

**MEME KANSERİ İÇİN HEDEFLENEBİLİR İLAÇ SALIM
SİSTEMİ OLARAK İKİLİ İLAÇ YÜKLÜ ALBÜMİN
BAZLI NANOPARTİKÜLLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF DUAL DRUG LOADED ALBUMIN
BASED NANOPARTICLES AS A TARGETABLE DRUG
DELIVERY SYSTEM FOR BREAST CANCER**

EZGİ TÜRKEŞ

PROF. DR YEŞİM SAĞ AÇIKEL

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2025

Anne ve Babam'a...

ÖZET

MEME KANSERİ İÇİN HEDEFLENEBİLİR İLAÇ SALIM SİSTEMİ OLARAK İKİLİ İLAÇ YÜKLÜ ALBÜMİN BAZLI NANOPARTİKÜLLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Ezgi TÜRKEŞ

Doktora, Biyomühendislik Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Yeşim SAĞ AÇIKEL

Ocak 2025, 161 sayfa

Kanserde güncel araştırma alanları, alternatif dozaj yollarına izin vermek için taşıyıcıların geliştirilmesini, tümör büyümesini besleyen kan damarları gibi yeni terapötik hedefleri ve daha spesifik olan hedefe yönelik tedavileri içermektedir. İdeal bir ilaç taşıyıcı sistemin arttırılmış hedefleme yeteneği, düşük toksisite ve kontrollü ilaç salım profili gibi optimum fiziksel-kimyasal özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bu tez kapsamında özellikle meme kanserine yönelik albumin bazlı, nano boyut aralığında farklı ilaç taşıyıcı formülasyonlar hazırlanmıştır. Poli(laktik-ko-glikolik asit):albumin çekirdek-kabuk yapısında protein-polimer hibrit nanopartiküller nanopresipitasyon yöntemi esasına göre sentezlenmiş, partikül boyutu ve boyut dağılımı optimizasyonu yapılmıştır. Güncel kanser tedavisi araştırmalarında aktif ve pasif hedefleme yaklaşımları ağırlıklı olarak çalışılmaktadır. Sentezlenen tüm partikül formülasyonlarının hedeflenen boyut aralığı 100-200nm aralığında tutulmaya çalışılarak pasif hedeflemeye uygun, formülasyonun yüzeyine konjuge edilen albumin tabakası ile de albuminin vücutta bir azot ve enerji kaynağı olması, ikinci bir ilacın enkapsülasyonuna olanak tanınması, tümörlü bölgelerde birikme özelliğinden yararlanılarak da aktif hedeflemeye uygun formülasyonlar

hazırlanmıştır. Poli(laktik-ko-glikolik asit):albümin protein-polimer hibrit nanopartiküllerinde Poli(laktik-ko-glikolik asit)'ten oluşan çekirdek kısmına kemoterapötik bir etkin madde olan Dosetaksel enkapsüle edilmiş ve kabuk kısmını oluşturan albümin tabakasına ise kemoduyarlaştırıcı ve kemopreventif özellikte bir etkin madde olan Kurkumin'in enkapsülasyonu sağlanmıştır. Meme kanseri tedavisi için yürütülen güncel çalışmalarda özellikle ilaç direncinin üstesinden gelmek, sinerjistik etki yaratarak hücre apoptozunu arttırmak, hücreleri kemoterapiye duyarlı hale getirerek tedavinin etkinliğini arttırmaya yönelik olarak Dosetaksel ve Kurkumin'in bir arada kullanımının önemini gösteren çalışmalar yapılmaktadır. Bu amaca uygun olarak sentezlenen Poli(laktik-ko-glikolik asit):albümin çekirdek-kabuk yapısında protein-polimer hibrit nanopartiküllerin haricinde hem polimer hem de proteinin tek başına nanopartikül formülasyonları da hazırlanmıştır. Bu sayede hem polimer-protein hibrit hem de protein nanopartiküllerin boyut, yük, ilaç salımı vb. yönlerden karşılaştırmalarının yapılması mümkün olmuştur. Öte yandan hazırlanan formülasyonların yüzeyi folik asit ile konjuge edilmiş ve bu sayede folat reseptörleri taşıyan kanser hücrelerine spesifik hedeflemeye uygun formülasyonların da sentez, karakterizasyon ve ilaç salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen formülasyonlar için Zetasizer ile boyut analizi ve zeta potansiyel ölçümleri, SEM, FTIR, TGA, DSC, XRD, temas açısı ölçümleri gibi karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İlaç yüklü formülasyonların enkapsülasyon etkinlikleri ve yükleme kapasitesi değerleri hesaplanmış hem tekli hem ikili *in vitro* ilaç salım çalışmaları diyaliz metodu ile 37°C'de asidik tümör mikroçevresini simüle eden pH 5.6 ve fizyolojik kanı simüle eden pH 7.4 PBS tampon ortamlarında incelenmiş ve farklı ilaç salım kinetik modellerine (Sıfırıncı Derece, Birinci Derece, Higuchi, Hixson-Crowell ve Korsmeyer-Peppas) uyum araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Albümin, Poli(laktik-ko-glikolik asit), Çekirdek-Kabuk Nanopartiküller, Dosetaksel, Kurkumin, Hedefleme, Folik Asit

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF DUAL DRUG LOADED ALBUMIN BASED NANOPARTICLES AS A TARGETABLE DRUG DELIVERY SYSTEM FOR BREAST CANCER

Ezgi TÜRKEŞ

Doctor of Philosophy, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Yeşim SAĞ AÇIKEL

January 2025, 161 pages

Current areas of research in cancer include the development of carriers to allow alternative dosage routes, new therapeutic targets such as blood vessels that feed tumor growth, and more specific targeted therapies. An ideal drug delivery system should have optimal physical-chemical properties such as enhanced targeting ability, low toxicity and controlled drug release profile. Within the scope of this thesis, different albumin-based drug carrier formulations in the nano-size range have been prepared especially for breast cancer. Protein-polymer hybrid nanoparticles in the structure of poly(lactic-co-glycolic acid):albumin core-shell were synthesized based on nanoprecipitation method and particle size and size distribution were optimized. Active and passive targeting approaches are predominantly studied in current cancer therapy research. All synthesized particle formulations are suitable for passive targeting by trying to keep the targeted size in the range of 100-200nm, and formulations suitable for active targeting have been prepared by taking advantage of the albumin layer conjugated to the surface of the formulation, albumin being a nitrogen and energy source in the body, allowing the encapsulation of a second drug, and accumulating in tumor areas. In poly(lactic-co-

glycolic acid):albumin protein-polymer hybrid nanoparticles, Docetaxel, a chemotherapeutic active ingredient, was encapsulated in the core of the poly(lactic-co-glycolic acid) and curcumin, a chemosensitizing and chemopreventive active ingredient, was encapsulated in the albumin layer forming the shell. In current studies carried out for the treatment of breast cancer, studies showing the importance of the combined use of Docetaxel and Curcumin in order to overcome drug resistance, to increase cell apoptosis by creating a synergistic effect, and to increase the effectiveness of treatment by sensitizing cells to chemotherapy. In addition to protein-polymer hybrid nanoparticles in the structure of Poly(lactic-co-glycolic acid):albumin core-shell synthesized for this purpose, nanoparticle formulations of both polymer and protein alone were also prepared. In this way, it was possible to compare both polymer-protein hybrid and protein nanoparticles in terms of size, charge, drug release, etc. On the other hand, the surface of the prepared formulations was conjugated with folic acid and thus synthesis, characterization and drug release studies of formulations suitable for specific targeting of cancer cells carrying folate receptors were carried out. For the synthesized formulations, characterization studies such as size analysis and zeta potential measurements with Zetasizer, SEM, FTIR, TGA, DSC, XRD, contact angle measurements were carried out. The encapsulation efficiencies and loading capacity values of the drug-loaded formulations were calculated, both single and dual *in vitro* drug release studies were investigated by dialysis method at 37°C in pH 5.6 PBS buffer media simulating acidic tumor microenvironment and pH 7.4 PBS buffer media simulating physiological blood, and compliance with different drug release kinetic models (Zero Order, First Order, Higuchi, Hixson-Crowell and Korsmeyer-Peppas) was examined.

Keywords: Albumin, Poly(lactic-co-glycolic acid), Core-Shell Nanoparticles, Docetaxel, Curcumin, Targeting, Folic Acid

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin en başından tezimin tamamlanma sürecine kadar her aşamada bilgi ve tecrübeleriyle beni destekleyen, yol gösteren saygı değer hocam Prof. Dr. Yeşim Sağ Açıkel' e,

Doktora çalışmalarım boyunca değerli görüş ve önerilerini sunan tez izleme komitesi hocalarım Prof. Dr. Zekiye Serpil Takaç ve Prof. Dr. Adil Denizli'ye,

Bünyesinde çalışmaktan mutluluk duyduğum İlko İlaç Arge Merkezi direktörümüz Sayın Dr. Onur Pınarbaşı'ya, ARGE Analitik Bölüm Müdürümüz Sayın Dr. Asuman Aybey Doğanay'a, ekibinin bir parçası olduğum bu süreçte beni hep destekleyen değerli yöneticim Sayın Nurdan Atılgan'a,

2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı kapsamında çalışmalarım maddi destek sağlayan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı'na, 100/2000 YÖK Doktora bursu programı için bursiyeri olduğum Yükseköğretim Kurulu Başkanlığı'na,

Tezime vermiş oldukları maddi destekten dolayı (FDK-2020-18595 numaralı doktora tez projesi) Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü merkez laboratuvarında gerçekleştirdiğim analizler ve karakterizasyon çalışmaları için yardımlarını esirgemeyen Duygu Gülay'a,

Karakterizasyon çalışmalarımın büyük çoğunluğunu gerçekleştirdiğim Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanlarına ve ODTÜ Merkez Laboratuvar çalışanlarına,

Laboratuvarda çok uzun süreler birlikte vakit geçirdiğim, bu sürecin en başından beri zorluklara birlikte katlanmaya çalıştığımız, hayatımda olmalarından mutluluk duyduğum Görkem Polat, Merve Öztekin, Burcu Nazlı ve Damla Gürel'e,

Her daim sonsuz destekleri ve sabırlarıyla yanımda olan, en büyük destekçilerim, yaşadığım her iyiliğin sebebi sevgili annem Gülay Türkeş ve babam Kayahan Türkeş'e, saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez TÜBİTAK tarafından “Meme Kanseri İçin Hedeflenebilir İlaç Salım Sistemi Olarak İkili İlaç Yüklü Albümin Bazlı Nanopartiküllerin Geliştirilmesi” konulu yurt içi öncelikli alanlara yönelik doktora bursu programı (2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı) ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xx
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Meme Kanseri ve Tedavi Yöntemleri.....	4
2.2. Meme Kanserinin Moleküler Alt Tipleri	5
2.3. Hedefe Yönelik Tedaviler	5
2.3.1. Kanser Tedavisinde Pasif Hedefleme.....	6
2.3.2. Kanser Tedavisinde Aktif Hedefleme	6
2.4. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler	8
2.5. Polimer ve Protein Yapıda Nanotaşıyıcı Tasarımı ve Üretimi	9
2.5.1. Protein Bazlı Nanopartiküller.....	9
2.5.2. Polimerik Yapıdaki Nanotaşıyıcıların Tasarımı ve Üretimi.....	14
2.6. İlaç Salımı için Kullanılan Protein-Polimer Hibrit Nanopartiküller.....	19
2.7. Kurkumin (CUR) ve Doksetaksel (DTX): Özellikleri ve Kombinasyon Tedavisi.....	22
2.7.1. CUR ve CUR'in Biyolojik Etkileri-Etki Mekanizması.....	22
2.7.2. DTX ve DTX'in Biyolojik Etkileri-Etki Mekanizması.....	24
2.7.3. DTX ve CUR Kombinasyon Tedavisi.....	25
2.8. İlaç Salım Sistemlerinin Matematiksel Modellenmesi	26
2.8.1. Sıfırıncı Derece İlaç Salım Kinetik Modeli.....	27
2.8.2. Birinci Derece İlaç Salım Kinetik Modeli.....	27
2.8.3. Higuchi İlaç Salım Kinetik Modeli	28
2.8.4. Korsmeyer-Peppas İlaç Salım Kinetik Modeli.....	28

2.8.5.	Hixson-Crowell İlaç Salım Kinetik Modeli	29
3.	DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	30
3.1.	Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Ekipman	30
3.1.1.	Kullanılan Madde ve Kimyasal Malzemeler	30
3.1.2.	Kullanılan Cihazlar.....	31
3.2.	Analitik Yöntem Validasyonları	32
3.2.1.	Stok ve Standart Çözeltilerin Hazırlanması	33
3.3.	Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması.....	34
3.3.1.	Albümin Nanopartiküller (BSANPs) ve Kurkumin Yüklü Albümin Nanopartiküller (CUR-BSANPs)'in Hazırlanması	34
3.3.2.	Folik Asit ile Konjuge Edilmiş CUR-BSANPs'in Hazırlanması (FA-CUR-BSANPs)	36
3.3.3.	PLGANPs'in ve Dosetaksel yüklü PLGANPs (PLGA-DTX-NPs)'in Hazırlanması.....	36
3.3.4.	PLGA-BSA-NPs'in ve Dosetaksel Yüklü PLGA-BSA-NPs (PLGA-DTX-BSA-NPs)'in Hazırlanması	37
3.3.5.	Kurkumin Yüklü PLGA-DTX-BSA-NPs (PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs) ve FA-PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'in Hazırlanması	37
3.4.	Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	39
3.4.1.	Nanopartiküllerin Boyut Dağılımı ve Polidispersite İndeksi Analizleri ...	39
3.4.2.	Hazırlanan Formülasyonların Morfolojik Analiz Çalışmaları.....	39
3.4.3.	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre (FTIR) Analizi	39
3.4.4.	X ışını kırınımı (XRD) Analizleri	39
3.4.5.	TGA-DSC Analizleri	40
3.4.6.	Temas Açısı (Gonyometre) Analizi.....	40
3.5.	Enkapsülasyon Verimliliği ve Yükleme Kapasitesinin Hesaplanması	40
3.6.	<i>İn Vitro</i> İlaç Salım Çalışmaları	41
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	42
4.1.	Analitik Yöntem Validasyonları	42
4.1.1.	CUR için Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu	42
4.1.2.	DTX için Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu	44

4.2. BSANPs ve CUR-BSANPs'lerin Optimizasyonu, Karakterizasyon ve İlaç Salım Çalışmaları	48
4.2.1. Partikül Boyutu ve Polidispersite İndeksi Analizleri	48
4.2.2. CUR-BSANPs ve BSANPs'in Morfolojik Analiz Çalışmaları.....	58
4.2.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre (FTIR) Analizi	61
4.2.4. XRD Analizi	63
4.2.5. TGA-DSC Analizleri	64
4.2.6. Enkapsülasyon Verimliliği ve Yükleme Kapasitesinin Hesaplanması	68
4.2.7. <i>İn Vitro</i> İlaç Salım Çalışmaları.....	69
4.2.8. CUR-BSANPs' den CUR Salım Kinetiğinin Farklı pH Değerlerinde İncelenmesi.....	73
4.3. PLGANPs ve Doseksel Yüklü PLGA-NPs (PLGA-DTX-NPs)'in Optimizasyonu, Karakterizasyon ve İlaç Salım Çalışmaları	82
4.3.1. Partikül Boyutu ve Polidispersite İndeksi Analizleri	82
4.3.2. PLGANPs'in Morfolojik Analiz Çalışmaları	87
4.3.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre (FTIR) Analizi	89
4.3.4. TGA Analizleri	90
4.3.5. Enkapsülasyon Verimliliği ve Yükleme Kapasitesi	91
4.3.6. <i>İn vitro</i> İlaç Salım Çalışmaları.....	93
4.3.7. PLGA-DTX-NPs'den DTX Salım Kinetiğinin Farklı pH Değerlerinde İncelenmesi.....	95
4.4. PLGA-BSA-NPs'in ve Doseksel Yüklü PLGA-BSA-NPs (PLGA-DTX-BSA-NPs)'in Optimizasyonu, Karakterizasyon ve İlaç Salım Çalışmaları.....	102
4.4.1. Partikül Boyutu ve Polidispersite İndeksi Analizleri	102
4.4.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre (FTIR) Analizi	107
4.4.3. TGA Analizleri	110
4.4.4. Temas Açısı (Gonyometre) Analizi.....	110
4.4.5. Enkapsülasyon Verimliliği ve Yükleme Kapasitesi	112
4.4.6. <i>İn vitro</i> İlaç Salım Çalışmaları.....	113
4.4.7. PLGA-DTX-BSA-NPs'den DTX Salım Kinetiğinin Farklı pH Değerlerinde İncelenmesi.....	114
4.5. Kurkumin Yüklü PLGA-DTX-BSA-NPs (PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs)'in Karakterizasyon ve İlaç Salım Çalışmaları.....	119
4.5.1. Yüze Morfolojisi ve Partikül Boyutu Ölçüm Analizleri	119

4.5.2.	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre (FTIR) Analizi	120
4.5.3.	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizleri	121
4.5.4.	XRD Analizleri	125
4.5.5.	Enkapsülasyon Verimliliği ve Yükleme Kapasitesi	126
4.5.6.	<i>İn Vitro</i> İlaç Salım Çalışmaları	127
4.5.7.	PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den DTX ve CUR Salım Kinetiğinin Farklı pH Değerlerinde İncelenmesi	130
4.5.8.	Folik Asit ile Konjuge Edilmiş PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs (FA-PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs)'in FTIR, TGA Analizi Sonuçları ve <i>İn Vitro</i> İlaç Salım Çalışmaları	137
5.	YORUM	141
6.	KAYNAKLAR	145
	EKLER	157
	EK 1- Kalibrasyon Doğruları	157
	EK 2- Tezden Türetilmiş Yayınlar	158
	EK 3- Tezden Üretilmiş Projeler	159
	EK 4- Tez Çalışması Orijinallik Raporu	160
	ÖZGEÇMİŞ	161

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Folik asit- ve FR-hedefli formülasyonların içselleştirilmesini gösteren şema [30].	7
Şekil 2.2. Nanotaşıyıcılar aracılığıyla yapılan aktif ve pasif hedeflemenin şematik gösterimi [33].	8
Şekil 2.3. Kanser tedavisinde ilaç taşıyıcısı olarak araştırılan nanopartiküllerin özeti [38].	9
Şekil 2.4. PLGANPs'in emülsiyon buharlaştırma yöntemiyle hazırlanması [67].	16
Şekil 2.5. PLGANPs'in nanopresipitasyon metodu ile hazırlanması [68].	17
Şekil 2.6. PLGANPs'in salting-out metodu ile hazırlanması [67].	18
Şekil 2.7. PLGANPs'in diyaliz metodu ile hazırlanması [70].	19
Şekil 2.8. Önemli üç kurkuminoid: (a) CUR, (b) demetoksikurkumin ve (c) bisdemetoksikurkumin [79].	23
Şekil 2.9. CUR'in moleküler hedefleri [82]	24
Şekil 2.10. DTX'in kimyasal yapısı [83].	25
Şekil 3.1. Albümin Nanopartiküller (BSANPs)'in nanopresipitasyon metodu ile sentez basamaklarının şekilsel gösterimi [96].	35
Şekil 3.2. FA ile konjuge PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'in şekilsel gösterimi.	38
Şekil 3.3. <i>In vitro</i> ilaç salım çalışmalarında kullanılan selüloz diyaliz membranlarının (MA: 12kDa) ve salım ortamını içeren sistemin şekilsel gösterimi.	41
Şekil 4.1. Asetonitril ve %0.1 formik asit içeren distile su (50:50) kullanılarak oluşturulan HPLC kromatogramı.	43
Şekil 4.2. CUR'in HPLC analiziyle elde edilen kalibrasyon doğrusu.	43
Şekil 4.3. Asetonitril ve distile su (60:40) kullanılarak oluşturulan HPLC kromatogramı.	45
Şekil 4.4. DTX'in HPLC analiziyle elde edilen kalibrasyon doğrusu.	46
Şekil 4.5. DTX ve CUR içeren ikili karışımda DTX miktar tayini metodu ile elde edilen numune kromatogramının, tek başına DTX kromatogramı ile karşılaştırılması. ...	47
Şekil 4.6. DTX ve CUR içeren ikili karışımda CUR miktar tayini metodu ile elde edilen numune kromatogramının, tek başına CUR kromatogramı ile karşılaştırılması. ...	47
Şekil 4.7. Farklı çapraz bağlama sürelerinde hazırlanan BSANPs'in boyut dağılımı (BSA Konsantrasyonu 25mg/ml, Çapraz bağlama süresi 24 saat, pH=8.0).	49

Şekil 4.8. Farklı çapraz bağlama sürelerinde hazırlanan BSANPs'in boyut dağılımı (BSA Konsantrasyonu 25mg/ml, Çapraz bağlama süresi 12 saat, pH=8.0).	49
Şekil 4.9. 25mg/ml BSA konsantrasyonunda hazırlanan nanopartiküllerin boyut dağılımı (Çapraz bağlama süresi 12 saat, pH=7.0).	50
Şekil 4.10. 40 mg/ml BSA konsantrasyonunda hazırlanan nanopartiküllerin boyut dağılımı (Çapraz bağlama süresi 12 saat, pH=7.0).	51
Şekil 4.11. 50 mg/ml BSA konsantrasyonunda hazırlanan nanopartiküllerin boyut dağılımı (Çapraz bağlama süresi 12 saat, pH=7.0).	51
Şekil 4.12. 10mg/ml BSA konsantrasyonunda hazırlanan nanopartiküllerin boyut dağılımı (Çapraz bağlama süresi 12 saat, pH=10.0).	53
Şekil 4.13. 25mg/ml BSA konsantrasyonunda hazırlanan nanopartiküllerin boyut dağılımı (Çapraz bağlama süresi 12 saat, pH=10.0).	53
Şekil 4.14. 40mg/ml BSA konsantrasyonunda hazırlanan nanopartiküllerin boyut dağılımı (Çapraz bağlama süresi 12 saat, pH=10.0).	54
Şekil 4.15. 50mg/ml BSA konsantrasyonunda hazırlanan nanopartiküllerin boyut dağılımı (Çapraz bağlama süresi 12 saat, pH=10.0).	54
Şekil 4.16. Solvent/Non-Solvent Oranı 1:3 olduğu durum için BSANPs'in boyut dağılımı.	55
Şekil 4.17. Solvent/Non-Solvent Oranı 1:4 olduğu durum için BSANPs'in boyut dağılımı.	55
Şekil 4.18. Farklı çapraz bağlama sürelerinde hazırlanan CUR-BSANPs'in boyut dağılımı (BSA Konsantrasyonu 25mg/ml, 5mg CUR, Çapraz bağlama süresi 12 saat, Solvent/Non-Solvent Oranı 1:2, pH=10.0).	57
Şekil 4.19. Farklı çapraz bağlama sürelerinde hazırlanan CUR-BSANPs'in boyut dağılımı (BSA Konsantrasyonu 25mg/ml, 5mg CUR, Çapraz bağlama süresi 24 saat, Solvent/Non-Solvent Oranı ½, pH=10.0).	57
Şekil 4.20. BSANPs'in SEM görüntüleri (A,B,C,D,E,F,G,H,I,İ) (pH=10.0, BSA Konsantrasyonu: 25 mg/ml ve Çapraz Bağlama Süresi: 24 saat) ve CUR-BSANPs'in SEM görüntüleri (J,K,L,M) (pH=10.0, BSA Konsantrasyonu: 25 mg/ml, CUR miktarı: 15mg ve Çapraz Bağlama Süresi: 24 saat).	58
Şekil 4.21. CUR-BSANPs (a), BSANPs (b), BSA (c) ve CUR (d)'e ait FTIR spektrumlarının karşılaştırılması.	61
Şekil 4.22. CUR-BSANPs'in FTIR spektrumlarının karşılaştırılması (15mg CUR (a) ve 5mg CUR (b) kullanılarak hazırlanan).	62

Şekil 4.23. FA-CUR-BSANPs (a), FA-BSANPs (b) ve FA 'e (c) ait FTIR spektrumlarının karşılaştırılması.....	62
Şekil 4.24. Toz formdaki CUR 'in XRD deseni.....	63
Şekil 4.25. CUR-BSANPs'e ait XRD deseni.	63
Şekil 4.26. Saf CUR'e ait termogravimetrik analiz sonucu.	64
Şekil 4.27. BSANPs'e ait termogravimetrik analiz sonucu.....	65
Şekil 4.28. CUR-BSANPs'e ait termogravimetrik analiz sonucu.....	65
Şekil 4.29. FA'e ait termogravimetrik analiz sonucu.....	66
Şekil 4.30. FA-BSANPs'e ait termogravimetrik analiz sonucu.	66
Şekil 4.31. FA-CUR-BSANPs'e ait termogravimetrik analiz sonucu.....	67
Şekil 4.32. BSA (1), CUR (2), FA (3), BSANPs (4), CUR-BSANPs (5), FA-CUR-BSANPs (6) ve FA-BSANPs (7)'e ait DSC eğrilerinin karşılaştırılması.....	67
Şekil 4.33. CUR-BSANPs'den CUR salım profillerinin farklı CUR miktarları için karşılaştırılması (pH 7.4 ve T=37°C).....	70
Şekil 4.34. CUR-BSANPs'den CUR salım profillerinin farklı CUR miktarları için karşılaştırılması (pH 5.6 ve T=37°C).....	71
Şekil 4.35. CUR-BSANPs ve FA-CUR-BSANPs'den CUR salım profillerinin karşılaştırılması (pH 7.4 ve T=37°C).....	73
Şekil 4.36. Sıfırncı dereceden kinetik modele göre farklı CUR konsantrasyonlarında ve pH 7.4'te CUR-BSANPs'den CUR salım verilerinin doğrusallaştırılması.	74
Şekil 4.37. Sıfırncı dereceden kinetik modele göre farklı CUR konsantrasyonlarında ve pH 5.6'da CUR-BSANPs'den CUR salım verilerinin doğrusallaştırılması.	75
Şekil 4.38. Birinci dereceden kinetik modele göre farklı CUR konsantrasyonlarında ve pH 7.4'te CUR-BSANPs'den CUR salım verilerinin doğrusallaştırılması.	75
Şekil 4.39. Birinci dereceden kinetik modele göre farklı CUR konsantrasyonlarında ve pH 5.6'da CUR-BSANPs'den CUR salım verilerinin doğrusallaştırılması.	76
Şekil 4.40. Higuchi kinetik modeline göre farklı CUR konsantrasyonlarında ve pH 7.4'te CUR-BSANPs'den CUR salım verilerinin doğrusallaştırılması.	76
Şekil 4.41. Higuchi kinetik modeline göre farklı CUR konsantrasyonlarında ve pH 5.6'da CUR-BSANPs'den CUR salım verilerinin doğrusallaştırılması.	77
Şekil 4.42. Hixson-Crowell kinetik modeline göre farklı CUR konsantrasyonlarında ve pH 7.4'te CUR-BSANPs'den CUR salım verilerinin doğrusallaştırılması.	77
Şekil 4.43. Hixson-Crowell kinetik modeline göre farklı CUR konsantrasyonlarında ve pH 5.6'da CUR-BSANPs'den CUR salım verilerinin doğrusallaştırılması.	78

Şekil 4.44. Korsmeyer-Peppas kinetik modeline göre farklı CUR konsantrasyonlarında ve pH 7.4'te CUR-BSANPs'den CUR salım verilerinin doğrusallaştırılması.	78
Şekil 4.45. Korsmeyer-Peppas kinetik modeline göre farklı CUR konsantrasyonlarında ve pH 5.6'da CUR-BSANPs'den CUR salım verilerinin doğrusallaştırılması.	79
Şekil 4.46. PLGANPs'e ait boyut dağılımı eğrileri (PLGA miktarı 30 mg, PVA konsantrasyonu %0.5, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 3 ml)...	82
Şekil 4.47. PLGANPs'e ait boyut dağılımı eğrileri (PLGA miktarı 10 mg, PVA konsantrasyonu %0.5, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 3 ml)...	83
Şekil 4.48. PLGANPs'e ait boyut dağılımı eğrileri (PLGA miktarı 30 mg, PVA konsantrasyonu % 1.0, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 3 ml)...	84
Şekil 4.49. PLGANPs'e ait boyut dağılımı eğrileri (PLGA miktarı 30 mg, PVA konsantrasyonu % 2.0, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 3 ml)...	84
Şekil 4.50. PLGANPs'e ait boyut dağılımı eğrileri (PLGA miktarı 20 mg, PVA konsantrasyonu % 1.0, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 3 ml)...	85
Şekil 4.51. PLGANPs'e ait boyut dağılımı eğrileri (PLGA miktarı 40 mg, PVA konsantrasyonu % 1.0, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 3 ml)...	86
Şekil 4.52. PLGANPs'e ait boyut dağılımı eğrileri (PLGA miktarı 30 mg, PVA konsantrasyonu % 1.0, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 1 ml)...	87
Şekil 4.53. PLGANPs'in SEM Görüntüleri (A,B,C,D) (PLGA miktarı 30 mg, PVA konsantrasyonu % 1.0, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 3 ml) ve PLGA-DTX-NPs'in SEM görüntüleri (E,F) (PLGA miktarı 30 mg, DTX miktarı 3.0 mg, PVA konsantrasyonu % 1.0, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 1 ml).....	88
Şekil 4.54. Saf PLGA (A) ve PLGANPs'e (B) ait FTIR spektrumları.	89
Şekil 4.55. Toz formundaki PLGA'ya ait termogravimetrik analiz sonucu.....	90
Şekil 4.56. PLGANPs (A) ve PLGA-DTX-NPs'e (B) ait termogravimetrik analiz sonucu.	91
Şekil 4.57. PLGA-DTX-NPs'den DTX salım profillerinin farklı DTX miktarları için karşılaştırılması (pH 7.4 ve T=37°C).....	93
Şekil 4.58. PLGA-DTX-NPs'den DTX salım profillerinin farklı DTX miktarları için karşılaştırılması (pH 5.6 ve T=37°C).....	93
Şekil 4.59. Sıfırıncı dereceden kinetik modele göre farklı DTX konsantrasyonlarında ve pH 7.4'te PLGA-DTX-NPs'den DTX salım verilerinin doğrusallaştırılması.	95

Şekil 4.60. Sıfırıncı dereceden kinetik modele göre farklı DTX konsantrasyonlarında ve pH 7.4'te PLGA-DTX-NPs'den DTX salım verilerinin doğrusallaştırılması.	96
Şekil 4.61. Birinci dereceden kinetik modele göre farklı DTX konsantrasyonlarında ve pH 7.4'te PLGA-DTX-NPs'den DTX salım verilerinin doğrusallaştırılması.	96
Şekil 4.62. Birinci dereceden kinetik modele göre farklı DTX konsantrasyonlarında ve pH 5.6'da PLGA-DTX-NPs'den DTX salım verilerinin doğrusallaştırılması.	97
Şekil 4.63. Higuchi kinetik modeline göre farklı DTX konsantrasyonlarında ve pH 7.4'te PLGA-DTX-NPs'den DTX salım verilerinin doğrusallaştırılması.	97
Şekil 4.64. Higuchi kinetik modeline göre farklı DTX konsantrasyonlarında ve pH 5.6'da PLGA-DTX-NPs'den DTX salım verilerinin doğrusallaştırılması.	98
Şekil 4.65. Hixson-Crowell kinetik modeline göre farklı DTX konsantrasyonlarında ve pH 7.4'de PLGA-DTX-NPs'den DTX salım verilerinin doğrusallaştırılması.	98
Şekil 4.66. Hixson-Crowell kinetik modeline göre farklı DTX konsantrasyonlarında ve pH 5.6'da PLGA-DTX-NPs'den DTX salım verilerinin doğrusallaştırılması.	99
Şekil 4.67. Korsmeyer-Peppas kinetik modeline göre farklı DTX konsantrasyonlarında ve pH 7.4'de PLGA-DTX-NPs'den DTX salım verilerinin doğrusallaştırılması. .	99
Şekil 4.68. Korsmeyer-Peppas kinetik modeline göre farklı DTX konsantrasyonlarında ve pH 5.6'da PLGA-DTX-NPs'den DTX salım verilerinin doğrusallaştırılması.	100
Şekil 4.69. PLGA-BSA-NPs'e ait boyut dağılımı eğrileri (PLGA miktarı 30 mg, BSA miktarı 30mg, BSA konsantrasyonu %0.3 (a/h), sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 1 ml).	103
Şekil 4.70. PLGA-BSA-NPs'e ait boyut dağılımı eğrileri (PLGA miktarı 30 mg, BSA miktarı 50mg, BSA konsantrasyonu %0.5 (a/h), sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 1 ml).	103
Şekil 4.71. PLGA-BSA-NPs'e ait boyut dağılımı eğrileri (PLGA miktarı 30 mg, BSA miktarı 60mg, BSA konsantrasyonu %0.5 (a/h), sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 1 ml).	104
Şekil 4.72. Farklı BSA konsantrasyonlarında hazırlanan PLGA-BSA-NPs'e ait zeta potansiyel ölçümleri.	105
Şekil 4.73. PLGA-BSA-NPs'e ait FTIR spektrumu.	107
Şekil 4.74. PLGANPs ve PLGA-BSA-NPs'e ait FTIR spektrumlarının karşılaştırılması.	108
Şekil 4.75. DTX'e ait FTIR spektrumu.	108
Şekil 4.76. PLGA-DTX-BSA-NPs'e ait FTIR spektrumu.	109

Şekil 4.77. DTX ve PLGA-DTX-BSA-NPs'e ait FTIR spektrumlarının karşılaştırılması.	109
Şekil 4.78. PLGA-BSA-NPs'e ait termogravimetrik analiz sonucu.	110
Şekil 4.79. Saf PLGA, Saf BSA ve PLGA-BSA-NPs'ine ait belirlenen temas açısı değerleri ve ölçümler sırasında çekilen fotoğraflar.	111
Şekil 4.80. PLGA-DTX-BSA-NPs'den DTX salım profillerinin pH 7.4 ve pH 5.6 için karşılaştırılması (T=37°C).....	113
Şekil 4.81. 3.0mg DTX kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-NPs'den DTX salımı için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen sıfırıncı derece kinetik model grafiği.	115
Şekil 4.82. 3.0mg DTX kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-NPs'den DTX salımı için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen birinci derece kinetik model grafiği.	115
Şekil 4.83. 3.0mg DTX kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-NPs'den DTX salımı için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen Higuchi kinetik model grafiği.	116
Şekil 4.84. 3.0mg DTX kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-NPs'den DTX salımı için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen Hixson-Crowell kinetik model grafiği.	116
Şekil 4.85. 3.0mg DTX kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-NPs'den DTX salımı için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen Korsmeyer-Peppas kinetik model grafiği.	117
Şekil 4.86. PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'in SEM görüntüleri (PLGA miktarı 30 mg, DTX miktarı 3.0 mg, CUR miktarı 3.75mg, PVA konsantrasyonu %1.0, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 1 ml).....	119
Şekil 4.87. PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'in boyut dağılımı eğrileri (PLGA miktarı 30 mg, DTX miktarı 3.0 mg, CUR miktarı 3.75mg, PVA konsantrasyonu %1.0, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 1 ml).....	119
Şekil 4.88. PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'e ait FTIR spektrumu.....	120
Şekil 4.89. CUR ve PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'e ait FTIR spektrumlarının karşılaştırılması.....	120
Şekil 4.90. DTX ve PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'e ait FTIR spektrumlarının karşılaştırılması.....	121
Şekil 4.91. DTX'e ait DSC termogramı.	122
Şekil 4.92. PLGA-DTX-BSA-NPs'e ait DSC termogramı.	123
Şekil 4.93. CUR'e ait DSC termogramı.	123
Şekil 4.94. PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'e ait DSC termogramı.....	124
Şekil 4.95. DTX, CUR, PLGA-DTX-BSA-NPs, PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'e ait DSC termogramlarının karşılaştırılması.....	124

Şekil 4.96. Toz formdaki DTX'in XRD Deseni.....	125
Şekil 4.97. PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'e ait XRD deseni.....	125
Şekil 4.98. Toz formdaki DTX, CUR ve PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'e ait XRD desenlerinin karşılaştırılması.	126
Şekil 4.99. PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den pH 5.6 ve pH 7.4'teki CUR salım profillerinin karşılaştırılması (T=37°C).	128
Şekil 4.100. PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den pH 5.6 ve pH 7.4'teki DTX salım profillerinin karşılaştırılması (T=37°C).	128
Şekil 4.101. 3.0mg DTX ve 3.75mg CUR kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den CUR için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen sıfırıncı derece kinetik model grafiği.....	131
Şekil 4.102. 3.0mg DTX ve 3.75mg CUR kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den CUR için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen birinci derece kinetik model grafiği.....	131
Şekil 4.103. 3.0mg DTX ve 3.75mg CUR kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den CUR için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen Higuchi kinetik model grafiği.....	132
Şekil 4.104. 3.0mg DTX ve 3.75mg CUR kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den CUR için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen Hixson-Crowell kinetik model grafiği.....	132
Şekil 4.105. 3.0mg DTX ve 3.75mg CUR kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den CUR için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen Korsmeyer-Peppas kinetik model grafiği.....	133
Şekil 4.106. 3.0mg DTX ve 3.75mg CUR kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den DTX için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen sıfırıncı derece kinetik model grafiği.....	133
Şekil 4.107. 3.0mg DTX ve 3.75mg CUR kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den DTX için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen birinci derece kinetik model grafiği.....	134
Şekil 4.108. 3.0mg DTX ve 3.75mg CUR kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den DTX için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen Higuchi kinetik model grafiği.....	134

Şekil 4.109. 3.0mg DTX ve 3.75mg CUR kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den DTX için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen Hixson-Crowell kinetik model grafiği.....	135
Şekil 4.110. 3.0mg DTX ve 3.75mg CUR kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den DTX için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen Korsmeyer-Peppas kinetik model grafiği.....	135
Şekil 4.111. FA-PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'in FTIR spektrumu.	138
Şekil 4.112. PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs ve FA-PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'in FTIR spektrumlarının karşılaştırılması.....	138
Şekil 4.113. FA-PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'e ait termogravimetrik analiz sonucu.	139
Şekil 4.114. FA-PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den pH 7.4 ve pH 5.6'da CUR (A) ve DTX (B) salımının PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs ile karşılaştırılması.	140

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Farklı metotlar uygulanarak hazırlanan albümin bazlı nanopartiküllerin geliştirildiği çalışmalara örnekler.	11
Çizelge 2.2. Protein-polimer hibrit taşıyıcı sistemlerinde kullanılan çeşitli polimer türleri [71].	20
Çizelge 2.3. Korsmeyer Peppas modeline göre salım mekanizmalarının yorumlanması [94].	29
Çizelge 3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar.	31
Çizelge 3.2. CUR miktar tayininde kullanılan HPLC yöntem parametreleri.	32
Çizelge 3.3. DTX miktar tayininde kullanılan HPLC yöntem parametreleri.	32
Çizelge 4.1. CUR' in HPLC ile miktar tayini yönteminde elde edilen regresyon verileri.	44
Çizelge 4.2. CUR'in HPLC miktar tayini yönteminde elde edilen gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik bulguları.	44
Çizelge 4.3. DTX' in HPLC ile miktar tayini yönteminde elde edilen regresyon verileri.	46
Çizelge 4.4. DTX'in HPLC miktar tayini yönteminde elde edilen gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik bulguları.	46
Çizelge 4.5. BSA desolvasyonu için farklı BSA konsantrasyonlarında pH ayarlanmadan hazırlanan BSANPs'in partikül boyutu ve polidispersite indeksi.	52
Çizelge 4.6. Farklı çapraz bağlama sürelerinde, pH 7.0 ve pH 10.0' da farklı BSA konsantrasyonlarında ve BSA desolvasyonu için farklı distile su/etanol oranlarında hazırlanan BSANPs'in ortalama partikül boyutu ve polidispersite indeksleri.	56
Çizelge 4.7. Farklı çapraz bağlama sürelerinde hazırlanan CUR-BSANPs'in ortalama partikül boyutu ve polidispersite indeksi (BSA Konsantrasyonu 25mg/ml, 5mg CUR, Çapraz bağlama süresi 24 saat, Solvent/Non-Solvent Oranı ½, pH=10.0). .	57
Çizelge 4.8. CUR-BSANPs'deki CUR enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi (pH 10.0, BSA konsantrasyonu = 25 mg/ml).....	68
Çizelge 4.9. CUR-BSANP'lerden CUR salımının çeşitli kinetik modellere uyumunun karşılaştırılması (fizyolojik kanı simüle eden pH 7.4'teki kinetik parametrelerin değerleri ve R ² değerlerinin karşılaştırılması).	80

- Çizelge 4.10.** CUR-BSANP'lerden CUR salımının çeşitli kinetik modellere uyumunun karşılaştırılması (asidik tümör mikroçevresini simüle eden pH 5.6'daki kinetik parametrelerin değerleri ve R^2 değerlerinin karşılaştırılması). 81
- Çizelge 4.11.** Farklı PLGA ve PVA konsantrasyonlarında hazırlanan PLGANPs'in ortalama partikül boyutu ve polidispersite indeksi değerlerinin karşılaştırılması. . 87
- Çizelge 4.12.** PLGA-DTX-NPs'deki DTX enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi PLGA miktarı 30 mg, PVA konsantrasyonu %1.0, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 1 ml). 92
- Çizelge 4.13.** PLGA-DTX-NPs'den DTX salımının çeşitli kinetik modellere uyumunun karşılaştırılması (fizyolojik kanı simüle eden pH 7.4'teki kinetik parametrelerin değerleri ve R^2 değerlerinin karşılaştırılması). 100
- Çizelge 4.14.** PLGA-DTX-NPs'den DTX salımının çeşitli kinetik modellere uyumunun karşılaştırılması (asidik tümör mikroçevresini simüle eden pH 5.6'daki kinetik parametrelerin değerleri ve R^2 değerlerinin karşılaştırılması). 102
- Çizelge 4.15.** Farklı BSA konsantrasyonlarında hazırlanan PLGA-BSA-NPs'e ait ortalama partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel ölçüm sonuçları. 106
- Çizelge 4.16.** PLGA-DTX-BSA-NPs'deki DTX enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi (PLGA miktarı 30 mg, BSA konsantrasyonu %0.5 (50mg), sulu faz (BSA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 3 ml). 112
- Çizelge 4.17.** PLGA-DTX-BSA-NPs'den DTX salımının kinetik modellere uyumunun karşılaştırılması (pH 5.6 ve pH 7.4'teki kinetik parametrelerin değerleri ve R^2 değerlerinin karşılaştırılması). 117
- Çizelge 4.18.** PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs 'deki DTX ve CUR enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi değerlerinin karşılaştırılması (PLGA miktarı 30 mg, BSA konsantrasyonu %0.5 (50mg), sulu faz (BSA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 1 ml). 127
- Çizelge 4.19.** PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den CUR salımının kinetik modellere uyumunun karşılaştırılması (pH 5.6 ve pH 7.4'teki kinetik parametrelerin değerleri ve R^2 değerlerinin karşılaştırılması). 136
- Çizelge 4.20.** PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den DTX salımının kinetik modellere uyumunun karşılaştırılması (pH 5.6 ve pH 7.4'teki kinetik parametrelerin değerleri ve R^2 değerlerinin karşılaştırılması). 137

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

C_t	t zamanında salınan ilaç miktarı
C_0	t=0 zamanında ilacın başlangıç konsantrasyonu
K_0	Sıfırıncı mertebe hız sabiti
C	t zamanında kalan ilacın yüzdesi
K_1	zaman ⁻¹ veya saat başına ifade edilen birinci dereceden hız sabiti
Q	Birim alan başına t zamanında salınan ilaç miktarı
K_H	Higuchi modeli salım kinetiği sabiti
M_t/M_∞	t zamanında salınan ilacın kesir ifadesi
n	Salım üssü
W_0	Farmasötik dozaj formundaki başlangıç ilaç miktarı
W_t	t zamanında farmasötik dozaj formunda kalan ilaç miktarı
K_{HC}	Yüzey hacim ilişkisini tanımlayan Hixson-Crowell sabiti

Kısaltmalar

PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
BSA	Bovine Serum Albümin
DTX	Dosetaksel
CUR	Kurkumin
NP	Nanopartikül
NPs	Nanopartiküller
BSANPs	Bovine Serum Albümin Nanopartiküller
CUR-BSANPs	Kurkumin Yüklü Bovine Serum Albümin Nanopartiküller
FA	Folik Asit
FA-CUR-BSANPs	Folik Asit ile Konjuge Edilmiş Kurkumin Yüklü Bovine Serum Albümin Nanopartiküller
PLGANPs	Poli(laktik-ko-glikolik asit) Nanopartiküller
PLGA-DTX-NPs	Dosetaksel Yüklü Poli(laktik-ko-glikolik asit) Nanopartiküller

- PLGA-BSA-NPs Poli(laktik-ko-glikolik asit): Bovine Serum Albümin Çekirdek-Kabuk Yapısında Protein-Polimer Hibrit Nanopartiküller
- PLGA-DTX-BSA-NPs Dosetaksel Yüklü Poli(laktik-ko-glikolik asit): Bovine Serum Albümin Çekirdek-Kabuk Yapısında Protein-Polimer Hibrit Nanopartiküller
- PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs Dosetaksel ve Kurkumin Yüklü Poli(laktik-ko-glikolik asit): Bovine Serum Albümin Çekirdek-Kabuk Yapısında Protein-Polimer Hibrit Nanopartiküller
- FA-PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs Folik Asit ile Konjuge Edilmiş Dosetaksel ve Kurkumin Yüklü Poli(laktik-ko-glikolik asit): Bovine Serum Albümin Çekirdek-Kabuk Yapısında Protein-Polimer Hibrit Nanopartiküller

1. GİRİŞ

KontROLSÜZ hücre büyümesi ve doku istilası ile karakterize karmaşık ve yıkıcı bir hastalık grubu olan kanser, dünya çapında sağlık sistemleri için büyük bir sorun teşkil etmektedir. Çeşitli kanser türleri arasında meme kanseri, moleküler özelliklere dayalı çeşitli alt tipler sergileyen en yaygın ve üzerinde en çok çalışılan malignitelerden biridir. 2022 yılında, tanı konulan kadınlar arasında meme kanserine bağlı ölüm oranı yaklaşık %29.1'dir ve 2.3 milyon vakada 670.000 ölüm bildirilmiştir [1, 2].

Kemoterapi, geleneksel ve yaygın olarak kullanılan bir kanser tedavi yöntemidir. Kemoterapi bir dizi farklı mekanizma aracılığıyla çalışsa da temel işlevi tümör ve normal hücreler de dahil olmak üzere güçlü bir şekilde büyüyen hücreleri ayırma gözetmeksizin öldürmektedir. Bu durum da kemik iliği baskılanması, saç dökülmesi ve gastrointestinal reaksiyonlar gibi bazı ciddi yan etkilere neden olmaktadır. Kemoterapiden kaynaklı bu yan etkileri azaltabilmek ve tedavinin etkinliğini arttırmak için normal hücreler yerine tümör hücrelerini hedefleyebilen ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi günümüzde kanserle ilgili araştırmaların büyük bir çoğunluğunu oluşturmaktadır [3]. Kanserde hedefleme aktif ve pasif hedefleme olmak üzere temelde 2'ye ayrılmaktadır. Tedavide kullanılacak olan ilaç taşıyıcı sistemlerin boyutları optimize edilerek 200 nm ve altındaki nanometre boyutlarında sentezlenen taşıyıcıların, hedef bölgede bozulan damar yapısı ve geçirgenlik dolayısıyla arttırılmış geçiş etkisi ile pasif olarak hedeflenmesi sağlanmaktadır. Öte yandan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin yüzeylerine konjuge edilen hedefleme ajanlarının (Epidermal büyüme faktörü reseptörü-EGFR, folik asit (FA), transferrin reseptörleri vb.) veya doğrudan kullanılan taşıyıcı malzemenin hedefleme özelliğinden yararlanılarak da aktif hedefleme yapılmaktadır [4]. Hedefe yönelik olarak tasarlanan nanopartiküler sistemlerin biyobozunur, biyoyumlu malzemelerden seçilmesi oldukça önemlidir. Kullanılan biyopolimerik malzemelerin çözünürlük özelliklerine göre enkapsüle edilen ilacın istenen hızda ve hedef bölgede sistemden serbest kalması yoluyla efektif bir tedavi uygulanabileceği düşünülmektedir. Son yıllarda kanser tedavilerinde yaşanan ilaç direncinin üstesinden gelmek için, ilaçların bir arada kullanılması ile sinerjistik etki yaratılmaya çalışılarak ilaçların kombinasyon kemoterapisi şeklinde uygulanması sağlanmıştır [5].

Kanser tedavisine yönelik olarak geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemlerin birden fazla ilacın enkapsülasyonuna uygun ve hatta görüntüleme ve hedefleyici ajanları da yapısında bulunduran, sıcaklığa ve pH'a duyarlı sistemlerin bir arada olduğu kompleks yapıların

literatürde bu alanda en çok çalışılan ve araştırılan çalışma konularını oluşturduğu tespit edilmiştir [6]. Bu doğrultuda tez kapsamında albümin bazlı nanopartiküllerin hedefe yönelik olarak tasarlanmış formları ile özellikle meme kanserine yönelik ilaç salım çalışmaları yapılmıştır. Albümin insan ve diğer memeli canlıların kan plazmasında fazla miktarlarda bulunan bir transport proteindir, kanın ozmotik basıncını düzenlemekte ve çeşitli maddelerin kanda taşınmasını sağlamaktadır. Albümin ilaç taşıyıcı sistemler için oldukça önemli bir yüzey modifiye ajanı olup, ilaç taşıyıcı sistemlerin dolaşımında kalma sürelerini de uzatmaktadır [7]. Tez kapsamında hazırlanan nanopartikül formülasyonları ile Kurkumin ve Dosetaksel'in enkapsülasyonları araştırılmıştır. Sarı fenolik pigmente sahip aktif bir bileşen olan Kurkumin'in antiinflamatuvar, antioksidan, antikanser ve antitümör özellikleri gibi birçok farmakolojik aktiviteyi yürüttüğü rapor edilmiştir. Özellikle meme kanserindeki etkisi de bilinen Kurkumin bileşiğinin içerisinde bulunan kurkuminoidlerin oral biyoyararlanımının düşük olduğu ve hidrofobik olmaları sebebiyle zayıf çözünürlük, fizyolojik ve alkali pH'larda düşük stabilite gösterdikleri bilinmektedir. Kurkumin'in hazırlanan formülasyonlar içerisinde enkapsüle edilmesi yoluyla biyoyararlanımının artırılması ve bu yolla meme kanseri üzerindeki etkisinin geliştirilmesi hedeflenmiştir [8, 9]. Dosetaksel ise taksan grubu, suda çözünmeyen antimitotik bir kemoterapi ajanıdır. Dosetaksel'in tedavide tekli olarak uygulanması ile meme kanseri hücrelerinde direnç geliştiği bilinmektedir [10]. Literatür çalışmalarında, Dosetaksel'in kemoterapi ajanı olarak tek başına uygulandığı zaman meydana gelen yan etkileri azaltmak, hücreleri kemoterapiye duyarlaştırarak hücre apoptozunu indüklemek için Kurkumin gibi kemopreventif ve kemoduyarlaştırıcı etkin maddelerle uygulanmasının önemi belirtilmekte ve bu konuda yapılan çalışmalar ile konunun önemi ortaya konmaktadır. Bu amaca uygun olarak Poli(laktik-ko-glikolik asit):albümin çekirdek-kabuk yapısında protein-polimer hibrit nanopartiküller ile hem polimer hem de proteinin tek başına nanopartikül formülasyonları da hazırlanmış ve ilaç salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu sayede hem polimer-protein hibrit hem de protein nanopartiküllerin boyut, yük, ilaç salımı vb. yönlerden karşılaştırmalarının yapılması mümkün olmuştur. Öte yandan hazırlanan formülasyonların yüzeyi folik asit ile konjuge edilmiş ve bu sayede folat reseptörleri taşıyan kanser hücrelerine spesifik hedeflemeye uygun formülasyonların da sentez, karakterizasyon ve ilaç salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Protein bazlı nano ilaç taşıyıcı sistemlerin kanser tedavisinde kullanılmak üzere hedefe yönelik olarak hazırlanmış formları ile ilgili kimi çalışmalar literatürde yer almakla beraber diğer biyopolimerik malzemelere göre daha sınırlıdır. Protein nanopartiküllerin hazırlanmasında tekrarlanabilirliğin ve boyut kontrolünün zor olmasının yanında, kullanılan yöntemlerin proteini denatüre edici özellikte olabilmesi daha çok çalışma yapılmasını gerektirmektedir. Albümin nanopartikül sentezi ile ilgili yayımlanan çalışmalarda çok farklı boyutlarda ve boyut dağılımında sonuçlar elde edilmiş olduğu tespit edilmiştir. Albümin proteini, yapısında var olan negatif ve pozitif yüklü fonksiyonel gruplar sayesinde farklı yüklerdeki bileşiklerin enkapsülasyonuna da olanak verebilmektedir [11]. Elde edilen sonuçların ikili etken madde salım çalışmaları ile ilgili konularda ön bilgi birikimini sağlayarak literatüre katkı yapacağı ve sistemin daha da geliştirilebilmesinde yapılan çalışmaların temel oluşturacağı da düşünülmektedir.

Poli(laktik-ko-glikolik asit):albümin çekirdek-kabuk yapısında protein-polimer hibrit nanopartiküller ile ilgili oldukça az çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmalar incelendiğinde Poli(laktik-ko-glikolik asit) yüzeyine albümin kaplaması (farklı metotlar ile) dolaşımında kalma sürelerini uzatma, biyoyumluluğu artırma ve kan beyin bariyerini geçebilme gibi amaçlara yönelik olarak hazırlanmıştır. Bu tez kapsamında ise literatür çalışmalarından farklı olarak Poli(laktik-ko-glikolik asit) (çekirdek) yüzeyindeki albümin katmanına (kabuk) ikinci bir etkin maddenin enkapsülasyonu araştırılmıştır. Bilindiği kadarı ile Poli(laktik-ko-glikolik asit):albümin çekirdek-kabuk nanopartikül formülasyonu ile, Dosetaksel ve Kurkumin ikili ilacının enkapsülasyonu ve salımının incelenmesine yönelik olarak literatürde yayımlanmış olan bir çalışma bulunmamaktadır. Öte yandan bu tez kapsamında nanopartikül boyutları optimize edilerek sağlanacak pasif hedeflemenin yanında partikül formülasyonuna folik asit konjuge edilerek aktif hedeflemeye de uygun sistemin sentez, karakterizasyon ve ilaç salım çalışmaları yapılmıştır. Bilindiği kadarı ile literatürde Poli(laktik-ko-glikolik asit):albümin çekirdek-kabuk nanopartiküllerinin folik asit ile konjuge edildiği bir formülasyon ve ilaç salım çalışması da bulunmamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri ve Tedavi Yöntemleri

Kanser, kalp ve damar hastalıklarından sonra dünyada en sık görülen hastalıklardan biri olarak bilinmektedir ve bu hastalığa yakalanma riski her geçen gün artmaktadır. Meme kanseri ise en sık görülen kanser türlerinden biridir. Kadınlarda bu hastalığa yakalanma riski %30, ölüm oranı ise %14'tür. Meme kanserinde en yüksek ölüm oranı metastatik meme kanserinden kaynaklanmaktadır. Yaklaşık 40.000 kadın metastatik meme kanseri nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Meme kanserinin en sık metastaz yaptığı bölgeler lenf nodları, beyin, akciğer ve karaciğerdir [12].

Yıllardır kanserin önlenmesi ve tedavisine yönelik büyük çabalara ve kaydedilen ilerlemelere rağmen, kanser hala dünya çapında önde gelen morbidite nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir. Geleneksel kemoterapötik ajanların, zayıf çözünürlük, yüksek dozaj ihtiyaçları, ciddi yan etkiler, düşük terapötik indeksler, çoklu ilaç direnci gelişimi ve kanser hücrelerinin spesifik olmayan hedeflenmesi gibi birçok dezavantajı bulunmaktadır. Artan kanser prevalansı ve konvensiyonel kemoterapi ile ilgili sorunların ortaya çıkması nedeniyle, içsel, dışsal uyaranlara duyarlı nano taşıyıcılara dayanan hedefe yönelik, fonksiyonel ilaç dağıtım sistemleri geniş çapta incelenmektedir. Meme kanseri tedavisinin temelleri cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir, ancak şimdiye kadar bu sorunu çözmek için tamamen etkili bir tedavi yöntemi geliştirilememiştir [13]. Cerrahi yöntem her kanser evresi için uygulanabilir değildir ve tedavi sonrasında çoğu zaman istenen sonuçlar elde edilememektedir. Radyoterapide kanser hücreleri her zaman tedaviye yanıt vermeyebilir ve tedavi sağlıklı hücreler için de zararlıdır. Meme kanseri devam eden önemli bir halk sağlığı sorunudur ve günümüzde meme kanserinden muzdarip hastalar için çeşitli tedavi seçenekleri bulunurken, gelişmekte olan nanoteknoloji uygulamaları sayesinde meme kanserinin erken teşhisi ve tedavisi için umut verici yeni yaklaşımlar sunulmaktadır. Nanopartiküller meme kanserinin görüntülenmesi, teşhisi ve hedeflenmesine yönelik araştırmalar için disiplinler arası bir alan sağlamaktadır [14]. Nanoteknolojik yöntemlerin ilaç salım sistemlerinde kullanılması, ilaç dolaşım süresinde iyileşmelere, nanopartiküllerin tümör hücresi içine alınımının artmasına, retikülo-endotel sisteminden (RES) kaçınılmasına ve toksisitenin en aza indirilmesine neden olan terapötik ajanların kapsüllenmesine yönelik avantajlar sağlamaktadır [15].

2.2. Meme Kanserinin Moleküler Alt Tipleri

Meme kanserinin farklı alt tiplerinin biyolojisi ve klinik davranışının keşfedilmesinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Östrojen, progesteron ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER-2) ekspresyon düzeyine dayanan farklı alt tipleri bulunmaktadır [16]. Meme kanseri hücre reseptörleri bu hastalığın prognozunda ve tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır.

Östrojen reseptörü (ER) önemli bir tanısal belirleyicidir, çünkü invaziv meme karsinomlarının yaklaşık %70-75'i yüksek ER ekspresyonu ile karakterizedir [16]. Progesteron reseptörü (PR), ER-pozitif hastaların %50'sinden fazlasında ve çok nadiren ER-negatif meme kanseri olanlarda eksprese edilmektedir [17]. PR ekspresyonu ER tarafından düzenlenmektedir, bu nedenle fizyolojik PR değerleri işlevsel ER yolu hakkında bilgi vermektedir [17]. Öte yandan hem ER hem de PR meme kanseri hücrelerinde bol miktarda eksprese edilmekte ve her ikisi de meme kanserinin tanısal ve prognostik biyobelirteçleri olarak kabul edilmektedir [18]. Daha yüksek PR ekspresyonu genel sağkalım, nükse kadar geçen süre ve tedavi başarısızlığı veya progresyona kadar geçen süre ile pozitif ilişkilirken, daha düşük seviyelerin genellikle daha agresif bir hastalık seyrinin yanı sıra daha kötü nüks ve prognoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir [19].

2.3. Hedefe Yönelik Tedaviler

Mevcut kanser tedavisi genellikle kemoterapiye izin vermek için kateterlerin uygulanması, mevcut herhangi bir kanserin küçültülmesi için ilk kemoterapinin uygulanması, ardından mümkünse tümörün çıkarılması ve daha fazla kemoterapi, radyasyon uygulanması gibi müdahaleci işlemleri içermektedir. Güncel araştırma alanları, alternatif dozaj yollarına izin vermek için taşıyıcıların geliştirilmesini, tümör büyümesini besleyen kan damarları gibi yeni terapötik hedefleri ve daha spesifik olan hedefe yönelik tedavileri içermektedir [20].

Her durumda kanser tedavisinin etkinliği, tedavinin, mümkün olduğu kadar az sayıda sağlıklı hücreyi etkilerken, kanser hücrelerini hedefleme ve öldürme kabiliyeti ile doğrudan ilişkilidir. Hastanın yaşam kalitesindeki değişim derecesi ve beklenen yaşam süresi, tedavinin bu hedefleme yeteneği ile doğrudan ilişkilidir. Kanser tedavisindeki ilerlemeler hem kansere karşı yeni ajanlar hem de eski ve yeni ajanları sunmanın yeni yolları açısından hızlı bir şekilde ilerlemektedir. Moleküler hedefli tedaviler hastaların tümörlerinin genetik profiline dayanarak kişiselleştirilmiş tedavilerinde önünü

açmaktadır. Tüm bu araştırmaların doğrultusunda kullanılan ilaç dozajlarının azaltılması ve hedefe yönelik tedavi vasıtasıyla vücudun diğer bölgelerinde meydana gelen yan etkilerin azaltılması sağlanabilecektir. Kanser hücreleri bağışıklık sisteminden kaçıp kolay bir şekilde ilerleyebildiği için kullanılacak tedavide sağlıklı hücrelerle, kanserli hücrelerin birbirinden ayırt edilmesi gerekmektedir. Hedeflemenin amacı kanserli hücrelerin büyümesinde ve yayılmasında kullanılan belirli moleküllerin inhibe edilmesiyle kanserin yok edilmesidir.

Kanser tedavisinde ilaç hedefleme nanoteknolojik gelişmeler de göz önünde bulundurularak temelde iki gruba ayrılabilir. Monoklonal antikolar ve küçük moleköl inhibitörlerin direk uygulanması yoluyla yapılan tedaviye doğrudan hedefleme denilmektedir. İkinci yöntemde ise ilaç taşıyıcı nanopartiküler sistemler ve hedefleme ajanları birlikte kullanılmaktadır ve bu yöntemle dolaylı hedefleme denilmektedir [21].

2.3.1. Kanser Tedavisinde Pasif Hedefleme

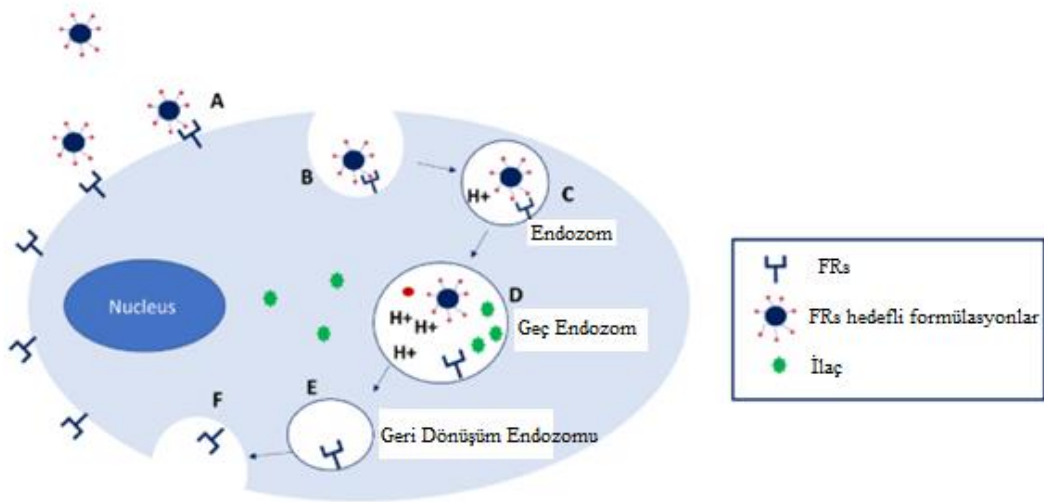
Tümörlerin büyük çoğunluğunda besin ve oksijen ihtiyacının artmasına bağlı olarak damar geçirgenliği daha yüksek olmaktadır. Sağlıklı bir damarda 2 nm'den daha büyük olan moleküller sıkı bağlantılardan dolayı endotel hücrelerinin arasından geçemez. Ancak tümörlü bölgede sıkı bağlanma bölgeleri bozulduğu için 10-500 nm boyutlarındaki makromoleküller geçebilir ve burada birikebilirler. Buna ek olarak tümörlü bölgenin lenfatik boşaltımı da bozulduğu için biriken bu makromoleküllerin sistemin dışına çıkması da zorlaşır. Tümörlü bölgenin damarsal yapısındaki bu değişiklerden yararlanılarak pasif hedefleme gerçekleştirilir [22]. Pasif hedefleme ile aktive olan nanotaşıyıcılar 1980'li yıllarda klinik aşamaya geçmiştir. Lipozomlar ve polimer-protein konjugatlarının ilk ürünleri 1990'lı yıllarda ticarileşebilmiştir (Örnek: Doxil/Caelyx, DOX yüklü PEG-lipozom). Pasif hedefleme her ne kadar klinikte uygulanmış olsa da bazı tümör tipleri için damarsal geçirgenlik farklı olabildiği için EPR etkisi (Enhanced permeability retention-arttırılmış geçiş ve alıkonma) ile aktarım olmayabilir. Böyle durumlar için nanotaşıyıcıların aktif olarak hedeflenmesi yaklaşımı doğmuştur.

2.3.2. Kanser Tedavisinde Aktif Hedefleme

Hedefe yönelik kanser tedavisi için mühendislik stratejilerinin odağında, tümöre doğrudan yüksek dozda bir antikanser ilacı vermek, kötü huylu hücreler tarafından ilaç alımını arttırmak ve kötü huylu olmayan hücreler tarafından ilaç alımını en aza indirmek bulunmaktadır [22-24]. Bu tür dağıtım sistemleri tipik olarak, ilaçların veya ilaç

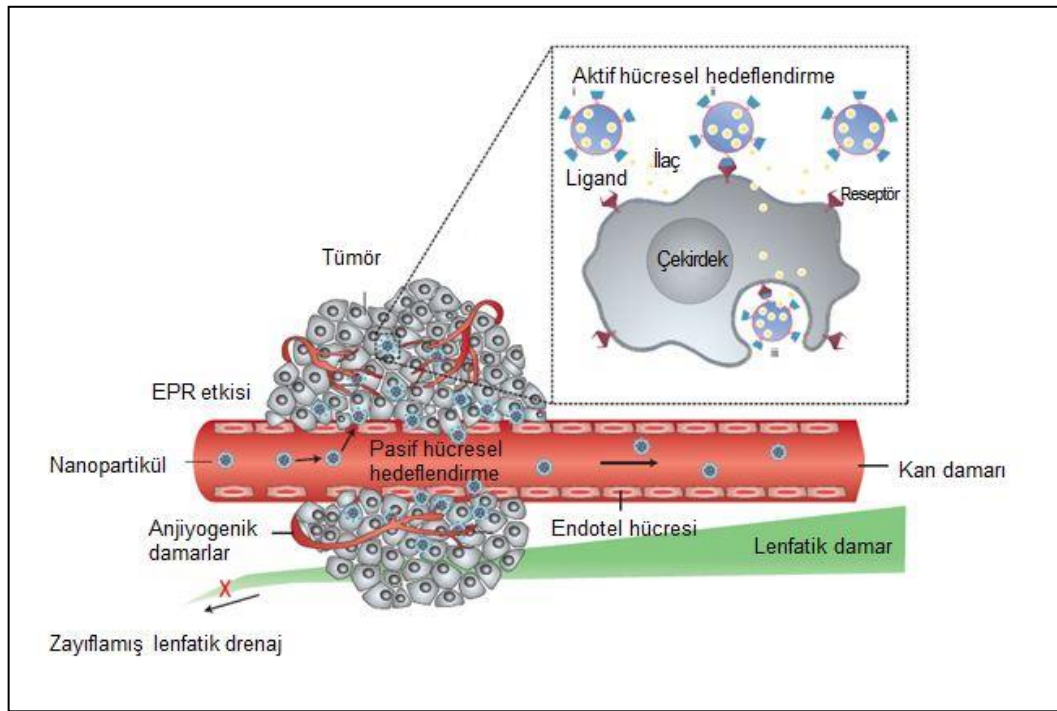
taşıyıcılarının hedefleme kısmına kimyasal konjugasyonunu gerektirmektedir [25]. Nanotaşıyıcıların yüzeyi, hedef bölgelere yönelik özgüllüklerini arttırmak için spesifik tanıma ligandları, fonksiyonel gruplar ve farklı boyutlarda ve yüklerde polimerler ile kimyasal modifikasyonlara açıktır [26]. Hedef moleküller, hastalıklı organlarda veya hücrelerin yüzeyinde bulunan proteinler, şekerler veya lipitler olabilir. Temsili ligandlar arasında antikorlar, proteinler, peptitler, nükleik asitler, şekerler ve vitaminler gibi küçük moleküller (Epidermal büyüme faktörü reseptörü-EGFR, folik asit (FA), transferrin reseptörleri) bulunmaktadır [27].

FA ilaçların hedefe yönelik salımı için hedefleyici ligand olarak kullanılabilir. FA, DNA sentezi ve replikasyonunda, hücre bölünmesinde, büyümesinde, özellikle de hızla bölünen hücrelerde görev alan karbon transferi reaksiyonlarında önemli bir rol oynamaktadır. Folat reseptörlerinin meme kanseri de dahil olmak üzere farklı kanser hücrelerinde aşırı eksprese edildiği bilinmektedir. Ayrıca, yalnızca indirgenmiş folat sağlıklı hücrelerde taşınırken, kanser hücreleri, folat konjugatlarını reseptör aracılı endositoz yoluyla içselleştirebilmektedir (Şekil 2.1). Bu mekanizma ile FA kaplı ve ilaç yüklü NPs, P-glikoprotein efluks pompalarının neden olduğu ilaç direncinin üstesinden gelebilir. FA ve FA reseptörlerinin kanser hücreleri üzerindeki doğal özellikleri, ilaç hedeflemede serbest ilaçların ağır yan etkilerini hafifletmek ve ilaç direncinin üstesinden gelmek için etkili ajanlar olmalarını sağlamaktadır. FA ile modifiye edilmiş ilaç yüklü NP'lerin, yüksek sitotoksisite ve hücre alım etkinliği gösterdiği bilinmektedir [28, 29].



Şekil 2.1. Folik asit- ve FR-hedefli formülasyonların içselleştirilmesini gösteren şema [30].

Ligand aracılı hedefleme olarak da adlandırılan aktif hedefleme, hedeflenen hastalık hücreleri tarafından spesifik tutulum ve alım için nanopartiküllerin yüzeyindeki afinite ligandlarının kullanılmasını içermektedir (Şekil 2.2) [31]. Ligand yoğunluğu, nanopartiküllerin büyüklüğü veya hedefleme ligandının seçimi gibi fizikokimyasal özellikler *in vitro* ve en önemlisi *in vivo* olarak aktif hedefleme stratejisinin etkinliğini oldukça etkilemektedir [32]. Aktif hedefleme yönteminde tümörlü hücrenin yüzeyindeki ya da damar bölgesindeki reseptörleri tanıyacak şekilde spesifik hedefleyici ligandlar nanotaşıyıcıların üstüne kaplanmaktadır. Böylece antikanser ajanının sitotoksik etkisi azaltılır ve vücudun sağlıklı bölgelerine yapacağı etkiler azaltılmış olur. Seçiciliğin artması için hücre yüzeyindeki reseptörlerin ya da antijenlerin sağlıklı hücrelerdekine oranla daha fazla olması gerekmektedir. Nanotaşıyıcıya bağlı halde bulunan ligandın, hücre yüzeyindeki reseptöre bağlanması ile reseptör aracılı endositoz yoluyla hücre içerisine alım gerçekleşip ilacın hücre içinde salınması sağlanır.

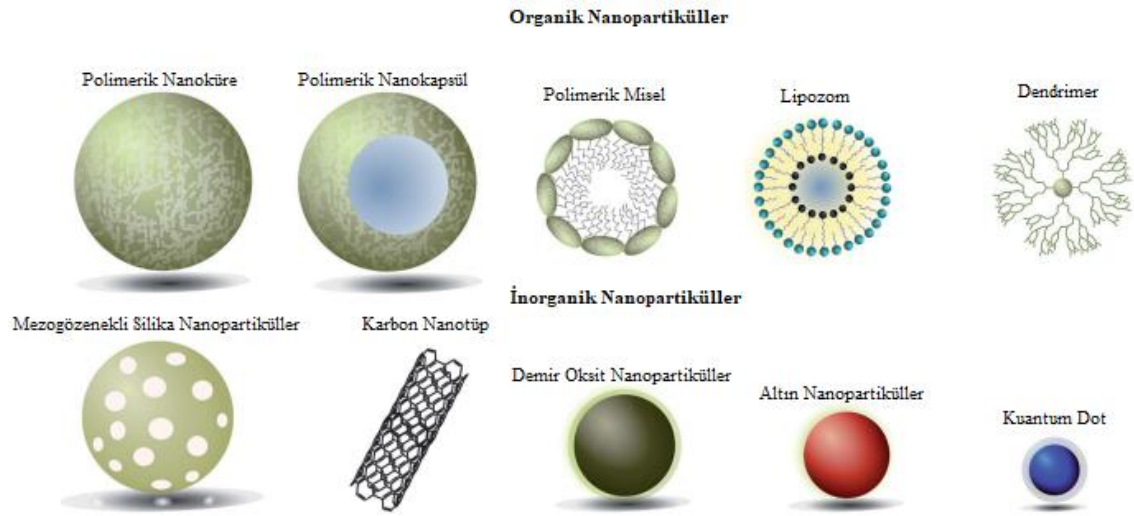


Şekil 2.2. Nanotaşıyıcılar aracılığıyla yapılan aktif ve pasif hedeflemenin şematik gösterimi [33].

2.4. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nanopartiküller hem kontrollü hem de hedefe yönelik ilaç salımı için ideal ilaç dağıtım sistemleridir. Nanoilaç yaklaşımında kullanılan taşıyıcı sistemlerin boyutları yaklaşık olarak 200 nm ve daha küçük olacak şekilde tercih edilmektedir. Bunun nedeni

partiküllerin bu boyut aralıklarında mikro-kılcal damarları geçebilme yetenekleridir [34]. Nanopartiküller; metaller, polisakkaritler ve proteinler dahil olmak üzere çok çeşitli malzemelerden üretilebilmektedirler. Lipid bazlı nanotaşıyıcılar ise genellikle sulu bir fazı bölümlere ayıran ve lipozom, lipid nanopartikülleri ve emülsiyonları oluşturan bir lipid çift tabakasından oluşan küresel bir şekle sahiptir. Polimerik nanotaşıyıcılar arasında dendrimerler, polimer miselleri vb. bulunmaktadır (Şekil 2.3). Metal içeren inorganik nanopartiküller, tıbbi görüntüleme için özel uygulamalarına ve uygunluklarına bağlı olarak ilaç taşıyıcı nanopartiküler sistemler olarak kullanılabilirler [35-37].



Şekil 2.3. Kanser tedavisinde ilaç taşıyıcısı olarak araştırılan nanopartiküllerin özeti [38].

2.5. Polimer ve Protein Yapıda Nanotaşıyıcı Tasarımı ve Üretimi

2.5.1. Protein Bazlı Nanopartiküller

Protein bazlı nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler özellikle son yıllarda kanser çalışmalarında araştırma konusu olarak dikkat çekmektedir. İpek, keratin, kolajen, jelatin, elastin, kazein, fibrinojen, hemoglobin, albümin gibi biyolojik protein bazlı nanopartiküller biyolojik olarak parçalanabilirliğe, biyoyararlanıma ve nispeten düşük maliyete sahip olmada avantajlıdır. Pek çok protein nanopartikülünün işlenmesi kolay olmakla birlikte boyut, morfoloji ve ağırlık gibi istenen spesifikasyonlara ulaşmak için modifikasyona uygundur. Protein nanoparçacıkları biyoyumlu olmayan ve çevre üzerinde olumsuz etkiye sahip olan birçok malzemenin yerini almaktadır [39]. Ayrıca, proteinler içindeki Arg-Gly-Asp (RGD) sekansları hücre yapışmasını düzenleyebilmekte ve hücre tanıma bölgelerini destekleyebilmektedir [40].

2.5.1.1. Albümin Bazlı Nanopartiküler Taşıyıcılar

Albümin bilindiği üzere insan ve diğer memeli hayvanların kan plazmasında en yaygın bulunan proteindir ve kanın kolloid osmotik basıncının düzenlenmesi ve çeşitli maddelerin kanda taşınmasını sağlamaktadır. Albümin ilaç salım sistemlerinde kullanılmakta olan ideal bir malzemedir. Albümin nanoparçacıkları, çeşitli ilaçların yüksek bağlanma kapasiteleri ve ciddi yan etkileri olmadan iyi tolere edilebilmeleri nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Tanımlanan albümin primer yapısı ve yüklü amino asitlerin (örneğin lizin) yüksek içeriği nedeniyle, albümin bazlı nanoparçacıklar, diğer bileşiklere gerek duyulmaksızın pozitif veya negatif yüklü moleküllerin elektrostatik adsorpsiyonuna izin verebilmektedir. Albümin ticari olarak yumurta akından (ovalbümin), sığır serumundan (Bovine Serum Albümin-BSA), insan serumundan (Human Serum Albümin-HSA) önemli miktarlarda elde edilmekle birlikte, soya fasulyesi, süt ve bazı tahıllarda da bulunmaktadır [40, 41].

Albümin bazlı nanopartiküller, biyolojik olarak parçalanabilmekte ve antijenik özellik göstermemektedir. Öte yandan yüzeyleri modifiye edilebildiği için, vücut dağılımlarını değiştirme ve hücre alımı iyileştirme yoluyla ilaçların istenmeyen toksisitelerinin önlenmesini sağlamaktadırlar [40]. Albümin pasif hedefleme kadar aktif hedefleme özelliği de gösteren bir bileşiktir. Çalışmalar tümörlerin ve iltihaplı dokuların vücutta bir azot ve enerji kaynağı olarak önemli miktarlarda albümini metabolize ettiğini göstermiştir. Tümör taşıyan hayvanlar üzerinde yapılan diğer çalışmalarda tümörlü bölgelerin değişen fizyolojisi ve metabolizması nedeniyle albüminin tümör bölgelerinde biriktiğine dair kanıtlar elde edilmiştir. Bu nedenle, albüminin, vücudun sağlıklı hücreleri ile karşılaştırıldığında kanserli hücrelerde tutulmayı teşvik etmek için polimerik bazlı ilaç salım sisteminde kullanılması gündeme gelmiştir [42].

Albümin bazlı nanotaşıyıcılara örnek olarak albümin-ilac konjugatları, albümin-metal konjugatları, albümin-polimer konjugatları, albümin miseller, çekirdek-kabuk nanopartikülleri ve albümin bazlı ön ilaçlar örnek verilebilir [40]. Çizelge 2.1’de farklı sentez metotları kullanılarak hazırlanan albümin bazlı nanopartiküllerin boyut, kullanılan etkin madde ve formülasyona konjuge edilen hedefleyici ajanların karşılaştırıldığı tablo sunulmuştur.

Çizelge 2.1. Farklı metotlar uygulanarak hazırlanan albümin bazlı nanopartiküllerin geliştirildiği çalışmalara örnekler.

Albümin Bazlı Nanopartiküller	Hedefleyici Ligand	Metot	Boyut	İlaç	Hastalık Tipi	Hücre Hattı
Demir oksit ve altın nanopartikül ile konjuge edilen BSANPs [43]	AS1411 Aptamer	Desolvasyon Çapraz Bağlama	~120 nm	Dokсорubisin	Meme Kanseri	MCF7 ve SKBR3
BSANPs [44]	-	Desolvasyon	~165 nm	Parvifloron D	Pankreas ve Meme Kanseri	BxPC3, PANC-1, Ins1-E, MCF-7, HaCat ve Caco-2
BSANPs [45]	Transferrin	Koaservasyon/ Nanopresipitasyon	-	Oksitosin	Otizm Spektrum Bozukluğu	-
Gemsitabin ve anakardik asit ile modifiye edilmiş BSANPs [46]	Anakardik asit (VEGF reseptörleri hedefleyici)	Yüksek Basıncılı Homojenizasyon	~140 nm	Dosetaksel ve Gemsitabin	Meme Kanseri	MCF-7 ve MDA-MB-231
HSANPs [47]	Aptamer	Desolvasyon	~281 nm	Kurkumin	HER-2 Pozitif Meme Kanseri	SK-BR-3
Kitosan ve PLG-PEG modifiye BSANPs [48]	-	Nab (Nanoparticle Albümin Bound Technology)	~250 nm	Teniposid	Akciğer Kanseri	A549
HSANPs [49]	Konkavalin A	Desolvasyon	~53-180 nm	Etoposid	Meme Kanseri	MCF-7

HSANPs [50]	Folik Asit	Emülsiyon- Çözücü Buharlaştırma metodu	~102 nm	Resveratrol	Karaciğer Tümörleri İçin	HepG2
HSANPs [51]	-	Desolvasyon	~220 nm	Fisetin	Meme Kanseri	MCF-7
Manyetik BSANPs [52]	Folik Asit	Desolvasyon Çapraz Bağlama	~180 nm	Doksorubisin	Nazofarenks (Yutak) Kanseri	NPC KB
Di-fluorinated Kurkumin yükü BSA- Paklitaksel yükü BSANPs'in kombinasyonu [53]	Folik Asit	Desolvasyon	~190 nm	Di-fluorinated Kurkumin (Kurkumin Analogu) ve Paklitaksel	Yumurtalık ve Rahim Kanseri	SKOV 3, HeLa

Baneshi ve ark., 2019 yılında yayınladıkları bir çalışmada demir oksit ve altın nanoparçacıkları yüklü, AS1411 aptameri ile fonksiyonelleştirilmiş albümin nanopartikülleri hazırlamış ve iyi bilinen bir antikanser ilacı olan doksorubisinin hedefe yönelik salımını araştırmışlardır. Hazırlanan formülasyonda yapılan aptamer modifikasyonunun meme kanseri hücrelerine (MCF7) hedeflemeyi önemli derecede artırdığını, *in vitro* ve *in vivo* fototermal aktivite, MRI görüntülemesi ve ayrıca *in vivo* değerlendirme için büyük potansiyel gösterdiği belirtilmiştir [43]. Ano ve ark., pankreas ve meme kanserinde değerlendirilmek üzere Parvifloron D yüklü albümin nanopartikülleri hazırlamışlardır. Albümin nanopartiküller desolvasyon metodu ile hazırlanmış olup yaklaşık partikül boyutu 165 nm ve enkapsülasyon verimi %91.2 olarak hesaplanmıştır [54]. Rokon ve ark., koerservasyon/nanopresipitasyon yöntemi ile albümin nanopartikülleri sentezlemiş ve otizm spektrum bozukluğu tedavisine yönelik olarak oksitosin salımını araştırmışlardır. Oksitosin kan beyin bariyerini geçemeyen bir bileşik olduğu için albümin nanopartikül sistemi içerisinde enkapsüle edilmiş ve hedefleme ajanı olarak yüzeye transferin konjugasyonu sağlanmıştır. Hazırlanan formülasyonun, invaziv olmayan bir şekilde kan beyin bariyerine ilaç ve terapötik peptitlerin dağıtılması için potansiyel bir aday olabileceği belirtilmiştir [45]. Sunhui ve ark., Kurkumin/Sunitinib yüklü albümin ile stabilize edilmiş süperparamanyetik demir oksit nanopartikülleri

sentezlemişlerdir. Demir oksit nanopartiküller ortamda bulunan albümin varlığında birlikte çöktürme metoduna göre sentezlenmiştir. Harici olarak uygulanan bir manyetik kuvvet altında albümin-süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerinin kapsüllenmiş ilaçların sitotoksitesini ve *in vivo* MR görüntülemesini önemli ölçüde arttırdığını, tümör bölgesine iyi bir hedefleme, artırılmış stabilite ve uzun süreli dolaşım potansiyeli sağladıkları rapor edilmiştir [55]. Vieri ve ark., 2019 yılında yayınladıkları çalışmada kitosan ile kaplanmış insan serum albümini bazlı nanopartiküllerin burundan beyine (nazal salım) ilaç salım sistemi olarak uygunluğunu araştırmışlardır. Son yıllarda kan beyin bariyerinin aşılması ve ilaçların doğrudan beyne ulaştırılabilmesi için bu yol yeni bir strateji olarak araştırılmaktadır. Albümin nanopartiküller desolvasyon yöntemi ile hazırladıktan sonra kitosan elektrostatik etkileşim yoluyla albümin nanopartiküllerin yüzeyine kaplanmıştır. Kitosan kaplaması ile özellikle kitosanın mukoadesyon etkisinden faydalanmak amaçlanmıştır [56]. Bolin ve ark., karaciğer tümörlerinin hedeflenmesine yönelik olarak resveratrol yüklü, folat-konjuge albümin nanopartiküller hazırlamışlardır. Ortalama partikül boyutu 102 nm ve resveratrol enkapsülasyon verimi %98.36 olarak bulunmuştur. Folat-konjuge resveratrol yüklü albümin nanopartiküllerin karakterizasyonu için SEM, TEM, FTIR, TGA, XRD ve DSC analizleri yapılmıştır [57].

2.5.1.2. Albümin Bazlı Nanopartiküler Taşıyıcıların Sentez Metotları

Albümin nanopartiküllerin sentez yöntemi fiziksel ve kimyasal olmak üzere ikiye ayrılabilir. Kimyasal yöntemde desolvasyon, emülsifikasyon ve kendiliğinden düzenlenme (self-assembly) yer alırken, fiziksel yöntem termal jelasyon, albümin bağlı nanopartikül (NAB) teknolojisi ve nanosprey kurutma metotlarından oluşmaktadır [58]. Desolvasyon, albümin nanopartiküllerini hazırlamak için en çok kullanılan prosedürlerden biridir. Etanol veya aseton gibi bir çözücü maddenin, çözelti bulanıklaşana kadar sürekli ve damla damla bir şekilde, karıştırılarak albüminin sulu çözeltisine eklenmesi esasına dayanmaktadır. Desolve edici maddeler (etanol, aseton vb.), albüminin üçüncül yapısını kademeli olarak değiştirerek, proteinin faz ayrılmasına ve kümelenmesine yol açarak çalışmaktadır. Çoğu zaman, elde edilen formülasyon yeterince stabilize edilemediği için elde edilen nanopartiküllerin morfolojisini daha fazla korumak ve stabilize etmek için glutaraldehit gibi bir çapraz bağlayıcı kullanılmaktadır. Elde edilen formülasyonun özellikleri, pH, protein konsantrasyonu, çapraz bağlayıcı konsantrasyonu, çözücü madde seviyesi, iyonik güç ve karıştırma hızı gibi işlemin koşullarına bağlıdır [11, 58]. Emülsifikasyon metodu, bir albümin çözeltisine (su fazı)

susuz bir çözelti (yağ fazı) eklenmesini, karıştırma altında, ham bir emülsiyon oluşturulmasını içermektedir. Kendiliğinden düzenlenme (self-assembly), β -merkaptolanol kullanımıyla oluşan disülfür bağlarının kırılması veya lipofilik bir bileşiğin eklenmesiyle proteinin yüzeyindeki birincil amin gruplarının indirgenmesiyle proteinin hidrofobitesinin artması sonucunda albümin nanopartiküllerinin oluşumuna dayanmaktadır. Termal jelleşme metodu, ısı kaynaklı protein konformasyonel değişimi ve açılmasıyla karakterize edilmektedir, ardından hidrojen bağlarının oluşumu, elektrostatik, hidrofobik etkileşimler ve disülfür-sülfidril değişim reaksiyonları gibi protein-protein etkileşimleri meydana gelmektedir. Elde edilen formülasyonun özellikleri, pH, protein, konsantrasyon ve iyonik güç gibi işlem koşullarına bağlıdır. Nanosprey kurutma metodu ise genellikle sıvı bir fazdan kuru toz üretmek için kullanılan çok yönlü bir tekniktir. Bu yöntemin temel avantajlarından biri, parçacıkların sürekli ve tek adımlı bir işlemden kurutulması ve üretilmesidir. NAB teknolojisi süreci, daha önce açıklanan emülsiyon bazlı bir yöntemle dayanmaktadır. Bir yağ fazı (ilacı içeren) sulu bir faza (HSA/BSA içeren, %1 kloroformla önceden doyurulmuş) damla damla eklenir ve karışım, ham bir emülsiyon oluşturmak için düşük rpm'de hafif homojenizasyona tabi tutulur. Son emülsiyon, yüksek basınçlı bir homojenizasyon kullanılarak elde edilir ve karışım döner bir buharlaştırıcıya aktarıldıktan sonra çözücü uzaklaştırılır ve nanosüspansiyon bu şekilde üretilmiş olur [59].

2.5.2. Polimerik Yapıdaki Nanotaşıyıcıların Tasarımı ve Üretimi

Son yıllarda, polimer bazlı ilaç salım sistemleri biyoyumlulukları, gelişmiş biyoyararlanımları ve yeni terapötiklerin tümördeki birikimini ve antikanser etkinliğini artırma yetenekleri nedeniyle artan bir ilgi görmektedir. Polimer bazlı ilaç dağıtım sistemlerinin kritik bir yönü, terapötik maddelerin vücuda zarar vermeden güvenli bir şekilde hedef bölgeye iletilmesini sağlayan biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin kullanılmasıdır [60]. Kitosan, arjinin, siklodekstrin, selüloz, hyaluronik asit (HA) ve polisakkaritler dahil olmak üzere doğal polimerler, ilaç salım sistemlerinin etkinliğini artırabilmek için uzun yıllardır kullanılmaktadır. Sentetik polimerler ise yapı modifikasyonlarının kolaylığı ve biyo-duyarlı ve biyoaktif özellikleri nedeniyle giderek daha fazla ilgi görmektedir. Polietilen glikol (PEG), poliglolik asit (PGA), polilaktik asit (PLA), poli(laktik-ko-glikolik asit) PLGA, poli (kaprolakton) ve polidioksanon gibi alifatik poliesterler en yaygın kullanılan bileşenlerdir [61, 62].

2.5.2.1. PLGA Bazlı Nanopartiküller

Biyomedikal alanda poli (laktik-ko-glikolik asit) polimeri, sergilediği güvenlik profili, onaylanmış biyouyumluluğu, düşük immünojenite ve toksisite seviyelerinin yanı sıra *in vivo* çalışmalar sırasında biyolojik olarak parçalanması nedeniyle ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa İlaç Kalite Ajansı (EMA) tarafından onaylanan tek biyolojik olarak parçalanabilir polimerdir. PLGA, laktik asitlerin ve glikolik asitlerin belirli bir oranda polimerizasyonu ile oluşan doğrusal alifatik poliestere bazlı bir kopolimerdir.

Laktik asit ve glikolik asidin bir kopolimeri olan PLGA, karşılık gelen laktik asit dimerlerinin ve glikolik asit dimerlerinin halka açma polimerizasyonu veya laktik asit ve glikolik asidin doğrudan polikondensasyonu yoluyla sentezlenmektedir.

PLGA bileşimi genellikle monomeri PLA'nın PGA'ya oranıyla belirlenmektedir. L-laktik asit (LA)/glikolik asit (GA) molar oranı PLGA'nın kristalliğini etkilemekte ve dolayısıyla su absorpsiyonunu ve polimerin şişme özelliklerini etkilemektedir. Özellikle, glikolik asidin eklenmesi polimerin kristalliğini azaltmakta ve nanomalzemenin su emilim oranını hızlandırmaktadır [63].

GA içeriği %50'nin altında olduğunda PLGA, gelişmiş hidrofobisite ve azaltılmış bozunma oranı ile PLA'nın özelliklerini sergilemektedir. PGA içeriği ne kadar yüksekse, PLGA'nın hidrofilitesi, ıslanabilirliği ve amorf yapısı o kadar güçlü olmaktadır. Amorf yapının güçlenmesi ile bozunma oranı da hızlanmakta ve bu da daha hızlı ilaç salımıyla sonuçlanmaktadır [64].

2.5.2.2. PLGA Bazlı Nanopartiküllerin Sentez Metotları

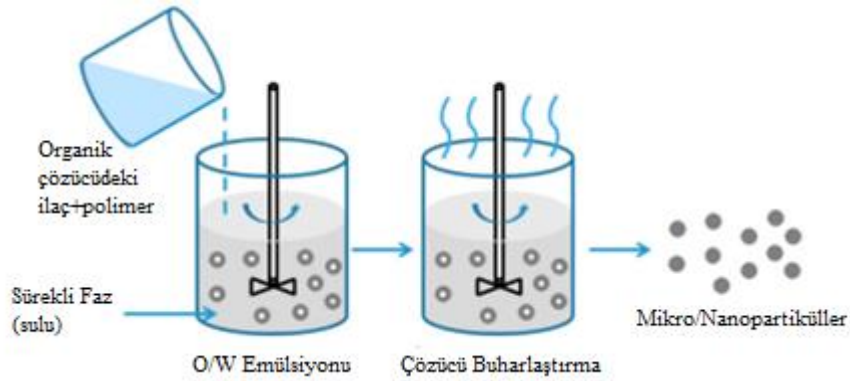
Kanser tedavisi ve spesifik olarak hedefe yönelik tedavilerde kullanılmak üzere araştırılan PLGA nanopartiküller (PLGANPs)'in şekil, boyut, boyut dağılımı ve kararlılık gibi nihai özelliklerinde nanopartiküllerin üretim teknikleri önemli bir rol oynamaktadır. PLGA bazlı nanopartiküller ilaç taşıyıcı sistemlerin sentezi için emülsifikasyon (tek veya çift), nanopresipitasyon, diyaliz ve sprey kurutma metotları kullanılmaktadır.

Emülsiyon-Çözücü Buharlaştırma Metodu

Emülsifikasyon, PLGANPs'in üretimi için en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Tek emülsiyon (yağ-su veya O/W) yöntemi hidrofobik ilaçların kapsüllenmesi için uygundur. Bu yöntemde, PLGA kopolimerleri ve ilaçlar uçucu ve su ile karışmayan bir

organik fazda (örneğin, benzil alkol, diklorometan, etil asetat, vb.) çözülür ve bu çözelti, yüzey aktif madde (örneğin, polivinil alkol (PVA), sodyum kolat, vb.) içeren sulu bir faza damla damla eklenir ve daha sonra karışım sonikasyona tabi tutulur. Ardından organik çözücüyü uzaklaştırmak için karıştırma ve buharlaştırma yapılır. Organik çözücünün difüzyonu ve suyun emülsiyon damlacıklarındaki karşı difüzyonu polimer nanopartiküllerin oluşumuyla sonuçlanır [39] (Şekil 2.4). Hidrofilik ilaçlar için çift emülsiyon yöntemi kullanılır. Bunun için ilaç önce sulu fazda çözülür ve PLGA kopolimerleri organik fazda çözülür. Ardından sulu faz organik faza eklenerek birincil su-yağ (W/O) emülsiyonu oluşturmak için ultrasonik işlem gerçekleştirilir. Daha sonra birincil emülsiyon sulu faza eklenir, bir yüzey aktif madde ile çözülür, sonikasyona tabi tutulur ve son aşamada karıştırılarak organik çözücünün uçurulması sağlanır, böylece mikro parçacıklar su-yağ-su (W/O/W) emülsiyonu ile oluşturulur [65].

Polimer konsantrasyonu ve buharlaştırma adımı nanopartiküllerin boyutunu belirlemektedir. Farklı emülsiyon çeşitlerinin kullanılabilir olması, tekrarlanabilirliğinin yüksek olması ve aglomerasyonun az olması gibi sebeplerden dolayı emülsifikasyon çözücü buharlaşma metodu tercih edilmektedir. Ancak bu yöntem ile lipofilik etkin maddelerin enkapsülasyon verimi oldukça düşüktür ve tercih edilmemektedir [66].

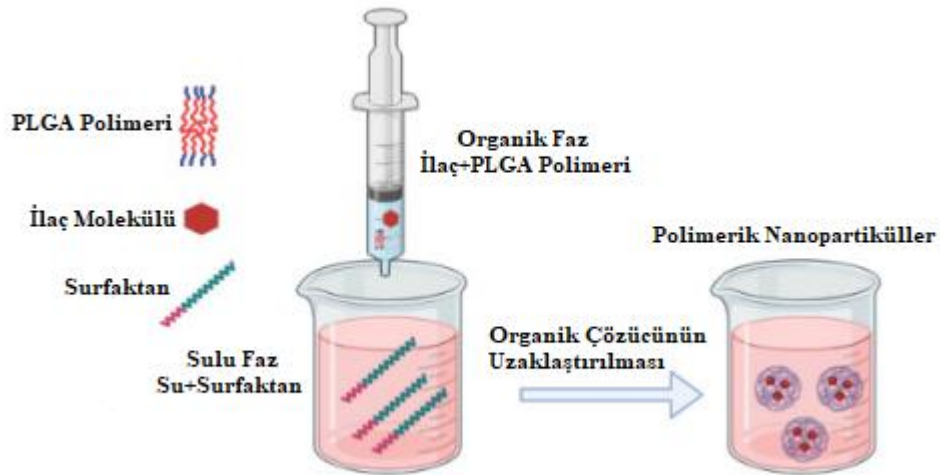


Şekil 2.4. PLGANPs'in emülsiyon buharlaştırma yöntemiyle hazırlanması [67].

Nanopresipitasyon Metodu

Nanopresipitasyon tekniği, çözücü yer değiştirme veya arayüz biriktirme yöntemi olarak da bilinen tek adımlı bir işlemdir. Bu yöntem genellikle hidrofobik ilaçların enkapsüle edilmesi için kullanılır, ancak hidrofilik ilaçlar için de uygundur. Polimerler ve ilaçlar aseton, asetonitril, etanol veya metanol gibi polar, suyla karışabilen bir çözücü içinde

çözülür. Çözelti, yüzey aktif madde veya stabilizer içeren sulu bir çözeltiye kontrollü bir şekilde (damla damla ekleme) eklenir ve oluşan bu koloidal süspansiyon da nanopartiküller elde edilmiş olur (Şekil 2.5). Nanopartiküllerin oluşumu yağ fazının sulu faza eklenmeye başlaması ile anında gerçekleşir, bu nedenle hızlı ve kolay çalışma avantajına sahiptir [62]. Üretim prosedüründe organik faz enjeksiyon hızı, sulu faz karıştırma hızı ve yağ fazın sulu faza oranı gibi temel parametrelerin nanopresipitasyon yöntemi üzerinde büyük etkisi bulunmaktadır. Kesme geriliminin olmaması nedeniyle çok dar dağılımlı parçacık boyutları sentezlenebilmektedir. Nanopresipitasyon metodunun avantajları ölçeklenebilirlik ve düşük enerji gereksinimi olup, elde edilen nanopartiküllerin özellikleri polimer içeriğine ve molekül ağırlığına, kullanılan çözücülere ve oranlara ve karıştırma hızına bağlıdır.



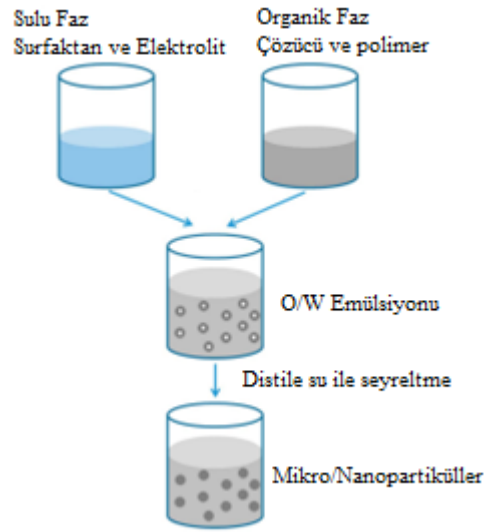
Şekil 2.5. PLGANPs'in nanopresipitasyon metodu ile hazırlanması [68].

Salting-Out Metodu

Salting-out yönteminde, bir çözelti polimer, ilaç ve sulu faza (tuz ve stabilizatörün çözüldüğü ve emülsiyon oluşturmak için karıştırıldığı) eklenen su ile karışabilen organik çözücünden oluşur (Şekil 2.6). Tipik olarak, en yaygın kullanılan tuzlar %60 (a/a) konsantrasyona sahip magnezyum klorür heksahidrat veya 1:3 (polimer/tuz) oranında kullanılan magnezyum asetat tetrahidrattır. Yağ fazı mekanik karıştırıcı kullanılarak uygulanan güçlü kesme kuvveti altında sulu bir fazda emülsifiye edilir. Emülsiyon difüzyon yöntemi ile salting-out yöntemi arasındaki fark, ortamdaki tuzların varlığı sebebiyle salting-out metodunda çözücü difüzyon adımı olmamasıdır. Elektrolitteki iyonik gücü azaltmak için, manyetik karıştırıcı altında oluşan O/W emülsiyonuna

damıtılmış su eklenir. Aynı zamanda, hidrofilik organik çözücüler yağ fazından sulu faza göç eder ve bu da nanopartiküllerin oluşumuyla sonuçlanır [67, 69].

Salting-out yöntemi, yüksek polimer konsantrasyonları ve işlem sırasında ısıya ihtiyaç duymadığından ısıya duyarlı ilaçlar/etkenler için de kullanımı uygundur. Ancak, lipofilik ilaçlar için bu yöntem uygun değildir ve kullanılan stabilizatörleri gidermek için birkaç basamaklı yıkama adımı gerektirdiğinden saflaştırma prosedürü zaman alıcıdır.

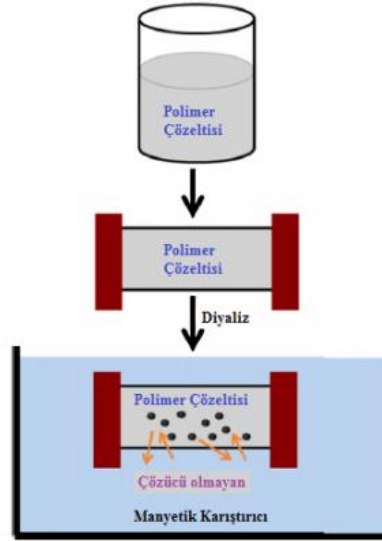


Şekil 2.6. PLGANPs'in salting-out metodu ile hazırlanması [67].

Diyaliz Metodu

Bu yöntemde bir diyaliz tüpü veya yarı geçirgen bir membran, polimerler için fiziksel bir bariyer olarak kullanılmaktadır. Polimerler ve ilaç organik çözeltilerde çözüldükten sonra, uygun bir molekül ağırlığındaki diyaliz membranının içine yerleştirilir. Çözücünün diyaliz sonucunda yer değiştirmesi ile çözünürlüğünü kaybeder, arayüz gerilimindeki artışla polimer agregasyonu meydana gelir ve polimerin kümelenmesiyle homojen nanopartikül süspansiyonu elde edilmektedir (Şekil 2.7).

Diyaliz metodu küçük ve dar boyut dağılımı gösteren nanopartiküllerin oluşturulmasında kullanılan basit ve etkili bir yöntemdir [62, 69, 70].



Şekil 2.7. PLGANPs'in diyaliz metodu ile hazırlanması [70].

2.6. İlaç Salımı için Kullanılan Protein-Polimer Hibrit Nanopartiküller

Protein-polimer sistemleri toksik olmaması, tahrişe yol açmaması, suda iyi çözünürlük göstermeleri ve biyouyumluluk gibi üstün özelliklerinden dolayı kanser tedavisinde oldukça dikkat çekici taşıyıcı ajan sistemleri olarak ilgi çekmektedir. Proteinler, biyolojik kataliz, yüksek afiniteli molekül tanıma ve hücresel yolların aktivasyonu veya inhibisyonu gibi önemli işlevlere sahip, canlı organizmadaki biyolojik süreçlerde yaygın olarak bulunan biyomakromoleküllerdir. Endojen yapıda oldukları için proteinler biyoyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen malzemelerdir. Öte yandan proteinlerin bozunma ürünlerinin de vücut tarafından bilinip ortadan kaldırılması ve bu nedenle tedaviler sırasında potansiyel toksisitelerin azalması yönüyle de taşıyıcı sistemlerde kullanımı oldukça geniştir.

Geleneksel ilaç salımına kıyasla, polimerik ilaç salım sistemleri, sürekli ve kontrollü salım, ilaçların hedef bölgede salımına olanak tanınması ve biyolojik bariyerleri aşma işlevselliği kazandırılabilmesi, tedavinin etkisini büyük ölçüde iyileştirebilmekte ve yan etkileri azaltabilmektedir. Polimerlerin ve proteinlerin sahip oldukları bu avantajlar, protein-polimer sistemlerinin kullanımını kanser tedavisinde faydalı hale getirmektedir. Son zamanlarda, farklı kanser tiplerinin tedavilerinin araştırmalarında daha fazla yeni teknik kullanılmaktadır. Kemoterapiye ek olarak fototerapi, gen terapisi, kombinasyon terapisi ve teranostik gibi kanser tedavisi için giderek artan sayıda nanoteknoloji destekli polimerik ve protein bazlı nanomalzemeler *in vitro* ve *in vivo* olarak incelenmektedir.

Protein-polimer sistemleri, hidrofobik ilaç çözünürlüğünü geliştirmek, ilacın biyolojik dağılımını ve farmakokinetiğini geliştirmek ve hedeflenen bölgede birikimini sağlayabilmek için büyük potansiyel göstermektedir. Bir protein-polimer hibrit nanopartikül sistemi oluşturmak için polimer ve proteinler seçilirken bunların sahip olduğu fiziksel ve kimyasal özellikleri, fonksiyonları ve uygulamaları tam olarak dikkate alınmalıdır.

Protein-polimer hibrit taşıyıcı sistemlerinde kullanılan polimer türlerine örnekler Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Protein-polimer hibrit taşıyıcı sistemlerinde kullanılan çeşitli polimer türleri [71].

Kategori	Örnek
Polietilen glikol (PEG) ve PEG analogları	Poli(N-(2-hidroksipropil) metakrilamid p(HPMA)
	Zwitteriyonik poli(karboksibetain) (PCB)
	Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)
Biyomimetik Polimerler	Trehaloz-bazlı polimer
	Dekstran, Selüloz, Pektin polimeri
	Heparin mimetik polimer
	Horseradish peroxidase (HRP)-katalizli sistem
Biyobozunur Polimerler	Siklik keten asetal bazlı polimer (CKA)
	Peptitler
	Hidroksietil nişasta (HES)
	Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)
Uyarana Duyarlı Polimerler	Poli(N-izopropil akrilamid) (p(NIPAAm))
	Poliakrilik Asit
	Poli (N,N-dimetilaminoetil metakrilat) (p(DMAEMA))
	Jelatin içeren supramoleküler nanofiberler

Albümin, nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler için oldukça önemli bir yüzey modifiye ajanıdır. Disopsonin görevi gören albümin, dolaşımdaki nanoparçacıkların mononükleer fagositik sistem (MPS) tarafından tanınması ve temizlenmesini engelleyebilmektedir. Öte yandan albümin, kanser hücreleri tarafından artan tüketim ve tümör mikro çevresi ile etkileşimlerine bağlı olarak katı tümörlere nanopartiküllerin taşınmasına yardımcı olabilmektedir. Albümin önem arz eden tüm bu özelliklerinden yola çıkılarak ilaç taşıyıcı sistemlerde albümin-ilaç konjugatları, albümin-metal konjugatları, albümin-polimer konjugatları, albümin miseller, çekirdek-kabuk nanopartikülleri ve albümin bazlı ön ilaçlar gibi çeşitli formülasyon şekillerinde kullanılmaktadır. Tez kapsamında protein-polimer hibrit ilaç taşıyıcısı olarak PLGA:BSA çekirdek-kabuk nanopartikül formülasyonu hazırlanmıştır. Bu iki bileşen kullanılarak hazırlanan çekirdek-kabuk yapısında oldukça az çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmalar incelendiğinde PLGA yüzeyine albümin kaplaması (farklı metotlar ile) dolaşımda kalma sürelerini uzatma, biyouyumluluğu artırma ve kan beyin bariyerini geçebilme gibi amaçlara yönelik olarak hazırlanmıştır.

Literatürde bu iki bileşenin kullanıldığı farklı kompozit yapılarında ve farklı amaçlara yönelik olarak hazırlanan bazı çalışmalar bulunmaktadır. Pooja ve ark., emülsifikasyon yöntemi ile Morin yüklü PLGANPs hazırlayıp, nanopartikül yüzeylerini HSA ile (adsorpsiyon metodu kullanılarak) kompleks hale getirmişlerdir. PLGA yüzeyindeki HSA tabakasının ilaç salımına etkisini araştırmışlardır [72]. Prashant ve ark., kan beyin bariyerini aşabilmek ve beyin tümörlerinde Metotreksat ilaç salımını araştırmak üzere katyonik BSA ile konjuge edilmiş PLGANPs (kimyasal konjugasyon ile) sentezlemişlerdir. Bu çalışmada BSA konjugasyonun amacı nanopartiküllerin kan beyin bariyerini aşabilmesidir [73]. Chuang ve ark., altın nanoçubuklar ve Doksorubisin yüklü PLGANPs sentezleyip, partikül yüzeylerini polietilenimin ile fonksiyonelleştirdikten sonra, elektrostatik etkileşim aracılığı ile taşıyıcı sistemin en dış tabakasına HSA kaplamışlardır. Bu çalışmada çoklu ilaç direncini yenebilmek için altın nanoçubuklar ile fototermal terapi sağlanmış ve kemoterapi ile de kombinasyon terapisi araştırılmıştır. HSA ile yapılan kaplamanın sebebi ise taşıyıcı sistemin biyoyararlanımını desteklemek ve tümöre spesifik hedeflemeyi sağlamaktır [74]. Xinyi ve ark., emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemini kullanarak BSA ve polietilenimin ile kaplanmış PLGANPs hazırlamışlardır. PLGA nanopartikül yüzeylerindeki BSA ve polietilen kaplamasının makrofajların immün aktivasyonu üzerine etkisini araştırmışlardır [75].

Bu tez kapsamında ise literatür çalışmalarından farklı olarak PLGA (çekirdek) yüzeyindeki BSA katmanına (kabuk) ikinci bir ilacın enkapsülasyonu araştırılmıştır. Bilindiği kadarı ile arayüze gömme metodu ile uygun boyutlarda hazırlanmış PLGA:BSA çekirdek-kabuk nanopartikül formülasyonu ile, Dosetaksel ve Kurkumin ikili ilacının enkapsülasyonu ve sıralı salımının incelenmesine yönelik olarak literatürde yayımlanmış olan bir çalışma bulunmamaktadır. Öte yandan bu tez kapsamında nanopartikül boyutları optimize edilerek sağlanan pasif hedeflemenin yanında partikül formülasyonuna konjuge edilen BSA ve FA ile de aktif hedeflemeye uygun partikül formülasyonu hazırlanmış, karakterizasyonu ve optimizasyonu yapılmıştır. Literatürde PLGA:BSA çekirdek-kabuk nanopartiküllerinin FA ile konjuge edildiği bir formülasyon ve ilaç salım çalışması da bulunmamaktadır.

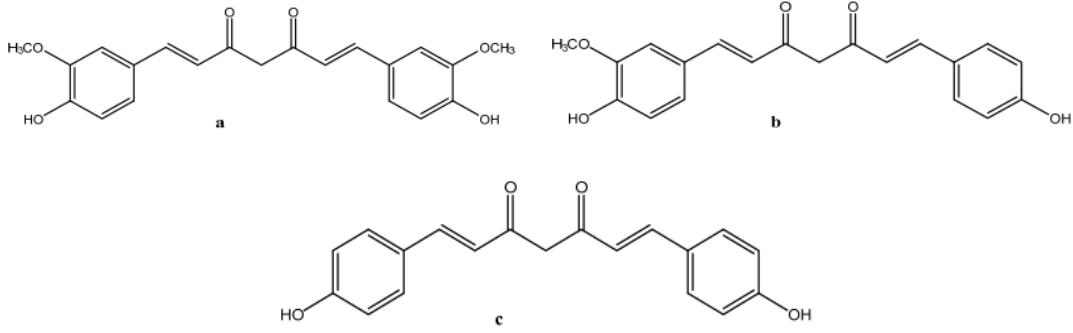
2.7. Kurkumin (CUR) ve Dosetaksel (DTX): Özellikleri ve Kombinasyon Tedavisi

2.7.1. CUR ve CUR'in Biyolojik Etkileri-Etki Mekanizması

Zerdeçal (*Curcuma longa*) köksapından türetilmiş sarı fenolik pigmente sahip aktif bir bileşen olan CUR, Güney Asya'ya özgü "Zingiberaceae" bitki ailesine aittir [76]. Renklendirici, lezzet verici ve koruyucu özelliklerine ek olarak CUR, belirli kanser hastalıkları, öksürük, cilt yaraları ve iltihaplanma gibi birçok rahatsızlığın ve metabolik rahatsızlıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda CUR'in antiinflamatuar, antioksidan ve antitümör özellikleri gibi birçok farmakolojik aktiviteyi yürüttüğü rapor edilmiştir. Ayrıca, CUR'in karsinogenezi önleyebildiği, kanser hücrelerini kemoterapiye duyarlı hale getirebildiği ve normal hücreleri kemoterapinin neden olduğu zararlardan koruyabildiği belirtilmektedir [77]. Elde edilen veriler CUR'in, geniş antikanser aktivitesi ve azalmış toksisite dahil olmak üzere geleneksel kemoterapötik ilaçlara göre avantajları olduğunu ortaya çıkarmıştır. CUR'in meme kanseri, akciğer kanseri, baş ve boyun kanserleri, prostat kanseri ve beyin tümörleri üzerindeki antitümör aktivitesi ve çoklu kanser hücre hatlarını hedefleme kabiliyeti rapor edilmiştir [78]. CUR hidrofobik yapıdadır ve genellikle yağda, etanolde, aseton ve dimetil sülfoksitte (DMSO) çözünmektedir.

Curcuma longa'nın sarı pigmentli kısmı, kimyasal olarak ana bileşeni olan CUR ile ilişkili olan kurkuminoidler (Demetoksikurkumin ve Bis-demetoksikurkumin) içermektedir (Şekil 2.8) [79]. Kurkuminoidler, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından "Genel Olarak Güvenli" (GRAS) olarak onaylanmıştır ve klinik deneylerle, üç

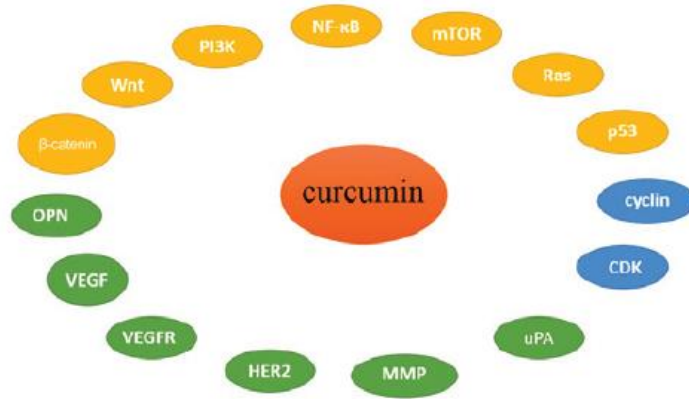
kurkuminoidin (kurkumin, bisdemetoksikurkumin ve demetoksikurkumin) %95 konsantrasyonunda 4000 ila 8000 mg/gün arasındaki dozlarda ve 12.000 mg/güne kadar olan dozlarda bile iyi tolere edilebilirlik ve güvenlik profilleri gösterdiği rapor edilmiştir [80].



Şekil 2.8. Önemli üç kurkuminoid: (a) CUR, (b) demetoksikurkumin ve (c) bisdemetoksikurkumin [79].

Son yıllarda, kapsamlı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, CUR'in kansere, viral enfeksiyona, artrit, amiloid agregasyonuna, oksidasyona ve iltihaplanmaya karşı aktiviteye sahip olduğunu ileri sürmüştür. CUR, öncelikle kanser hücrelerinde apoptotik yolları aktive ederek ve inflamasyon, anjiyogenez dahil olmak üzere kanser öncesi süreçleri inhibe ederek antikanser etkiler gösterir [81]. CUR; p53, Ras, fosfatidilinositol-3-kinaz, protein kinaz B, Wnt- β katenin sinyal yolağı ve mTOR'un (Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi) aracılık ettiği yollar dahil olmak üzere kanser tedavisiyle ilişkili çok sayıda sinyal yolunu hedeflemektedir [82].

Meme kanseri dokularında, sikline bağımlı kinazların (CDK'ler) aşırı ekspresyonu ve tümör baskılayıcı protein p53'ün yetersiz ekspresyonu gözlemlenmektedir. Eşzamanlı olarak p21, p27 ve p57 CDK inhibitörlerini içeren bir dizi hücre döngüsü düzenleyici protein aşağı regüle edilmektedir. Özellikle bu molekülleri hedeflemenin meme kanseri tedavisinde etkili olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 2.9. CUR'in moleküler hedefleri [82].

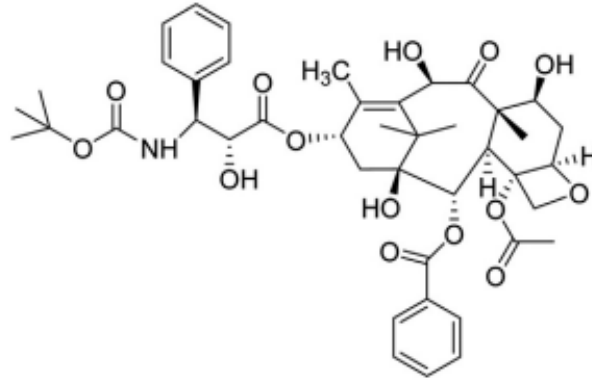
*PI3K, fosfatidilinositol-3-kinaz; NF-κB, nükleer faktör-κB; mTOR, memeli hedefi veya rapamisin; CDK, sikline bağımlı kinaz; uPA, ürokinaz tip plazminojen aktivatörü; MMP, matris metalloproteinaz; insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2; HER2, vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü; VEGFR, vasküler endotelial büyüme faktörü; VEGF, osteopontin; OPN. Sarı, transkripsiyon faktörlerini ve sinyal moleküllerini; yeşil, tümör anjiyogenezini ve büyümeyle ilişkili proteinleri; mavi, tümör proliferasyonu ile ilişkili molekülleri göstermektedir [82].

CUR, i) Hücre döngüsü durmasını ve p53'e bağlı apoptozu indükleyerek; ii) Ras, fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K), protein kinaz B (Akt), rapamisinin memeli hedefi (mTOR) ve Wnt/β-katenin dahil olmak üzere sinyal proteinlerinin ekspresyonunun değiştirilmesi; iii) transkripsiyon faktörlerinin aşağı düzenlenmesi (downregulating); ve iv) tümör büyümesinin ve anjiyogenezin inhibe edilmesi yoluyla meme kanseri hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir (Şekil 2.9) [82].

2.7.2. DTX ve DTX'in Biyolojik Etkileri-Etki Mekanizması

DTX ise taksan grubu, suda çözünmeyen antimitotik bir kemoterapi ajanıdır. DTX, meme kanseri, akciğer kanseri, yumurtalık kanseri vb. gibi çeşitli malignitelere karşı sitotoksik potansiyeli ve klinik etkinliği kanıtlanmış neoplastik ajanlar sınıfına aittir [10]. G2/M fazında hücre döngüsü durmasına yol açan mikrotübül stabilizasyonunu düzenlemekte ve ayrıca kanser hücrelerinde apoptoz ve sitotoksitenin başlamasına yol açmaktadır. DTX, β-tübülün alt ünitelerine yüksek afinite ile bağlanarak, mitozun metafaz aşamasında mikrotübüllerin depolimerizasyonunu engelleyerek etkisini göstermektedir [83]. DTX meme kanseri tedavisinde hem tek başına hem de diğer ajanlarla birlikte kombine olarak kullanılabilir. Meme kanseri tedavisinde altın standart olan taksanların farklı antineoplastik ajanlarla yapılan kombinasyonları, MDR-1 ve Pgp aracılı dışa atım mekanizmaları gibi direnç mekanizmalarını inhibe etmektedir. Bu nedenle özellikle

metastatik ve erken evre meme kanseri olgularında etkinliği kanıtlanmış olan taksanlar ile kombine edilerek kemoduyarlılığı artıracak yeni ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Efluks pompalarının sebep olduğu ilaç direncinin üstesinden gelmek ve inhibisyonu sağlamak amacıyla günümüzde piperin, CUR, naringenin gibi kemoduyarlaştırıcı bileşenlerle kombinasyon tedavileri araştırılmaktadır [76, 84, 85].



şekil 2.10. DTX'in kimyasal yapısı [83].

2.7.3. DTX ve CUR Kombinasyon Tedavisi

CUR'in kanser karştı aktivitesi son zamanlarda kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve gastrointestinal, melanom, genitoüriner, meme ve akciğer kanserlerinde önemli gelişmeler görölmüştür. Ayrıca günde 12g'lık bir tolerans dozuyla anti-inflamatuar aktivite göstermiştir. CUR yüksek lipofilitesi nedeniyle hücre zarlarından serbestçe geçebileceği için olası bir ilaç olarak değerlendirilmesi gündeme gelmiştir. Ancak sulu ortamlardaki çözünürlüğünün düşük olması CUR'i alkali ortamda bozunmaya da duyarlı hale getirmektedir. Bu durum düşük biyoyararlanımının ve terapötik optimum kan konsantrasyonlarına ulaşmak için yüksek dozlara çıkılmasının olası bir nedeni olarak düşünölmektedir [86].

Dian ve ark., oral uygulama yolu ile ilaç dirençli meme kanserini tedavi etmek için D- α - tokoferol poli(etilen glikol) 1000 süksinat (TPGS) bazlı DTX ve CUR'i eş zamanlı yükledikleri miseller hazırlamışlardır [87]. *İn vitro* hücre çalışmasında, DTX+CUR yüklü karışık misellerin sinerjik bir etki oluşturarak, MCF-7/Adr hücrelerinde en yüksek hücresel alımı, sitotoksiteyi, hücre apoptozunu indükleyen oranları ve hücre ROS indükleyen seviyeleri gösterdiği tespit edilmiştir. *İn vivo* farmakokinetik çalışmalar ile, DTX+CUR yüklü karışık misellerin, %574'lük bir göreceli oral biyoyararlanımla, saf

DTX'e kıyasla DTX'in oral emilimini belirgin şekilde artırdığını tespit etmişlerdir. DTX+CUR uygulamasının meme kanseri hücrelerindeki çoklu ilaç direncini aşarak kemosenstizör ve antikanser ilacı arasında sinerjik etkileşimi kolaylaştırdığı, eş zamanlı salımın yan etkileri en aza indirirken terapötik etkileri artırdığı sonuçlarına ulaşmışlardır. Kim ve ark., emülsiyon-çözücü buharlaştırma metodu ile DTX ve CUR'i eş zamanlı yükledikleri nanoboyutlu lipid taşıyıcılar hazırlayıp, meme kanserindeki etkisini araştırmışlardır [88]. Bu çalışmada DTX veya CUR yüklü formülasyonların doza bağlı sitotoksosite gösterdiği tespit edilmiştir. DTX/CUR kombinasyonu 1:3 w/w; a/a olarak çalışıldığında, sırasıyla 0.286 ve 0.130 kombinasyon indeksi değerleriyle hem MCF7 hem de MCF7/ADR meme kanseri hücre hatlarında en güçlü sinerjik etkiyi göstermiştir. İkili tedavinin her iki hücre hattında da apoptozu artırdığı ve MCF7/ADR üç boyutlu küreler üzerinde üstün sinerjistik inhibitör etki gösterdiği tespit edilmiştir. OVCAR3-ksenografıtlı fare modellerinde, DTX ve CUR içeren eş zamanlı tedavinin, diğer tedavi gruplarına kıyasla tümör büyümesini önemli ölçüde durdurduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bayet-Robert ve ark., Faz-I aşamasında gerçekleştirdikleri klinik çalışmada, ilerlemiş veya metastatik meme kanseri olan 14 hastada DTX ve CUR'in uygulanabilirliğini ve tolere edilebilirliğini araştırmışlardır [89]. CUR, yedi gün boyunca günde 500 mg'lık bir dozda oral olarak verilmiştir ve doz sınırlayıcı toksisiteye kadar artırılmıştır. Veriler, DTX (100 mg/m²) ve CUR (500 mg/gün) uygulamasının karsinoembriyonik antijen (CEA) tümör belirtecini azaltarak kemoprevansiyonda ümit verici biyolojik yanıt gösterdiğini ortaya koymuştur. Sağlam ve ark., DTX'in tek başına ve sentetik CUR analogu olan EF24 ile ön koşullamasının ardından DTX uygulamasının, meme kanseri MCF-7 hücrelerindeki hücre çoğalması ve apoptoz üzerindeki etkisini araştırmışlardır [90]. MCF-7 hücrelerine EF24 ön uygulamasının ardından DTX uygulamasının, DTX'in tek başına uygulanmasına göre hücre canlılığını anlamlı ölçüde düşürdüğü tespit edilmiştir. EF24 ön koşullamasının, tek başına DTX uygulamasına kıyasla cMYC ve cFOS genlerinin mRNA düzeylerini anlamlı derecede azalttığı belirlenmiştir. Bu çalışmaya göre MCF-7 hücrelerine EF24 ön uygulamasının, DTX'in tek başına uygulamasına kıyasla hücreleri daha duyarlı hale getirdiği ve kemoterapinin etkisini artırdığı sonucuna ulaşılmıştır.

2.8. İlaç Salım Sistemlerinin Matematiksel Modellenmesi

Matematiksel salım modellemesi, ilaç salım sistemlerinden ilaç salım oranlarını ve difüzyon özelliklerini tahmin etmeye odaklanmaktadır. İlaç salımının kinetiği, bu matematiksel modeller kullanılarak belirlenmektedir [91]. Deneysel verilerin

matematiksel yaklaşımlarla karşılaştırılması yoluyla ilaç taşınmasının ardındaki fiziksel mekanizmaları keşfetmek ve salım kinetiğini iyileştirmek mümkündür. Beklenen ilaç salım oranlarına matematiksel yaklaşımların sistematik olarak uygulanması maliyet ve deney süresinden de tasarruf sağlamaktadır.

2.8.1. Sıfıncı Derece İlaç Salım Kinetik Modeli

Farmakokinetik prensiplerine göre, dozaj formundan ilaç salımı Eşitlik 1 ile gösterilebilir [92, 93]:

$$C_0 - C_t = K_0 \times t$$

$$C_t = C_0 + K_0 \times t \quad (\text{Eşitlik 1})$$

C_t , t zamanında salınan ilaç miktarıdır.

C_0 , t=0 zamanında ilacın başlangıç konsantrasyonudur. (Çoğunlukla $C_0=0$ 'dır.)

K_0 , sıfıncı mertebeye hız sabitidir.

Sıfıncı dereceden kinetik model bir ilaç salım sisteminden sabit ilaç salım sürecini tanımlamaktadır ve bu modele göre kandaki ilaç seviyesi salım boyunca sabit kalmaktadır. *In vitro* salım çalışmasından elde edilen kümülatif ilaç salım verileri zamana karşı grafiğe geçirilir. Çizilen grafiğin eğimi sıfıncı derece hız sabitini verir, korelasyon katsayısı ise ilaç salımının sıfıncı derece kinetik modele uyup uymadığı bilgisini vermektedir. Bazı transdermal sistemlerde, kaplanmış formlarda düşük çözünürlükte ilaç içeren matris tabletlerde, ozmotik sistemlerde vb. gibi çeşitli tipteki modifiye salımlı farmasötik dozaj formlarından ilaç salımını tanımlamak için kullanılabilir.

2.8.2. Birinci Derece İlaç Salım Kinetik Modeli

Birinci derece kinetiği izleyen ilaç salımı Eşitlik 2 ile temsil edilebilir [92, 93]:

$$dC/dt = -K_1 \times C \quad (\text{Eşitlik 2})$$

K_1 , zaman⁻¹ veya saat başına ifade edilen birinci dereceden hız sabitidir.

Birinci dereceden proses, reaksiyona giren ilacın konsantrasyonuyla doğru orantılı olan, yani konsantrasyon arttıkça reaksiyon daha hızlı gerçekleşen proses olarak tanımlanabilir.

Eşitlik 2 yeniden düzenlendikten sonra:

$$\log C = \log C_0 - K_1 \times t / 2.303 \quad (\text{Eşitlik 3})$$

C_0 , ilacın başlangıç konsantrasyonudur.

C , t zamanında kalan ilacın yüzdesidir.

In vitro salım çalışmasından elde edilen ilaç salım kinetiği verilerinin incelenmesi için zamana göre kalan ilacın log %'si çizilir ve çizimin eğimi birinci derece hız sabitini verir. Bu kinetik model gözenekli matrislerde suda çözünen ilaçlar içeren farmasötik dozaj formlarındaki ilaç salımını tanımlamak için kullanılabilir.

2.8.3. Higuchi İlaç Salım Kinetik Modeli

Matris sistemlerinden ilaç salımını tanımlamayı amaçlayan matematiksel bir modelin ilk örneği 1961'de Higuchi tarafından geliştirilmiştir. Başlangıçta düzlemsel sistemler için tasarlanmış, daha sonra farklı geometrik ve gözenekli sistemlere genişletilmiştir. Bu model, (i) matristeki başlangıç ilaç konsantrasyonunun ilaç çözünürlüğünden çok daha yüksek olduğu; (ii) ilaç difüzyonunun yalnızca bir boyutta gerçekleştiği (kenar etkisi ihmal edilebilir düzeyde olmalıdır); (iii) ilaç parçacıklarının sistem kalınlığından çok daha küçük olduğu; (iv) matris şişmesi ve çözünmesinin ihmal edilebilir düzeyde olduğu; (v) ilaç difüzyonunun sabit olduğu ve (vi) salım ortamında her zaman sink koşullarının elde edildiği hipotezlerine dayanmaktadır. Buna göre, basitleştirilmiş Higuchi modeli ifadesi Eşitlik 4 ile gösterilebilir [92, 93]:

$$f_t = Q = K_H \times t^{1/2} \quad (\text{Eşitlik 4})$$

Burada Q , birim alan başına t zamanında salınan ilaç miktarıdır.

K_H , Higuchi modeli salım kinetiği sabitidir.

İlaç salımı çalışmalarından elde edilen veriler zamanın kareköküne karşı kümülatif yüzde ilaç salımı olarak grafiğe geçirilir. Bu matematiksel model, bazı transdermal sistemler, suda çözünen ilaçlar içeren matris tabletler ve çeşitli modifiye salım gösteren farmasötik dozaj formlarından ilaç çözünmesini tanımlamak için kullanılabilir.

2.8.4. Korsmeyer-Peppas İlaç Salım Kinetik Modeli

Korsmeyer ve ark., polimerik bir sistemden ilaç salımını tanımlayan basit bir ilişki türetmiştir (Eşitlik 5).

$$M_t/M_\infty = K \times t^n \quad (\text{Eşitlik 5})$$

Burada M_t/M_∞ , t zamanında salınan ilacın bir kesridir.

K, salım hızı sabitidir.

n, salım üssüdür. n değeri, silindirik şekilli matrisler için farklı salımları karakterize etmek için kullanılır. Bu modelde n değeri Çizelge 2.3'te açıklandığı şekilde ilaç salım mekanizmasını karakterize etmektedir [92, 93].

Çizelge 2.3. Korsmeyer Peppas modeline göre salım mekanizmalarının yorumlanması [94].

Salım Üssü (n)	İlaç Transport Mekanizması	Zamanın Fonksiyonu Olarak Hız	İlaç Salım Mekanizması
n<0.5	Quasi-Fickian Difüzyon	t^n	Şişmeyen matris difüzyonu
0.5	Fickian Difüzyon	$t^{-0.5}$	Şişmeyen matris difüzyonu
0.5<n<1.0	Non-Fickian Difüzyon (Anomalous)	t^{n-1}	Difüzyon+gevşeme (erozyon)
1.0	Case-II Transport	ZamandanBağımsız	Sıfıncı Derece Salım
>1.0	Süper Case-II Transport	t^{n-1}	(gevşeme/erozyon)

2.8.5. Hixson-Crowell İlaç Salım Kinetik Modeli

Hixson-Crowell küp kök yasası, parçacıkların veya tabletlerin yüzey alanında ve çapında bir değişiklik olan sistemlerden ilaç salımını tanımlamaktadır. Bu nedenle, düzenli alanlı parçacıklar hacimlerinin küp köküyle orantılıdır. Yukarıdaki kavramdan yola çıkılarak Hixson-Crowell, ilaç salımı ile zaman arasında bir ilişki kurmuştur ve bu ilişki Eşitlik 6 ile ifade edilmiştir:

$$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = K_{HC} \times t \quad (\text{Eşitlik 6})$$

Burada W_0 , farmasötik dozaj formundaki başlangıç ilaç miktarıdır (0. zamanda kalan ilaç miktarı)

W_t , t zamanında farmasötik dozaj formunda kalan ilaç miktarıdır.

K_{HC} , yüzey hacim ilişkisini tanımlayan Hixson-Crowell sabitidir.

Salım kinetiğini incelemek için, *in vitro* ilaç salım çalışmalarından elde edilen veriler, matriste kalan ilaç yüzdesinin zamana göre küp kökü olarak grafiğe geçirilir. Bu model geleneksel dozaj formunda, dağılıbilir dozaj formunda veya anında salım yapan dozaj formlarındaki salım verilerinin yorumlanması için kullanılmaktadır. Hixson-Crowell modelinin korelasyon katsayısı daha yüksekse, çözünme süreci sırasında yüzey alanındaki değişimin ilaç salımı üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu şeklinde yorum yapılabilir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Ekipman

3.1.1. Kullanılan Madde ve Kimyasal Malzemeler

Çalışmada kullanılan Bovine Serum Albümin (Fraksiyon V) (MW = 68 kDa, 10735078001) Roche firmasından temin edilmiştir.

Etanol (34852-M), Metanol (320290), Asetonitril (34851), Dimetil Sülfoksit (34869), Aseton (270725), Fosfat Tamponu (P3813-10), Kurkumin (C1386), Dosetaksel (PHR1883), Poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit) 50:50 ortalama molekül ağırlığı 7.000-17.000 (719897), Polivinil Alkol (348406), Tween-80 (P1754), Folik asit (F7876), N-hidroksisüksinimid (130672), N-(3-Dimetilaminopropil)-N-etilkarbodiimid hidroklorür (03450) Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir.

Diyaliz torbaları (16 mm çapında-MW 12.000 Da) (D6191) ve diyaliz tüp kapakları (Z371092) da Sigma-Aldrich firmasından tedarik edilmiştir.

Partikül boyutu 5µm ve boyutları 250 × 4.6 mm olan Thermo Scientific Hypersil GOLD C18 özellikteki kolon Thermo Scientific firmasından satın alınmıştır. Tüm deneylerde Thermo Scientific Smart2Pure (Amerika) su arıtma sisteminden elde edilen 18.2 MΩ.cm dirence sahip deiyonize (DI) su kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Çizelge 3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar.

CİHAZ	MARKA	KURUM
Liyofilizatör	Christ Alpha 1-2 LD Plus	Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
HPLC	Thermo Scientific	Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Genesys 10S UV-VIS Spektrofotometre	Thermo Scientific	Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Mekanik Karıştırıcı	AP1n	Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Dijital Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı, MSH-20D	Wisd Laboratory Instruments	Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Ultrasonik Homojenizatör (Sonikatör) HD 2070	Bandelin	Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Ultraturrax (SilentCrusher M)	Heidolph	Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Ultrasonik Banyo	Wisd Laboratory Instruments	Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Peristaltik Pompa	Watson Marlow 120S	Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
pH Metre	Isolab	Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Masaüstü Soğutmalı Ultrasantrifüj (Z 36 HK)	Hermle	Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Hassas Terazı	Sartorius Extend	Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Ultra Saf Su Sistemi, Smart2Pure	Thermo Scientific	Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

3.2. Analitik Yöntem Validasyonları

İn vitro koşullardaki DTX ve CUR miktar tayini analizleri ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) yöntemi ile UV dedektörü kullanılarak çalışılmıştır. CUR ve DTX etkin maddeleri için dalga boyu taraması yapılmış ve en yüksek absorbansın alındığı dalga boyu tespit edilmiştir. DTX ve CUR için kromatografik şartlar Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3’ de özetlenmiştir.

Çizelge 3.2. CUR miktar tayininde kullanılan HPLC yöntem parametreleri.

Mobil Faz	Asetonitril: %0.1 formik asit içeren distile su (50:50, v/v)
Analitik Kolon	C18 Hypersil Gold 5µm, 250mm×4.6mm
Enjeksiyon Hacmi	10 µl
Akış Hızı	0.8 ml/dk
Kolon Sıcaklığı	30 °C
Dedektör-Dalga Boyu	VWD-3×00(RS) Dedektör, 425 nm
Enjeksiyon Süresi	12 dk.

Çizelge 3.3. DTX miktar tayininde kullanılan HPLC yöntem parametreleri.

Mobil Faz	Asetonitril: Distile su (60:40, v/v)
Analitik Kolon	C18 Hypersil Gold 5µm, 250mm×4.6mm
Enjeksiyon Hacmi	10 µl
Akış Hızı	0.8 ml/dk
Kolon Sıcaklığı	30 °C
Dedektör-Dalga Boyu	VWD-3×00(RS) Dedektör, 230 nm
Enjeksiyon Süresi	7 dk.

Kullanılan analitik metotlarda mobil fazlar gradient pompa kullanılarak çalışılmıştır. Miktar tayini analizleri başlatılmadan önce hem HPLC cihazının hem de kullanılan kolonun temizlenmesi ve şartlanması için sistemden en az 30dk süre boyunca mobil faz geçirilmiştir.

3.2.1. Stok ve Standart Çözeltilerin Hazırlanması

CUR'e ait kalibrasyon doğrusunun oluşturulabilmesi için farklı konsantrasyonlarda CUR çözeltileri hazırlanmıştır. 3 mg CUR, 4 ml etanol içinde çözünerek stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözeltiden gerekli miktarlarda seyreltmeler yapılarak 0.5, 1, 5, 10, 20, 40 µg/ml konsantrasyonda 6 farklı çözelti hazırlanmıştır. Tüm stok ve standart çözeltiler amber renkli volümetrik şişeler kullanılarak ışıktan korunmuş ve 4°C' de muhafaza edilmiştir.

DTX'e ait kalibrasyon doğrusunun oluşturulabilmesi için farklı konsantrasyonlarda DTX çözeltileri hazırlanmıştır. 10 mg DTX, 10 ml aseton içinde çözünerek stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözeltiden gerekli miktarlarda seyreltmeler yapılarak 20, 50, 100, 200, 400, 600, 800 µg/ml konsantrasyonda 7 farklı çözelti hazırlanmıştır. Tüm stok ve standart çözeltiler amber renkli volümetrik şişeler kullanılarak ışıktan korunmuş ve 4°C' de muhafaza edilmiştir.

3.2.1.1. Spesifiklik

Kullanılan analitik metotlarda analizi yapılacak etkin maddenin kromatogramlarında, etkene ait piklerin alıkonma zamanında çözücüden, mobil fazdan ve plasebodan gelen herhangi bir pik olmamalıdır. *In vitro* ilaç salım çalışmalarında CUR ve DTX ile etkileşime giren bir maddenin olup olmadığı spesifiklik parametresi ile tespit edilmiştir. Bunun için mobil faz, kullanılan diğer polimerik malzemeler ve etkin maddelerin kendisi her iki metotla analiz edilmiş olup, elde edilen kromatogramlar karşılaştırılarak etkileşim olup olmadığı belirlenmiştir.

3.2.1.2. Doğrusallık ve Aralık

Kullanılan analitik metotlarda analizi yapılacak etkin maddenin lineer cevap ilişkisini kanıtlamak için hazırlanan çözeltilerin pik alanları ölçülmüştür. CUR çözeltisi için 0.5, 1, 5, 10, 20, 40 µg/ml ve DTX çözeltisi için 20, 50, 100, 200, 400, 600, 800 µg/ml konsantrasyonlarında çalışılmıştır.

3.2.1.3. Doğruluk ve Kesinlik

Kullanılan analitik metotlar ile ölçümü yapılan etkin maddelerin gerçek değere ne kadar yakın sonuç verdiği ve ölçüm sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin incelenebilmesi amacıyla doğruluk ve kesinlik parametreleri çalışılmıştır. Belirlenen konsantrasyon

aralığı içinde üç farklı konsantrasyon için çözeltiler üç tekrarlı olacak şekilde hazırlanıp analiz edilmiştir.

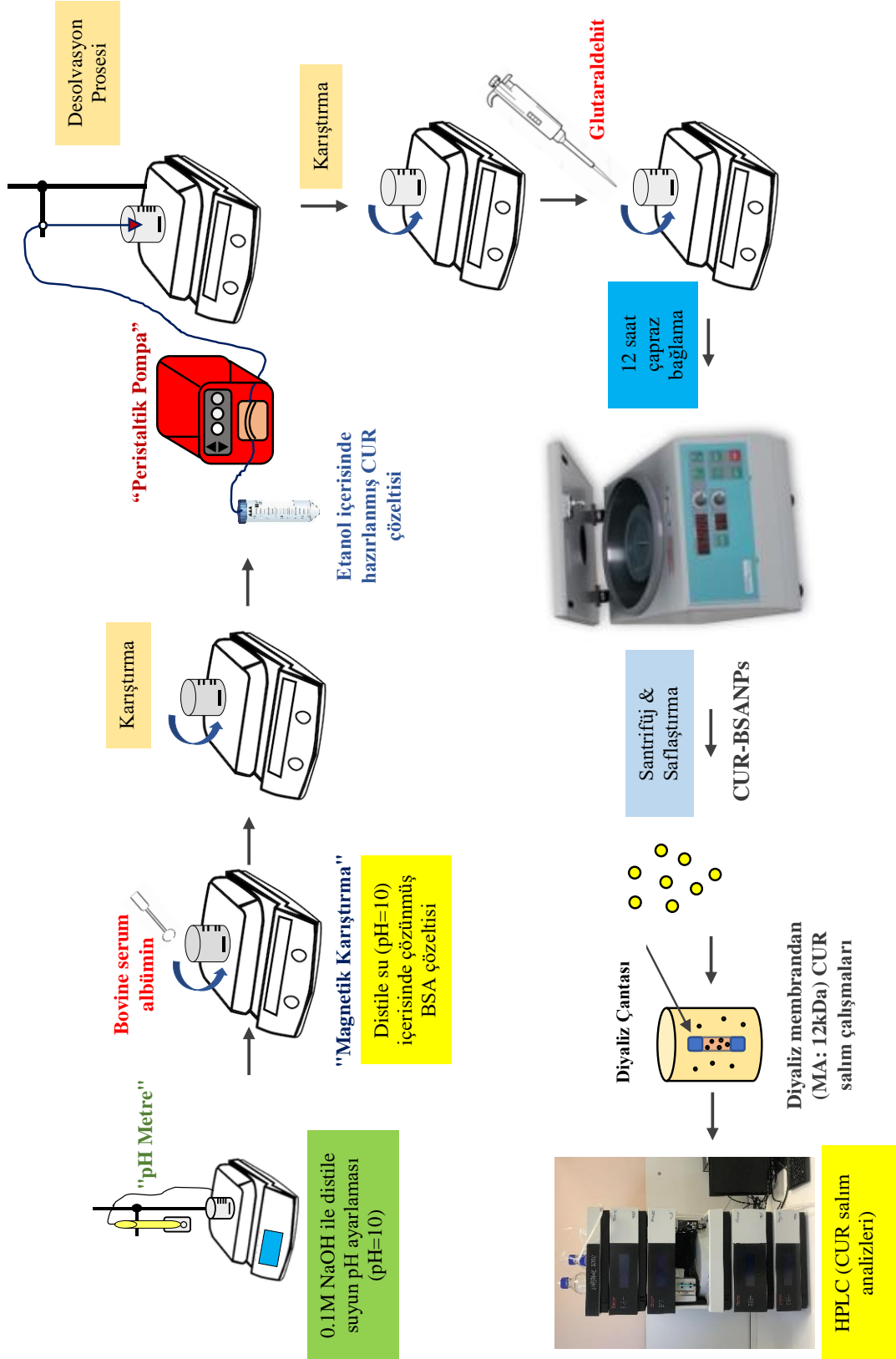
3.3. Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

3.3.1. Albümin Nanopartiküller (BSANPs) ve Kurkumin Yüklü Albümin Nanopartiküller (CUR-BSANPs)'in Hazırlanması

BSANPs desolvasyon tekniği kullanılarak, Gawde vd. [95] tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek sentezlenmiştir (Şekil 3.1). Öncelikle 0.1M NaOH ile distile suyun pH'ı 10.0 olacak şekilde ayarlanmıştır. Belirli miktarlarda tartılan BSA, pH'ı 10.0'a ayarlanmış 2 ml distile su içerisine alınıp, manyetik karıştırıcıda 500 rpm karıştırma hızında çözelti tamamen berrak bir hal alana kadar BSA'nın çözünmesi beklenmiştir. Peristaltik pompa aracılığı ile antisolvent olarak kullanılan etanol, BSA çözeltisine akış hızı 1 ml/dk olacak şekilde ilave edilmiştir. Etanol ekleme işlemi devam ederken çözeltinin rengi bulanık beyaza dönmekte ve bu durum BSANPs'in oluşmaya başladığını göstermektedir. Son aşamada ortama uygun miktarlarda Glutaraldehit çözeltisi (8% w/v) çapraz bağlayıcı olarak ilave edilmiş ve çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Çapraz bağlama süresi sonunda nanopartiküller 3 kere distile su ile yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Her yıkama aşamasında ultrasantrifüjden alınan nanopartiküllerin yeniden distile su içerisinde dağıtılması için 10 saniye prop sonikasyon işlemi uygulanmıştır. Nanopartiküller freeze-dryer kullanılarak kurutulmuş ve 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

BSANPs'in sentezinde çapraz bağlama süresi, albümin konsantrasyonu, pH ve su/etanol oranı değiştirilerek bu parametrelerin BSANPs'in boyut, boyut dağılımı ve polidispersite indeksi üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

CUR-BSANPs'in hazırlanması için de yukarıda anlatılan aynı prosedür uygulanmış ve etanol ekleme aşamasında ortama CUR ilave edilerek sentez gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Albümin Nanopartiküller (BSANPs)'in nanopresipitasyon metodu ile sentez basamaklarının şekilsel gösterimi [96].

3.3.2. Folik Asit ile Konjuge Edilmiş CUR-BSANPs'in Hazırlanması (FA-CUR-BSANPs)

Folik asit (FA), BSANPs'in yüzeylerine 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDC) ve N-hidroksisüksinimit (NHS) çapraz bağlayıcıları kullanılarak kimyasal yöntem ile konjuge edilmiştir [97]. Bu yöntemle göre 5 mg FA 10 ml DMSO' da çözüldükten sonra yaklaşık 700 rpm' de sürekli olarak karıştırılmıştır. Daha sonra 15 mg NHS ve 30 mg EDC karıştırılmakta olan FA çözeltisine eklenmiştir. Oda sıcaklığında karanlık koşullarda reaksiyonun tamamlanması için 1 saat sürekli karıştırma işlemi uygulanmıştır. 100 ml pH 9.8 karbonat tampon çözeltisi hazırlandıktan sonra, bu çözeltiliye önceden sentezi yapılmış olan BSANPs'in uygun miktarı ilave edilmiştir. BSANPs'in tampon çözelti içerisinde homojen bir şekilde dağılmasını sağlayabilmek için sonikasyon işlemi uygulanmıştır. BSANPs'i içeren çözeltiliye, 5 ml aktifleştirilmiş folik asit (DMSO içerisinde) çözeltisi bir peristaltik pompa aracılığı ile damla damla ilave ilave edilmiştir. Nihai çözeltili oda sıcaklığında karanlık koşullarda 12 saat boyunca karıştırılmaya bırakılmıştır. Son aşamada santrifüj işlemi uygulanmış ve hazırlanan partiküller freeze-dryer kullanılarak kurutulmuştur. Aynı prosedür CUR içermeyen BSANPs-FA sentezi için de uygulanmıştır. CUR içermeyen BSANPs karbonat tampon çözeltisine eklenmiş ve ardından aynı sentez yöntemi kullanılmıştır.

3.3.3. PLGANPs'in ve Doseksel yüklü PLGANPs (PLGA-DTX-NPs)'in Hazırlanması

PLGA nanopartikülleri nanopresipitasyon metoduna göre sentezlenmiştir [13]. Bu yöntemle göre öncelikle 30 mg PLGA, 3 ml asetonda çözülmüş ve 500 rpm karıştırma hızında manyetik karıştırıcıda tam çözünme gerçekleşinceye kadar karıştırılmaya devam edilmiştir (Organik Faz). 0.1g PVA (%1) 10 ml distile suya eklendikten sonra çözünmenin gerçekleşmesi için sıcaklık 80°C'ye çıkarılmış, ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda 300 rpm'de karıştırılma işlemi devam ettirilmiştir. Tam çözünmenin olduğu kontrol edildikten sonra sıcaklık 25 °C'ye düşürülmüş ve çözeltili ortam koşullarına gelene kadar beklenmiştir (Sulu Faz). %1'lik 10 ml PVA çözeltisi 5000 rpm'de Heidolph marka yüksek karıştırılmalı homojenizatörde karıştırılmaya başlanmış ve daha sonra hazırlanan PLGA çözeltisi 0.5 ml/dk'da damla damla, karıştırılmakta olan PVA çözeltisine peristaltik pompa kullanılarak eklenmiştir. Ekleme işlemi tamamlandıktan sonra prob-sonikatör ile 10 saniye açık-kapalı olacak şekilde 2 tur sonikasyon işlemi uygulanmıştır. Nihai çözeltili organik fazın uçurulması için bir gece manyetik karıştırıcıda bekletilmiştir.

Partiküllerin saflaştırılması için 30000 rpm' de 3 dk olacak şekilde ultrasantrifüj işlemi yapılmış ve örnekler 3 kez saf su ile yıkanmıştır. Son aşamada freeze-dryer kullanılarak 24 saat boyunca kurutma işlemi yapılmıştır.

PLGA-DTX-NPs'in hazırlanması için de yukarıda anlatılan aynı prosedür uygulanmış ve organik faz içerisine uygun miktarlarda DTX eklenip sentez işlemine devam edilmiştir.

3.3.4. PLGA-BSA-NPs'in ve Dositaksel Yüklü PLGA-BSA-NPs (PLGA-DTX-BSA-NPs)'in Hazırlanması

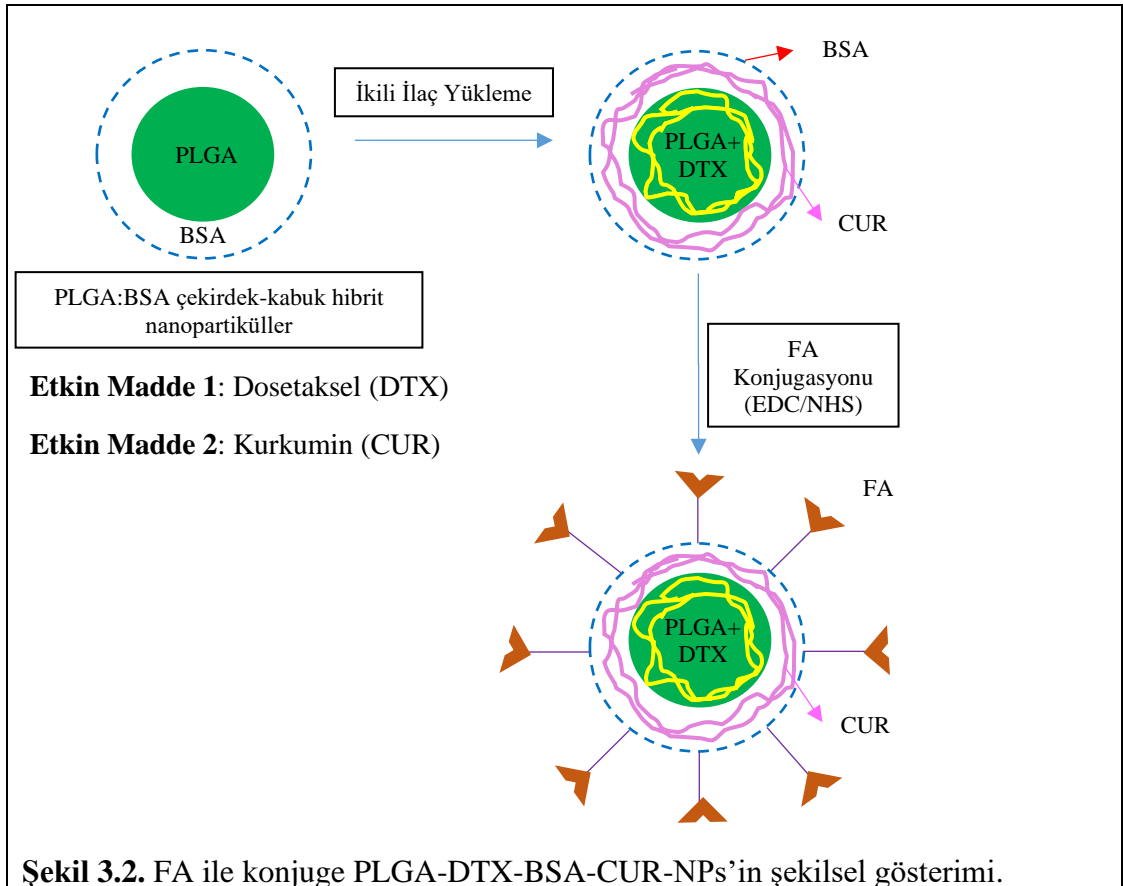
PLGA-BSA-NPs'i Kotova vd. tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek hazırlanmıştır [98]. Öncelikle 30 mg PLGA, 1 ml asetonda çözülmüş ve 500 rpm karıştırma hızında manyetik karıştırıcıda tam çözünme gerçekleşinceye kadar karıştırılmaya devam edilmiştir (Organik Faz). Sulu faz için %0.5'lik BSA çözeltisi (10 ml) hazırlanmıştır ve Heidolph marka yüksek karıştırmalı homojenizatörde yaklaşık 17000 rpm'de sulu faza karıştırma işlemi uygulanmıştır. Sonraki aşamada çekirdek-kabuk nanopartikülleri oluşturabilmek ve PLGA arayüzeyine BSA'nın gömülmesi için organik faz bir peristaltik pompa aracılığı ile homojenizatörde 17000 rpm'de karıştırılmakta olan sulu faza 0.5 ml/dk'da damla damla eklenmiştir. Ekleme işlemi tamamlandıktan sonra yaklaşık 1 dakika daha homojenizatörde bekletilen son karışıma, prob-sonikatör ile 10 saniye açık-kapalı olacak şekilde 2 tur sonikasyon işlemi uygulanmıştır. Son aşamada Glutaraldehit çözeltisi (8% w/v) ortama ilave edilerek BSA kabuk kısmının stabilitesi çapraz bağlama ile artırılmıştır. Nihai çözelti organik fazın uçurulması için bir gece manyetik karıştırıcıda bekletilmiştir. Partiküllerin saflaştırılması için 30000 rpm' de 3 dk olacak şekilde ultrasantrifüj işlemi yapılmış ve örnekler 3 kez saf su ile yıkanmıştır. Son aşamada freeze-dryer kullanılarak 24 saat boyunca kurutma işlemi yapılmıştır. DTX Yüklü PLGA-BSA-NPs (PLGA-DTX-BSA-NPs)'in hazırlanması için de yukarıda anlatılan aynı prosedür uygulanmış ve organik faz içerisine uygun miktarlarda DTX eklenip sentez işlemine devam edilmiştir.

3.3.5. Kurkumin Yüklü PLGA-DTX-BSA-NPs (PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs) ve FA-PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'in Hazırlanması

Kurkumin yüklü PLGA-DTX-BSA-NPs (PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs)'i hazırlamak için PLGA-DTX-BSA-NP sentezinde kullanılan yöntem modifiye edilmiştir. PLGA-DTX-BSA-NP sentezinde sulu faz hazırlama aşamasında ortama CUR'in istenen

konsantrasyonda hazırlanan çözeltisi enjekte edilmiştir. Diğer tüm basamaklar aynı olacak şekilde sentez gerçekleştirilmiş ve PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs hazırlanmıştır.

FA ile konjuge PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'in hazırlanması için 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDC) ve N-hidroksisüksinimit (NHS) çapraz bağlayıcıları kullanılarak kimyasal yöntem ile konjuge edilmiştir [97, 99]. Bu yöntemle göre 5 mg FA 10 ml DMSO' da çözüldükten sonra yaklaşık 700 rpm' de sürekli olarak karıştırılmıştır. Daha sonra 15 mg NHS ve 30 mg EDC karıştırılmakta olan FA çözeltisine eklenmiştir. Oda sıcaklığında karanlık koşullarda reaksiyonun tamamlanması için 1 saat sürekli karıştırma işlemi uygulanmıştır. 100 ml pH 9.8 karbonat tampon çözeltisi hazırlandıktan sonra, bu çözeltiye önceden sentezi yapılmış olan PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'in uygun miktarı ilave edilmiştir. PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'in tampon çözelti içerisinde homojen bir şekilde dağılmasını sağlayabilmek için sonikasyon işlemi uygulanmıştır. PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'i içeren çözeltiye, 5 ml aktifleştirilmiş folik asit (DMSO içerisinde) çözeltisi bir peristaltik pompa aracılığı ile damla damla ilave edilmiştir. Nihai çözelti oda sıcaklığında karanlık koşullarda 3 saat boyunca karıştırılmaya bırakılmıştır. Son aşamada santrifüj işlemi uygulanmış ve hazırlanan partiküller freeze-dryer kullanılarak kurutulmuştur (Şekil 3.2).



3.4. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.4.1. Nanopartiküllerin Boyut Dağılımı ve Polidispersite İndeksi Analizleri

BSANPs, CUR-BSANPs, FA-CUR-BSANPs, PLGANPs, PLGA-DTX-NPs, PLGA-BSA-NPs, PLGA-DTX-BSA-NPs ve PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'in hidrodinamik çap ve boyut dağılımı 25 °C'de Malvern Zetasizer Nano ZSP kullanılarak Dynamic Light Scattering ölçüm prensibi ile belirlenmiştir. Boyut ve boyut dağılımını belirleyebilmek için Zetasizer analizinden önce desolvatize edilmiş numuneler distile su ile belirli oranda seyreltilmiştir ve 3 ölçüm alınmıştır.

3.4.2. Hazırlanan Formülasyonların Morfolojik Analiz Çalışmaları

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının yüzey morfolojilerinin incelenebilmesi amacıyla seyreltilmiş numuneler alüminyum stublar üzerinde kurutulmuştur. Numuneler yaklaşık 8nm altın ile kaplanmış ve Tescan marka GAIA3+Oxford XMax 150 EDS model FIB-SEM cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. SEM analizleri Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde cihazdan sorumlu uzman tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.4.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre (FTIR) Analizi

BSA, PLGA, CUR, FA, BSANPs, CUR-BSANPs, FA-CUR-BSANPs, PLGANPs, PLGA-DTX-NPs, PLGA-BSA-NPs, PLGA-DTX-BSA-NPs ve PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs yapılarının fonksiyonel grupların belirlenebilmesi ve karşılaştırmalarının yapılabilmesi amacıyla, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) analizi yapıp, FTIR spektrumları çıkarılmıştır. Analizler Thermo Scientific marka Nicolet 6700 model spektrofotometrede 4000-400 cm^{-1} dalga sayısında, 16 çözünürlükte ve 32 kez taranarak gerçekleştirilmiştir. FTIR analizleri Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nde çalışılmıştır.

3.4.4. X ışını kırınımı (XRD) Analizleri

X ışını kırınımı analizi CUR ve CUR-BSANPs için ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda Rigaku Ultima IV model XRD cihazında ve DTX, PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs için Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde Malvern Aeris Model XRD cihazında kristalin yapılarının belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla toz halindeki örneklerin her biri tarama derecesi $5^\circ \leq 2\theta \leq 90^\circ$ ve tarama hızı 1°/dk esas alınarak gerçekleştirilmiştir.

3.4.5. TGA-DSC Analizleri

SII Exstar6000 marka TG/DTA6300 model cihazda, dakikada 10 °C ısıtma hızında, 30-600 °C sıcaklık değişimi için, 200 ml/dk azot akışında partiküllerin saf halleri ve modifikasyon sonrası halleri için TGA analizi yapılmıştır. Öte yandan hazırlanan formülasyonların ve kullanılan malzemelerin saf hallerinin termal davranışını belirleyebilmek için diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) cihazında analiz yapılmıştır. Numuneler 20 ml/dk'lık azot gazı ortamında, 30°C'den 600°C'ye 10°C/dk'lık ısıtma hızı kullanılarak bir termal prosedüre tabi tutulup analiz edilmiştir. TGA-DSC analizleri Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nde çalışılmıştır.

3.4.6. Temas Açısı (Gonyometre) Analizi

Biolin Scientific marka Attension Theta model cihazda BSA, PLGA ve PLGA-BSA-NPs için yüzeyin ıslanabilirliği, hidrofobik ya da hidrofilik özelliklerinin belirlenebilmesi için su temas açısı değerlerinin ölçümü Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde cihazdan sorumlu uzman tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.5. Enkapsülasyon Verimliliği ve Yükleme Kapasitesinin Hesaplanması

CUR ve DTX enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi, serbest CUR ve DTX miktarının HPLC (Thermo Scientific) ile ölçülmesi yoluyla değerlendirilmiştir. CUR-BSANPs içerisindeki CUR miktarı indirekt yöntem aracılığıyla, sentez sonrası nanopartikül saflaştırma basamağında ultrasantrifüj işlemi ile elde edilen süpernatant içerisindeki CUR miktarı hesaplanarak bulunmuştur. Nanopartiküllerin santrifüjünden elde edilen süpernatant, etanol ile seyreltilmiş ve HPLC ile analiz edilmiştir. Ticari CUR içerisindeki kurkuminoidlerin birbiri ile başarılı bir şekilde ayrıldığı kromatogram Şekil 4.1'de görülmektedir.

PLGA-DTX-NPs, PLGA-DTX-BSA-NPs ve PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs içerisindeki DTX miktarı ise direkt yöntem aracılığı ile (Sentez sonrası kurutulmuş nanopartikül formülasyonlarının uygun bir çözücüde çözülmesi ve HPLC ile ölçülmesi esasına dayanan) hesaplanmıştır. Enkapsülasyon verimliliği (EE) ve yükleme kapasitesi (LC) sırasıyla Eşitlik (7) ve Eşitlik (8) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Enkapsülasyon Verimi (EE)(\%)} = \frac{\text{Toplam İlaç} - \text{Serbest İlaç}}{\text{Toplam İlaç}} \times 100 \quad \text{Eşitlik (7)}$$

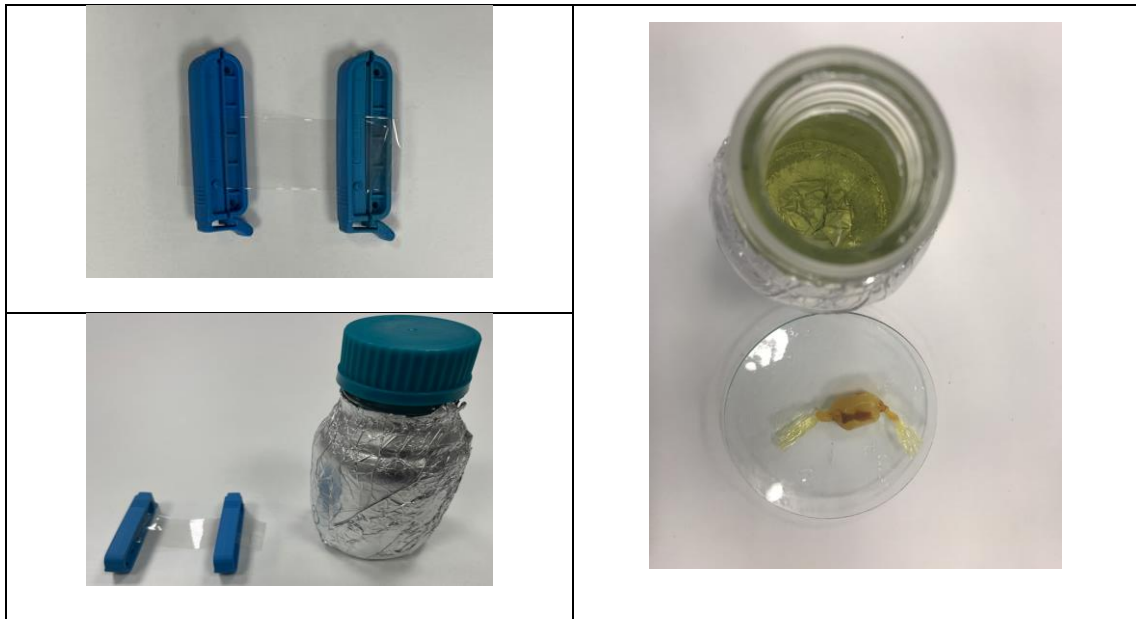
$$\text{Yükleme Kapasitesi (LC)(\%)} = \frac{\text{Toplam İlaç} - \text{Serbest İlaç}}{\text{Nanopartikül Miktarı}} \times 100 \quad \text{Eşitlik (8)}$$

3.6. *In Vitro* İlaç Salım Çalışmaları

Hazırlanan formülasyonlardan CUR ve DTX salım davranışının değerlendirilmesi için *in vivo* koşullara uygun olarak pH 5.6 ve pH 7.4'te hazırlanan PBS tampon ortamları (Etanol ve Tween-80 içeren) kullanılmıştır [55, 100]. Hidrofobik ilaç salımını kolaylaştırmak ve sink koşulu korumak için ortama %1 (v/v) Tween-80 ilave edilmiştir. CUR ve DTX salım deneyleri diyaliz metodu ile gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan formülasyonlardan *in vitro* CUR ve DTX salımı 37°C'de salım ortamına daldırılan nanopartikül formülasyonlarının uygun miktarını içeren bir diyaliz membran (Molekül Ağırlığı: 12kDa) torbada gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3). Diyaliz torbası, salım deneyleri öncesi saf suda yaklaşık 12 saat şartlandırılmıştır. Salım deneyleri için sabit karıştırma hızında (120 rpm) ve 37°C ortam sıcaklığında çalıştırılan inkübatör kullanılmıştır. Önceden belirlenen zaman aralıklarında salım ortamından alınan örneklerdeki CUR ve DTX miktarı HPLC ile analiz edilip, alınan örnek miktarı kadar taze tampon ortama ilave edilmiştir.

Kümülatif CUR ve DTX salımı, zamana karşı aşağıdaki Eşitlik (9)' e göre hesaplanan kümülatif salım yüzdelerinin (%) grafiği çizilerek değerlendirilmiştir.

$$\text{Kümülatif İlaç Salımı (\%)} = \frac{\text{Serbest kalan ilaç miktarı}}{\text{Toplam ilaç miktarı}} \times 100 \quad \text{Eşitlik (9)}$$



Şekil 3.3. *In vitro* ilaç salım çalışmalarında kullanılan selüloz diyaliz membranlarının (MA: 12kDa) ve salım ortamını içeren sistemin şekilsel gösterimi.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Analitik Yöntem Validasyonları

4.1.1. CUR için Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu

CUR için analitik metot geliştirme çalışmalarına başlanmadan önce kapsamlı farmakope ve literatür taraması yapılmıştır. Farmakope kaydı olan CUR'in aynı zamanda in house miktar tayini metotlarını içeren literatür kaynakları [101-105] kullanılarak denenmiş ve nihai yöntem tespit edilip kısmi validasyonu yapılmıştır.

Ticari zerdaçal ürünündeki kurkuminoidleri birbirinden başarılı bir şekilde ayırabilmek ve tek başlarına keskin pikler elde edebilmek için geliştirilen miktar tayini metodunda kurkuminoidler başarılı bir şekilde ayrılabilmiştir (Şekil 4.1). Bunun için mobil faz olarak asetonitril ve %0.1 formik asit içeren distile su seçilmiştir ve mobil faz oranı 50:50 olacak şekilde çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

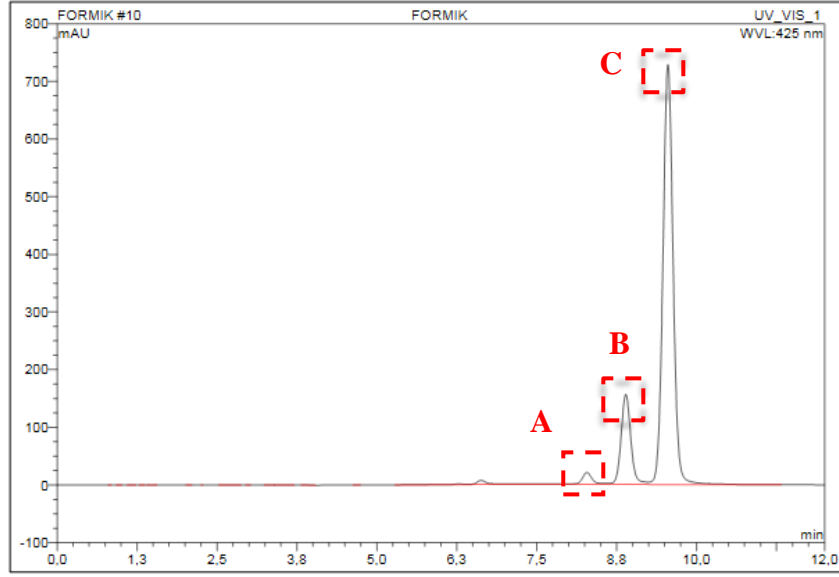
Spesifiklik

Kullanılan mobil fazlar, çözücüler, PLGA, BSA, PBS salım ortamı, DTX ve CUR çözeltileri geliştirilen miktar tayini metodu ile sisteme tek tek enjekte edilmiş olup HPLC kromatogramları alınmıştır. Bu kromatogramlar tek başına CUR çözeltisi kromatogramı ile karşılaştırma yapılması için üst üste çakıştırılmış ve CUR'in alıkonma zamanında diğer bileşenlerden gelen herhangi istenmeyen bir pikin CUR piki ile girişim yapmadığı görülmüştür. Yöntemin CUR için spesifikliği kanıtlanmıştır (Şekil 4.1.).

Şekil 4.1' de görüldüğü üzere mobil fazdaki distile suya %0.1 formik asit ilavesi, bileşenler için ayrı ayrı keskin pikler elde edilmesini sağlamıştır. Formik asit konsantrasyonundaki artış ve azalışlar pik şekillerini önemli olacak şekilde değiştirmemiştir ve literatürle uyumlu olarak %0.1'lik formik asit yeterli olmuştur.

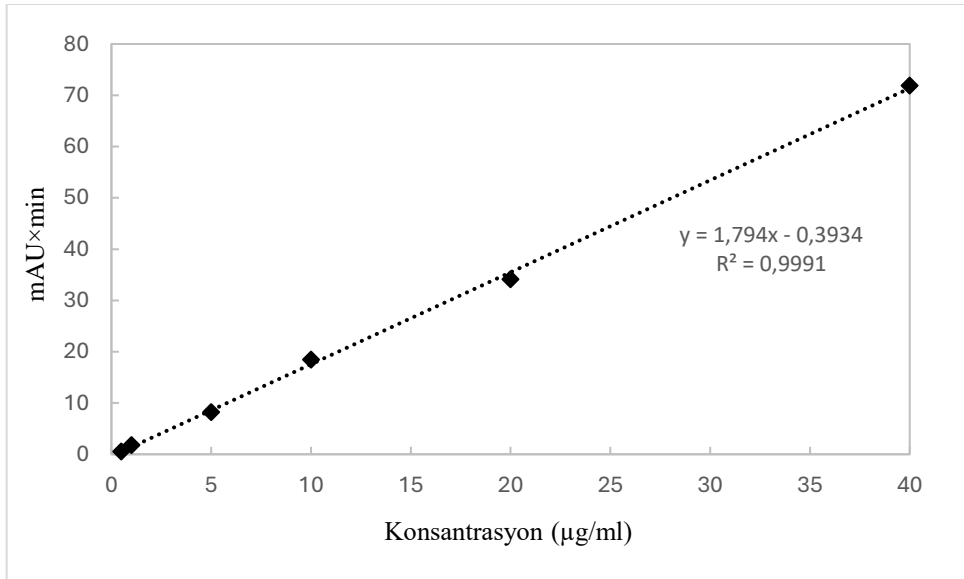
Doğrusallık ve Aralık

CUR standart çözeltileri HPLC sistemine enjekte edildikten sonra, CUR'e ait piklerin altında kalan alanların, CUR konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilmesi ile Şekil 4.2' de verilen doğru elde edilmiştir. CUR'in HPLC miktar tayini ile elde edilen lineer regresyon verileri Çizelge 4.1' de verilmiştir. Korelasyon katsayısı $R^2=0.9991$ olarak bulunmuş ve yöntemin bu yüksek korelasyon katsayısı değeri ile doğrusal olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Asetonitril ve %0.1 formik asit içeren distile su (50:50) kullanılarak oluşturulan HPLC kromatogramı.

* C: Kurkumin, B: Demetoksikurkumin, A: Bisdemetoksikurkumin.



Şekil 4.2. CUR'in HPLC analiziyle elde edilen kalibrasyon doğrusu.

Çizelge 4.1. CUR' in HPLC ile miktar tayini yönteminde elde edilen regresyon verileri.

Parametre	Sonuç
Konsantrasyon Aralığı	0.5, 1, 5, 10, 20, 40 µg/ml
Eğim (m)	1.794
İntersept (n)	-0.3934
Korelasyon Katsayısı	0.999

Doğruluk ve Kesinlik

Analitik yöntemin doğruluğunu araştırmak amacıyla aynı gün içerisinde 3 tekrarlı ve günler arası (3 gün art arda) miktar tayini analizleri gerçekleştirilmiş olup varyasyon katsayısı değerleri %2'nin altında, geri kazanım değerleri ise %98-102 aralığında bulunmuştur (Çizelge 4.2). Elde edilen sonuçlar ile yöntemin uygun doğrulukta olduğu gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. CUR'in HPLC miktar tayini yönteminde elde edilen gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik bulguları.

CUR Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Gün İçi			Günler Arası		
	Ortalama (µg/ml)	Geri Elde (%)	Varyasyon Katsayısı (%)	Ortalama (µg/ml)	Geri Elde (%)	Varyasyon Katsayısı (%)
10	10.11	101.05	0.38	9.81	98.08	1.82
20	20.16	100.82	1.66	20.24	101.20	0.82
40	40.14	100.36	0.79	40.55	101.37	0.56

4.1.2. DTX için Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu

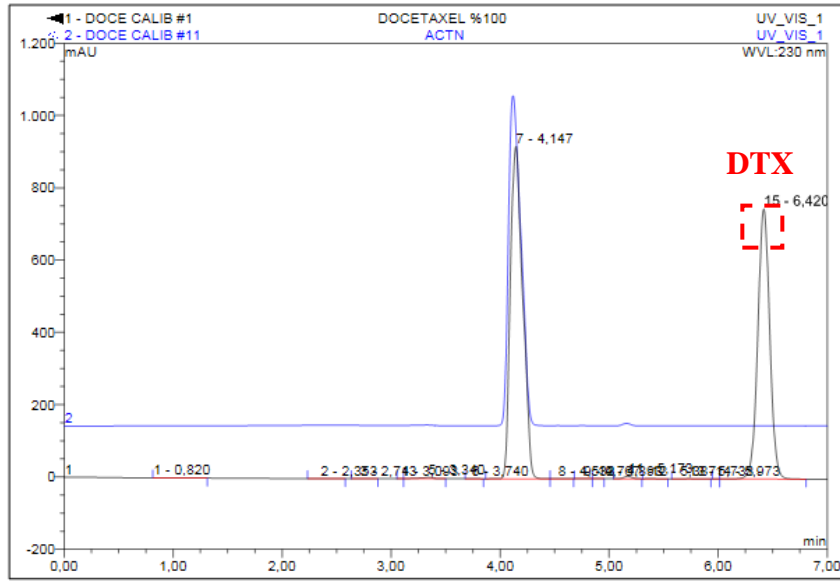
DTX için analitik metot geliştirme çalışmalarına başlanmadan önce kapsamlı farmakope ve literatür taraması yapılmıştır. Farmakope kaydı olan DTX'in aynı zamanda in house miktar tayini metotlarını içeren literatür kaynakları [106-110] kullanılarak denenmiş ve nihai yöntem tespit edilip kısmi validasyonu yapılmıştır. Bunun için mobil faz olarak asetonitril ve distile su seçilmiştir ve mobil faz oranı 60:40 olacak şekilde çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Spesifiklik

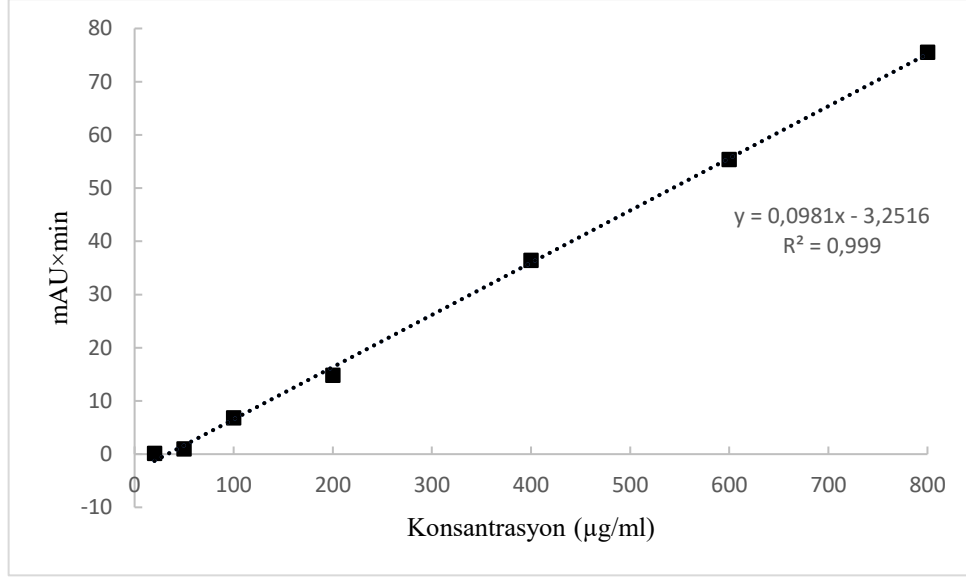
Kullanılan mobil fazlar, çözücüler, PLGA, BSA, PBS salım ortamı, DTX ve CUR çözeltileri geliştirilen miktar tayini metodu ile sisteme tek tek enjekte edilmiş olup HPLC kromatogramları alınmıştır. Bu kromatogramlar tek başına DTX çözeltisi kromatogramı ile karşılaştırma yapılması için üst üste çakıştırılmış ve DTX'in alıkonma zamanında diğer bileşenlerden gelen herhangi istenmeyen bir pikin DTX piki ile girişim yapmadığı görülmüştür (Şekil 4.3). Yöntemin DTX için spesifikliği kanıtlanmıştır.

Doğrusallık ve Aralık

DTX standart çözeltileri HPLC sistemine enjekte edildikten sonra, DTX'e ait piklerin altında kalan alanların, DTX konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilmesi ile Şekil 4.4'te de verilen doğru elde edilmiştir. DTX'in HPLC miktar tayini ile elde edilen lineer regresyon verileri Çizelge 4.3' te verilmiştir. Korelasyon katsayısı $R^2=0.999$ olarak bulunmuş ve yöntemin bu yüksek korelasyon katsayısı değeri ile doğrusal olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Asetonitril ve distile su (60:40) kullanılarak oluşturulan HPLC kromatogramı.



Şekil 4.4. DTX'in HPLC analiziyle elde edilen kalibrasyon doğrusu.

Çizelge 4.3. DTX' in HPLC ile miktar tayini yönteminde elde edilen regresyon verileri.

Parametre	Sonuç
Konsantrasyon Aralığı	20, 50, 100, 200, 400, 600, 800 µg/ml
Eğim (m)	0.098
İntersept (n)	3.2516
Korelasyon Katsayısı	0.999

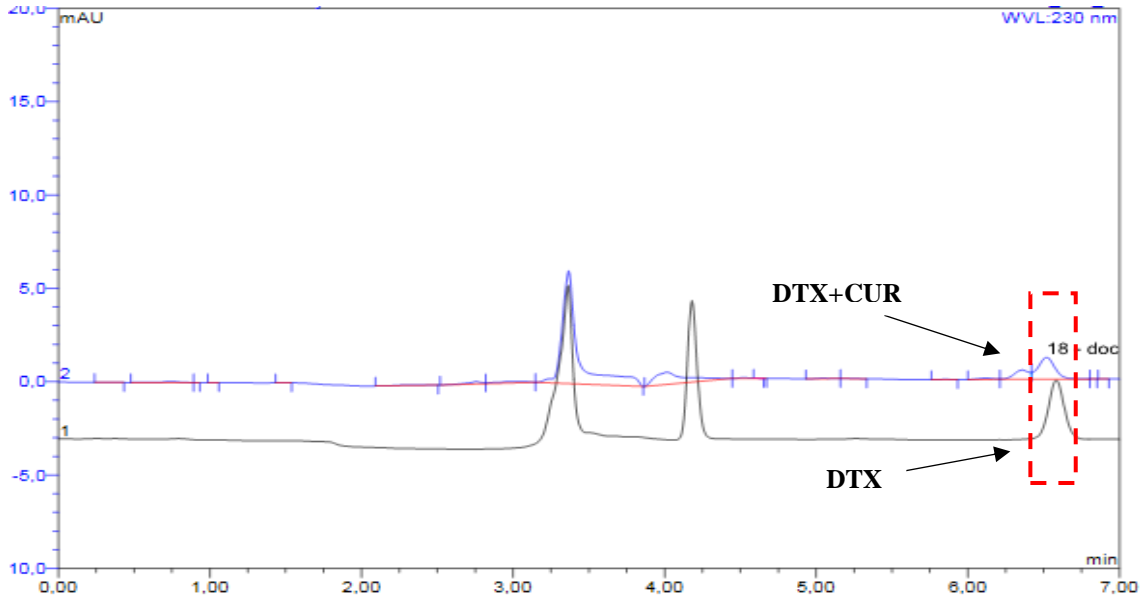
Doğruluk ve Kesinlik

Analitik yöntemin doğruluğunu araştırmak amacıyla aynı gün içerisinde 3 tekrarlı ve günler arası (3 gün art arda) miktar tayini analizleri gerçekleştirilmiş olup varyasyon katsayısı değerleri %2'nin altında, geri kazanım değerleri ise %98-102 aralığında bulunmuştur (Çizelge 4.4). Elde edilen sonuçlar ile DTX miktar tayini yönteminin uygun doğrulukta olduğu gösterilmiştir.

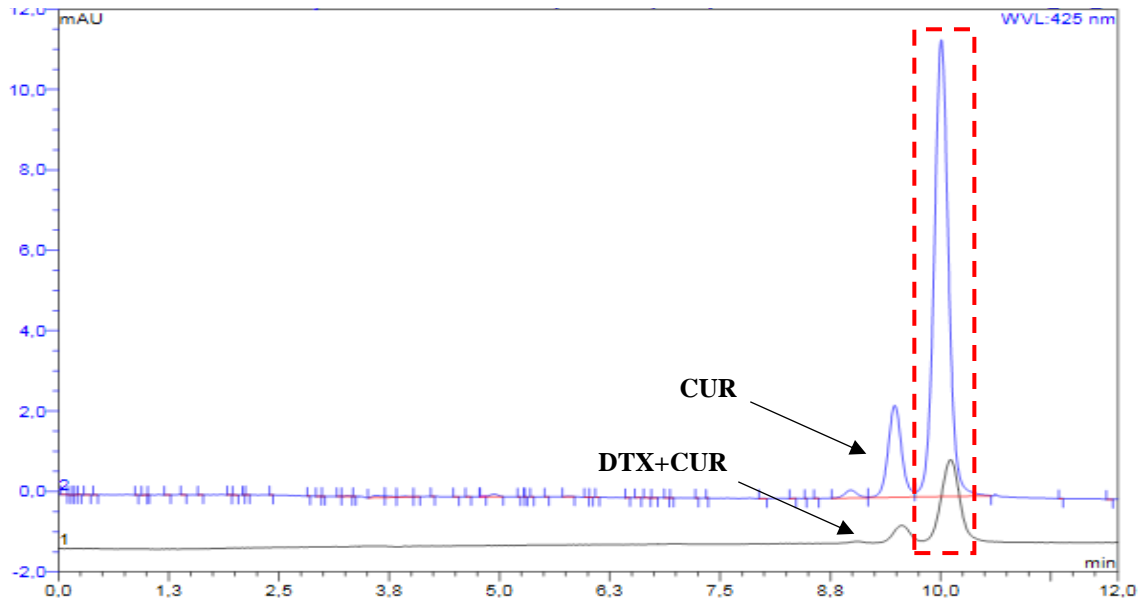
Çizelge 4.4. DTX'in HPLC miktar tayini yönteminde elde edilen gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik bulguları.

DTX Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Gün İçi			Günler Arası		
	Ortalama (µg/ml)	Geri Elde (%)	Varyasyon Katsayısı (%)	Ortalama (µg/ml)	Geri Elde (%)	Varyasyon Katsayısı (%)
50	50.26	100.53	1.63	50.01	100.00	1.45
100	101.90	101.90	0.56	101.55	101.55	0.62
200	197.41	98.71	0.68	196.32	98.16	0.23

DTX ve CUR içeren ikili ilaç salım çalışmaları için *in vitro* salım ortamında her 2 etken maddenin de olduğu durumda ayrı ayrı DTX ve CUR miktar tayini metotlarıyla elde edilen numune kromatogramları Şekil 4.5 ve Şekil 4.6’da verilmiştir. CUR’in 230 nm’de (DTX’in miktar tayini metodunda çalışılan dalga boyu) çok zayıf da olsa bir absorbans gösterdiği tespit edilmiştir ancak bu durum kurkuminoidlerin DTX’den ayrılması için bir engel oluşturmamıştır, rezolüsyon değeri yaklaşık 2.55 olarak bulunmuştur ve etkin maddeler başarılı bir şekilde birbirinden ayrılmıştır.



Şekil 4.5. DTX ve CUR içeren ikili karışımda DTX miktar tayini metodu ile elde edilen numune kromatogramının, tek başına DTX kromatogramı ile karşılaştırılması.



Şekil 4.6. DTX ve CUR içeren ikili karışımda CUR miktar tayini metodu ile elde edilen numune kromatogramının, tek başına CUR kromatogramı ile karşılaştırılması.

4.2. BSANPs ve CUR-BSANPs'lerin Optimizasyonu, Karakterizasyon ve İlaç Salım Çalışmaları

4.2.1. Partikül Boyutu ve Polidispersite İndeksi Analizleri

BSANPs'lerin ve CUR-BSANPs'lerin sentezinde çapraz bağlama süresi, BSA konsantrasyonu, pH ve su/etanol oranı değiştirilerek bu parametrelerin hazırlanan formülasyonların boyut, boyut dağılımı ve polidispersite indeksi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

4.2.1.1. Çapraz Bağlama Süresi

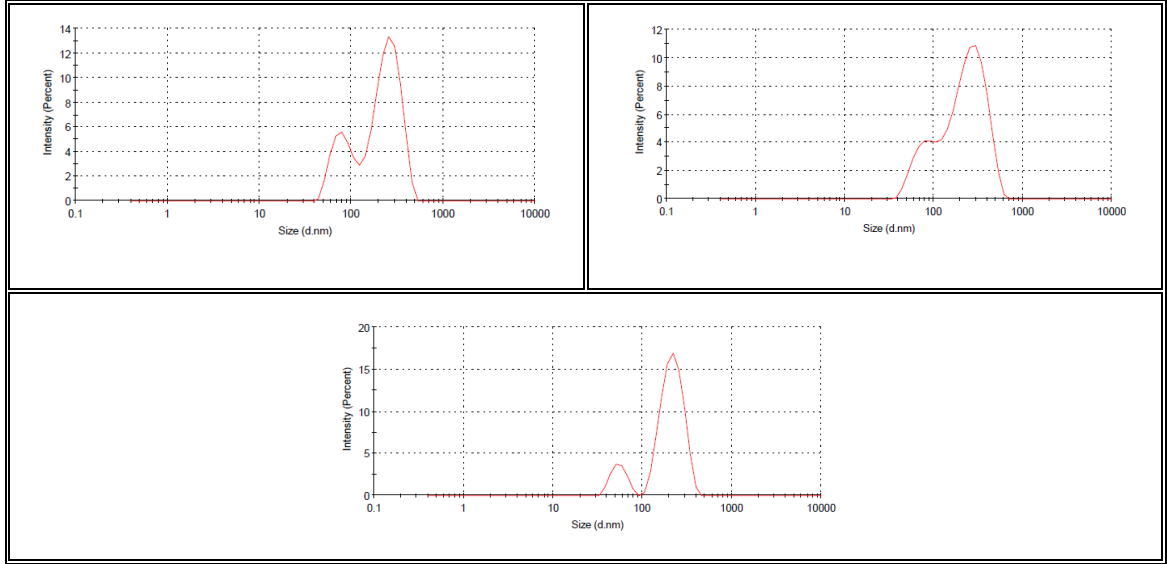
Çapraz bağlama süresinin partikül boyutu üzerine etkisinin incelenebilmesi amacıyla 25 mg/ml BSA konsantrasyonunda 12 ve 24 saat olacak şekilde 2 farklı sürede ve 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır.

Çapraz bağlama etkisinin belirlenebilmesi amacıyla gerçekleştirilen BSANP sentezi ön denemelerinde BSA distile suda çözüldükten sonra pH ayarlaması yapılmıştır. Toz formdaki BSA distile su içerisinde çözüldükten sonra, pH ayarlaması yapıldığında desolvasyon işlemi tam olarak gerçekleştirilememekte, bu metot ile çalışıldığında yeniden üretilebilirlik oldukça düşük olmaktadır. Bu sebeple BSANP sentezi için gerçekleştirilecek yöntemde saf suyun pH'ı önceden ayarlanıp daha sonra etanol ile desolvasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

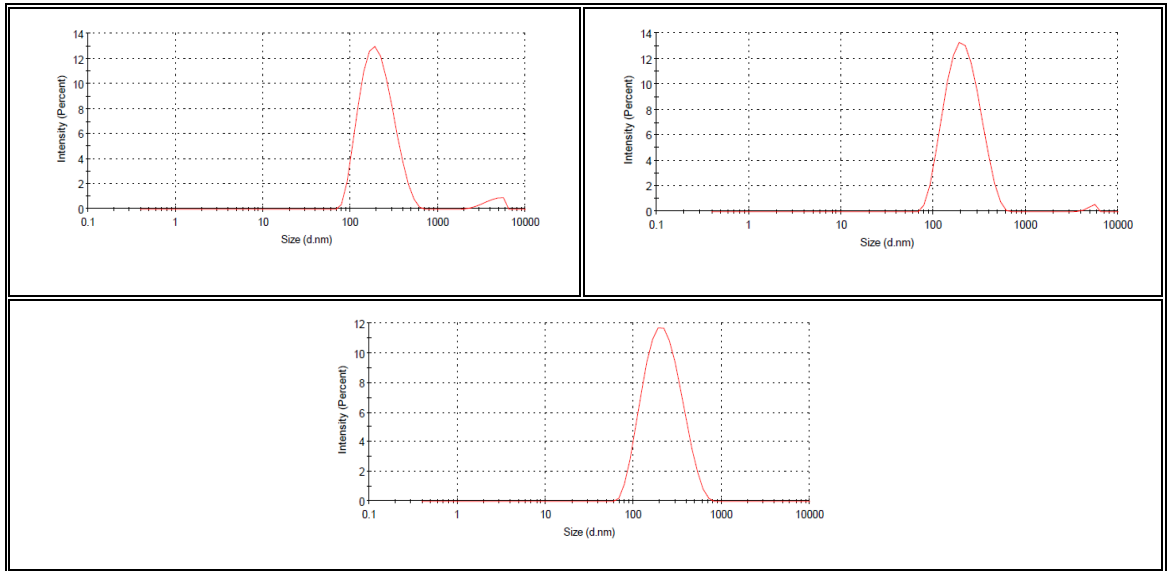
Gerçekleştirilen çok sayıda BSANP sentezi denemelerinde etanol ekleme sırası ve sonrasında çözeltilerde bir renk değişimi gözlemlenememiş, çözeltilerde saydam bir opaklık oluştuğu görülmüştür. Bu durum, BSA çözeltilisine etanolün damla damla eklenme aşamasında, etanol damlacıklarının sabit düştüğü noktada çözücü yoğunluğunun artması ve karıştırmanın tam olarak etkili olmaması ile açıklanabilir [111]. Bu sebeple daha sonra gerçekleştirilen sentez yöntemlerinde peristaltik pompa kullanılarak etanol ekleme aşamasında şırınga ucu çözelti içerisine daldırılmış ve bu sayede belirli bir bölgede çözücü yoğunluğu oluşmasına izin verilmemiş, etkili bir karıştırma yapılabilmektedir.

Partikül boyut dağılım eğrileri (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8) incelendiğinde ikili pik oluşumu mevcut olan durumlar ortamda çözülmemiş polimer, serbest ilaç ve nanoformülasyonların mevcut olduğunu göstermektedir. 12 saatlik sentez süresi sonunda tek bir pik oluşturacak şekilde elde edilen bir dağılım, nanopartikül oluşumunun tamamlandığını belirtmektedir. 24 saat gibi bir süre sonunda BSANPs ortamda halen

mevcut olan fazla çapraz bağlama maddesi, etanol ve su ile temas halinde çok uzun süre kaldığından tekrar toplanmaya başlayarak aglomerasyona uğramakta ve bu durum ikili pik oluşumu ile açıklanmaktadır. Çizelge 4.6’da iki farklı çapraz bağlama süresinde sentezlenen BSANPs’e ait ortalama partikül boyutu ve polidispersite indeksi ölçümleri verilmiştir.



Şekil 4.7. Farklı çapraz bağlama sürelerinde hazırlanan BSANPs’in boyut dağılımı (BSA Konsantrasyonu 25mg/ml, Çapraz bağlama süresi 24 saat, pH=8.0).



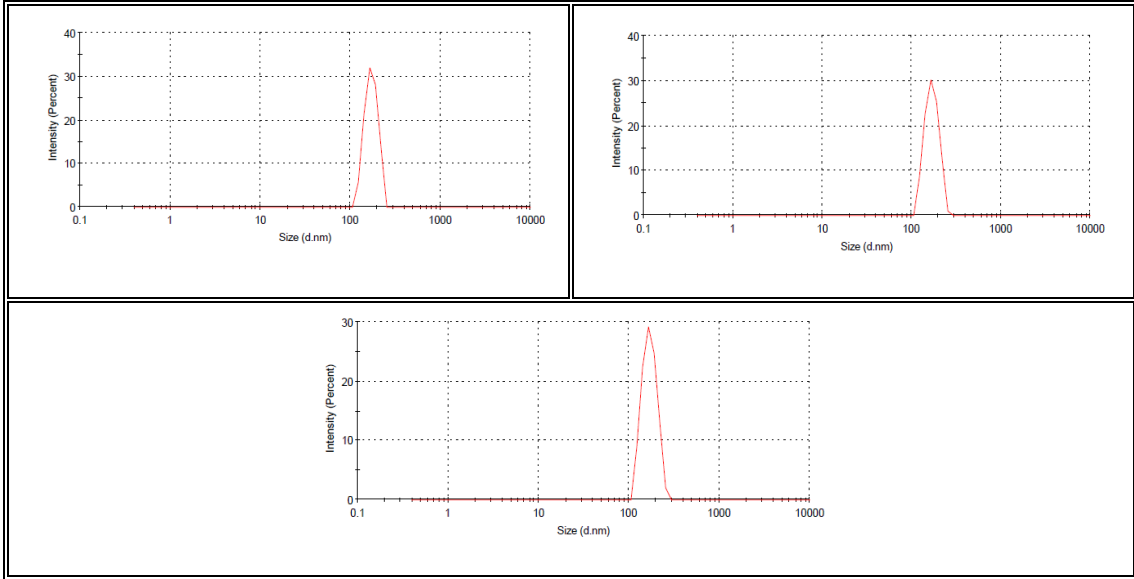
Şekil 4.8. Farklı çapraz bağlama sürelerinde hazırlanan BSANPs’in boyut dağılımı (BSA Konsantrasyonu 25mg/ml, Çapraz bağlama süresi 12 saat, pH=8.0).

4.2.1.2. BSA Konsantrasyonu Etkisi (Nötr pH Değerinde)

BSA konsantrasyonunun nanopartikül boyutu üzerine etkisinin incelenmesi için 3 farklı konsantrasyonda (25,40,50 mg/ml) çalışılmıştır. Sentez aşamasında distile suyun

pH' ı ayarlanmadan nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiştir. Distile suyun pH'ı ayarlanmadan ortama BSA ilave edildiğinde pH değeri yaklaşık 7.0 olarak ölçülmüştür. Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de farklı BSA konsantrasyonlarında hazırlanan nanopartiküllerin boyut dağılımı sonuçları görülmektedir.

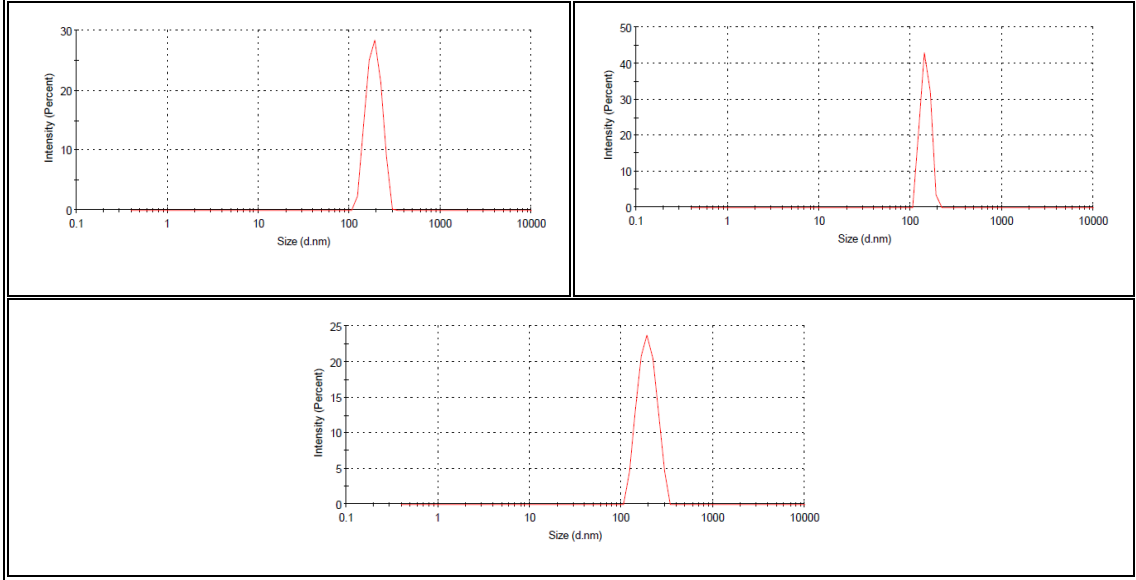
Farklı BSA konsantrasyonlarında hazırlanan BSANPs'lerin, artan konsantrasyonla orantılı olarak ortalama partikül boyutunun 235.1 ± 3.20 nm' den 338.3 ± 28.48 nm' ye yükseldiği görülmektedir. Polidispersite indeksi değerleri 0.347 ve 0.376 arasında değişmektedir. Polidispersite indeksi ideal olarak 0.50' den daha büyük olmamalıdır. 0.50' den daha büyük polidispersite indeksi değerleri agregasyonun (aggregation) oluştuğunu göstermektedir. BSA konsantrasyonunun artmasıyla birlikte oluşan aşırı doymunluk (supersaturation) daha küçük ve daha hızlı nanopartikül oluşumuna sebep olmaktadır. Ancak aşırı doymunluk kaynaklı olarak da oluşan nanopartiküller agregasyona başlamaktadır. Bu sebeple nanopartikül boyutlarında artış meydana gelmektedir. Ayrıca nanopartikül boyutlarının 200 nm ve daha üzeri ölçülmesinin bir diğer sebebi pH etkisi olarak düşünülmektedir.



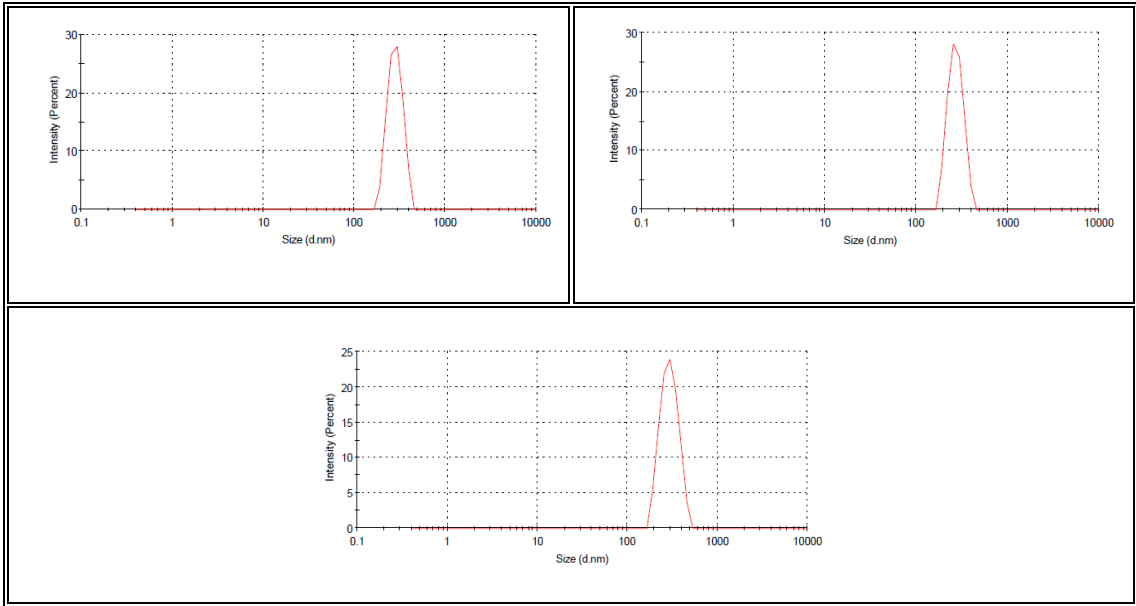
Şekil 4.9. 25mg/ml BSA konsantrasyonunda hazırlanan nanopartiküllerin boyut dağılımı (Çapraz bağlama süresi 12 saat, pH=7.0).

BSA konsantrasyonu arttıkça viskozite de artmakta ve su ve etanol arasındaki protein taşıma sıklığı azalmaktadır. Bu durum daha yavaş çekirdeklenme oranlarına ve dolayısıyla daha büyük parçacıklara yol açmaktadır. Öte yandan yüksek protein konsantrasyonu aşırı doymunluk (supersaturation) ile sonuçlanmaktadır. Böyle bir

durumda sayıca fazla ve daha küçük çekirdekler oluşmakta ancak aşırı doygunluk kaynaklı olarak daha büyük nanoparçacık oluşmasına sebep olan fazla sayıda parçacık çarpışması yoluyla yığılmayı yani aglomerasyonu da hızlandırmaktadır.



Şekil 4.10. 40 mg/ml BSA konsantrasyonunda hazırlanan nanopartiküllerin boyut dağılımı (Çapraz bağlama süresi 12 saat, pH=7.0).



Şekil 4.11. 50 mg/ml BSA konsantrasyonunda hazırlanan nanopartiküllerin boyut dağılımı (Çapraz bağlama süresi 12 saat, pH=7.0).

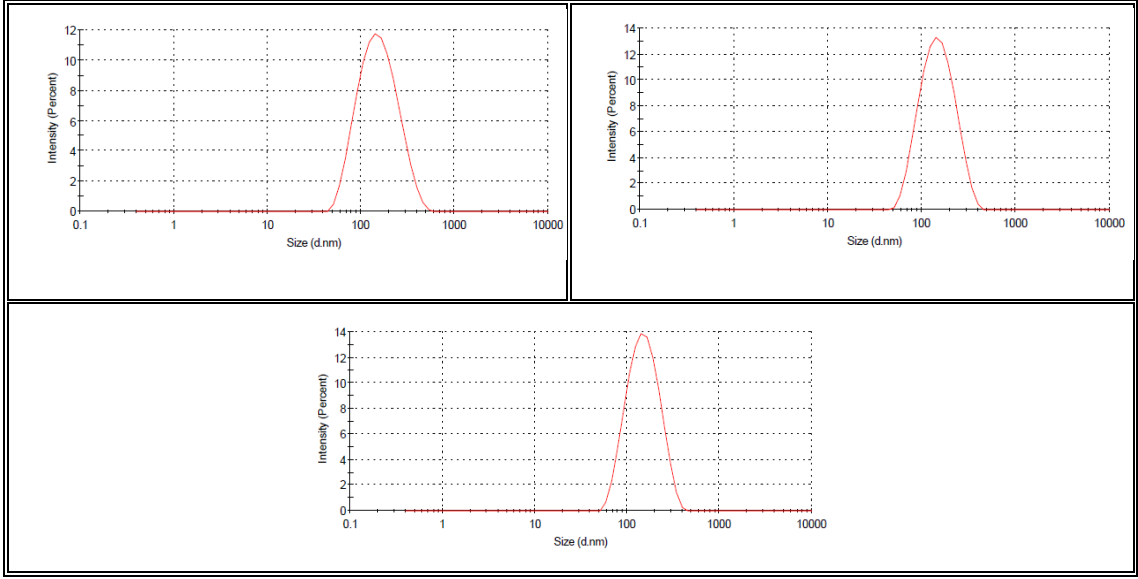
Çizelge 4.5. BSA desolvasyonu için farklı BSA konsantrasyonlarında pH ayarlanmadan hazırlanan BSANPs'in partikül boyutu ve polidispersite indeksi.

BSA Konsantrasyonu (mg/ml)	Boyut (nm)	PDI
25	235.1±3.20	0.347±0.09
40	237.0±9.38	0.376±0.17
50	338.3±28.48	0.357±0.08

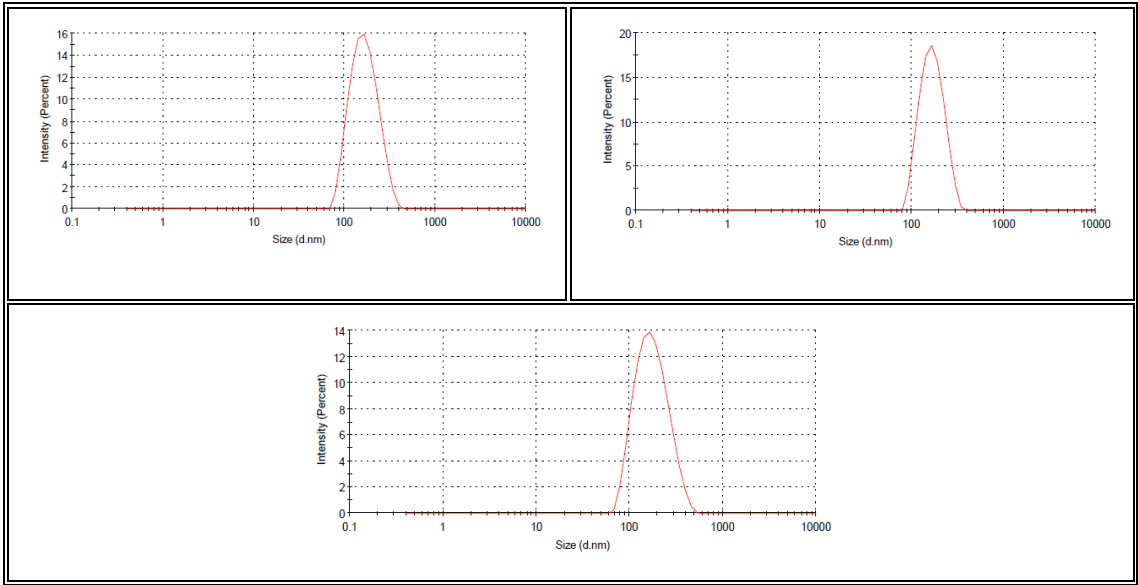
4.2.1.3. BSA Konsantrasyonu Etkisi (pH=10.0'da hazırlanan)

Farklı BSA konsantrasyonlarında (10,25,40,50 mg/ml), pH' ı 10.0' a ayarlanmış distile su kullanılarak deneyler tekrar edilmiş ve pH etkisi araştırılmıştır. Yüksek pH değerlerinde BSA yüzeyindeki hem amin fonksiyonel grupları hem de karboksilik fonksiyonel grupları negatif yüklü olmaktadır. pH etkisi, sistemdeki amino asitlerin varlığı ile doğrudan ilişkilidir. Daha yüksek pH değerlerinde, protein moleküllerinin net yükü artmakta ve elektrostatik itme BSA moleküllerinin koagülasyonunu azaltmaktadır. Böylece daha küçük nanopartiküller oluşturulabilmektedir. Öte yandan, pH daha düşük olduğunda, BSA moleküllerinin net yükü nötr ya da kısmen pozitifdir. Bu durum daha büyük parçacıkların oluşumuna izin veren nötr BSA moleküllerinin toplanmasına yol açmaktadır. Yüksek pH değerlerinde her partikül üzerindeki negatif yük, daha yüksek itmeye ve formülasyonun daha iyi dağılmasına yol açmaktadır. Aynı konsantrasyon aralığında pH ayarlanmadan hazırlanan BSA nanopartikülleri ile karşılaştırıldığında, pH 10.0' a ayarlanan ortamlarda nanopartikül boyutunun oldukça küçüldüğü ve polidispersite indeksi değerlerinin ise azaldığı ve homojen dağılımda nanopartiküller elde edildiği sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 4.12 - 4.15 ve Çizelge 4.6).

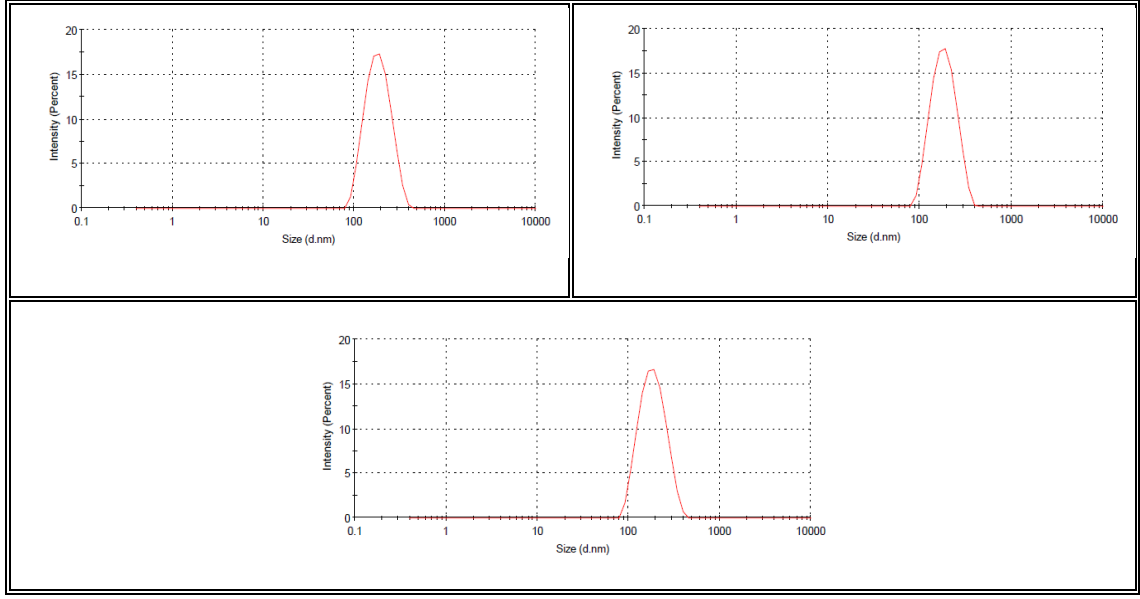
10 mg/ml BSA kullanılarak hazırlanan BSANPs'in boyutları yaklaşık 136 nm civarı ölçülmüştür. Bu değer 25 mg/ml BSA kullanılarak hazırlanan BSANPs'in boyutlarından küçük olmakla birlikte, 10 mg/ml konsantrasyonda BSA ile elde edilen partikül miktarı ve veriminde azalış gözlemlenmiştir. Bu sebeple optimum konsantrasyon 25 mg/ml olarak kabul edilmiştir.



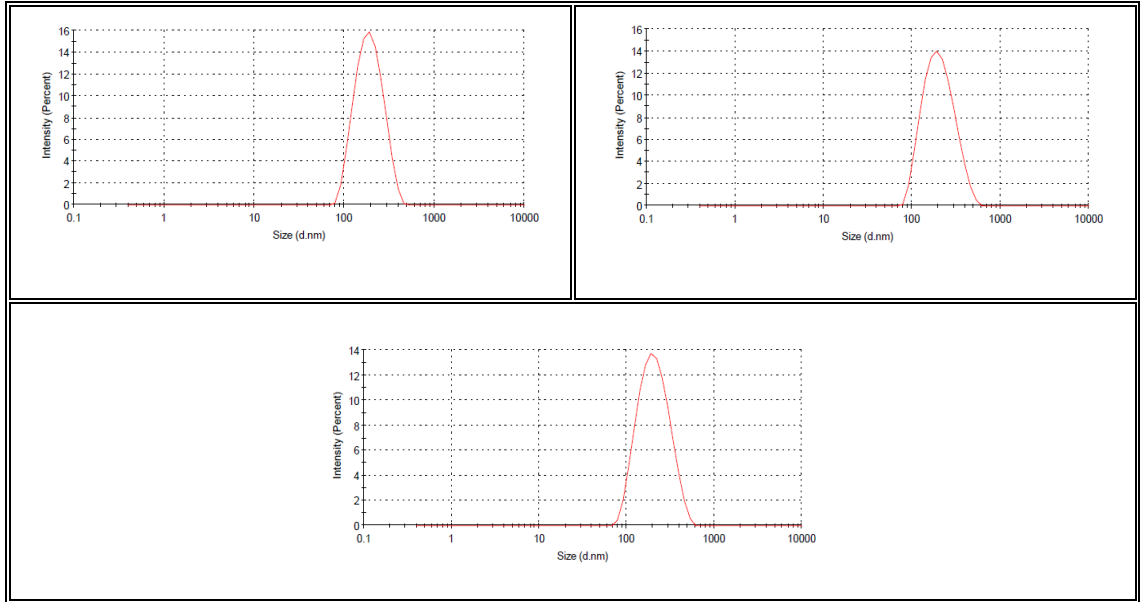
Şekil 4.12. 10mg/ml BSA konsantrasyonunda hazırlanan nanopartiküllerin boyut dağılımı (Çapraz bağlama süresi 12 saat, pH=10.0).



Şekil 4.13. 25mg/ml BSA konsantrasyonunda hazırlanan nanopartiküllerin boyut dağılımı (Çapraz bağlama süresi 12 saat, pH=10.0).



Şekil 4.14. 40mg/ml BSA konsantrasyonunda hazırlanan nanopartiküllerin boyut dağılımı (Çapraz bağlama süresi 12 saat, pH=10.0).



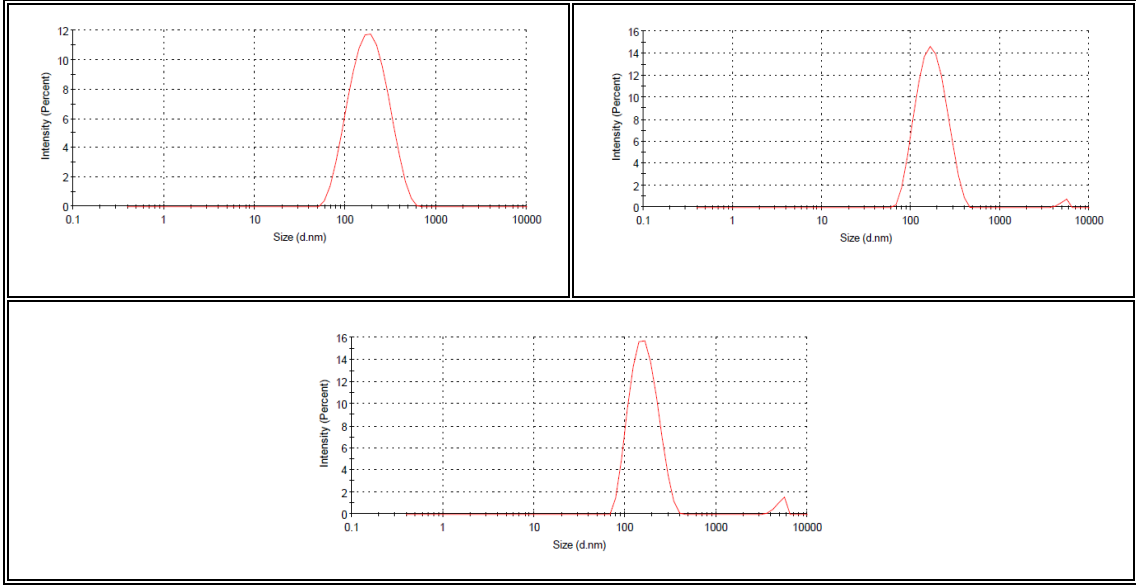
Şekil 4.15. 50mg/ml BSA konsantrasyonunda hazırlanan nanopartiküllerin boyut dağılımı (Çapraz bağlama süresi 12 saat, pH=10.0).

4.2.1.4. Distile su/Etanol (Solvent/Non-Solvent) Oranının Etkisi

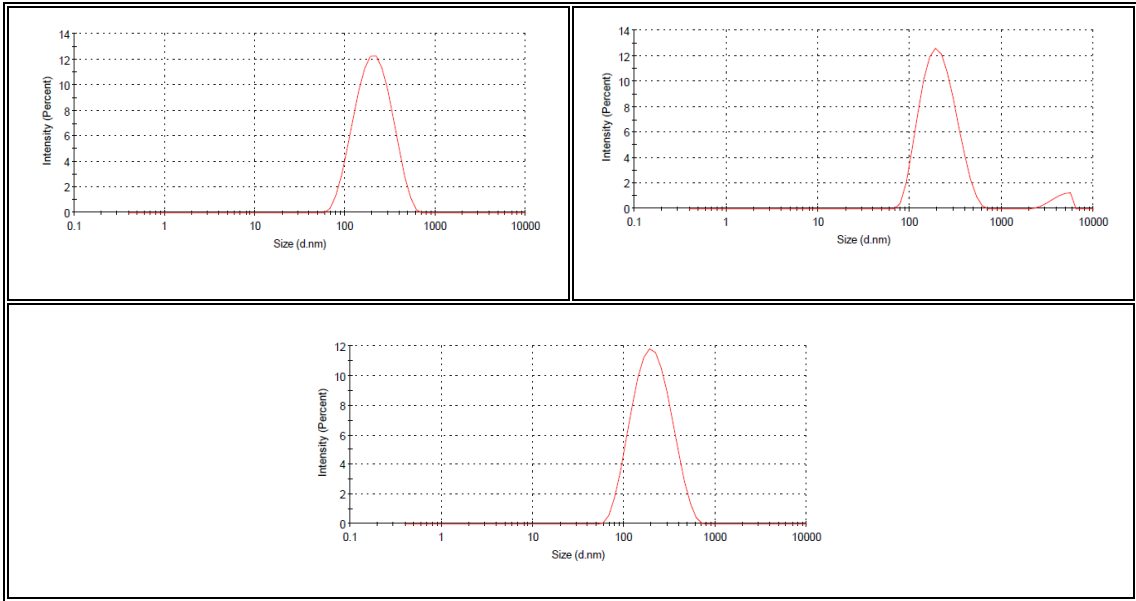
BSA'yı çözmek için kullanılan distile su (solvent) miktarının, BSANP sentezi için kullanılan etanol (non-solvent) miktarına oranının etkisini incelemek için farklı distile su/etanol oranlarında deneyler gerçekleştirilmiştir (1/1, 1/2, 1/3, 1/4).

Desolvasyon için gereken optimum distile su (solvent): etanol (non-solvent) oranını kontrol etmek için sentez ortamına değişen miktarlarda etanol eklenmiştir (Şekil 4.16-Şekil 4.17). Distile su: Etanol oranı 1:1 olduğunda, etanol miktarı desolvasyon için yeterli

olmamış ve beyaz bulutsu görüntü elde edilememiştir. Solvent/Non-Solvent oranı 1:2 (4 ml etanol) istenen nanopartikül boyutu için optimum oran olarak belirlenmiştir ve etanol miktarı arttırıldıkça nanopartikül boyutunda ve polidispersite indeksinde artışa sebep olmuştur. Sistemdeki susuz çözücünün (non-aqueous solvent) miktarının artmasının BSANPs'in birikmesine yol açtığı söylenebilir. Hem sulu hem de organik fazlar ve bunların miktarları, polimerin ve ilacın fiziksel davranışını da etkilemektedir.



Şekil 4.16. Solvent/Non-Solvent Oranı 1:3 olduğu durum için BSANPs'in boyut dağılımı.



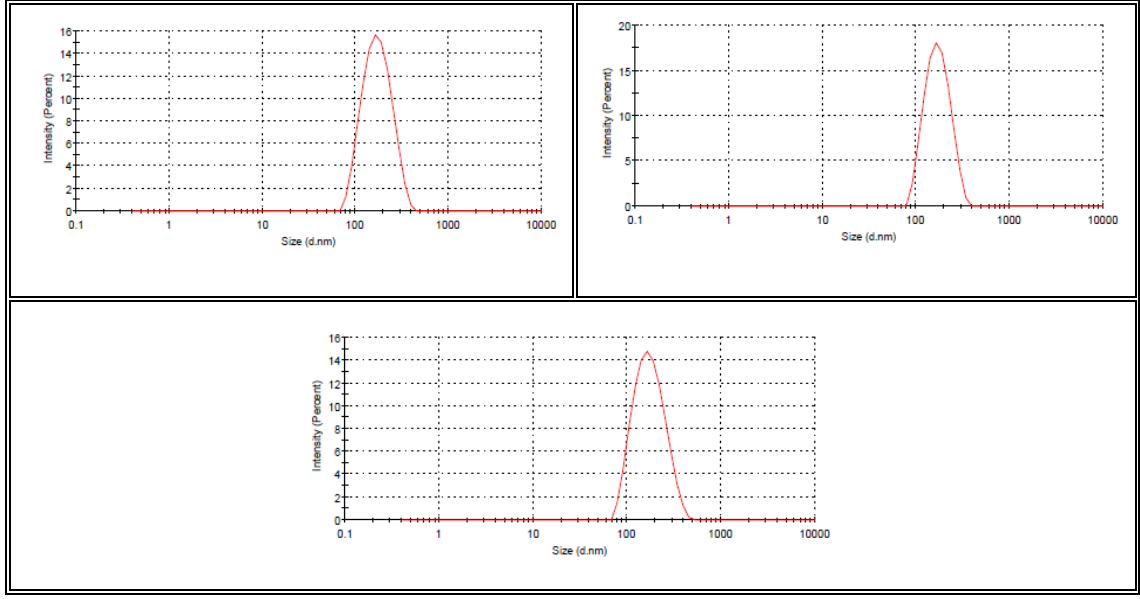
Şekil 4.17. Solvent/Non-Solvent Oranı 1:4 olduğu durum için BSANPs'in boyut dağılımı.

Çizelge 4.6’da farklı çapraz bağlama süreleri, pH değerleri, konsantrasyon ve farklı su/etanol oranlarında hazırlanan BSANPs’in ortalama partikül boyutu ve polidispersite indekslerini gösteren özet tablosu verilmiştir. Partikül boyutu ve polidispersite indeksi değerleri 3 tekrarlı olacak şekilde ölçülmüş olup, ortalama sonuçlar %95 güven aralığı ile sunulmuştur.

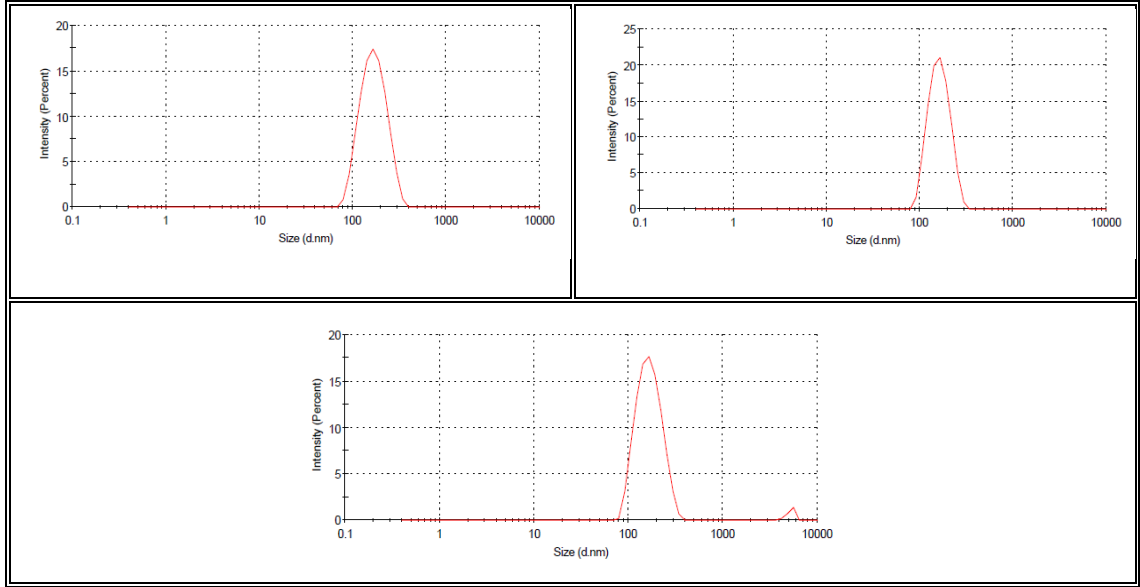
Çizelge 4.6. Farklı çapraz bağlama sürelerinde, pH 7.0 ve pH 10.0’ da farklı BSA konsantrasyonlarında ve BSA desolvasyonu için farklı distile su/etanol oranlarında hazırlanan BSANPs’in ortalama partikül boyutu ve polidispersite indeksleri.

	Çapraz Bağlama Süresi (h)	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	PDI
25mg/ml BSA, pH=8.0	12	191.8±3.15	0.168±0.04
	24	281.0±20.34	0.307±0.09
	BSA Konsantrasyonu (mg/ml)	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	PDI
Çapraz Bağlama Süresi 12 saat (nötr pH)	25	235.1±3.20	0.347±0.09
	40	237.0±9.38	0.376±0.17
	50	338.3±28.48	0.357±0.08
	BSA Konsantrasyonu (mg/ml)	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	PDI
Çapraz Bağlama Süresi 12 saat pH=10.0	10	136.3±1.92	0.133±0.06
	25	156.9±1.42	0.078±0.06
	40	172.6±0.94	0.093±0.02
	50	185.8±0.92	0.124±0.06
	Distile Su/ Etanol Oranı	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	PDI
25mg/ml BSA, pH=10.0 ve çapraz bağlama süresi 12 saat	1:2	156.9±1.42	0.078±0.06
	1:3	167.0±3.12	0.187±0.04
	1:4	181.1±22.20	0.199±0.08

25 mg/ml BSA kullanılarak hazırlanan BSANPs’e 5 mg CUR yüklenmiş, farklı çapraz bağlama sürelerinde boyutları Zetasizer’da ölçülerek PDI’leri belirlenmiştir (Şekil 4.18-Şekil 4.19). CUR yüklendiğinde partikül boyutlarında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Polidispersite indeksi değerleri ise CUR-BSANPs’ in dar boyut dağılımı gösterdiğini ve partiküller arasında agregasyonun (aggregation) oluşmadığını göstermektedir (Çizelge 4.7).



Şekil 4.18. Farklı çapraz bağlama sürelerinde hazırlanan CUR-BSANPs'in boyut dağılımı (BSA Konsantrasyonu 25mg/ml, 5mg CUR, Çapraz bağlama süresi 12 saat, Solvent/Non-Solvent Oranı 1:2, pH=10.0).



Şekil 4.19. Farklı çapraz bağlama sürelerinde hazırlanan CUR-BSANPs'in boyut dağılımı (BSA Konsantrasyonu 25mg/ml, 5mg CUR, Çapraz bağlama süresi 24 saat, Solvent/Non-Solvent Oranı ½, pH=10.0).

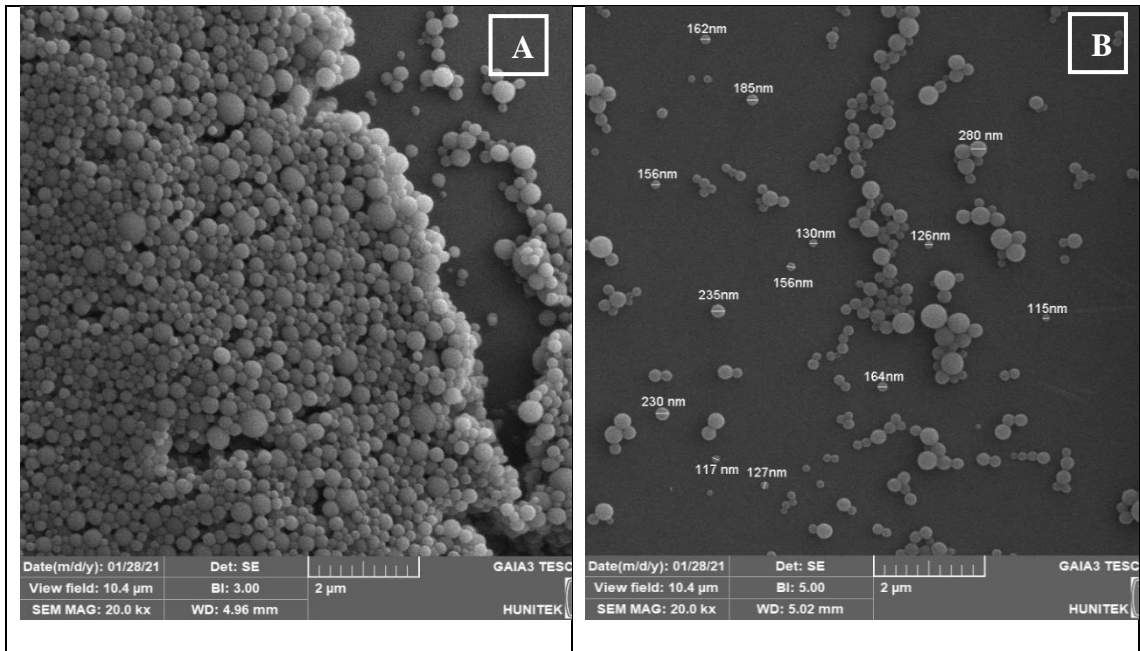
Çizelge 4.7. Farklı çapraz bağlama sürelerinde hazırlanan CUR-BSANPs'in ortalama partikül boyutu ve polidispersite indeksi (BSA Konsantrasyonu 25mg/ml, 5mg CUR, Çapraz bağlama süresi 24 saat, Solvent/Non-Solvent Oranı ½, pH=10.0).

Çapraz Bağlama Süresi (saat)	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	PDI
12	159.8±0.93	0.122±0.04
24	169.0±7.27	0.207±0.05

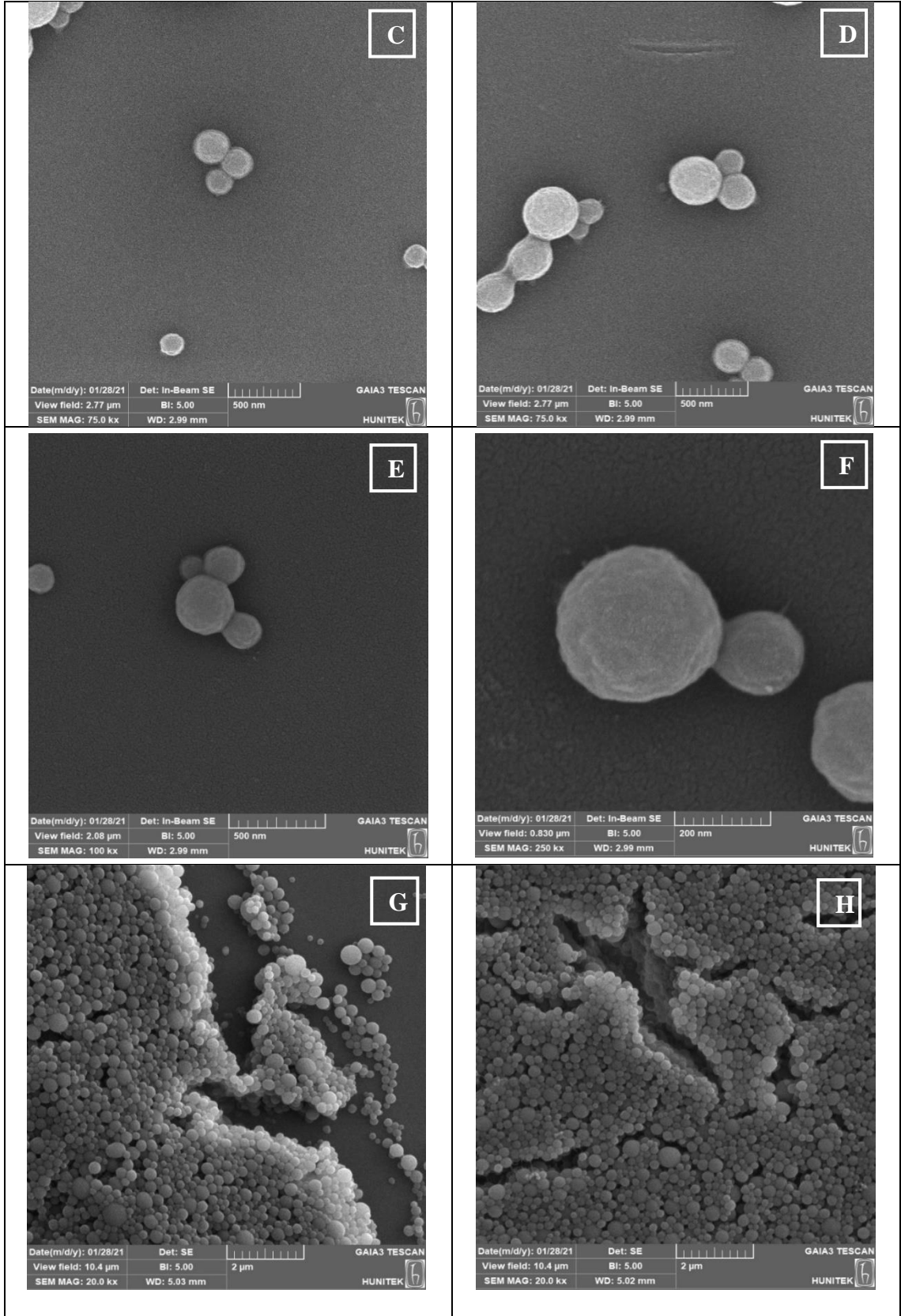
4.2.2. CUR-BSANPs ve BSANPs'in Morfolojik Analiz Çalışmaları

Şekil 4.20'de desolvasyon metodu ile hazırlanan BSANPs'ine (A,B,C,D,E,F,G,H,I,İ) ve CUR-BSANPs'ine (J,K,L,M) ait SEM görüntülerini göstermektedir. Nanopartiküllerin küresel bir morfolojiye ve pürüzsüz bir yüzeye sahip oldukları görülmektedir.

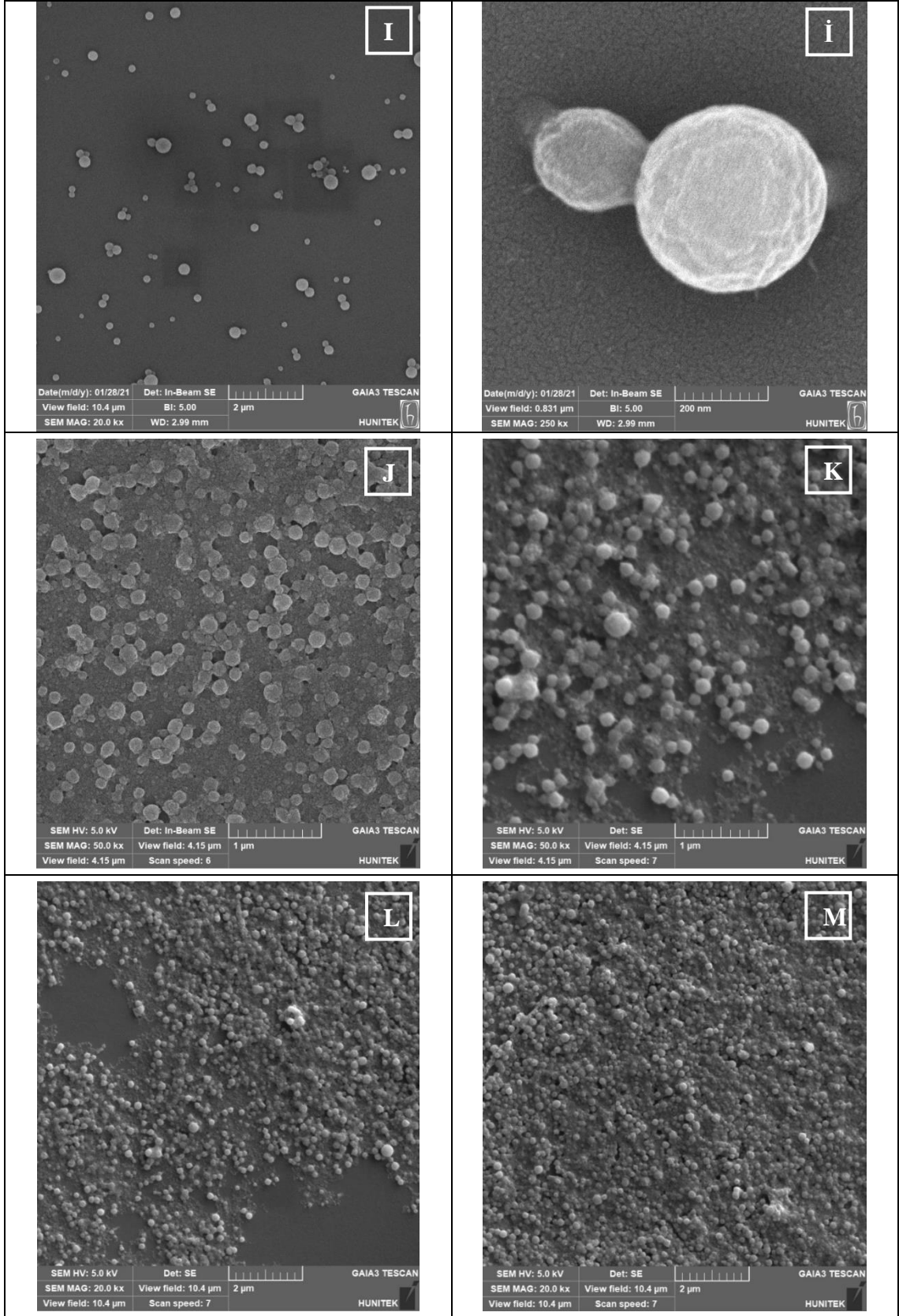
SEM görüntülerinde ImageJ programı aracılığıyla ölçülen nanoparçacık boyutları, Zetasizer ile ölçülen nanoparçacık boyut dağılımını doğrulamıştır. CUR yüklemesi sonucu partiküllerin yüzeyinde ve küresel simetrisinde herhangi bir değişim meydana gelmemiştir. Desolvasyon yöntemi ile hazırlanan nanopartiküller glutaraldehit ile stabilize edilir ve daha yüksek stabiliteye neden olabilecek fazla sayıda negatif yüke sahiptirler. Desolvasyon yöntemiyle hazırlanan nanopartiküllerin bu sebeple düşük polidispersite ile daha düzenli bir şekil gösterdiği tespit edilmiştir [112].



Şekil 4.20. BSANPs'in SEM görüntüleri (A,B,C,D,E,F,G,H,I,İ) (pH=10.0, BSA Konsantrasyonu: 25 mg/ml ve Çapraz Bağlama Süresi: 24 saat) ve CUR-BSANPs'in SEM görüntüleri (J,K,L,M) (pH=10.0, BSA Konsantrasyonu: 25 mg/ml, CUR miktarı: 15mg ve Çapraz Bağlama Süresi: 24 saat).



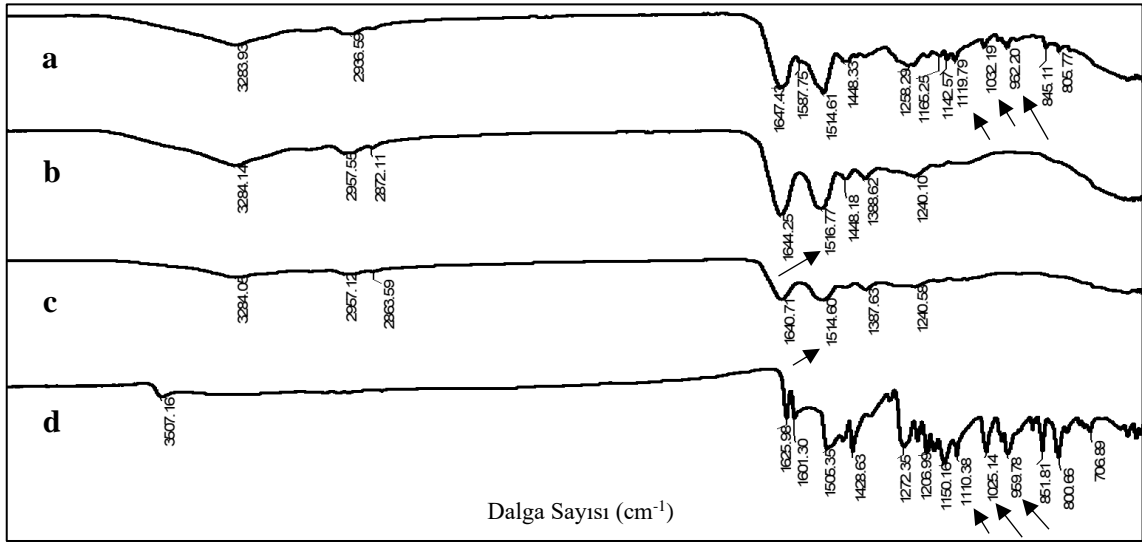
Şekil 4.20. (Devam) BSANPs'in SEM görüntüleri (A,B,C,D,E,F,G,H,I,İ) (pH=10.0, BSA Konsantrasyonu: 25 mg/ml ve Çapraz Bağlama Süresi: 24 saat) ve CUR-BSANPs'in SEM görüntüleri (J,K,L,M) (pH=10.0, BSA Konsantrasyonu: 25 mg/ml, CUR miktarı: 15mg ve Çapraz Bağlama Süresi: 24 saat).



Şekil 4.20. (Devam) BSANPs'in SEM görüntüleri (A,B,C,D,E,F,G,H,I,İ) (pH=10.0, BSA Konsantrasyonu: 25 mg/ml ve Çapraz Bağlama Süresi: 24 saat) ve CUR-BSANPs'in SEM görüntüleri (J,K,L,M) (pH=10.0, BSA Konsantrasyonu: 25 mg/ml, CUR miktarı: 15mg ve Çapraz Bağlama Süresi: 24 saat).

4.2.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre (FTIR) Analizi

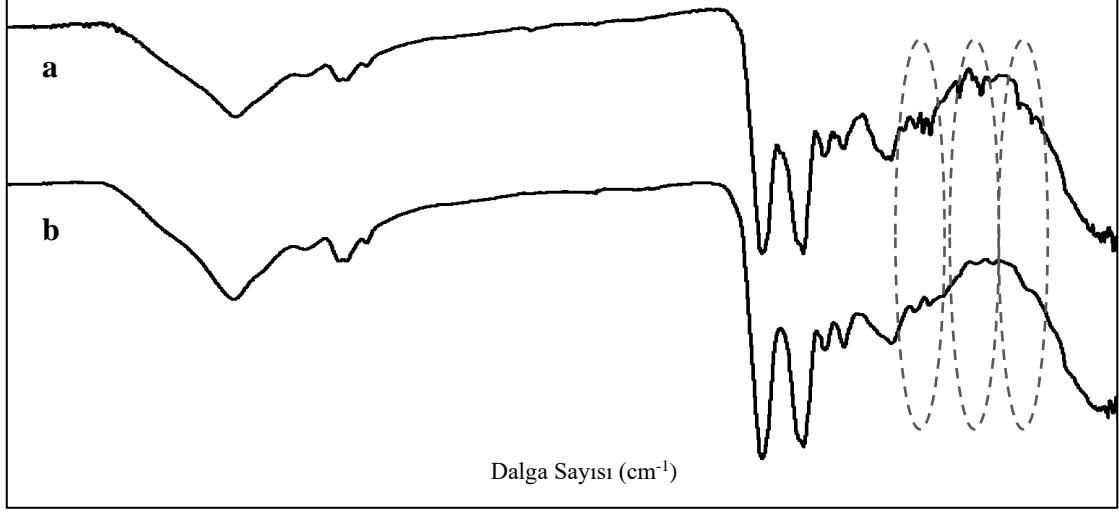
Şekil 4.21’de BSA’ya ait ana pikler incelendiğinde 3284 cm^{-1} ’de N-H gerilmesi ile ilgili amid A, 2957 cm^{-1} ’de NH_3^+ serbest iyonunun N-H gerilmesi ile ilgili amid B, 1640 cm^{-1} ’de C=O gerilmesi ile ilgili amid I, 1514 cm^{-1} ’de C-N gerilme ve N-H eğilme titreşimleriyle ilgili amid II, 1387 cm^{-1} ’de CH_2 eğilme grupları ile ilgili ve 1240 cm^{-1} ’de C-N gerilme ve N-H eğilme titreşimleriyle ilgili amid III olmak üzere tipik protein karakteristik pikleri görülmektedir [113]. Öte yandan yaklaşık 2863 cm^{-1} ’de görülen pik ise CH bağına aittir [114]. Saf BSA’ya ait spektrumda görülen en yoğun bantların, proteinlerin ikincil yapısı ve konformasyonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir. BSANPs’in FTIR spektrumunda saf BSA spektrumunda görülen karakteristik piklerin varlığı görülmektedir. Bununla birlikte 1640 cm^{-1} ’de görülen amid I pikinin BSANPs’de 1644 cm^{-1} ’ye, 1514 cm^{-1} ’de görülen amid II pikinin BSANPs’de 1516 cm^{-1} ’ye çok az kaydıği tespit edilmiştir.



Şekil 4.21. CUR-BSANPs (a), BSANPs (b), BSA (c) ve CUR (d)’e ait FTIR spektrumlarının karşılaştırılması.

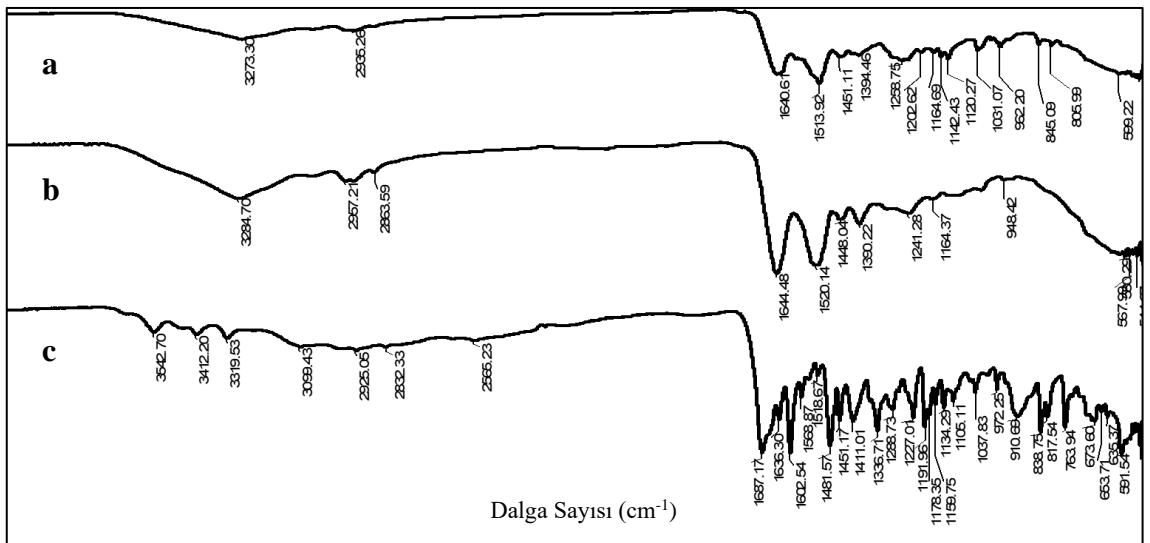
CUR’in FTIR spektrumu incelendiğinde 1601 cm^{-1} ve 1505 cm^{-1} ’de görülen pikler sırasıyla benzen halkasındaki C=C ve C=O bağlarından kaynaklanmaktadır [115]. Ayrıca 1428 cm^{-1} ’de görülen pik olefinik C-H gruplarını, 1272 cm^{-1} ’de görülen pik aromatik C-O gruplarını, 1110 cm^{-1} ’de görülen pik aromatik C-O gerilme titreşimlerini ve 1025 cm^{-1} ’de görülen pik de C-O-C gruplarını temsil etmektedir [115]. CUR-BSANPs’in FTIR spektrumunda hem BSA (1640 cm^{-1} ’de görülen amid I piki ve 1514 cm^{-1} ’de görülen amid II piki) hem de CUR’in karakteristik absorpsiyon pikleri görülmektedir (Şekil 4.21).

CUR-BSANPs'e ait FTIR spektrumunda yaklaşık 1119 cm^{-1} görülen aromatik C-O gerilme titreşimlerinden kaynaklı pik ve 1025 cm^{-1} 'de C-O-C gruplarını gösteren pik yapıda CUR olduğunu doğrulamaktadır.



Şekil 4.22. CUR-BSANPs'in FTIR spektrumlarının karşılaştırılması (15mg CUR (a) ve 5mg CUR (b) kullanılarak hazırlanan).

CUR-BSANPs'e ait FTIR spektrumunda CUR'e ait karakteristik piklerin daha belirgin olarak gösterilebilmesi ve karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla 5 mg ve 15mg CUR kullanılarak hazırlanan CUR-BSANPs'e ait FTIR spektrumu da analiz edilmiştir (Şekil 4.22). CUR-BSANPs içerisindeki CUR miktarı artırıldığında CUR'e ait karakteristik piklerin daha belirgin hale geldiği tespit edilmiştir. Yapıdaki CUR miktarı arttırıldıkça 1025 cm^{-1} ve 1119 cm^{-1} 'de CUR'e ait karakteristik pikler daha şiddetli olarak spektrumda görülmektedir.

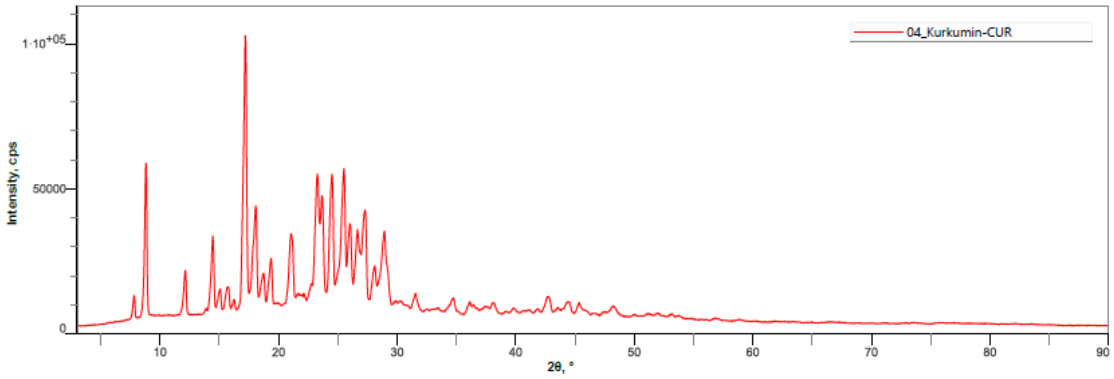


Şekil 4.23. FA-CUR-BSANPs (a), FA-BSANPs (b) ve FA'e (c) ait FTIR spektrumlarının karşılaştırılması.

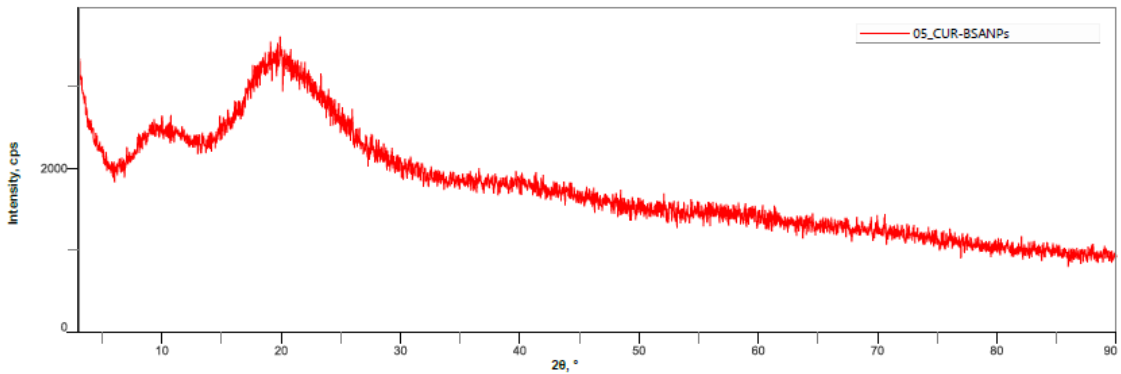
Şekil 4.23’ te FA-CUR-BSANPs, FA-BSANPs ve FA’ e ait FTIR spektrumları verilmiştir. FA’in karakteristik pikleri 1176 cm^{-1} , 952 cm^{-1} ve 512 cm^{-1} olarak bilinmektedir [116]. Öte yandan 1607 cm^{-1} ve 1448 cm^{-1} ’deki pikler sırası ile NH_2 eğilme titreşimine ve FA’in fenil halkasına karşılık gelmektedir [117]. FA-BSANPs’e ait spektrum incelendiğinde yaklaşık 1448 cm^{-1} ve FA-CUR-BSANPs’e ait spektrumda 1451 cm^{-1} ’de görülen pikler FA’in BSA yüzeylerine kimyasal konjugasyonunun gerçekleştiğini göstermektedir.

4.2.4. XRD Analizi

CUR ve CUR-BSANPs’e ait XRD desenleri sırası ile Şekil 4.24 ve Şekil 4.25’te görülmektedir. CUR, XRD deseninde görülen yoğun pikler ile karakterize edilen yüksek kristalli yapı sunmuştur ve ana pikleri $2\theta = 8.8^\circ$, 14.5° , 17.2° , 18.1° , 19.4° , 23.3° ve 24.5° ’de ortaya çıkmıştır [118].



Şekil 4.24. Toz formdaki CUR’in XRD deseni.

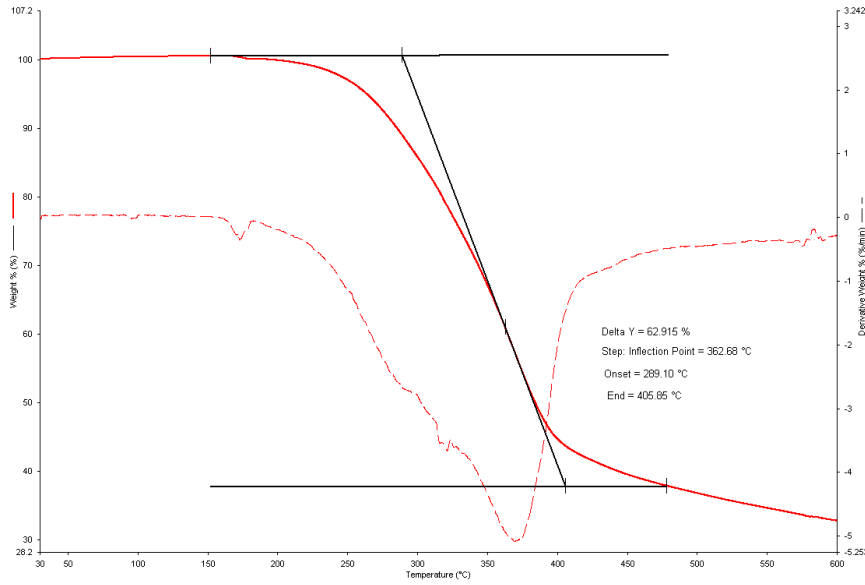


Şekil 4.25. CUR-BSANPs’e ait XRD deseni.

CUR-BSANPs'e ait XRD desenindeki geniş pik BSA proteinin amorf yapısını göstermektedir [119]. CUR-BSANPs'in XRD deseni $9,9^\circ$ ve $19,9^\circ$ 2θ değerlerinde karakteristik pikler göstermektedir ve burada keskin piklerin olmaması CUR'in nanotaşıyıcı içerisinde amorf halde olduğunu göstermiştir [120].

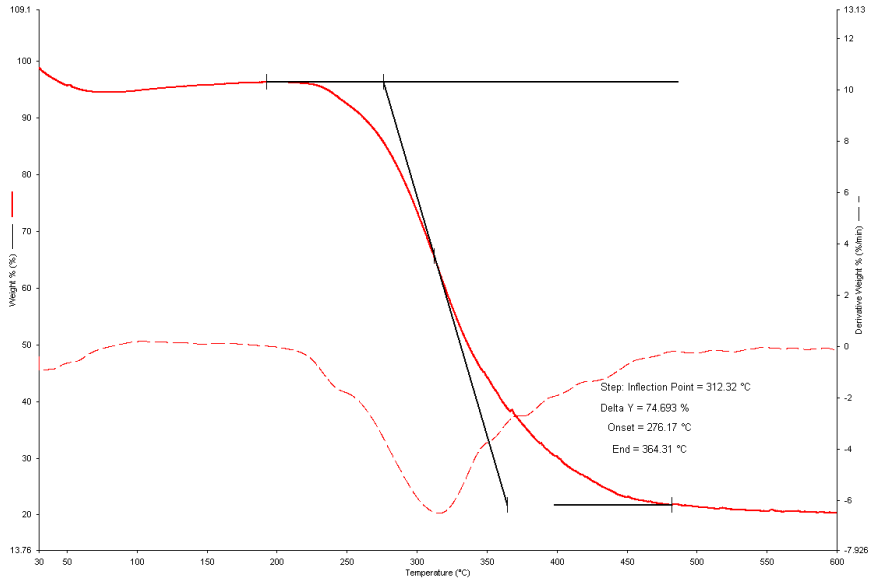
4.2.5. TGA-DSC Analizleri

Şekil 4.26-Şekil 4.31 arasında sırası ile saf CUR, BSANPs, CUR-BSANPs, FA, FA-BSANPs ve FA-CUR-BSANPs'e ait TGA termogramları verilmektedir. CUR'e ait TGA termogramı incelendiğinde CUR'in 362°C 'de bozunmaya uğradığı görülmektedir. BSANPs'e ait TGA termogramı incelendiğinde ise BSANPs'in 312°C 'de bozunmaya uğradığı görülmektedir.

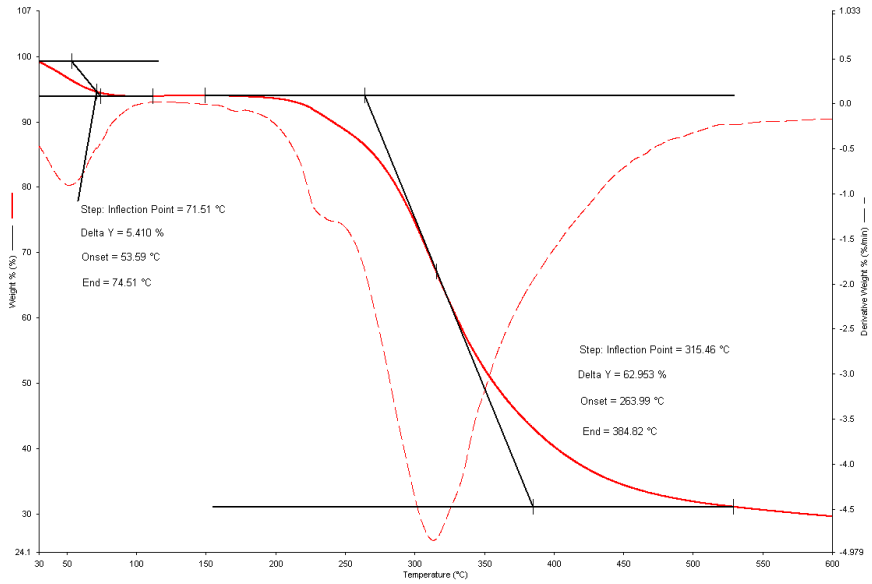


Şekil 4.26. Saf CUR'e ait termogravimetrik analiz sonucu.

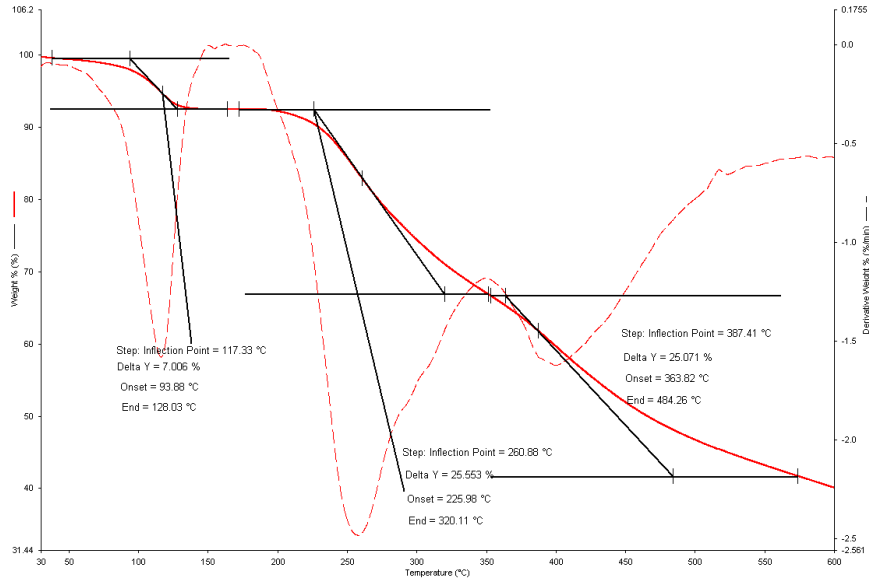
CUR-BSANPs'in TGA termogramı ise iki basamaklıdır (Şekil 4.28). İlk olarak CUR-BSANPs'in yaklaşık %5'i 71°C 'de ve %63'ü ise 315°C 'de bozunmuştur. Termal bozunma davranışlarında gözlenen değişiklikler protein yapıdaki BSA ile CUR arasındaki etkileşimlerin varlığına işaret ederek enkapsülasyon işleminin gerçekleştiğini göstermektedir.



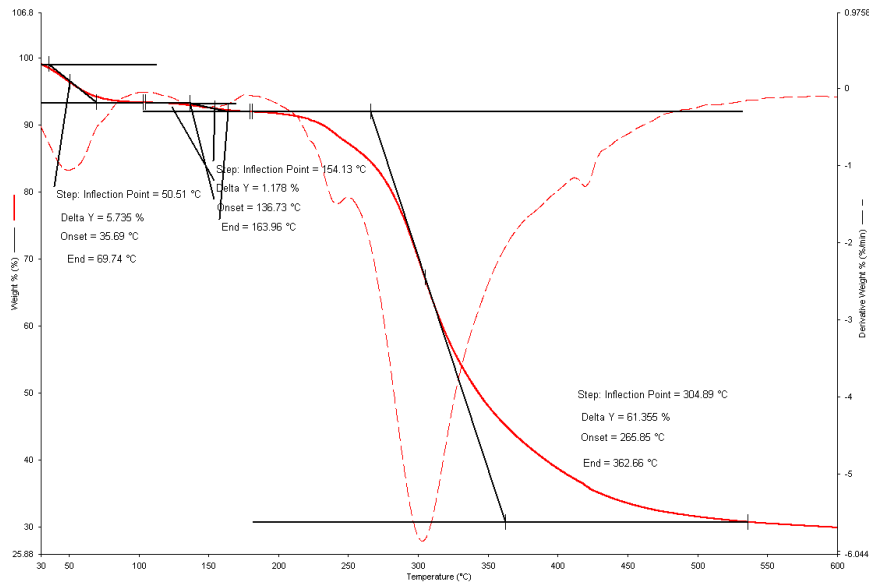
Şekil 4.27. BSANPs'e ait termogravimetrik analiz sonucu.



Şekil 4.28. CUR-BSANPs'e ait termogravimetrik analiz sonucu.

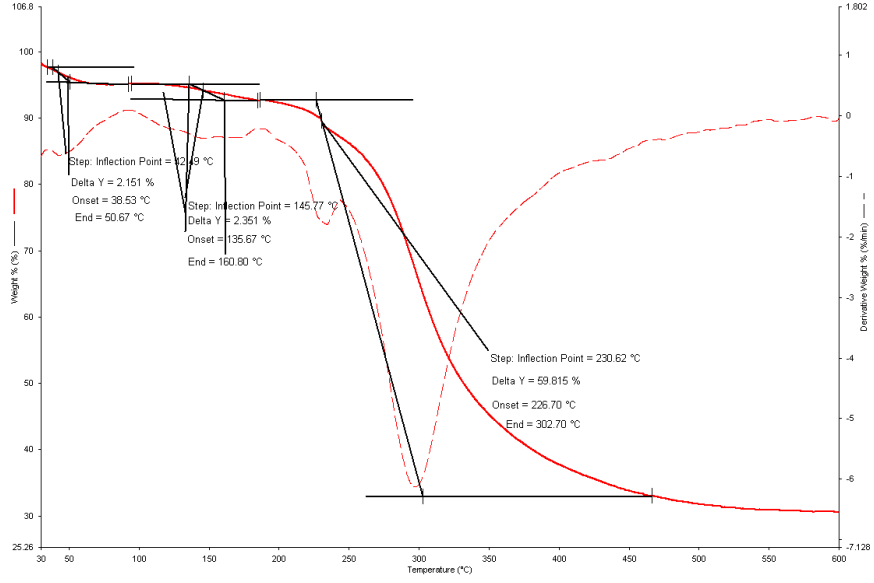


Şekil 4.29. FA'e ait termogravimetrik analiz sonucu.

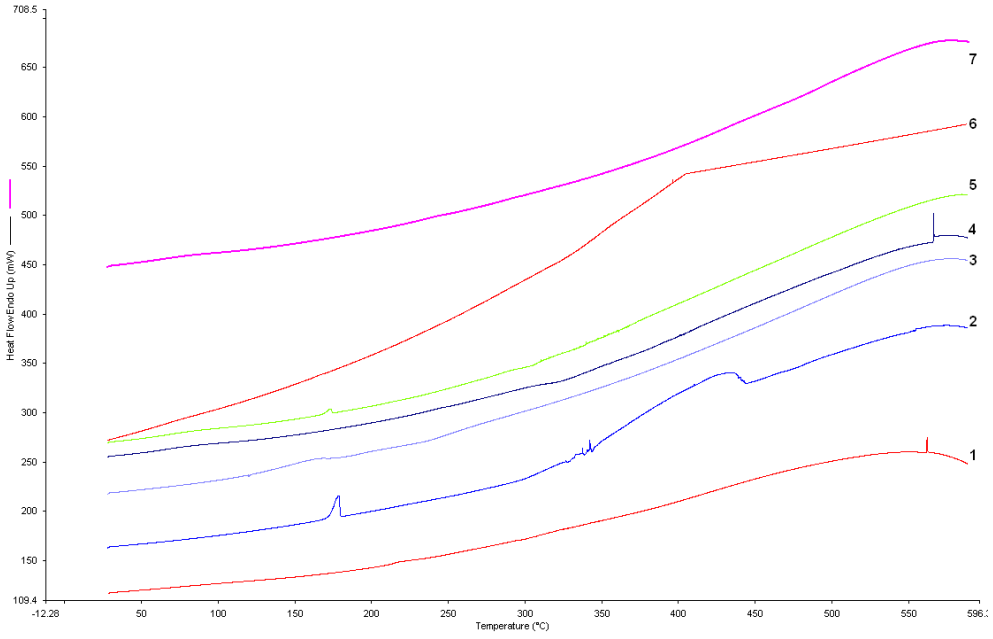


Şekil 4.30. FA-BSANPs'e ait termogravimetrik analiz sonucu.

FA'in TGA termogramı ise üç basamaklıdır (Şekil 4.29). İlk olarak FA'in %7'si yaklaşık 117 °C'de, %25'i 260 °C'de ve %25'i ise 387 °C'de bozunmuştur. Hem FA-BSANPs'in hem de FA-CUR-BSANPs'in TGA termogramının FA'in TGA termogramına benzer şekilde üç basamaklı olduğu Şekil 4.30-Şekil 4.31' de görülmektedir.



Şekil 4.31. FA-CUR-BSANPs'e ait termogravimetrik analiz sonucu.



Şekil 4.32. BSA (1), CUR (2), FA (3), BSANPs (4), CUR-BSANPs (5), FA-CUR-BSANPs (6) ve FA-BSANPs (7)'e ait DSC eğrilerinin karşılaştırılması.

Şekil 4.32'de BSA, CUR, FA, BSANPs, CUR-BSANPs, FA-CUR-BSANPs ve FA-BSANPs'e ait DSC termogramları görülmektedir. Her bir malzemenin endotermik piki (termal davranışı) bir yanıt parametresi olarak değerlendirilmiştir. CUR'e ait DSC termogramı değerlendirildiğinde yaklaşık 178 °C'de güçlü bir endotermik pik gösterdiği görülmektedir. Bu endotermik pik, CUR oldukça hidrofobik bir etken madde olduğu için, kristal oluşturma eğiliminden kaynaklanmaktadır. Diğer taraftan BSANPs ise yaklaşık

218 °C’de BSA’nın erimesine atfedilebilen bir termal davranış sergilemiştir. CUR-BSANPs (5 numaralı eğri) ve FA-CUR-BSANPs (6 numaralı eğri) formülasyonlarının bu bölgede herhangi güçlü bir pik bulundurmaması, CUR’in kristalleşmesinin BSANPs’in hazırlanması sırasında BSA tarafından inhibe edildiğini ve formülasyon içerisinde CUR’in amorf yapıda olduğunu göstermektedir. Formülasyon içerisindeki etken maddelerin amorf özellikte olması daha iyi çözünme, absorpsiyon ve biyoyararlanımla sonuçlanmakta ve bu sebeple tercih edilmektedir.

4.2.6. Enkapsülasyon Verimliliği ve Yükleme Kapasitesinin Hesaplanması

Çizelge 4.8’de glutaraldehit miktarı ve çapraz bağlama süresi artırılarak hazırlanan CUR-BSANPs’e ait enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi sonuçları verilmiştir. Çapraz bağlama süresi 12 saat olduğunda enkapsülasyon verimi değerleri daha düşük bulunmuştur. Aynı şekilde hem çapraz bağlama süresi hem de glutaraldehit miktarı artırıldığında enkapsülasyon veriminde belirgin bir artış olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca CUR miktarının artırılması ile de CUR enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi artmıştır.

Çizelge 4.8. CUR-BSANPs’deki CUR enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi (pH 10.0, BSA konsantrasyonu = 25 mg/ml).

CUR-BSANPs’i hazırlamak için kullanılan CUR miktarı (mg)	Glutaraldehit miktarı (µl)	Çapraz bağlama süresi (h)	CUR enkapsülasyon verimi (%)	CUR yükleme kapasitesi (%)
5.0	30	12	11.20	3.03
5.0	30	24	46.20	12.35
5.0	110	12	32.40	8.76
5.0	110	24	68.88	18.62
10.0	110	24	88.15	42.79
15.0	110	24	90.20	44.22

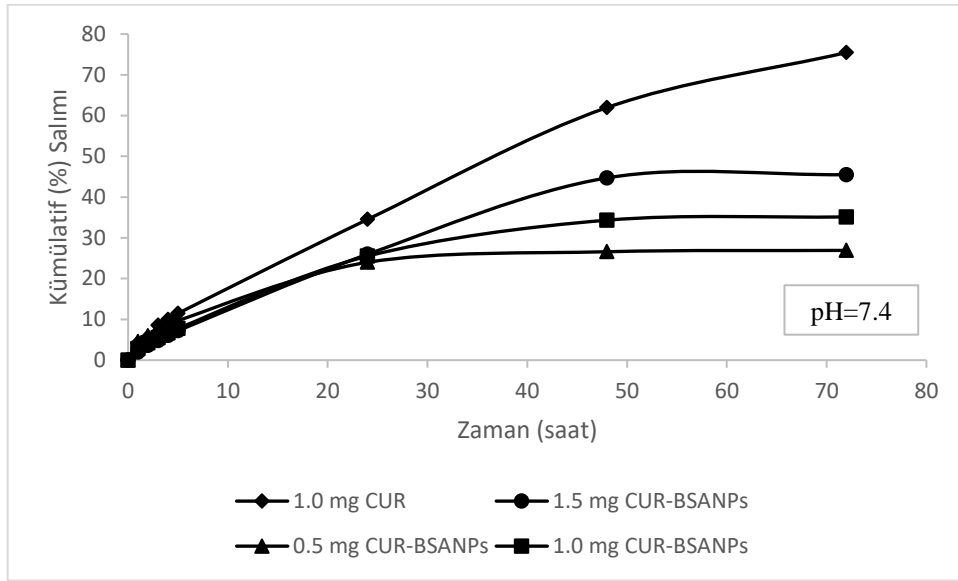
Lou ve ark., CUR-BSANPs’i içeren ısıya duyarlı oftalmik jel yapısında bir malzeme sentezleyip optimizasyon çalışmaları yapmışlardır. Bu çalışmada CUR-BSANPs desolvasyon metodu ile hazırlanmıştır. 4 mg CUR, 10 mg BSA, 50 µl glutaraldehit

kullanarak hazırladıkları BSANPs için 4 saatlik çapraz bağlama süresinde çalışmışlardır ve yaklaşık 85% CUR enkapsülasyon verimi ile 4% CUR yükleme kapasitesi elde etmişlerdir [121]. Li ve ark., glisiretinik asit reseptörü aracılı hedefleme için glisiretinik asit ile yüzeyi işlevselleştirilmiş CUR-BSANPs'i geliştirmişlerdir. CUR-BSANPs'i desolvasyon metodu ile hazırlamış ve 10 mg BSA, 4 mg CUR ve 50 µl glutaraldehit kullanarak hazırladıkları partiküller için yaklaşık 88.5% CUR enkapsülasyon verimi ve 25% CUR yükleme kapasitesi elde etmişlerdir [122]. Bir diğer çalışmada Camargo ve ark., melanoma tedavisinde araştırılmak üzere modifiye edilmiş desolvasyon metodu ile CUR-BSANPs hazırlamışlardır. 25 mg BSA, 10 mg CUR, 50 µl glutaraldehit ile pH=5.0'da 24 saatlik çapraz bağlama süresi sonunda 45% enkapsülasyon verimi elde etmişlerdir [103]. Thadapally ve ark., desolvasyon metodu ile CUR yüklü polietilen glikol (PEG)-BSANPs'i hazırlayıp bu partiküllerden CUR salımını araştırmışlardır. 200 mg BSA, 3 farklı konsantrasyonda PEG, 100 mg CUR, 0.11 ml glutaraldehit kullanarak 24 saatlik çapraz bağlama süresi sonunda yaklaşık olarak 95% enkapsülasyon verimi elde etmişlerdir [123]. Luo ve arkadaşları genipin ile çapraz bağlanmış, yüzeyi tannik asit ile modifiye edilmiş insan serum albümini (HSA) nanopartiküllerine CUR enkapsülasyon verimini yaklaşık 86% bulmuşlardır [121]. Bu çalışmada elde edilen maksimum CUR enkapsülasyon verimi 90.2% ile literatürde elde edilmiş olan en yüksek değere çok yaklaşıldığı görülmektedir. Öte yandan elde edilen maksimum CUR kapasitesinin (44.22%) literatürde elde edilen değerlerden önemli ölçüde yüksek olduğu görülmektedir.

4.2.7. *In Vitro* İlaç Salım Çalışmaları

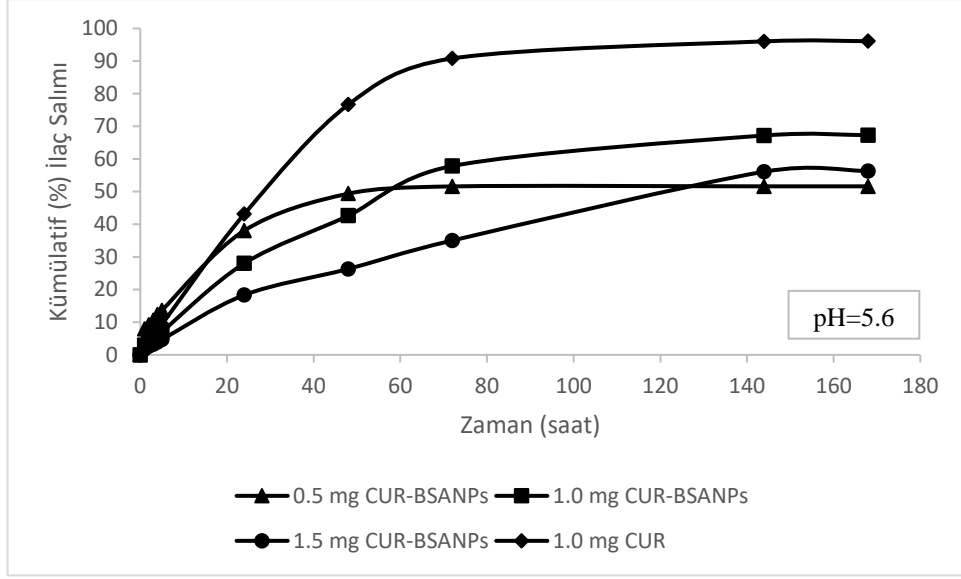
En uygun koşullarda elde edilmiş CUR-BSANPs'den CUR'in *in vitro* ortamda salımı 37°C'de asidik tümör mikroçevresini simüle eden pH 5.6 ve fizyolojik kanı simüle eden pH 7.4 PBS tampon ortamlarında incelenmiştir. Farklı miktarlarda CUR içeren CUR-BSANPs'den pH 5.6 ve pH 7.4'te gerçekleştirilen CUR salım eğrileri serbest (enkapsüle edilmemiş) CUR ile karşılaştırmalı olarak Şekiller 4.33 ve Şekil 4.34'te verilmektedir. 0.5, 1 ve 1.5 mg CUR içeren CUR-BSANPs'den CUR salımı 48 saat sonunda stabil bir değere ulaşarak bu değerde sabit kalmıştır. Yaklaşık 48 saat sonra pH 7.4'te desolvasyon yöntemiyle hazırlanan 0.5 mg, 1 mg ve 1.5 mg CUR yüklü CUR-BSANPs'den kümülatif salım sırasıyla yaklaşık %26.6, %34.3 ve %44.7 olarak bulunmuştur. 0.5, 1 ve 1.5 mg CUR içeren CUR-BSANPs'den kümülatif CUR salım yüzdesi 72 saatlik süre sonunda sırasıyla %26.9, %35.1 ve %45.5 olarak bulunmuştur. Karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla 1 mg CUR'in serbest halde kullanılarak gerçekleştirilen salım çalışmasında ise

CUR salımı sürekli olarak artma göstermiş, 48 saat sonunda CUR'in yaklaşık %62.0'si ve 72 saatlik süre sonunda CUR'in % 75.5 si ortama salınmıştır. Öte yandan salım verimliliğindeki artışın artan CUR miktarı ile hangi CUR konsantrasyonuna kadar arttığının belirlenebilmesi amacıyla 2.5 mg CUR içeren CUR-BSANPs'den de CUR salımı gerçekleştirilmiştir ve 72 saat sonunda %29.5 salım verimi elde edilmiştir. Bu sebeple daha yüksek CUR konsantrasyonlarında salım çalışmalarının yapılmasına gerek duyulmamış ve optimum salım verimi 1.5 mg yüklü CUR-BSANPs ile %45.5 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.33. CUR-BSANPs'den CUR salım profillerinin farklı CUR miktarları için karşılaştırılması (pH 7.4 ve T=37°C).

Şekil 4.34' te pH 5.6' da CUR-BSANPs'den CUR salım profilleri verilmiştir. pH 5.6' da 48 saat sonunda desolvasyon yöntemiyle hazırlanan 0.5 mg, 1 mg ve 1.5 mg CUR yüklü CUR-BSANPs'den kümülatif salım değerleri sırası ile %49.4, %42.6 ve %26.3 olarak bulunmuştur. 0.5 mg CUR içeren nanopartiküllerden CUR salımı 48 saat sonunda stabil hale gelmiş 72 saat ile 168 saat arasında % 51.6' lık sabit bir CUR salımı elde edilmiştir. 1.0 ve 1.5 mg CUR içeren nanopartiküllerden ise 144. saate kadar CUR salımı artmış 144-168. saatler arasında sırasıyla %67.3 ve %56.2 sabit bir CUR salımı elde edilmiştir. Serbest 1 mg CUR' in salımı sürekli olarak artmış 48 saat sonunda CUR' in 76.7' si, 144-168. saatler arasında ise CUR' in 96.1% i ortama salınmıştır.



Şekil 4.34. CUR-BSANPs'den CUR salım profillerinin farklı CUR miktarları için karşılaştırılması (pH 5.6 ve T=37°C).

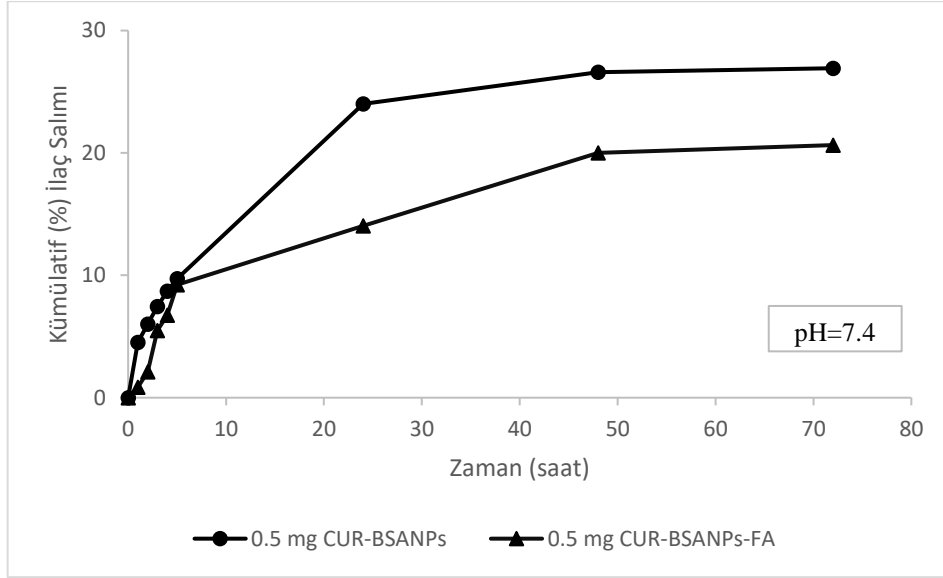
CUR-BSANPs'den ilacın başlangıçta ani salımı, hazırlanan nanoformülasyonların yüzeyine yakın olan ve yüzeyinde adsorplanan, salım ortamına kolayca yayılabilen serbest CUR moleküllerinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. İki farklı pH ortamında, CUR-BSANP formülasyonundan salım modelleri karşılaştırıldığında, 48 saat süre sonunda salımın 0.5 mg ve 1.0 mg CUR yüklenmiş olan CUR-BSANPs'den pH 5.6 için daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır. 1.5 mg CUR yüklenmiş olan CUR-BSANPs'den CUR salımı ise zamanla artış göstermiş, maksimum kümülatif salım yüzdesi pH 5.6' da 144-168. saatler arasında ancak stabil hale gelerek pH 7.4' deki stabil kümülatif salım yüzdesi değerini aşmıştır. Desolvasyon metodu ile CUR-BSANPs hazırlama metodunda kullanılan CUR miktarı arttırıldıkça, CUR enkapsülasyonunun kademeli olarak arttığı ve bir miktarda doyuma ulaştığı bilinmektedir. 1.5 mg CUR yüklü CUR-BSANPs'den ilaç salımının daha fazla olmasının sebebi hem çekirdekte hem de yüzeye yakın olan CUR miktarının daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır. Desolvasyon metodunda BSA moleküllerinin polimerizasyonu ve BSANPs'in glutaraldehit ile çapraz bağlanarak stabilize edilmesi CUR-BSANPs'i daha kararlı hale getirmekte ve CUR difüzyonunu zorlaştırabilmektedir. Bu nedenle daha yavaş bir salım gözlenmekte ve sistem daha uzun sürede stabil hale gelmektedir. Ortam pH'ının değişmesiyle birlikte BSA moleküllerinin yükü değişebilir ve bu durum albümine yüklü moleküllerin salımını etkileyebilir. Ortam pH'ı değiştiğinde pH 5.6'da ilaç salımı fizyolojik kan ortamına (pH 7.4) göre yaklaşık %30 kadar artmıştır.

CUR-BSANPs ve FA-CUR-BSANPs'in 72 saat içindeki ilaç salım profilleri Şekil 4.35'te gösterilmektedir. FA-CUR-BSANPs'in kümülatif salımı 72 saat sonra %21 olarak bulunmuştur. FA-CUR-BSANPs, CUR-BSANPs ile aynı karakteristik salım modelini sergilemiştir. Bu durumda, BSA yüzeyine konjuge edilen FA tabakasının salımı biraz daha geciktirdiği söylenebilir.

Qu ve ark., FA ile konjuge edilmiş mezogözenekli silika nanopartiküller hazırlamış ve bu formülasyondan aktif farmasötik bileşen topotekanın (TPT) *in vitro* ilaç salımını araştırmışlardır [124]. TPT, FA ile konjuge edilmiş TPT yüklü mezogözenekli silika nanopartiküllerden (FTMN), TPT yüklü mezogözenekli silika nanopartiküllere (TMN) kıyasla kontrollü bir şekilde salınmıştır. İlacın salım modelindeki farklılık öncelikle yüzeydeki FA varlığına bağlanmış ve yüzeydeki FA varlığının kapsüllenmiş ilacın çekirdekten dış ortama salımını yavaşlattığı bulunmuştur. Araştırmacılar, 24 saatlik inkübasyondan sonra, FTMN'den ilacın ~%20'sinin, TMN'den ise ~%30'unun salındığını bildirmişlerdir. Purushothaman ve ark., manyetik destekli CUR ilaç salımı için folat reseptörü hedefli hibrit kazein-kalsiyum ferrit nanotaşıyıcıları (CFNP) araştırmışlardır. Bu çalışmada Kazein-CFNP-CUR ve kazein-CFNP-CUR-FA'in manyetik alan varlığında çok benzer CUR salım modelleri sergilediği belirtilmiştir [125]. Literatürdeki çalışmaların ve bizim çalışmamızın da gösterdiği üzere, FA'in taşıyıcı sistemlere konjugasyonu salım hızını azaltmakta ancak yine de ilacın sürekli salımını sağlamaktadır.

Nosrati ve ark., BSA ile kapladıkları manyetik demir oksit nanopartiküllerinden CUR salımını incelemişlerdir. 2ml PBS tamponu içerisinde disperse edilen, 5mg partikül içeren diyaliz çantasından, 25ml salım ortamına pH 5.5 ve pH 7.4 olmak üzere 2 farklı ortamda CUR salım çalışması gerçekleştirmişlerdir. Kümülatif CUR (CUR yükleme kapasitesi 6.89%) salım yüzdesi, yaklaşık 6 gün içerisinde pH 5.5 salım ortamı için %55 ve pH 7.4 için %35 olarak bulunmuştur [126]. Li ve ark., yüzeyini glisirretinik asit (glycyrrhetic acid) ile modifiye ettikleri CUR yüklü albümin nanopartiküllerden CUR salımını 72 saatlik süre sonunda yaklaşık 60% olarak hesaplamışlardır [122]. Luo ve ark., genipin ile çapraz bağlanmış, yüzeyi tannik asit ile modifiye edilmiş insan serum albümini (HSA) nanopartiküllerinden diyaliz metodu ile pH 7.4'te, 100 saatlik süre sonunda yaklaşık 60%'lık kümülatif CUR salımı elde etmişlerdir [121]. Camargo ve ark., melanoma tedavisinde kullanılmak üzere hazırlanan albümin nanopartiküllerden, CUR kümülatif salım yüzdesini %5 dodesil sülfat içeren PBS tamponunda pH 7.4'te 5 günün sonunda

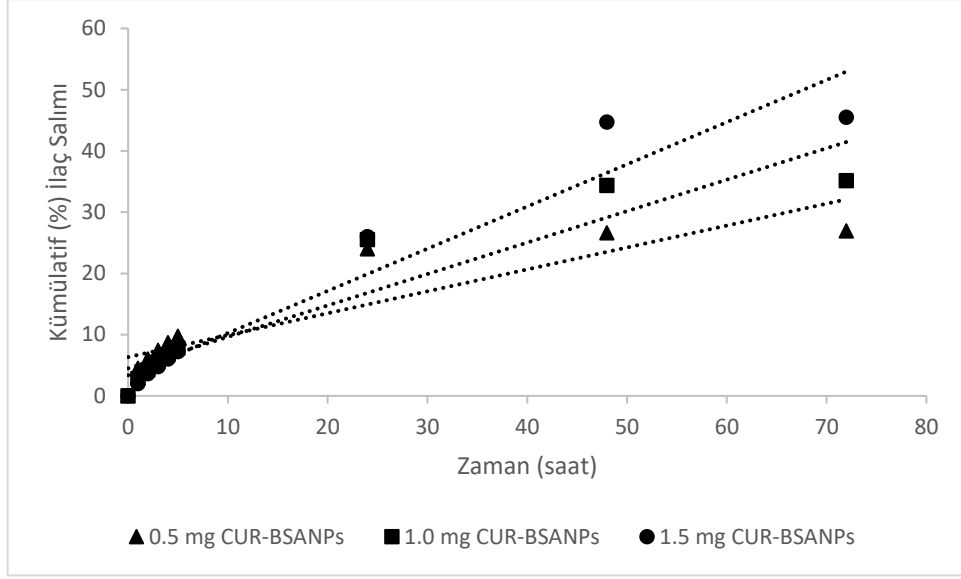
yaklaşık %33 olarak bulmuşlardır [103]. Bu çalışmada elde edilen CUR kümülatif salım yüzdelерinin her iki pH değeri içinde literatürle uyumlu olduğu görülmektedir. Aynı zamanda literatürle karşılaştırıldığında salımda stabiliteye daha kısa sürede ulaşıldığı, kontrollü ve uzun sürede daha yüksek bir salım profilinin elde edildiği görülmektedir.



Şekil 4.35. CUR-BSANPs ve FA-CUR-BSANPs'den CUR salım profillerinin karşılaştırılması (pH 7.4 ve T=37°C).

4.2.8. CUR-BSANPs' den CUR Salım Kinetiğinin Farklı pH Değerlerinde İncelenmesi

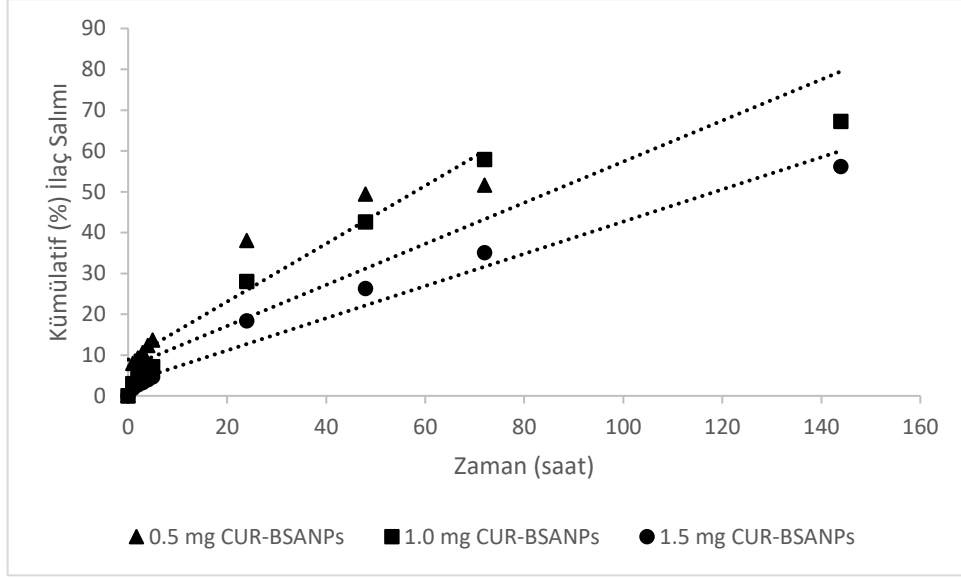
En uygun koşullarda sentezlenen ve farklı miktarlarda CUR yüklenen BSANPs'den CUR salım kinetiği araştırılmıştır. Fizyolojik kan pH'sı 7.4 ve asidik tümör mikroçevresi pH 5.6'yı simüle eden farklı pH tamponlarında yapılan *in vitro* salım çalışmalarından elde edilen verilerin sıfıncı mertebeden, birinci mertebeden, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowell salım modellerine uyumu araştırılmıştır [93, 127]. Her model için kinetik hız sabitlerinin (k_0 , k_1 , k_H , k_{HC} , k) değerleri ve Korsmeyer-Peppas modeli için n difüzyon üssünün değerleri pH 7.4 ve pH 5.6 için bulunmuş ve bu değerler Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10'da sunulmuştur.



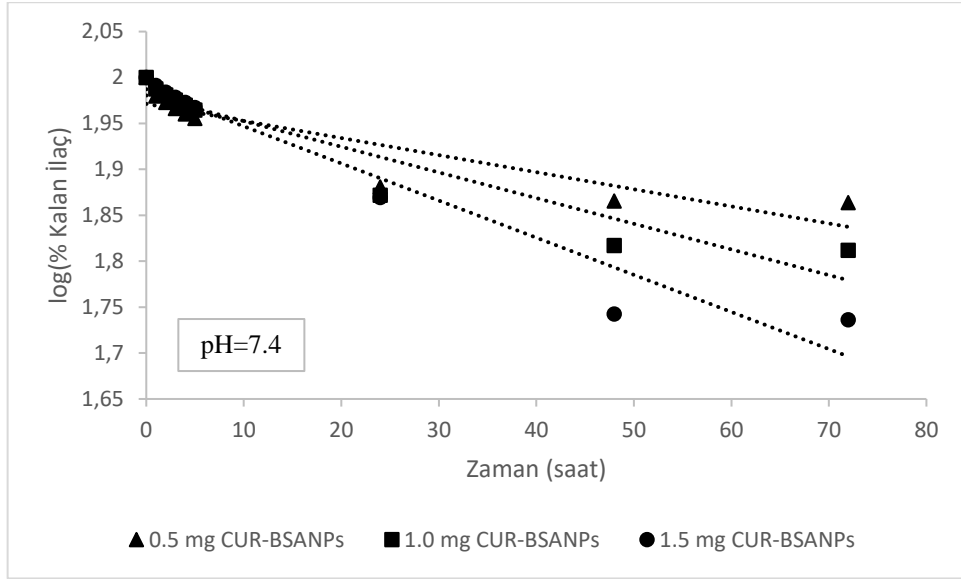
Şekil 4.36. Sıfırıncı dereceden kinetik modele göre farklı CUR konsantrasyonlarında ve pH 7.4'te CUR-BSANPs'den CUR salım verilerinin doğrusallaştırılması.

İlaç salımının kinetiği ve mekanizması, CUR salımına ait verilerin belirtilen kinetik modellere uyumunun incelenmesi yoluyla değerlendirilmiştir. Kontrollü ilaç dağıtım sistemleri karmaşık olduğundan ilaç salımının tek bir kinetik model ile açıklanması beklenemez. Her model için elde edilen regresyon katsayıları karşılaştırıldığında CUR-BSANPs' den CUR salımının her iki pH değerinde de en iyi Korsmeyer-Peppas modeli ile temsil edildiği anlaşılmıştır. Farklı CUR yüklemelerinde elde edilen salım profilleri, Korsmeyer-Peppas modeline göre doğrusallaştırılmış ve pH 7.4 ve pH 5.6 için elde edilen model doğruları sırasıyla Şekil 4.44-4.45'te verilmiştir. Diğer modellere göre doğrusallaştırılmış salım profilleri ise Şekil 4.36-4.43 arasında verilmiştir.

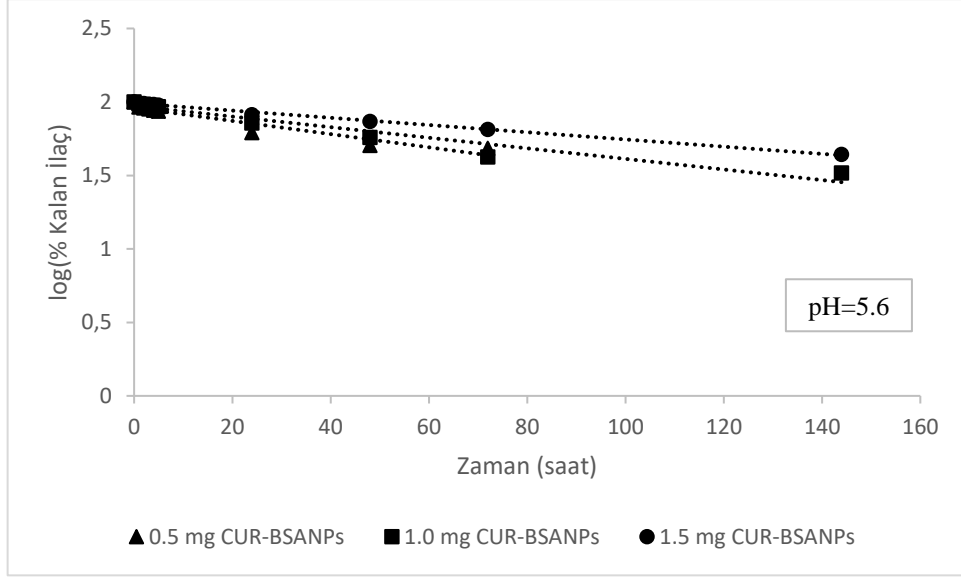
Bir ilacın ilaç salım sisteminden salınması hem çözünme hem de difüzyonu içermektedir ve durum çeşitli matematiksel denklem modelleriyle açıklanmaktadır. Eğer Higuchi modeli için korelasyon katsayısı daha yüksekse, ilaç salımının ana mekanizması difüzyon kontrollü salım mekanizmasıdır. İlaç salımının birincil mekanizmasının Higuchi modelinden difüzyon kontrollü olduğu tespit edildikten sonra, ilaç salımının hangi difüzyon türünü izlediğine karar vermek gerekir. Korsmeyer-Peppas matematiksel modeli n değeri (salım üssü) ile difüzyonun tipini göstermektedir.



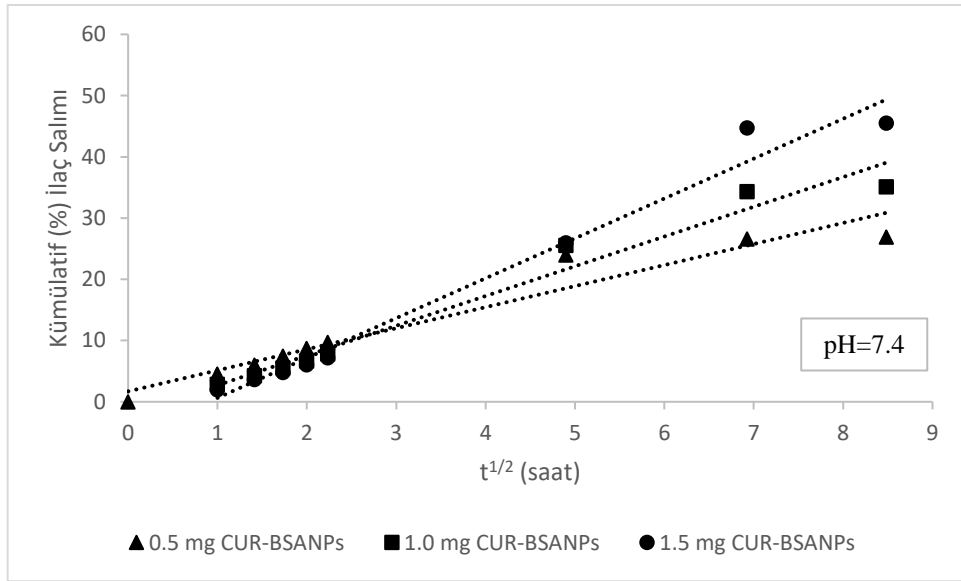
Şekil 4.37. Sıfırıncı dereceden kinetik modele göre farklı CUR konsantrasyonlarında ve pH 5.6'da CUR-BSANPs'den CUR salım verilerinin doğrusallaştırılması.



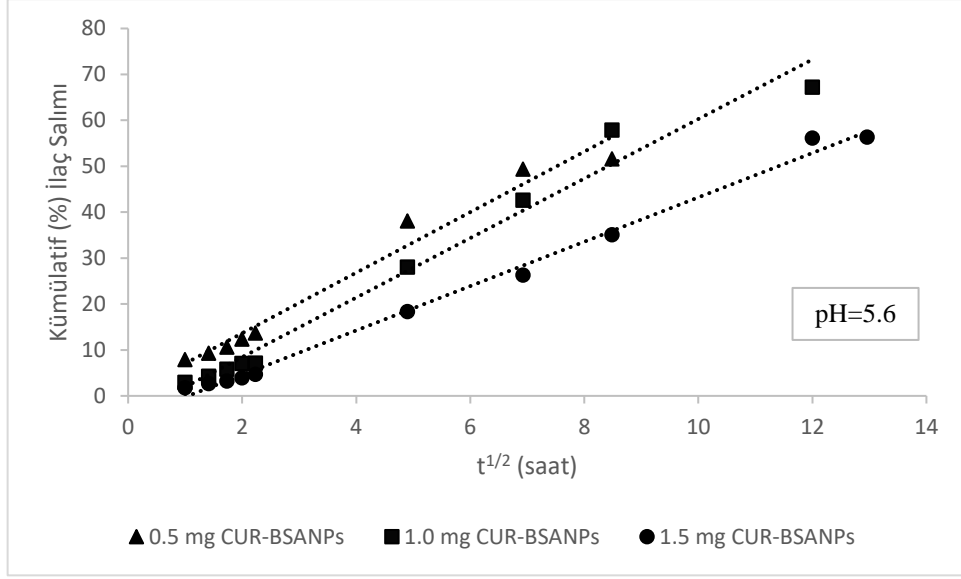
Şekil 4.38. Birinci dereceden kinetik modele göre farklı CUR konsantrasyonlarında ve pH 7.4'te CUR-BSANPs'den CUR salım verilerinin doğrusallaştırılması.



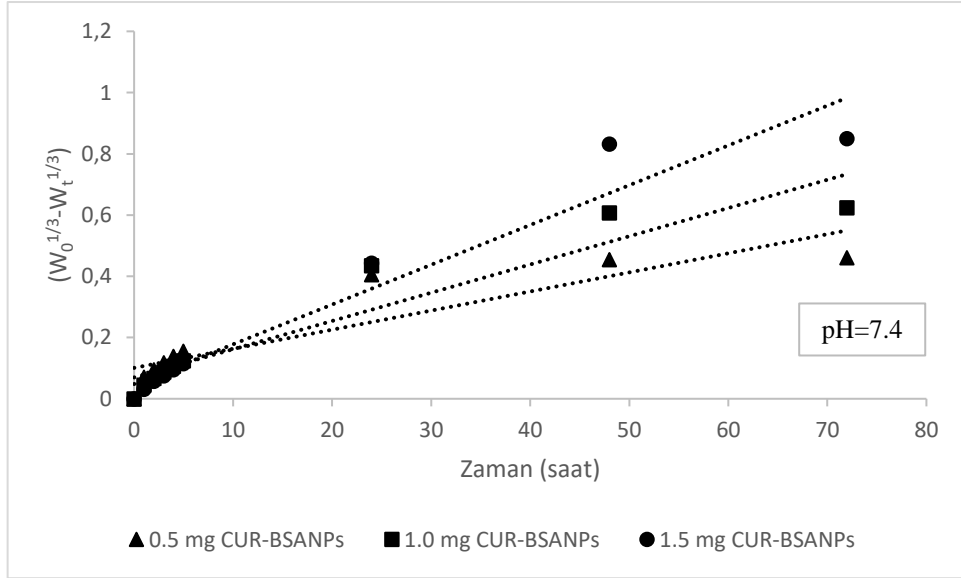
Şekil 4.39. Birinci dereceden kinetik modele göre farklı CUR konsantrasyonlarında ve pH 5.6'da CUR-BSANPs'den CUR salım verilerinin doğrusallaştırılması.



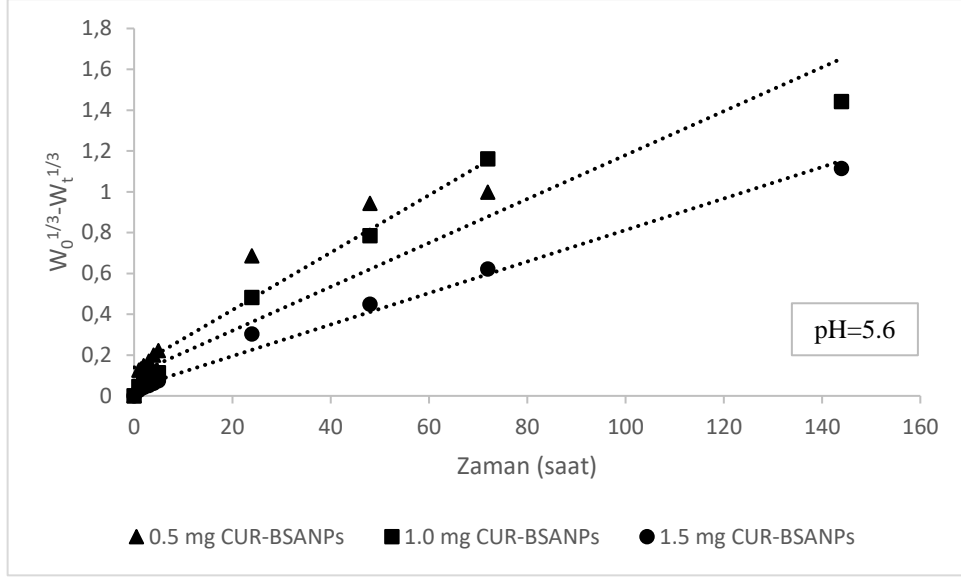
Şekil 4.40. Higuchi kinetik modeline göre farklı CUR konsantrasyonlarında ve pH 7.4'te CUR-BSANPs'den CUR salım verilerinin doğrusallaştırılması.



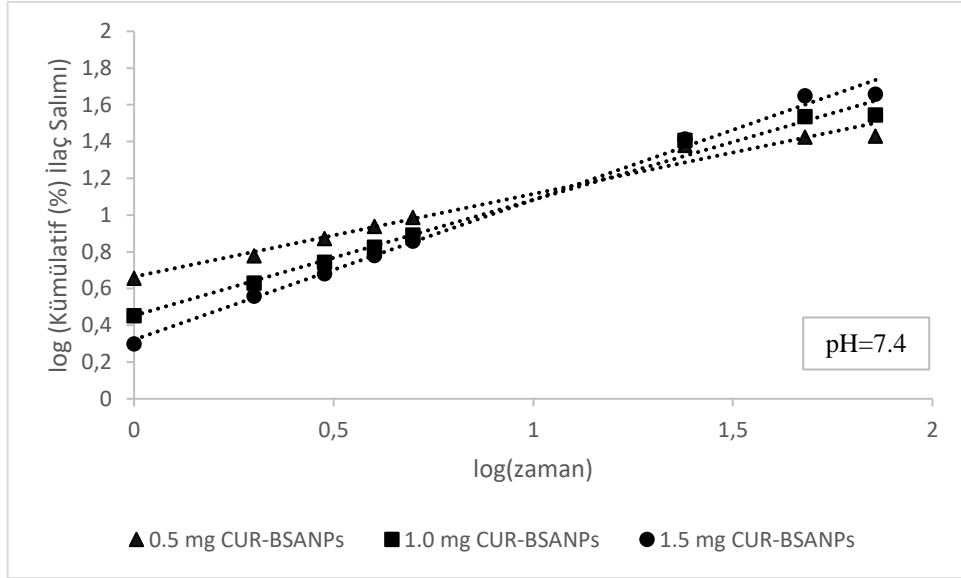
Şekil 4.41. Higuchi kinetik modeline göre farklı CUR konsantrasyonlarında ve pH 5.6’da CUR-BSANPs’den CUR salım verilerinin doğrusallaştırılması.



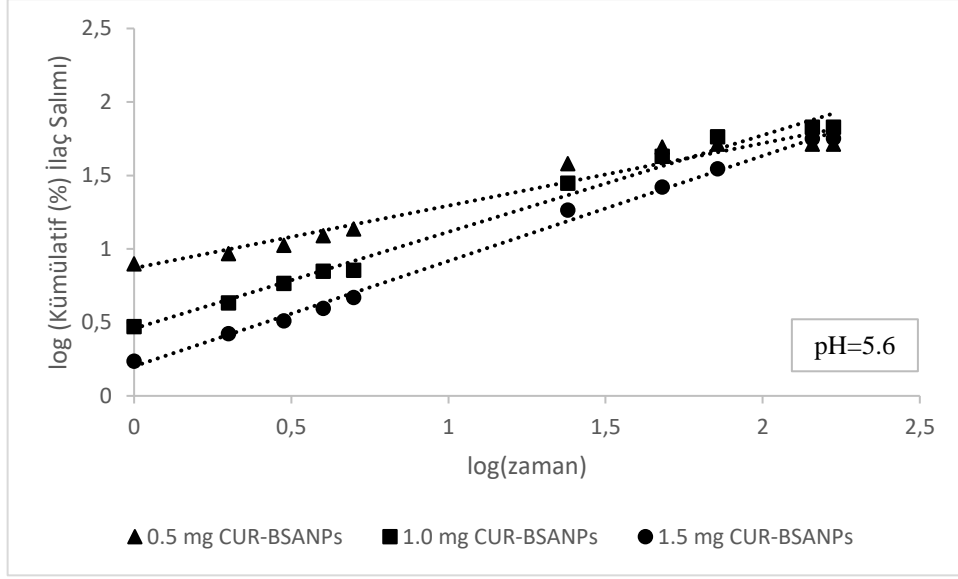
Şekil 4.42. Hixson-Crowell kinetik modeline göre farklı CUR konsantrasyonlarında ve pH 7.4’te CUR-BSANPs’den CUR salım verilerinin doğrusallaştırılması.



Şekil 4.43. Hixson-Crowell kinetik modeline göre farklı CUR konsantrasyonlarında ve pH 5.6'da CUR-BSANPs'den CUR salım verilerinin doğrusallaştırılması.



Şekil 4.44. Korsmeyer-Peppas kinetik modeline göre farklı CUR konsantrasyonlarında ve pH 7.4'te CUR-BSANPs'den CUR salım verilerinin doğrusallaştırılması.



Şekil 4.45. Korsmeyer-Peppas kinetik modeline göre farklı CUR konsantrasyonlarında ve pH 5.6’da CUR-BSANPs’den CUR salım verilerinin doğrusallaştırılması.

Korsmeyer-Peppas eşitliği ile hesaplanan n difüzyon üssüne göre, her pH seviyesinde meydana gelen salım için ilaç salım mekanizması önerilmektedir. Bu modele göre, küresel bir yapıya sahip partiküllerde ilaç salımı, $n < 0.5$ ise, “Fickian difüzyon” ile, eğer $0.5 < n < 1.0$ ise “Anomalous (non-Fickian) difüzyon” ile, $n = 1.0$ ise “case II transport” ve $n > 1.0$ ise “Super case II transport” ile gerçekleşir [94]. Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10’da görüldüğü gibi, farklı CUR yüklemelerinde hesaplanan n difüzyon üssünün değerleri incelendiğinde, fizyolojik kan ve asidik tümör mikroçevresini simüle eden pH 7.4 ve pH 5.6 seviyelerinde tampon çözeltilerdeki CUR salım mekanizmasının Anomalous (non-Fickian) difüzyon ile uyumlu olduğu bulunmuştur. Fickian difüzyon salımı, bir kimyasal potansiyel gradienti nedeniyle ilacın olağan moleküler difüzyonu ile oluşur. CUR-BSANPs’den CUR salımı için n değerlerinin 0.43 ile 0.76 arasında değiştiği görülmektedir. Hem Fickian transport yani ilacın sistemden ortama difüzyonla salınması hem de Case II transport, Anomalous transporttaki şişme kontrollü salım vardır. Case II transport terimi polimerin çözülmesini ve erozyonunu da içermektedir. BSANPs biyopolimerik yapıda olduklarından biyodegradasyonla da CUR’ inin sistemden serbest kaldığı söylenebilir. Her iki pH değerinde de BSANPs’e yüklenen CUR miktarı arttıkça, regresyon katsayılarının 1’ e çok daha yaklaştığı, yani Korsmeyer-Peppas modeline uyumun arttığı görülmektedir. Bu durum BSANPs’e yüklenen CUR miktarı arttıkça CUR salımının, anomalous transport mekanizması ile kontrol edildiğini göstermektedir. Her iki pH değerinde de 0.5 mg CUR yüklenen BSANPs’in n üssünün 0.43’ e yaklaştığı, 1

mg CUR yüklenen BSANPs'in n üssünün yaklaşık 0.6 olduğu, 1.5 mg CUR içeren nanopartiküllerin n üssünün ise yaklaşık 0.7 olduğu görülmektedir. Düşük CUR yüklemelerinde Korsmeyer-Peppas modeli n üssünün 0.43' e yaklaşması, ortam pH'ından bağımsız olarak CUR salımının Fickian difüzyona yaklaştığını göstermektedir. Yüksek CUR yüklemelerinde ise CUR-BSANPs'den CUR salımı, Anomalous (non-Fickian) transport mekanizmaları yani difüzyonla birlikte şişme, erozyon ve/veya biyodegradasyon kombinasyonu yoluyla gerçekleşmektedir. Korsmeyer-Peppas modeli kinetik sabiti k değerleri ise BSANPs'e yüklenen CUR miktarının artması ile azalmaktadır. Kinetik k sabitindeki azalma özellikle pH 5.6' da daha belirgindir. Düşük CUR konsantrasyonlarında salım başlangıçta hızlıdır, sonra sistem stabil hale gelmekte kontrollü salım başlamaktadır. Yüksek CUR konsantrasyonlarında ise başlangıçta yüzeydeki veya yüzeye yakın kısımlardaki CUR' un hızlı salımını, difüzyon kısıtlamaları nedeniyle daha yavaş bir eğimle yükselen ve daha uzun sürede stabil hale gelen bir salım profili izlemektedir.

Çizelge 4.9. CUR-BSANP'lerden CUR salımının çeşitli kinetik modellere uyumunun karşılaştırılması (fizyolojik kanı simüle eden pH 7.4'teki kinetik parametrelerin değerleri ve R² değerlerinin karşılaştırılması).

Sıfıncı derece kinetik model		($Q = Q_0 + k_0 \cdot t$)	
CUR miktarı (mg)	k_0	R²	
0.5	0.3579	0.8019	
1.0	0.5135	0.8917	
1.5	0.6891	0.9338	
Birinci derece kinetik model		($\log C = \log C_0 - k_1 \cdot t / 2.303$)	
CUR miktarı (mg)	k_1	R²	
0.5	0.0019	0.8182	
1.0	0.0028	0.9089	
1.5	0.0040	0.9468	
Higuchi kinetik model		($Q = K_H \times t^{1/2}$)	
CUR miktarı (mg)	K_H	R²	
0.5	3.4383	0.9407	
1.0	4.8563	0.9700	
1.5	6.5118	0.9791	
Hixson-Crowell kinetik model		($W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = k_{HC} \times t$)	
CUR miktarı (mg)	k_{HC}	R²	
0.5	0.0062	0.8130	
1.0	0.0092	0.9034	
1.5	0.0130	0.9431	

Çizelge 4.9. (Devam) CUR-BSANP'lerden CUR salımının çeşitli kinetik modellere uyumunun karşılaştırılması (fizyolojik kanı simüle eden pH 7.4'teki kinetik parametrelerin değerleri ve R² değerlerinin karşılaştırılması).

Korsmeyer-Peppas kinetik model $(\log(\frac{M_t}{M_\infty}) = \log k + n \log(t))$

CUR miktarı (mg)	k	R ²	n	İlaç Salım Mekanizması
0.5	4.6185	0.9783	0.4506	Non-Fickian Difüzyon
1.0	2.8373	0.9892	0.6299	Non-Fickian Difüzyon
1.5	2.0960	0.9943	0.7614	Non-Fickian Difüzyon

*Q=t zamanında salınan ilaç miktarı

*Q₀= t=0 zamanında ilacın başlangıç konsantrasyonu

*k₀= Sıfıncı derece hız sabiti

*C=t zamanında kalan ilaç yüzdesi

*C₀=İlacın başlangıç konsantrasyonu

*k₁= Zaman⁻¹ cinsinden ifade edilen birinci dereceden hız denklemi

*k_H= Higuchi hız sabiti

*W₀^{1/3}= Farmasötik dozaj formundaki başlangıç ilaç miktarı

*W_t^{1/3}= t zamanında farmasötik dozaj formunda kalan ilaç miktarı

*k_{HC}= Yüzey hacim ilişkisini tanımlayan Hixson-Crowell sabiti

*Q= t zamanında salınan ilaç miktarı

* $\frac{M_t}{M_\infty}$ = t zamanında salınan ilaç kesri

*k= Korsmeyer salım hızı sabiti

*n= İlaç salım üssü

Çizelge 4.10. CUR-BSANP'lerden CUR salımının çeşitli kinetik modellere uyumunun karşılaştırılması (asidik tümör mikroçevresini simüle eden pH 5.6'daki kinetik parametrelerin değerleri ve R² değerlerinin karşılaştırılması).

Sıfıncı derece kinetik model		$(Q = Q_0 + k_0 \cdot t)$	
CUR miktarı (mg)	k ₀	R ²	
0.5	0.7100	0.8861	
1.0	0.5032	0.8805	
1.5	0.3943	0.9701	
Birinci derece kinetik model		$(\log C = \log C_0 - k_1 \cdot t/2.303)$	
CUR miktarı (mg)	k ₁	R ²	
0.5	0.0045	0.9201	
1.0	0.0036	0.9412	
1.5	0.0025	0.9952	
Higuchi kinetik model		$(Q = K_H \times t^{1/2})$	
CUR miktarı (mg)	k _H	R ²	
0.5	6.5909	0.9726	
1.0	6.4796	0.9787	
1.5	4.8305	0.9946	
Hixson-Crowell kinetik model		$(W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = k_{HC} \times t)$	
CUR miktarı (mg)	k _{HC}	R ²	
0.5	0.0141	0.9095	
1.0	0.0108	0.9227	
1.5	0.0077	0.9898	

Çizelge 4.10. (Devam) CUR-BSANP'lerden CUR salımının çeşitli kinetik modellere uyumunun karşılaştırılması (asidik tümör mikroçevresini simüle eden pH 5.6'daki kinetik parametrelerin değerleri ve R² değerlerinin karşılaştırılması).

$$\text{Korsmeyer-Peppas kinetik model } \left(\log \left(\frac{M_t}{M_\infty} \right) = \log k + n \log(t) \right)$$

CUR miktarı (mg)	k	R ²	n	İlaç Salım Mekanizması
0.5	7.4012	0.9538	0.4248	Non-Fickian Difüzyon
1.0	2.8695	0.9871	0.6580	Non-Fickian Difüzyon
1.5	1.5889	0.9959	0.7162	Non-Fickian Difüzyon

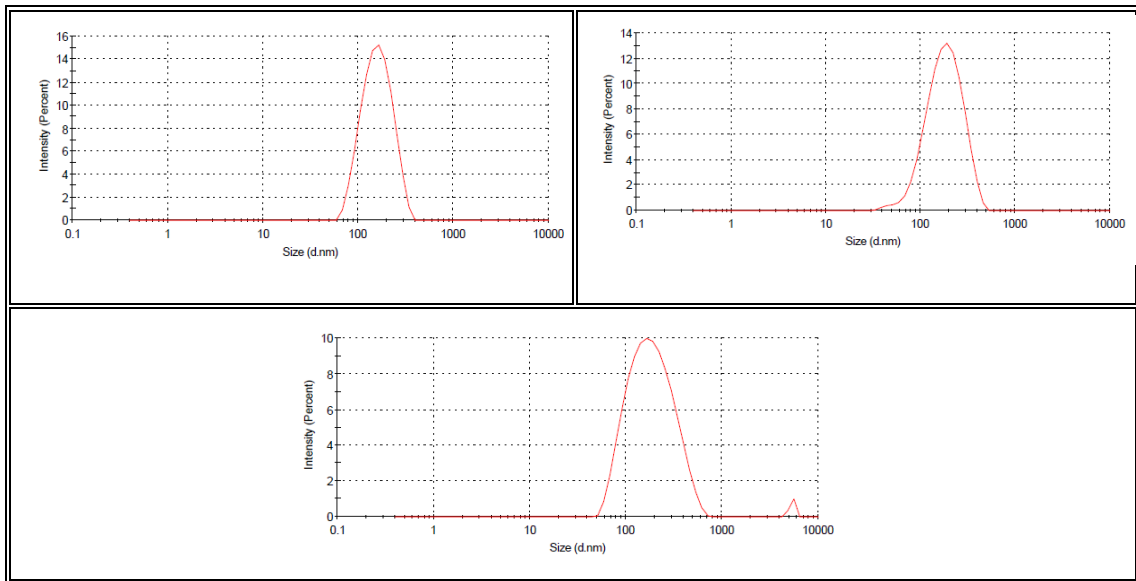
4.3. PLGANPs ve Doseksel Yüklü PLGA-NPs (PLGA-DTX-NPs)'in Optimizasyonu, Karakterizasyon ve İlaç Salım Çalışmaları

Nanopresipitasyon metodu ile hazırlanan PLGANPs'in sentez metodunda kullanılan polimer miktarının, organik faz (aseton) hacminin ve sulu fazı hazırlamak için kullanılan stabilizer PVA'nın konsantrasyonu değiştirilerek partikül boyutunun optimizasyonu yapılmıştır.

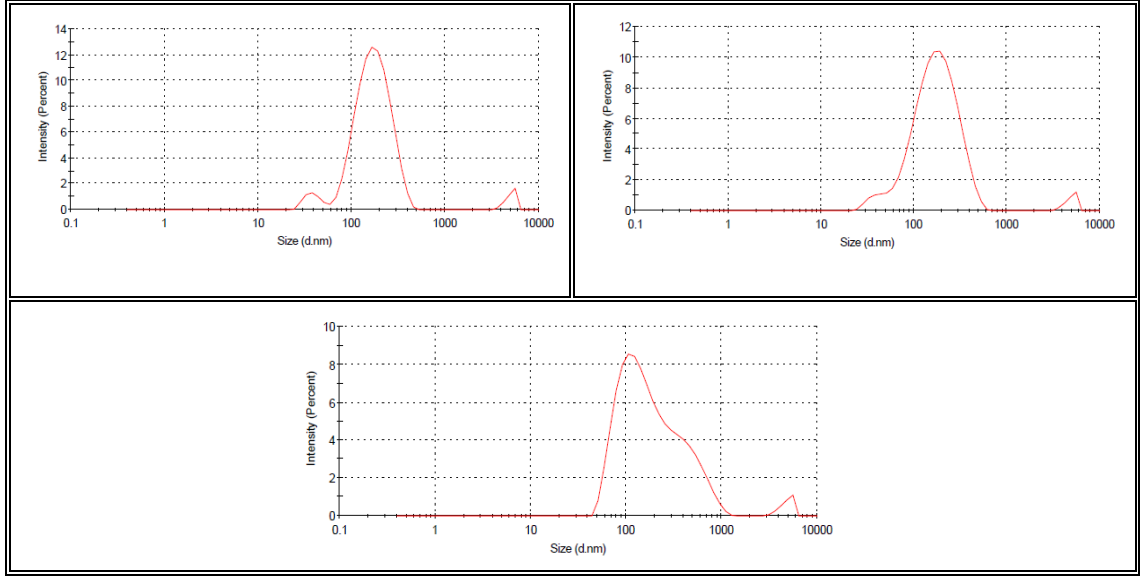
4.3.1. Partikül Boyutu ve Polidispersite İndeksi Analizleri

4.3.1.1. Polimer Miktarın Etkisi

Polimer miktarının nanopresipitasyon metodu üzerine etkisinin incelenebilmesi amacıyla 2 farklı konsantrasyonda (10mg ve 30mg), %0.5 PVA konsantrasyonunda ve organik faz hacmi 3 ml olacak şekilde analizler gerçekleştirilmiş ve 3 tekrarlı Zetasizer ölçümleri alınmıştır.



Şekil 4.46. PLGANPs'e ait boyut dağılımı eğrileri (PLGA miktarı 30 mg, PVA konsantrasyonu %0.5, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 3 ml).



Şekil 4.47. PLGANPs'e ait boyut dağılımı eğrileri (PLGA miktarı 10 mg, PVA konsantrasyonu %0.5, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 3 ml).

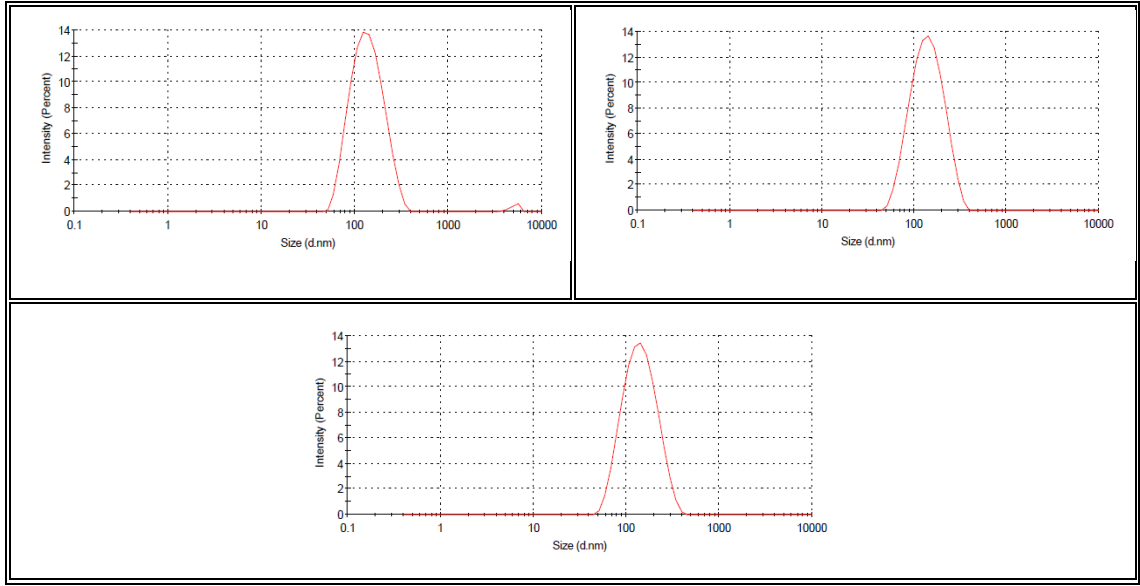
PLGA miktarı 30 mg, PVA konsantrasyonu %0.5, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve aseton hacmi (organik faz) 3 ml olacak şekilde gerçekleştirilen PLGANPs sentezinde Zetasizer sonuçları incelendiğinde partikül boyutu yaklaşık 177.7 ± 8.43 nm civarı, polidispersite indeksi değeri ise yaklaşık 0.284 ± 0.02 olarak bulunmuştur (Şekil 4.46). 10 mg PLGA kullanılarak hazırlanan PLGANP partikül boyutları ise yaklaşık 154.0 ± 0.42 nm civarı ve polidispersite indeksi 0.277-0.348 aralığında hesaplanmıştır. 30 mg PLGA kullanılan duruma göre partikül boyutu azalmış ancak polidispersite indeksi değerleri artmıştır. Öte yandan 10 mg PLGA kullanıldığında partikül veriminde düşüş gözlemlenmiştir.

4.3.1.2. Polivinil Alkol (PVA)-Stabilizer Konsantrasyonunun Etkisi

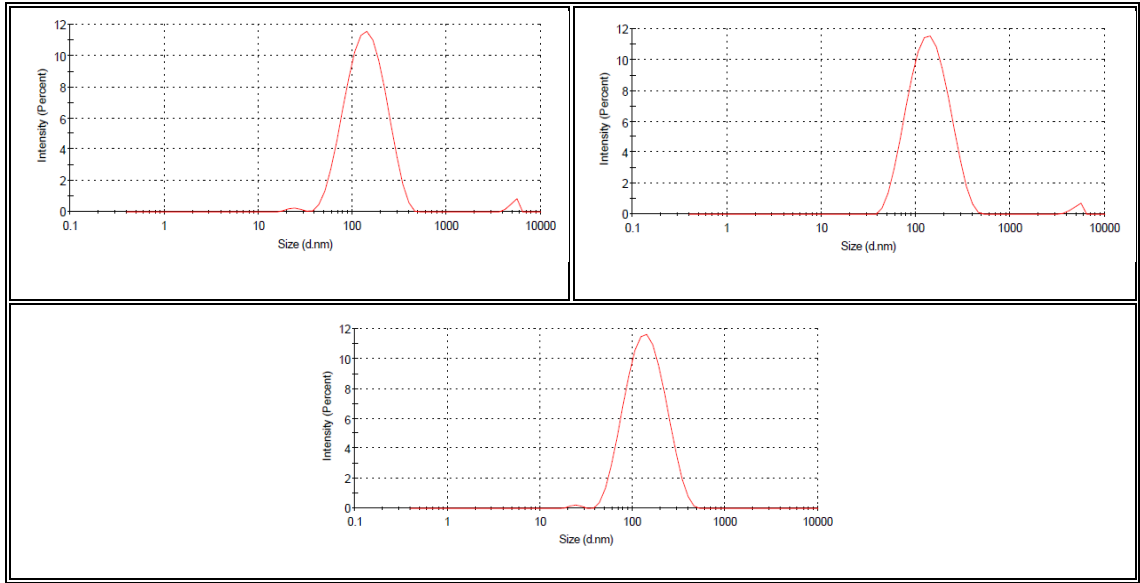
PLGANPs'in nanopresipitasyon yöntemi ile hazırlanmasında partikül boyutu üzerine önemli etkisi olan parametrelerden biri de kullanılan surfaktanın türü ve konsantrasyonudur. Bu tez kapsamında stabilizer olarak PVA tercih edilmiştir. PVA partikül boyutunu kontrol etme ve aglomerasyonu engelleme, sudaki çözünürlüğü ve biyoyumluluğu, düşük toksisitesi ve partiküllerin stabilitesini sağlama gibi bir dizi avantaja sahiptir.

Stabilizer konsantrasyonunun artırılmasının, partikül boyutunu çeşitli şekillerde etkileyebileceği bilinmektedir. Bu etki, stabilizerin türüne, kullanılan çözücünün özelliklerine, PLGA konsantrasyonuna ve diğer deneysel koşullara bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bu tez kapsamında 30 mg PLGA, PVA konsantrasyonu %1.0, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 3 ml olacak şekilde hazırlanan PLGANPs'in

ortalama partikül boyutu 128.9 ± 1.33 ve polidispersite indeksi verileri 0.178 ± 0.01 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.48).



Şekil 4.48. PLGANPs'e ait boyut dağılımı eğrileri (PLGA miktarı 30 mg, PVA konsantrasyonu % 1.0, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 3 ml).

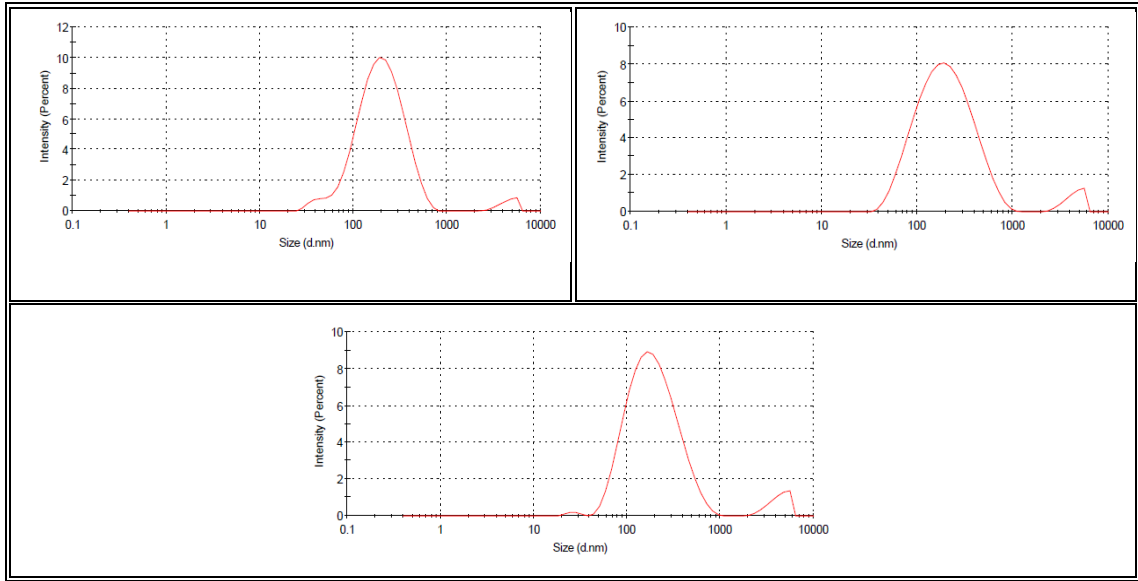


Şekil 4.49. PLGANPs'e ait boyut dağılımı eğrileri (PLGA miktarı 30 mg, PVA konsantrasyonu %2.0, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 3 ml).

Stabilizer konsantrasyonunun etkisinin belirlenebilmesi amacıyla aynı polimer (PLGA) konsantrasyonunda PVA konsantrasyonu %2'ye çıkarılarak PLGANPs'de hazırlanmış ve Zetasizer boyut dağılımı eğrileri Şekil 4.49'da sunulmuştur. 30 mg PLGA, PVA konsantrasyonu %2.0, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 3 ml olacak şekilde hazırlanan PLGANPs'in ortalama partikül boyutu 126.4 ± 4.12 ve polidispersite indeksi verileri 0.217 ± 0.03 olarak ölçülmüştür. Diğer parametrelerin aynı olduğu

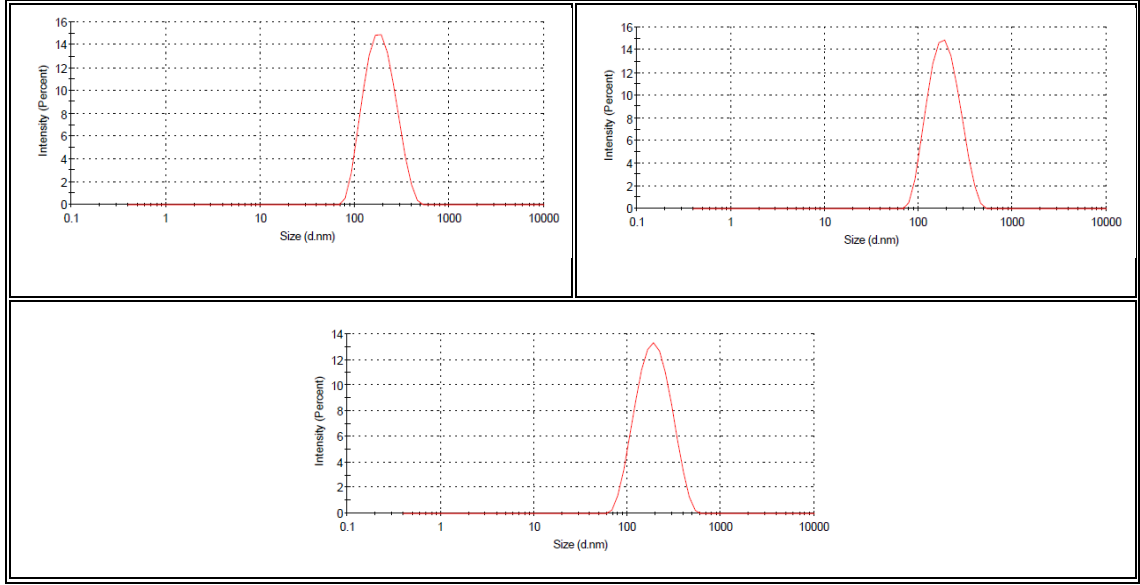
koşullarda PVA konsantrasyonun 2 katına çıkarılması PLGANPs'in ortalama partikül boyutlarında anlamlı bir değişikliğe sebep olmamış, bunun yanında polidispersite indeksi değerlerini %1 PVA kullanıldığı duruma göre arttırdığı tespit edilmiştir. PVA konsantrasyonu için %1 değeri optimum koşul olarak belirlenmiştir.

Optimum stabilizer konsantrasyonu belirlendikten sonra kullanılan polimer miktarını optimize etmek ve en uygun partikül boyutlarındaki PLGANPs'i tespit etmek için 20 mg ve 40 mg PLGA kullanılarak da PLGANPs hazırlanmış ve partikül boyut ölçümleri alınmıştır (Şekil 4.50-4.51).



Şekil 4.50. PLGANPs'e ait boyut dağılımı eğrileri (PLGA miktarı 20 mg, PVA konsantrasyonu %1.0, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 3 ml).

20 mg PLGA, PVA konsantrasyonu %1.0, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 3 ml olacak şekilde hazırlanan PLGANPs'in ortalama partikül boyutu 171.2 ± 1.55 ve polidispersite indeksi verileri 0.322 ± 0.09 olarak ölçülmüştür. 40 mg PLGA, PVA konsantrasyonu %1.0, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 3 ml olacak şekilde hazırlanan PLGANPs'in ortalama partikül boyutu 173.8 ± 1.55 ve polidispersite indeksi verileri 0.117 ± 0.03 olarak ölçülmüştür. 3 farklı PLGA konsantrasyonunda (20mg, 30mg ve 40mg) ve %1 surfaktan konsantrasyonunda hazırlanan PLGANPs partikül boyutu ölçümleri incelendiğinde en uygun partikül boyutu ortalaması 30mg PLGA kullanıldığı durumda elde edilmiştir. Öte yandan PLGA konsantrasyonu arttıkça polidispersite indeksi ölçümlerinin de bu 3 konsantrasyon için düzgün bir azalış eğilimi gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.11).

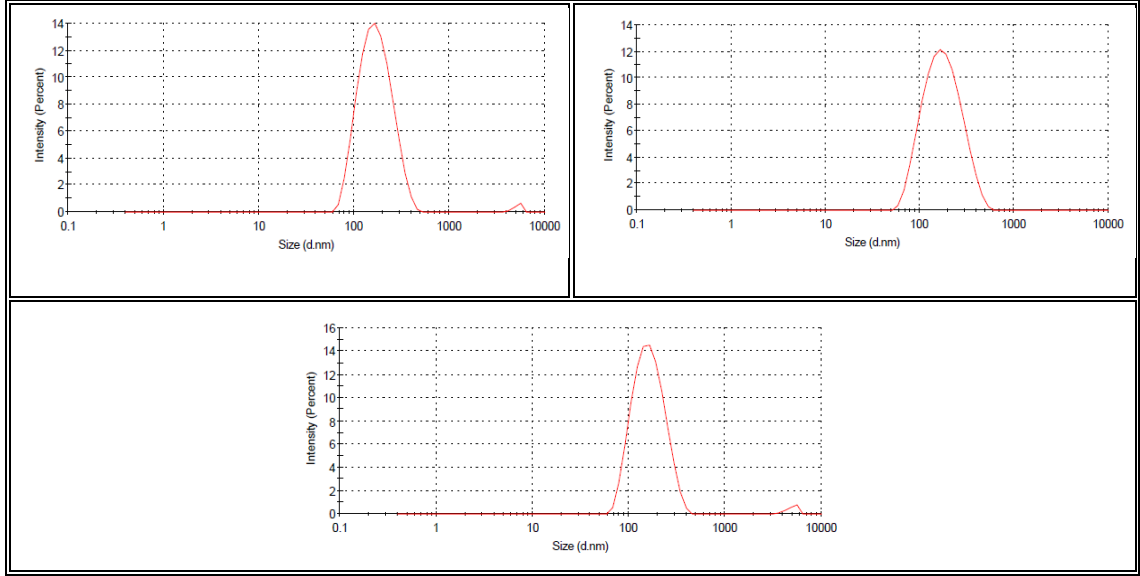


Şekil 4.51. PLGANPs'e ait boyut dağılımı eğrileri (PLGA miktarı 40 mg, PVA konsantrasyonu % 1.0, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 3 ml).

4.3.1.3. Organik Faz (Aseton) Hacminin Etkisi

PLGANPs'in nanopresipitasyon metoduna göre hazırlanmasında kullanılan organik fazın hacmi de önemli bir etkidir. Deneysel tasarımda organik faz hacmi 3ml olarak çalışıldığında en uygun polimer miktarı 30mg PLGA ve surfaktan konsantrasyonu %1 PVA olarak bulunmuştur. Optimize edilen bu parametreler kullanılarak organik fazın hacminin PLGANPs'in boyut ve polidispersite üzerindeki etkisini de araştırmak için organik faz hacmi 1ml olacak şekilde partikül sentezi yapılmış ve Zetasizer ölçümleri alınmıştır. İlaç yüklü PLGANPs hazırlarken organik fazın hacminin azaltılması ile aynı konsantrasyonda fakat daha az miktarda ilaç kullanılması açısından da bu parametrenin etkisini belirlemek önemlidir.

Organik faz hacmi 1 ml olacak şekilde hazırlanan PLGANPs'in ortalama partikül boyutu 157.2 ± 5.00 ve polidispersite indeksi verileri 0.176 ± 0.02 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.52).



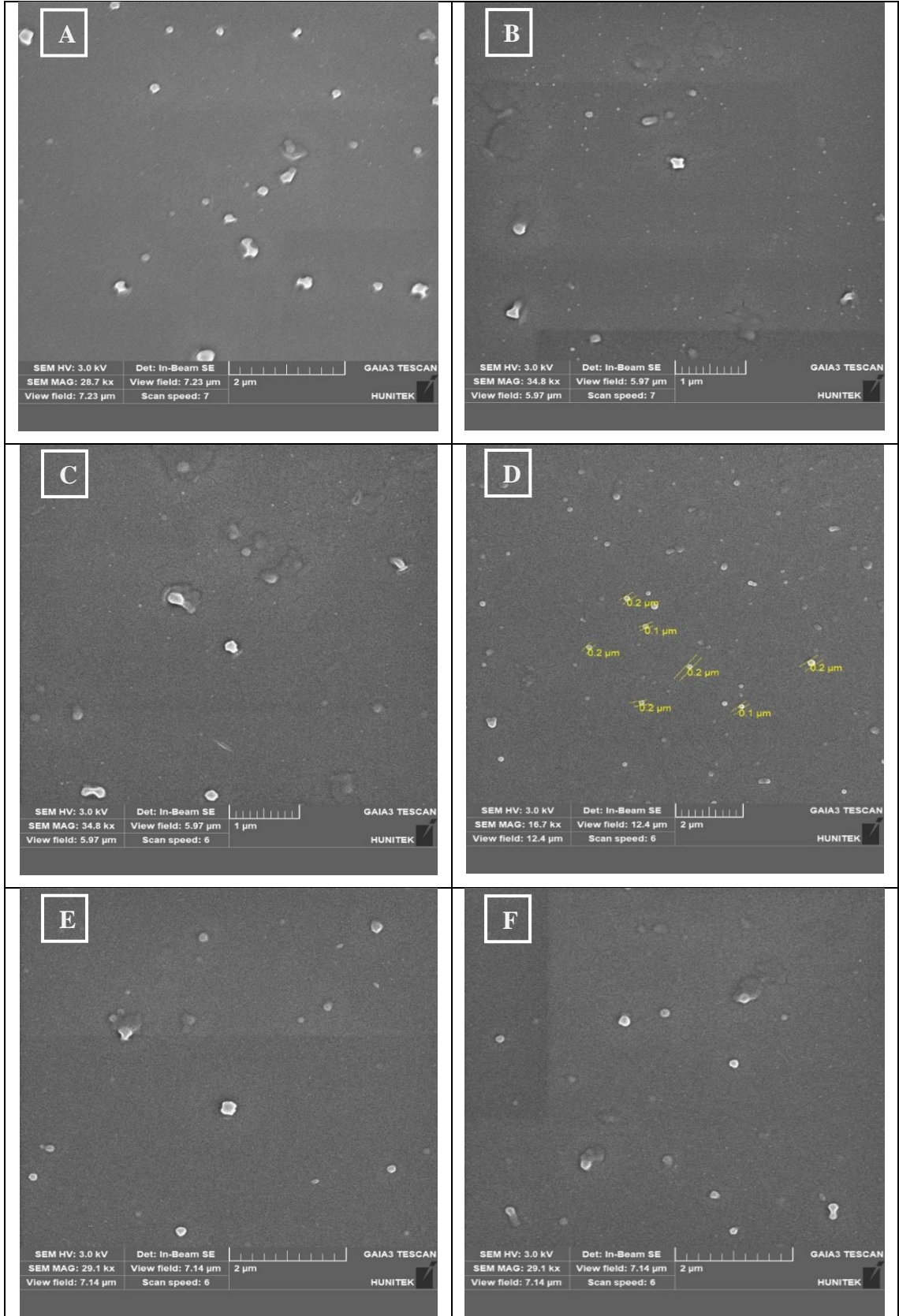
Şekil 4.52. PLGANPs'e ait boyut dağılımı eğrileri (PLGA miktarı 30 mg, PVA konsantrasyonu % 1.0, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 1 ml).

Çizelge 4.11. Farklı PLGA ve PVA konsantrasyonlarında hazırlanan PLGANPs'in ortalama partikül boyutu ve polidispersite indeksi değerlerinin karşılaştırılması.

PLGA (mg)	PVA (%)	Organik Faz (ml)	Sulu Faz (ml)	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	Polidispersite İndeksi
30	0.5	3	10	177.7±8.43	0.284±0.02
10	0.5	3	10	154.0±0.42	0.311±0.07
30	1.0	3	10	128.9±1.33	0.178±0.01
30	1.0	1	10	157.2±5.00	0.176±0.02
30	2.0	3	10	126.4±4.12	0.217±0.03
20	1.0	3	10	171.2±1.55	0.322±0.09
40	1.0	3	10	173.8±1.55	0.117±0.03

4.3.2. PLGANPs'in Morfolojik Analiz Çalışmaları

PLGANPs ve PLGA-DTX-NPs'in yüzey morfolojisini görüntülemek amacıyla SEM görüntüleri çekilmiştir. Şekil 4.53'te A, B, C ve D görüntüleri PLGANPs'e, E ve F görüntüleri ise PLGA-DTX-NPs'e aittir. Hem PLGANPs hem de PLGA-DTX-NPs'in küresel simetride ve dar bir partikül aralığında olduğu tespit edilmiştir ve SEM görüntülerinden ölçülen partikül boyutları Zetasizer ölçümleri ile paralel olarak bulunmuştur.

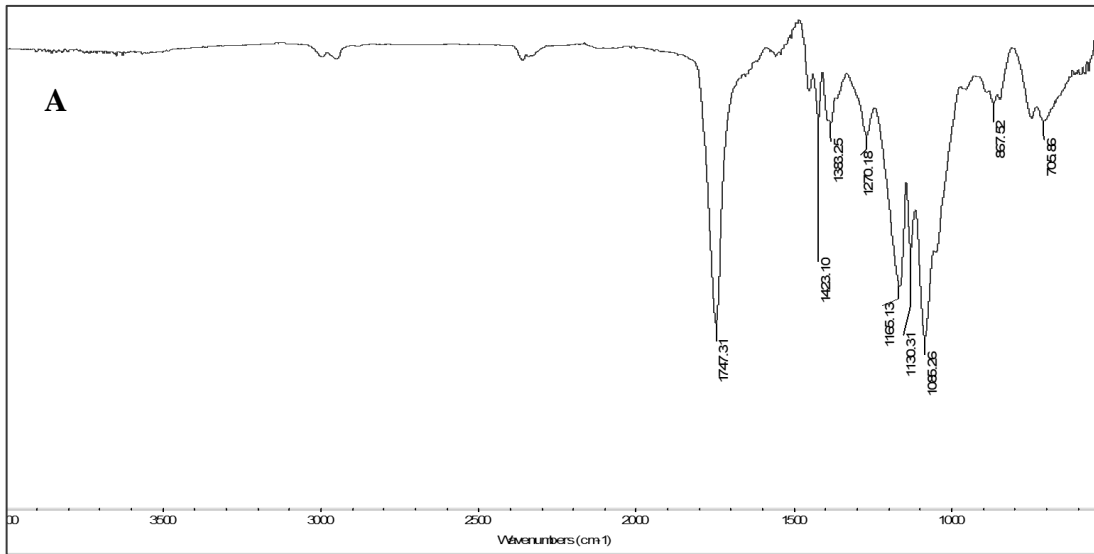


Şekil 4.53. PLGANPs'in SEM Görüntüleri (A,B,C,D) (PLGA miktarı 30 mg, PVA konsantrasyonu %1.0, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 3 ml) ve PLGA-DTX-NPs'in SEM görüntüleri (E,F) (PLGA miktarı 30 mg, DTX miktarı 3.0 mg, PVA konsantrasyonu %1.0, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 1 ml).

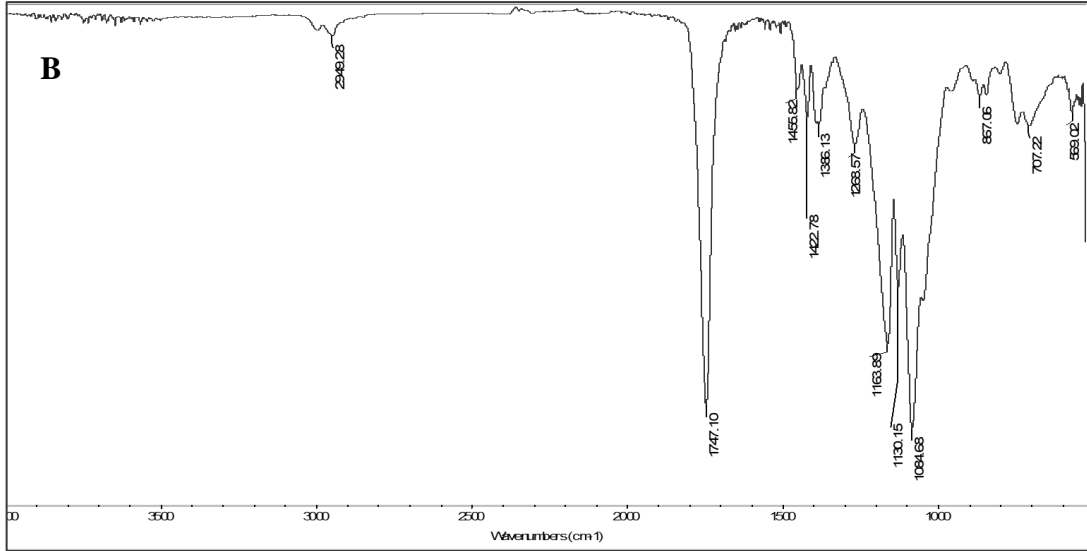
Prabhuraj ve ark., nanopresipitasyon metodu ile CUR ve niklosamid yüklü PLGANPs hazırlamışlardır. Hazırladıkları formülasyonların SEM görüntüleri incelendiğinde hazırlanan formülasyonların düzgün küresel simetride ve monodispers yapıdaki oluşumlarını doğrulamışlardır [128]. Bu çalışmada ilaç yüklü formülasyonların SEM ve TEM görüntüleri ilaç yüklendikten sonra PLGANPs'in morfolojik yapısında herhangi bir değişim olmadığını göstermiştir. Shi ve ark., tokoferil polietilen glikol süksinat (TPGS)'in surfaktan olarak kullanıldığı nanopresipitasyon metodu ile DTX yüklü PLGANPs hazırlamışlardır. Elde edilen SEM görüntüleri nanopartiküllerin dar boyut dağılımına sahip düzenli küresel simetride ve belirgin iğne delikleri olmayan pürüzsüz bir yüzeye sahip olduklarını ortaya koymuştur [109]. Literatür çalışmaları ile paralel olarak bu tez çalışmasında da benzer sonuçlar elde edilmiştir.

4.3.3. Fourier Dönümlü Kızılötesi Spektrofotometre (FTIR) Analizi

PLGANPs'e ait karakteristik pikleri gösteren FTIR spektrumu Şekil 4.54 (B)'de sunulmuştur. PLGA'ya ait FTIR spektrumu 3150-3650 cm^{-1} 'de geniş bir -OH grubu bandı göstermiştir. (Şekil 4.54 (A)). 1747 cm^{-1} 'de gözlenen yoğun bant, iki monomerde bulunan karbonil gruplarının gerilme titreşimine atfedilmektedir [129, 130]. 1085 cm^{-1} 'deki keskin pik PLGANPs'de bulunan ester grubunun C-O gerilmesine atfedilmiştir. C-H grubunun gerilme titreşimleri 2946 cm^{-1} ve 3000 cm^{-1} 'de, C-H grubunun eğilme titreşimleri ise 1270 cm^{-1} 'de gözlenmiştir [128].



Şekil 4.54. Saf PLGA (A) ve PLGANPs'e (B) ait FTIR spektrumları.

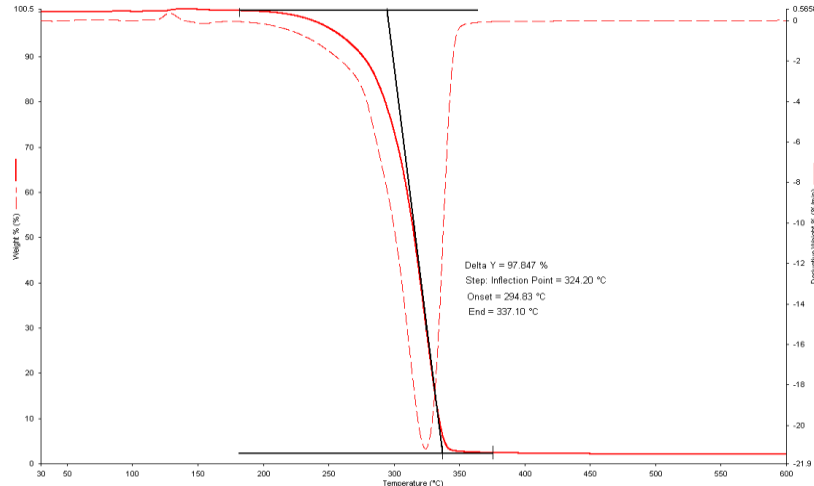


Şekil 4.54. (Devam) Saf PLGA (A) ve PLGANPs'e (B) ait FTIR spektrumları.

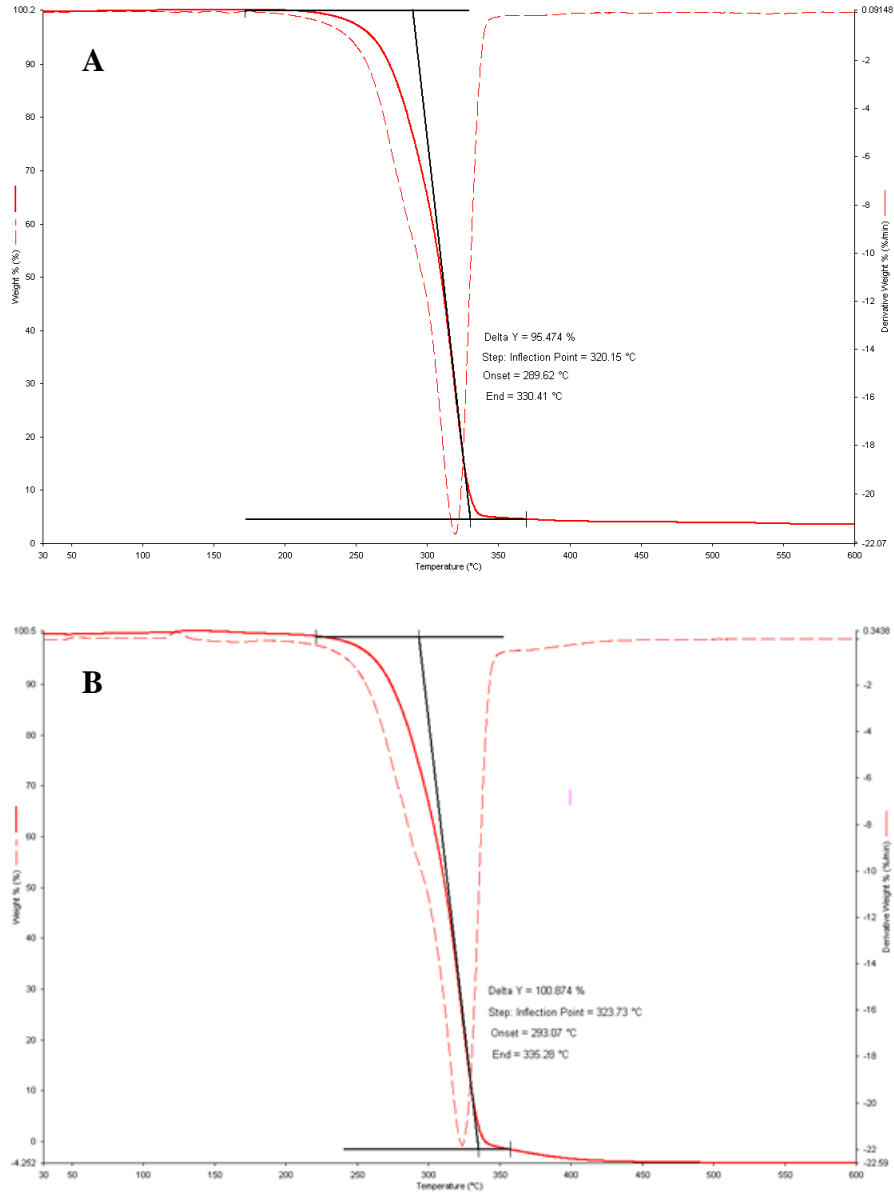
PLGANPs' ait FTIR spektrumunda PLGA ile aynı karakteristik pikler görülmektedir. Saf PLGA spektrumu ile karşılaştırıldığında bazı karakteristik piklerin şiddetinin azaldığı tespit edilmiştir. PLGA polimeri içeren farklı çalışmalarda da benzer pikler gözlemlendiği ve elde edilen sonuçların literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür.

4.3.4. TGA Analizleri

PLGA'nın toz formu, PLGANPs ve PLGA-DTX-NPs'e ait TGA eğrileri Şekil 4.55-4.56'da görülmektedir. PLGANPs' de PLGA ile aynı ağırlık kaybı modelini göstermiştir. Toz formundaki saf PLGA'daki ana bozunma olayı 294.83°C- 337.10°C'de %97.85'lik bir kütle kaybı ile gözlenmiştir. PLGANPs'de bu sıcaklık aralığı 289.62°C-330.41°C olarak ölçülmüştür ve PLGANPs'in ise %95.45'i bozunmuştur. PLGANPs hazırlamak için kullanılan metot ve kullanılan PLGA polimerinin özelliklerine göre bu değerlerde farklılık olabilmektedir [131, 132].



Şekil 4.55. Toz formundaki PLGA'ya ait termogravimetrik analiz sonucu.



Şekil 4.56. PLGANPs (A) ve PLGA-DTX-NPs'e (B) ait termogravimetrik analiz sonucu.

4.3.5. Enkapsülasyon Verimliliği ve Yükleme Kapasitesi

PLGANPs'e DTX yükleme sonrası hesaplanan enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi değerleri Çizelge 4.12'de sunulmuştur. PLGA-DTX-NPs' e yüklenen DTX miktarını ölçebilmek için direkt yöntem kullanılmıştır [133, 134]. Bu yöntemle göre öncelikle sentezlenip freeze-dryerda kurutulan PLGA-DTX-NPs'in uygun miktarı asetonitril içerisine eklenmiştir. Nanopartikülleri içeren bu çözelti yaklaşık 6 dk ultrasonik banyoda sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra ortamda var olan PLGA polimerini çöktürebilmek amacıyla çözeltiliye metanol ilave edilmiştir. Son karışım PTFE filtreden süzülüp viallenmiş ve HPLC'de DTX miktar tayini metodu kullanılarak

analiz edilmiştir. 3 farklı konsantrasyonda DTX kullanılarak PLGA-DTX-NPs hazırlanmış ve optimum DTX miktarı tespit edilmiştir.

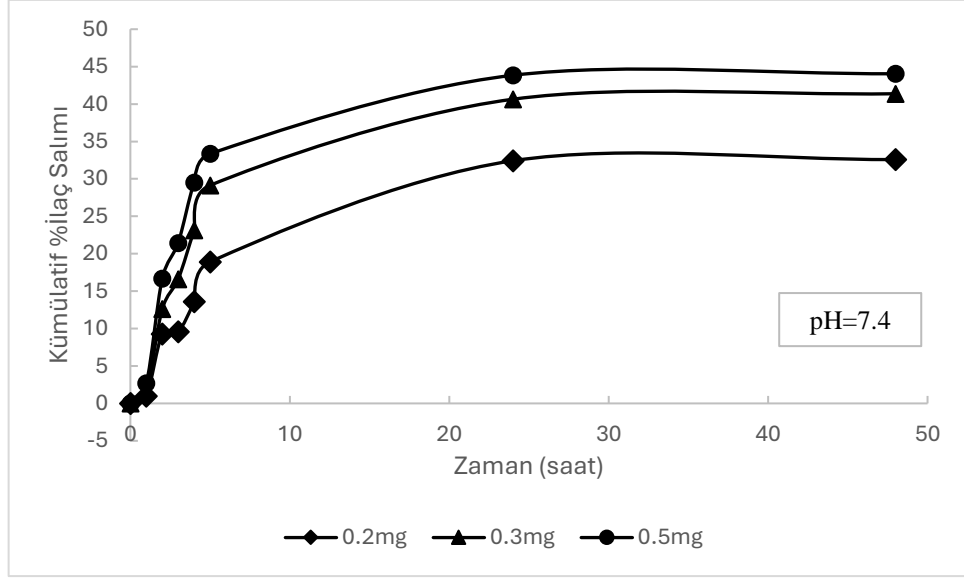
Çizelge 4.12. PLGA-DTX-NPs'deki DTX enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi PLGA miktarı 30 mg, PVA konsantrasyonu %1.0, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 1 ml).

PLGA-DTX-NPs hazırlamak için kullanılan DTX miktarı	DTX Enkapsülasyon Verimi (%)	DTX Yükleme Kapasitesi (%)
1.0 mg	20.20	1.07
3.0 mg	78.32	12.90
5.0 mg	65.15	17.72

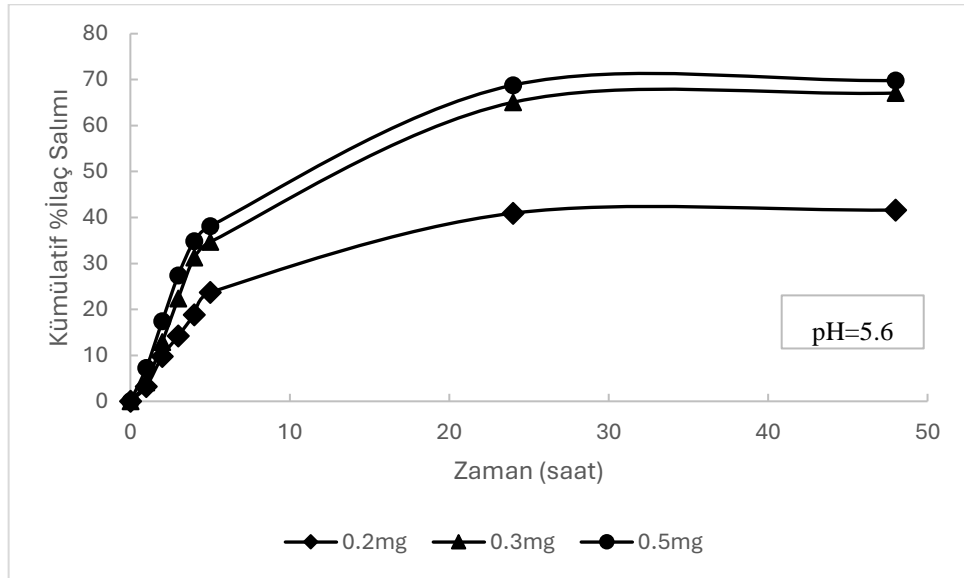
PLGA-DTX-NPs hazırlamak için kullanılan 3 farklı DTX konsantrasyonunda en uygun formülasyon 3.0 mg DTX kullanıldığında elde edilmiştir. Kullanılan DTX miktarının artırılması ile DTX yükleme kapasitesi kademeli olarak artmıştır. Enkapsülasyon verimi ise 1.0 mg DTX kullanıldığında %20.20, 3.0 mg DTX kullanıldığında %78.32 ve 5.0 mg DTX kullanıldığında 65.15% olarak hesaplanmıştır. 3.0 mg DTX kullanıldığında maksimum enkapsülasyon verimliliğine ulaşıldığı ve bu DTX konsantrasyonundan sonra enkapsülasyon veriminde artma olmadığı tespit edilmiştir. Tran ve ark., DTX yüklü PLGA nanopartikülleri nanopresipitasyon metodu ile Tokoferol Polietilen Glikol Süksinat (TPGS) surfaktanı kullanarak hazırlamışlardır. 3.0mg DTX için kullanarak hazırladıkları formülasyonda enkapsülasyon verimini en yüksek %81.3 olarak hesaplamışlardır ve yükleme kapasitesini de %10.6 olarak bulmuşlardır [135]. Bu tez kapsamında elde edilen DTX enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasiteleri Tran ve ark. çalışması ile tutarlı bulunmuştur. Jose ve ark., transferrin ile konjuge edilmiş DTX yüklü PLGA nanopartikülleri modifiye edilmiş yağ içinde su emülsiyonu çözücü buharlaştırma metodu ile hazırlamışlardır. DTX için hazırladıkları farklı formülasyonlarda DTX enkapsülasyon verimini en yüksek %60 olarak hesaplamışlardır ve yükleme kapasitesini de %30 olarak bulmuşlardır. Literatürdeki çalışmalar DTX enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesinin sentez yöntemi, kullanılan polimerin özelliklerine göre farklılık olabileceğini göstermiştir.

4.3.6. *In vitro* İlaç Salım Çalışmaları

En uygun koşullarda elde edilmiş PLGA-DTX-NPs'den DTX'in *in vitro* ortamda salımı 37°C'de asidik tümör mikroçevresini simüle eden pH 5.6 ve fizyolojik kanı simüle eden pH 7.4 PBS tampon ortamlarında incelenmiştir. Farklı miktarlarda DTX içeren PLGA-DTX-NPs'den pH 5.6 ve pH 7.4'de gerçekleştirilen DTX salım eğrileri Şekil 4.57- Şekil 4.58' de verilmiştir.



Şekil 4.57. PLGA-DTX-NPs'den DTX salım profillerinin farklı DTX miktarları için karşılaştırılması (pH 7.4 ve T=37°C).



Şekil 4.58. PLGA-DTX-NPs'den DTX salım profillerinin farklı DTX miktarları için karşılaştırılması (pH 5.6 ve T=37°C).

0.2, 0.3 ve 0.5mg DTX içeren PLGA-DTX-NPs'den DTX salımı 48 saat sonunda hem pH 7.4 hem de pH 5.6 salım ortamı için stabil bir değere ulaşarak bu değerde sabit kalmıştır. Yaklaşık 48 saat sonra pH 7.4' de nanopresipitasyon metoduyla hazırlanan 0.2 mg, 0.3 mg ve 0.5 mg DTX yüklü PLGA-DTX-NPs'den kümülatif salım sırasıyla yaklaşık %32.6, %41.4 ve %44.1 olarak bulunmuştur. Öte yandan 48 saat sonra pH 5.6' da nanopresipitasyon metoduyla hazırlanan 0.2 mg, 0.3 mg ve 0.5 mg DTX yüklü PLGA-DTX-NPs'den kümülatif salım sırasıyla yaklaşık %41.6, %67.1 ve %69.8 olarak bulunmuştur.

Her iki salım ortamında da ilk 5 saat içerisinde burst release (ani salım) meydana gelmiştir. İlaç taşıyıcı sistemlerde ve özellikle nanoteknolojik ilaç salım sistemlerinde kullanılan bu terim etken maddenin taşıyıcıdan hızlı ve büyük miktarlarda salımını ifade etmektedir. Genellikle taşıyıcının ilk başta hızlı bir şekilde açılması veya bozulması, yüzeye yakın ya da yüzeyde adsorplanan ilacın hızla salınmasının da bu duruma sebep olduğu bilinmektedir. Özellikle kanser tedavisi gibi acil etki gerektirebilen durumlarda önce ani bir salım ve daha sonra ilacın kontrollü salımı tercih edilebilmektedir. Bu tez kapsamında pH 7.4'de 0.2 mg DTX için %18.9, 0.3 mg için %29.1 ve 0.5 mg için %33.4'lük bir ani salım gerçekleşmiştir. Bu değerler pH 5.6'da sırası ile %23.7, %34.7 ve %38.1 olarak bulunmuştur. 5.saatten sonra DTX salımı yavaşlamış ve 48 saat sonuna kadar her 2 salım ortamı için de daha kontrollü bir DTX salımı elde edilmiştir.

Gao ve ark., DTX ve salinomisin yüklü PLGA/TPGS nanopartiküllerini nanopresipitasyon metodu ile hazırlayıp, meme kanserindeki etkinliğini değerlendirdikleri bir çalışmada DTX salımını 10.gün sonunda pH 7.4'de %60.52 ve pH 5.0'da ise %65.43 olarak hesaplamışlardır. Bu tez çalışmasındaki durumla paralel olarak pH 5.0'daki yani daha asidik pH'da PLGA/TPGS nanopartiküllerinden DTX salım yüzdesini daha yüksek hesaplamışlardır. Ancak pH 7.4 ve pH 5.6 arasındaki %DTX salım miktarı farkı oldukça az bulunmuştur ve kan pH'sını simüle eden ortamda da ciddi bir DTX salımı olmuştur [136].

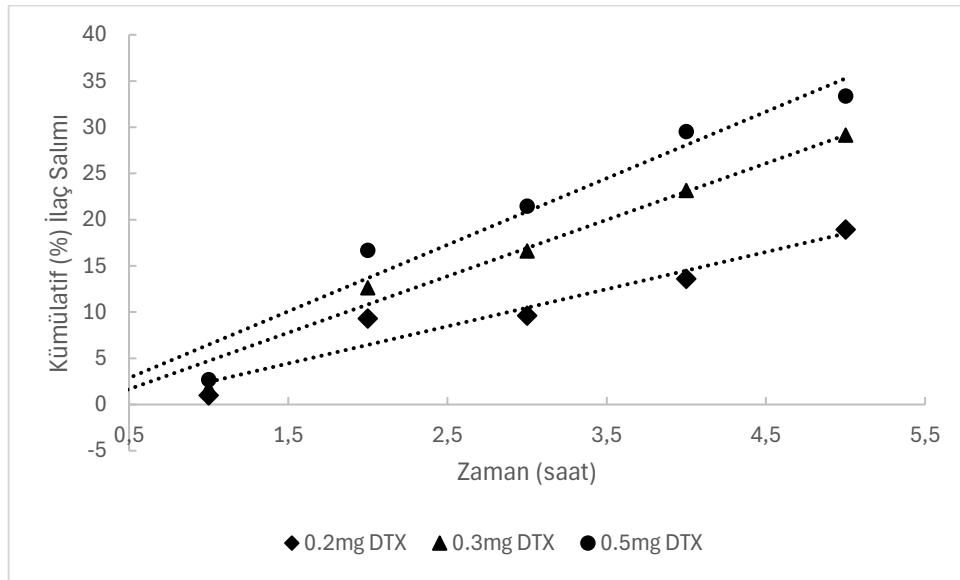
Cao ve ark., luteinize edici hormon salımını uyaran hormon (LHRH) ile konjuge edilmiş PEG-PLGA nanopartikülerinden DTX salımını araştırmış ve bu partiküllerin prostat kanseri tedavisindeki etkinliğini değerlendirmişlerdir. Hazırladıkları PEG-PLGA diblok polimer yapısına LHRH'ı konjuge ettikten sonra, bu kopolimeri kullanarak çözücü buharlaştırma metodu ile DTX yüklü PEG-PLGA-LHRH formülasyonunu

hazırlamışlardır. Hazırlanan bu formülasyondan 24 saatlik süre sonunda pH 7.4'te DTX'in yaklaşık %25'i , 96 saatlik süre sonunda ise DTX'in %80-85'i salınmıştır.

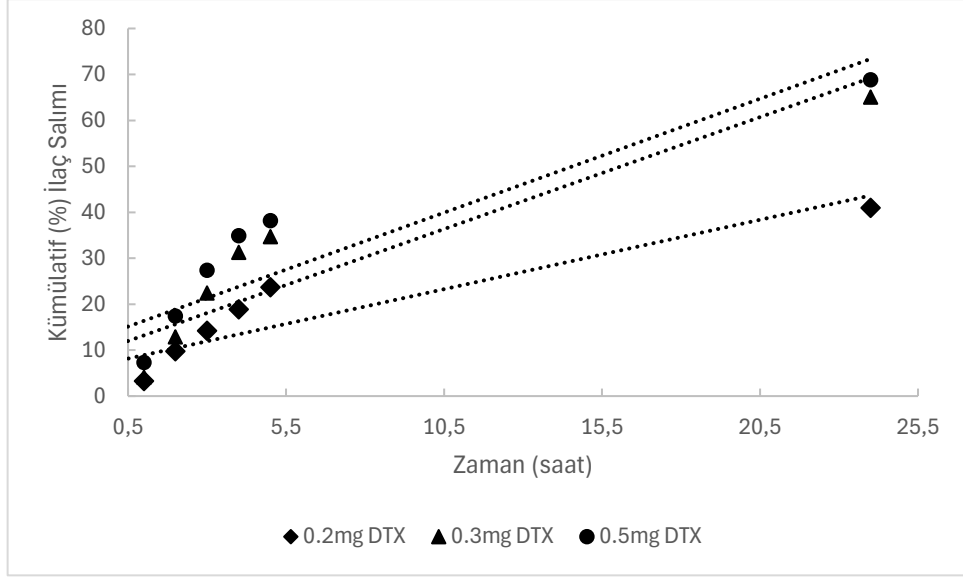
Literatürde incelenen çalışmalar hedeflenen hastalık ve tedavi yöntemine göre değişiklik gösteren, pH değişimine cevap verebilen ve etkin maddenin hedeflenen bölgede önce ani salım daha sonra kontrollü bir salımın veya sürekli kontrollü bir salımın önemini ortaya koymaktadır.

4.3.7. PLGA-DTX-NPs'den DTX Salım Kinetiğinin Farklı pH Değerlerinde İncelenmesi

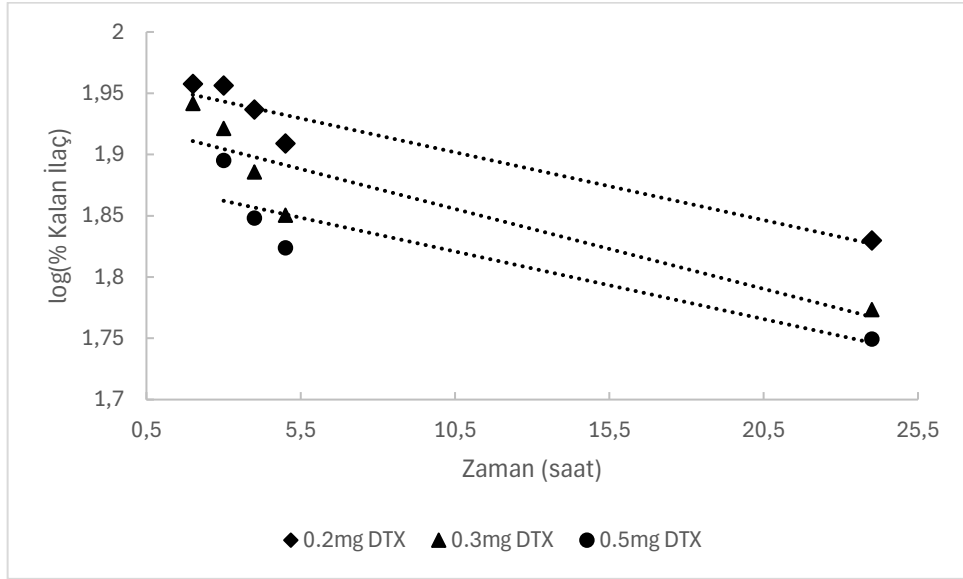
En uygun koşullarda sentezlenen ve farklı miktarlarda DTX yüklenen PLGA-DTX-NPs'den DTX salım kinetiği araştırılmıştır. Fizyolojik kan pH'sı 7.4 ve asidik tümör mikroçevresi pH 5.6'yı simüle eden farklı pH tamponlarında yapılan *in vitro* salım çalışmalarından elde edilen verilerin sıfırıncı mertebeden, birinci mertebeden, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowell salım modellerine uyumu araştırılmıştır [28, 29]. Her model için kinetik hız sabitlerinin (k_0 , k_1 , k_H , k_{HC} , k) değerleri ve Korsmeyer-Peppas modeli için n difüzyon üssünün değerleri pH 7.4 ve pH 5.6 için bulunmuş ve bu değerler Çizelge 4.13-Çizelge 4.14'te sunulmuştur.



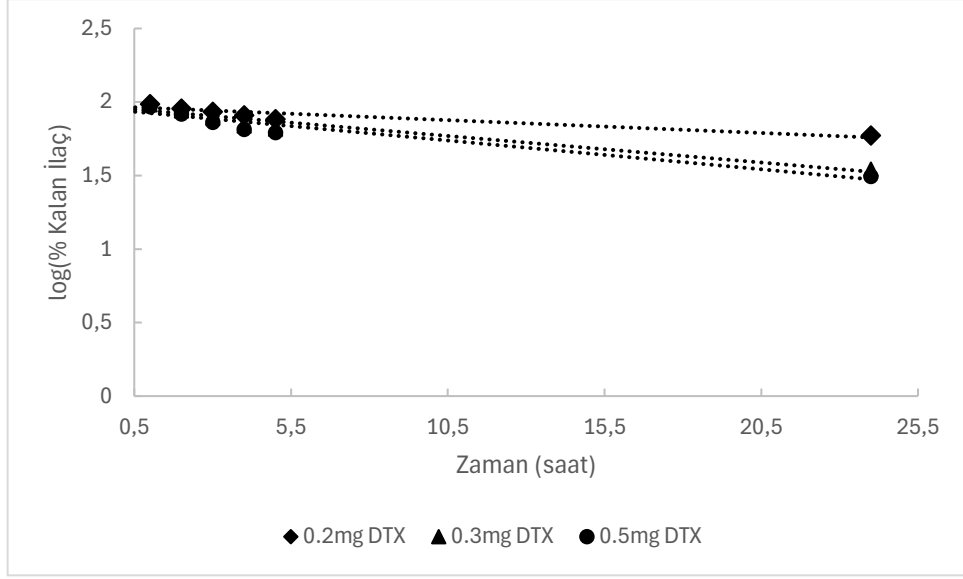
Şekil 4.59. Sıfırıncı dereceden kinetik modele göre farklı DTX konsantrasyonlarında ve pH 7.4'te PLGA-DTX-NPs'den DTX salım verilerinin doğrusallaştırılması.



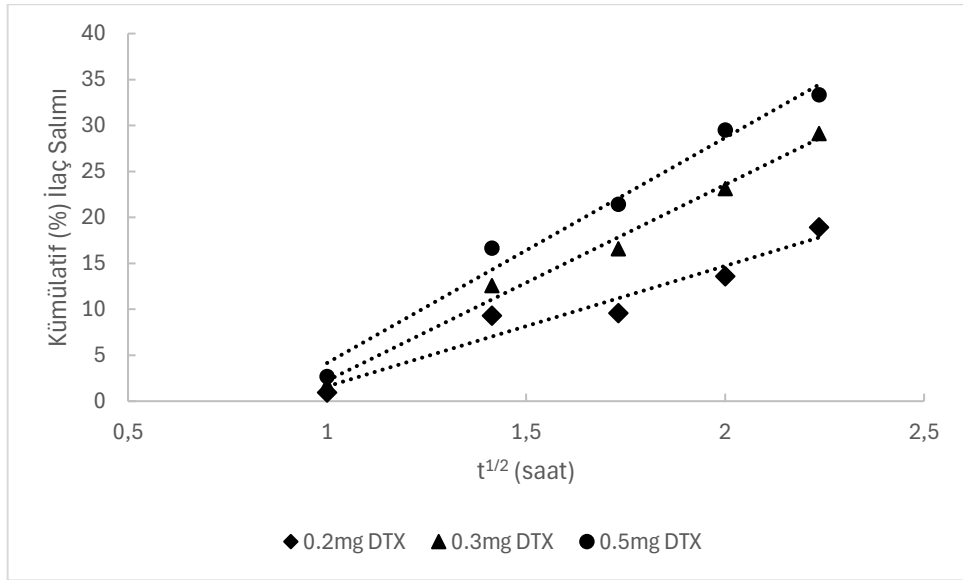
Şekil 4.60. Sıfırıncı dereceden kinetik modele göre farklı DTX konsantrasyonlarında ve pH 7.4'te PLGA-DTX-NPs'den DTX salım verilerinin doğrusallaştırılması.



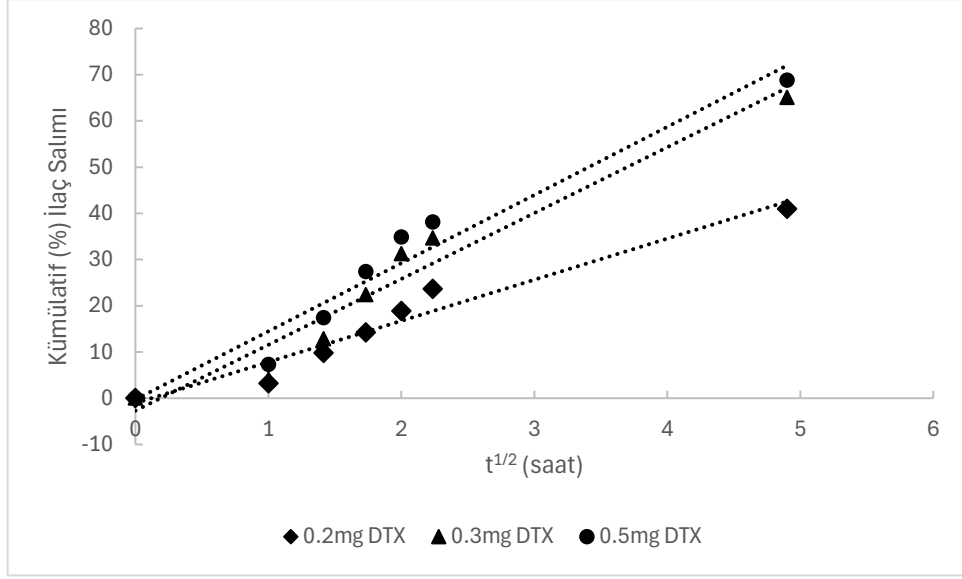
Şekil 4.61. Birinci dereceden kinetik modele göre farklı DTX konsantrasyonlarında ve pH 7.4'te PLGA-DTX-NPs'den DTX salım verilerinin doğrusallaştırılması.



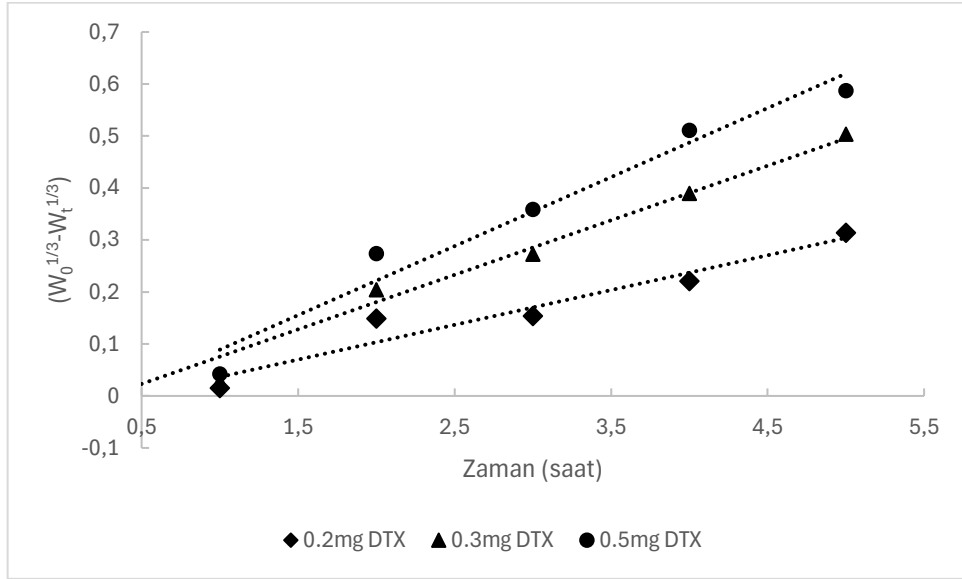
Şekil 4.62. Birinci dereceden kinetik modele göre farklı DTX konsantrasyonlarında ve pH 5.6'da PLGA-DTX-NPs'den DTX salım verilerinin doğrusallaştırılması.



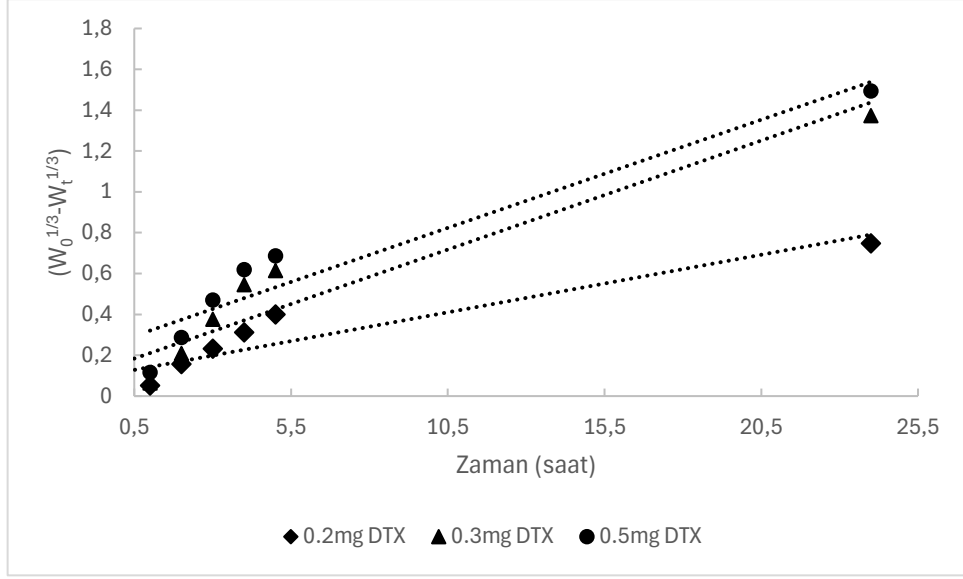
Şekil 4.63. Higuchi kinetik modeline göre farklı DTX konsantrasyonlarında ve pH 7.4'te PLGA-DTX-NPs'den DTX salım verilerinin doğrusallaştırılması.



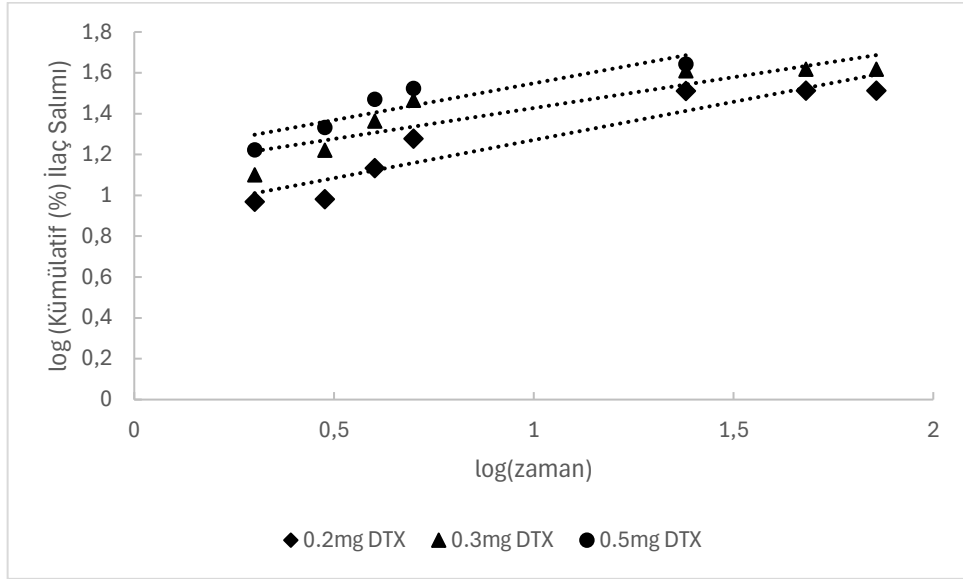
Şekil 4.64. Higuchi kinetik modeline göre farklı DTX konsantrasyonlarında ve pH 5.6'da PLGA-DTX-NPs'den DTX salım verilerinin doğrusallaştırılması.



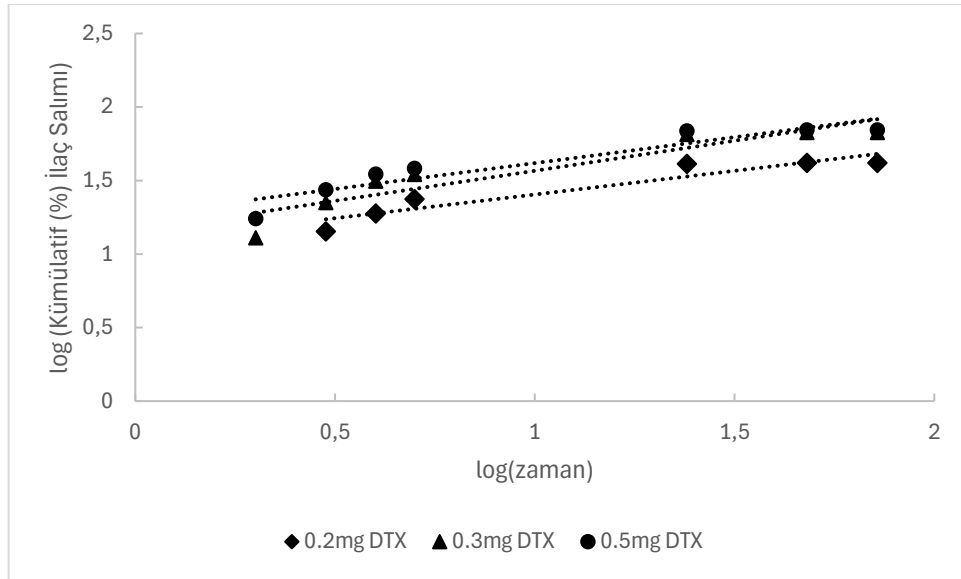
Şekil 4.65. Hixson-Crowell kinetik modeline göre farklı DTX konsantrasyonlarında ve pH 7.4'de PLGA-DTX-NPs'den DTX salım verilerinin doğrusallaştırılması.



Şekil 4.66. Hixson-Crowell kinetik modeline göre farklı DTX konsantrasyonlarında ve pH 5.6'da PLGA-DTX-NPs'den DTX salım verilerinin doğrusallaştırılması.



Şekil 4.67. Korsmeyer-Peppas kinetik modeline göre farklı DTX konsantrasyonlarında ve pH 7.4'de PLGA-DTX-NPs'den DTX salım verilerinin doğrusallaştırılması.



Şekil 4.68. Korsmeyer-Peppas kinetik modeline göre farklı DTX konsantrasyonlarında ve pH 5.6’da PLGA-DTX-NPs’den DTX salım verilerinin doğrusallaştırılması.

Çizelge 4.13. PLGA-DTX-NPs’den DTX salımının çeşitli kinetik modellere uyumunun karşılaştırılması (fizyolojik kanı simüle eden pH 7.4’teki kinetik parametrelerin değerleri ve R² değerlerinin karşılaştırılması).

Sıfıncı derece kinetik model		$(Q = Q_0 + k_0 \cdot t)$			
DTX miktarı (mg)		k_0	R ²		
0.2		4.0188	0.9308		
0.3		6.1069	0.9793		
0.5		7.1999	0.9681		
Birinci derece kinetik model		$(\log C = \log C_0 - k_1 \cdot t / 2.303)$			
DTX miktarı (mg)		k_1	R ²		
0.2		0.0127	0.9292		
0.3		0.0150	0.8251		
0.5		0.0127	0.8272		
Higuchi kinetik model		$(Q = K_H \times t^{1/2})$			
DTX miktarı (mg)		k_H	R ²		
0.2		13.113	0.9387		
0.3		21.325	0.9865		
0.5		24.505	0.9826		
Hixson-Crowell kinetik model		$(W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = k_{HC} \times t)$			
DTX miktarı (mg)		k_{HC}	R ²		
0.2		0.0669	0.9342		
0.3		0.1049	0.9801		
0.5		0.1327	0.9641		
Korsmeyer-Peppas kinetik model		$(\log \left(\frac{M_t}{M_\infty} \right) = \log k + n \log(t))$			
DTX (mg)	miktarı	k	R ²	n	İlaç Salım Mekanizması
	0.2	7.899	0.8901	0.3735	Fickian Difüzyon
	0.3	13.348	0.8267	0.3021	Fickian Difüzyon
	0.5	15.424	0.8202	0.3606	Fickian Difüzyon

İlaç salımı alanındaki birçok çalışmada sadece *in vitro* salım profili değerlendirilmektedir. İlaç salım sistemlerindeki salım kinetiğinin farklı modeller kullanılarak değerlendirilmesi salım davranışının daha net bir şekilde yorumlanması için oldukça önemlidir. Bu nicel değerlendirmeler sonucunda hazırlanan formülasyonların sonraki çalışma basamaklarında ve *in vivo* performansını tahmin ederek ilaç geliştirme süreçlerinde hız kazanmaya olanak sağlamaktadır. Tez kapsamında hazırlanmış olan PLGA-DTX-NPs'den DTX salım kinetiği modelleme çalışmalarının sonuçları Çizelge 4.13-4.14 ve Şekil 4.59-Şekil 4.68 arasında sunulmuştur.

Küresel parçacıklar için $n \leq 0.5$ olduğunda Fickian difüzyon, $n=0.5-1.0$ arasında ise anormal (Fickian olmayan) difüzyon, $n=1.0$ Durum II taşınımı ve $n > 1.0$ olduğunda ise Süper durum II taşınımı olarak raporlanmıştır. PLGA-DTX-NPs'den DTX salımının Korsmeyer-Peppas modeline göre 3 farklı konsantrasyon için incelenen n sabiti değerleri 0.5 altında kalmıştır. Bu durum DTX salımının Fickian difüzyona göre gerçekleştiğini göstermektedir (Çizelge 4.13 - Çizelge 4.14). Öte yandan *in vitro* salım verilerinin kinetik analizi, bifazik ilaç salım modelini ortaya koymuştur. Bifazik salım hemen salım aşaması ve sürdürülebilir salım aşaması olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır. Hemen salım aşaması, DTX salımında ilk 5 saatte gösterilen başlangıç patlama etkisiyle belirtilmiştir. DTX 48. saate kadar sürdürülebilir bir şekilde salınmaya devam etmiştir ve bu da bifazik salım modelinin sürdürülebilir salım aşamasını (Fickian difüzyon) göstermektedir.

Çizelge 4.13 incelendiğinde kinetik modeller arasında en iyi uyum her bir konsantrasyon için %98'lik R^2 değeri ile Higuchi salım modeli olmuştur. DTX salım verileri Higuchi kinetik modeline özgü olan bifazik DTX salımını doğrulamıştır. *In vitro* salım profillerinin modele bağlı temel değerlendirmesinde, nanopartikül yüzeyine adsorbe edilen veya nanopartikül materyalinde kapsüllenen ilacın, ana mekanizma olarak difüzyon temelinde polimerik yapıdan salındığını göstermektedir. Salımın difüzyona dayalı olduğu matematiksel modelleme ile doğrulanmıştır ve literatürdeki PLGA-DTX-NPs'den DTX salımını inceleyen diğer çalışmalarla da sonuçlar uyumlu bulunmuştur [137, 138].

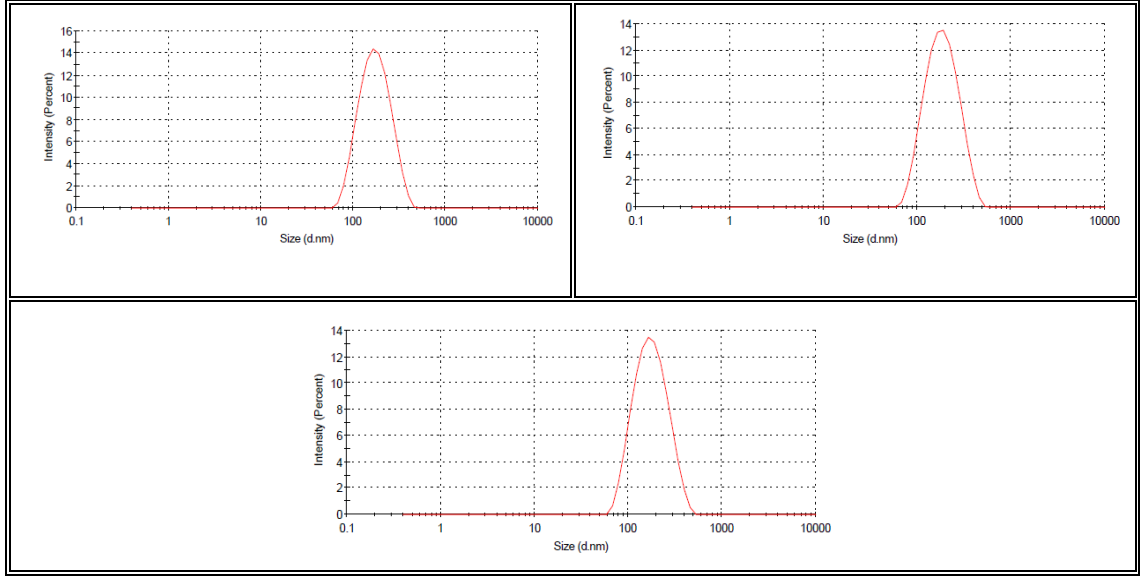
Çizelge 4.14. PLGA-DTX-NPs'den DTX salımının çeşitli kinetik modellere uyumunun karşılaştırılması (asidik tümör mikroçevresini simüle eden pH 5.6'daki kinetik parametrelerin değerleri ve R² değerlerinin karşılaştırılması).

Sıfıncı derece kinetik model		$(Q = Q_0 + k_0 \cdot t)$		
DTX miktarı (mg)		k_0		R ²
0.2		1.5106		0.8214
0.3		2.4361		0.8320
0.5		2.4784		0.8095
Birinci derece kinetik model		$(\log C = \log C_0 - k_1 \cdot t / 2.303)$		
DTX miktarı (mg)		k_1		R ²
0.2		0.0200		0.8802
0.3		0.0417		0.9342
0.5		0.0451		0.9309
Higuchi kinetik model		$(Q = K_H \times t^{1/2})$		
DTX miktarı (mg)		k_H		R ²
0.2		8.9019		0.9515
0.3		14.2500		0.9497
0.5		14.7480		0.9561
Hixson-Crowell kinetik model		$(W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = k_{HC} \times t)$		
DTX miktarı (mg)		k_{HC}		R ²
0.2		0.0282		0.8617
0.3		0.0534		0.9051
0.5		0.0530		0.9165
Korsmeyer-Peppas kinetik model		$(\log \left(\frac{M_t}{M_\infty} \right) = \log k + n \log(t))$		
CUR miktarı (mg)	k	R ²	n	İlaç Salım Mekanizması
0.2	12.095	0.8920	0.3222	Fickian Difüzyon
0.3	14.358	0.8607	0.4090	Fickian Difüzyon
0.5	18.450	0.8815	0.3524	Fickian Difüzyon

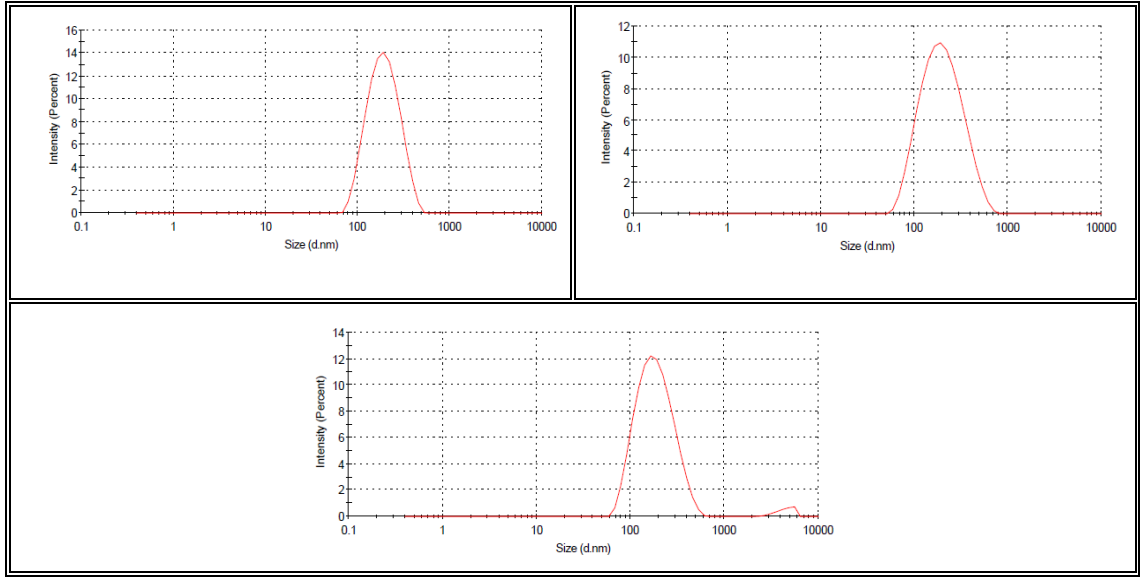
4.4. PLGA-BSA-NPs'in ve Dostetaksel Yüklü PLGA-BSA-NPs (PLGA-DTX-BSA-NPs)'in Optimizasyonu, Karakterizasyon ve İlaç Salım Çalışmaları

4.4.1. Partikül Boyutu ve Polidispersite İndeksi Analizleri

PLGA-BSA-NPs'in partikül boyutu ve boyut dağılımı, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel ölçümlerini gerçekleştirebilmek için 3 farklı BSA konsantrasyonunda PLGA-BSA-NPs sentezlenmiştir. PLGANPs'in partikül boyutu önceden optimize edildiği şekilde 30mg PLGA, 1ml aseton olacak şekilde organik faz hazırlanmıştır. Sulu faz için %0.3, %0.5 ve %0.6 (a/h) olacak şekilde BSA çözeltisi yani sulu faz hazırlanmıştır. Sentez sonrası hazırlanan nanopartikül formülasyonları saf su ile yıkanıp santrifüjlendikten sonra belirli oranda seyreltilip Zetasizer ile partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel ölçümleri 3 tekrarlı olacak şekilde alınmıştır.



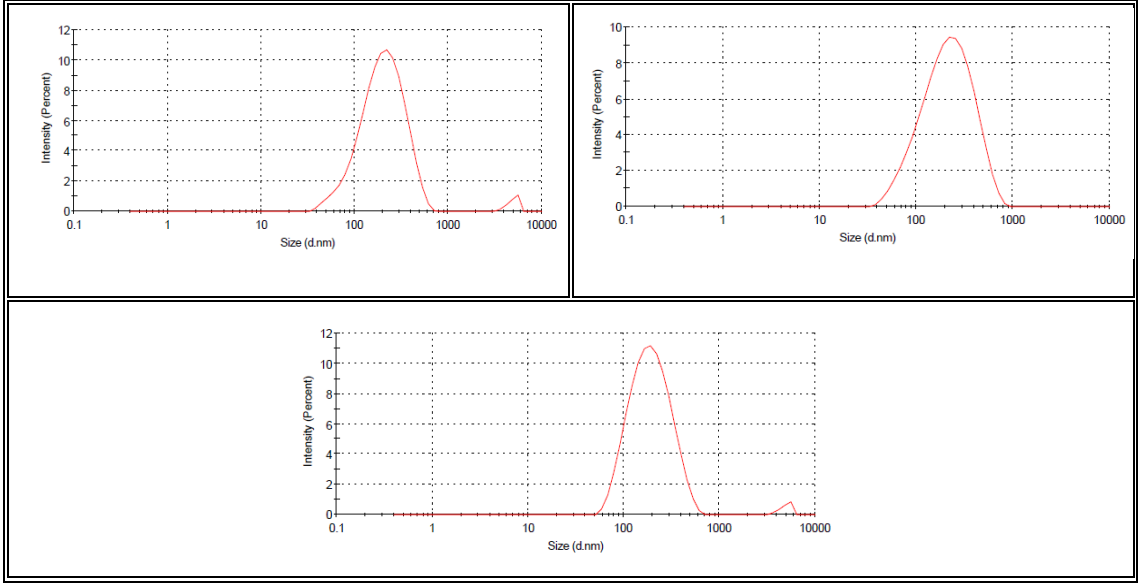
Şekil 4.69. PLGA-BSA-NPs'e ait boyut dağılımı eğrileri (PLGA miktarı 30 mg, BSA miktarı 30mg, BSA konsantrasyonu %0.3 (a/h), sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 1 ml).



Şekil 4.70. PLGA-BSA-NPs'e ait boyut dağılımı eğrileri (PLGA miktarı 30 mg, BSA miktarı 50mg, BSA konsantrasyonu %0.5 (a/h), sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 1 ml).

30mg BSA (%0.3 a/h) kullanılarak hazırlanan PLGA-BSA-NPs'e ait Zetasizer ölçümleri incelendiğinde sırası ile 164.8, 163.3 ve 158.1 nm olacak şekilde 3 ortalama partikül boyutu sonucu alınmıştır. Öte yandan bu partiküllere ait polidispersite indeksi değerleri ise 0.206, 0.196 ve 0.181 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.69). 50mg BSA (%0.5 a/h) kullanılarak hazırlanan PLGA-BSA-NPs'e ait Zetasizer ölçümleri incelendiğinde sırası ile 170.3, 167.5 ve 167.7 nm olacak şekilde 3 ortalama partikül boyutu sonucu alınmıştır.

Öte yandan bu partiküllere ait polidispersite indeksi değerleri ise 0.203, 0.212 ve 0.225 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.70).

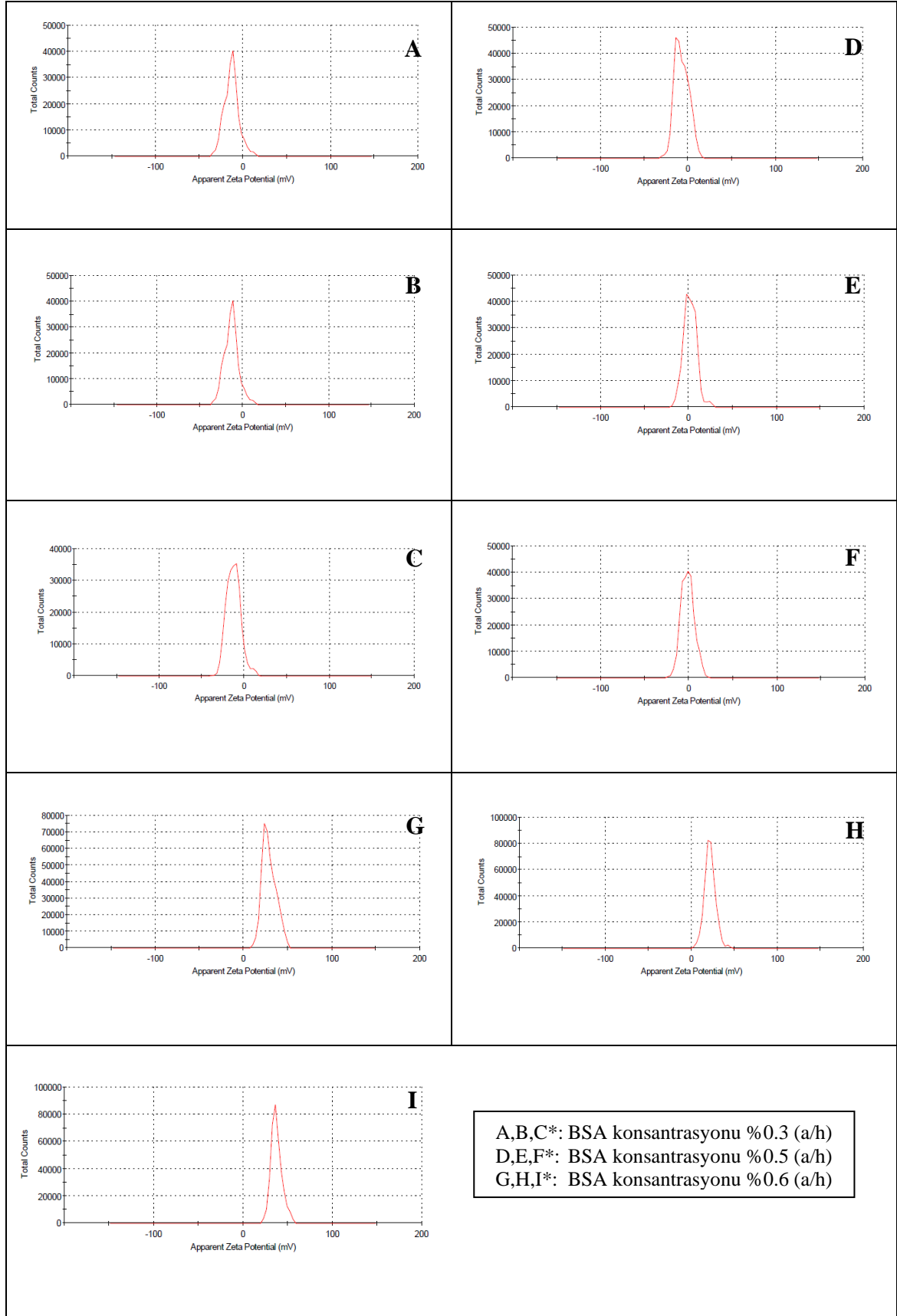


Şekil 4.71. PLGA-BSA-NPs'e ait boyut dağılımı eğrileri (PLGA miktarı 30 mg, BSA miktarı 60mg, BSA konsantrasyonu %0.6 (a/h), sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 1 ml).

60mg BSA (%0.5 a/h) kullanılarak hazırlanan PLGA-BSA-NPs'e ait Zetasizer ölçümleri incelendiğinde sırası ile 178.9, 175.2 ve 170.9 nm olacak şekilde 3 ortalama partikül boyutu sonucu alınmıştır. Öte yandan bu partiküllere ait polidispersite indeksi değerleri ise 0.295, 0.256 ve 0.245 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.71).

PLGA-BSA-NP yüzeyindeki BSA kabuk kısmının partikülün yük özelliklerini nasıl değiştirdiğini araştırmak üzere zeta potansiyel ölçümleri de 3 tekrarlı olacak şekilde alınmıştır.

Şekil 4.72' de 3 farklı BSA konsantrasyonunda hazırlanan PLGA-BSA-NPs'e ait zeta potansiyel ölçüm sonuçları görülmektedir. PLGA:BSA oranı 1:1 yani 30mg BSA kullanıldığı durumda ortalama zeta potansiyel ölçümü -13.9 ± 3.11 mV olarak bulunmuştur. BSA konsantrasyonu %0.5 ve %0.6 (a/h) olduğu durum için sırası ile bu değerler -10.5 ± 1.51 mV ve -9.30 ± 5.28 mV olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.15).



Şekil 4.72. Farklı BSA konsantrasyonlarında hazırlanan PLGA-BSA-NPs'e ait zeta potansiyel ölçümleri.

Çizelge 4.15. Farklı BSA konsantrasyonlarında hazırlanan PLGA-BSA-NPs'e ait ortalama partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel ölçüm sonuçları.

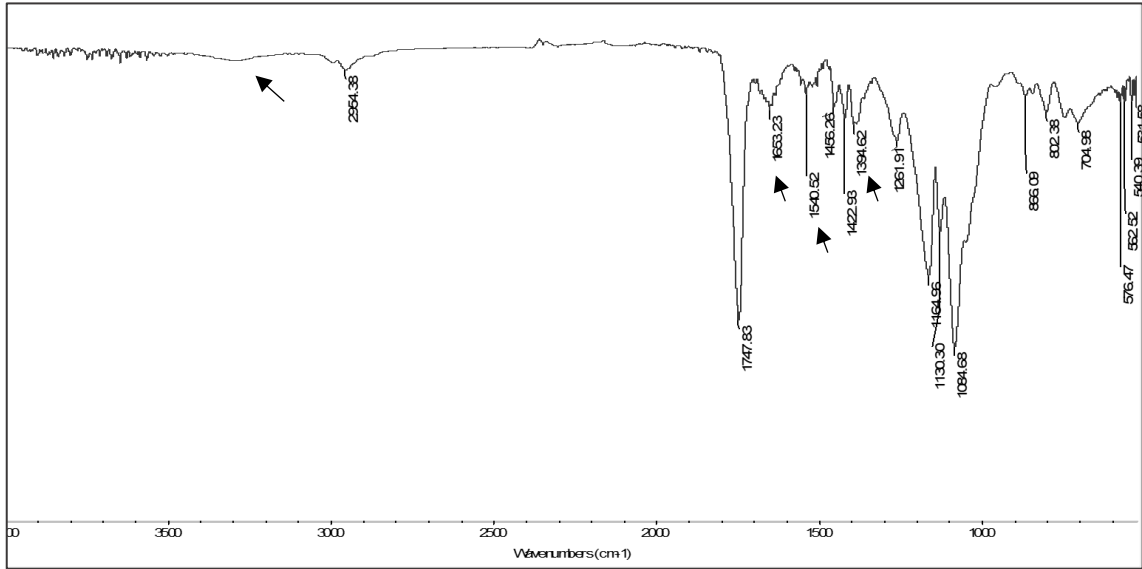
Polimer: Protein Oranı (PLGA: BSA) Oranı	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
30mg: 30mg (%0.3 (a/h) BSA)	162.1±7.13	0.194±0.03	-13.9±3.11
30mg: 50mg (%0.5 (a/h) BSA)	168.5±3.17	0.213±0.02	-10.5±1.51
30mg: 60mg (%0.6 (a/h) BSA)	175.0±8.12	0.265±0.05	-9.30±5.28

Jiang ve ark., su içinde yağ emülsiyonu çözücü buharlaştırma yöntemi ile BSA kaplı PLGANPs hazırlayıp, bu partikülerin mezenkimal kök hücre farklılaşmasındaki etkisini araştırmışlardır. PLGA-BSA-NPs'in zeta potansiyel ölçümü nötr pH değerinde 10 mM NaCl çözeltisinde negatif yüklü (-28.6±2.4mV) olduğunu göstermiştir [139]. Peng ve ark., biyopolimerik bir malzeme olan Poli-3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksiheksanoat nanopartikülleri hazırlayıp bu nanopartikül yapısının üzerine kandaki dolaşım süresini uzatmak ve toksisiteyi azaltmak için adsorpsiyon metodu ile BSA kaplamışlardır. Kaplanmamış nanopartiküllerin zeta potansiyeli -16mV olarak ölçülmüş ve BSA ile kaplandıktan sonra -16mV ve -20mV arasında değişen ölçüm sonuçları elde edilmiştir [140]. Manoochehri ve ark., tarafından hazırlanan bir diğer çalışmada ise modifiye edilmiş emülsiyon-çözücü buharlaştırma metodu kullanılarak Doseksel yüklü PLGA nanopartiküller sentezlenmiş ve bu yapıya karbodiimid bağlama reaksiyonu (EDC/NHS Çapraz Bağlama Kimyası) ile insan serum albumini (HSA) konjuge edilmiştir. HSA ile konjuge edilmiş PLGANPs'in zeta potansiyeli (-11.07±1.8mV), PLGANPs'den daha küçük olan negatif bir zeta potansiyeli (-5.60±0.21mV) gösterdiği tespit edilmiştir. Negatif zeta potansiyeldeki bu düşüş PLGANP yapısındaki karboksilik fonksiyonel grupların HSA birincil yapısındaki lizin amino asitleri üzerindeki amino bağları ile amid bağı oluşumuna atfedilmiştir. Palanikumar ve ark., Doksorubisin yüklü PLGANPs'i emülsiyon çözücü difüzyonu metoduna göre sentezlemişlerdir ve bu yapıya BSA'yı EDC/NHS çapraz bağlama kimyası aracılığı ile konjuge etmişlerdir. BSA'nın, PLGA yüzeyinde ~10 nm kalınlığında bir kabuk oluşturduğu ve hidrodinamik çapın 105 nm'den 130 nm'ye çıktığı tespit edilmiştir. PLGANPs'in zeta potansiyeli, BSA ile konjugasyondan sonra -28'den -16 mV'ye değiştiği tespit edilmiştir. Bikinkoninik asit (BCA) protein testi kullanılarak yapılan analiz ile, PLGANPs'ine konjuge edilen BSA konsantrasyonu 72.9±2.7 µg.mg⁻¹ olarak hesaplanmış, BSA'nın nanopartiküllerin toplam

ağırlığının yaklaşık %7.3'ünü oluşturduğu sonucuna ulaşılmıştır [141]. Bu tez çalışması kapsamında da BSA konsantrasyonu arttırıldıkça hazırlanan PLGA-BSA-NPs'in zeta potansiyeli kademeli olarak düşmüştür ve bu çalışma ile sonuçlar tutarlı bulunmuştur. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde kullanılan sentez metoduna ve polimerin özelliklerine göre zeta potansiyeli ölçüm sonuçlarında farklılıklar olabileceği görülmüştür.

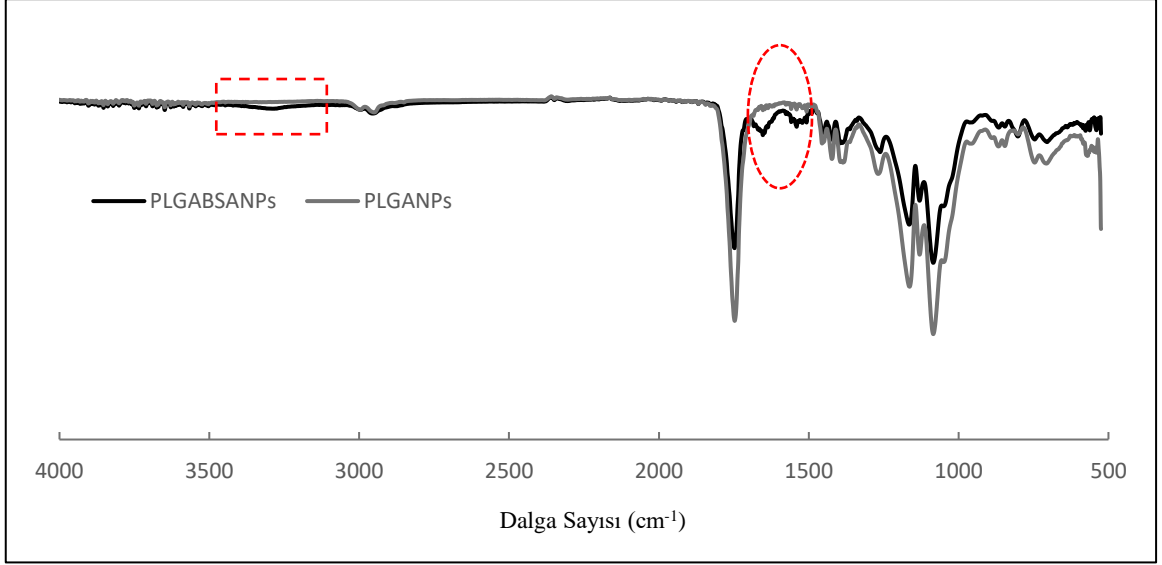
4.4.2. Fourier Dönümlü Kızılötesi Spektrofotometre (FTIR) Analizi

Şekil 4.21'de (Bölüm 4.2.3) BSA'ya ait ana pikler incelendiğinde 3284 cm^{-1} 'de N-H gerilmesi ile ilgili amid A, 2957 cm^{-1} 'de NH_3^+ serbest iyonunun N-H gerilmesi ile ilgili amid B, 1640 cm^{-1} 'de C=O gerilmesi ile ilgili amid I, 1514 cm^{-1} 'de C-N gerilme ve N-H eğilme titreşimleriyle ilgili amid II, 1387 cm^{-1} 'de CH_2 eğilme grupları ile ilgili ve 1240 cm^{-1} 'de C-N gerilme ve N-H eğilme titreşimleriyle ilgili amid III olmak üzere tipik protein karakteristik pikleri görülmektedir [113]. Öte yandan yaklaşık 2863 cm^{-1} 'de görülen pik ise CH bağına aittir [114].

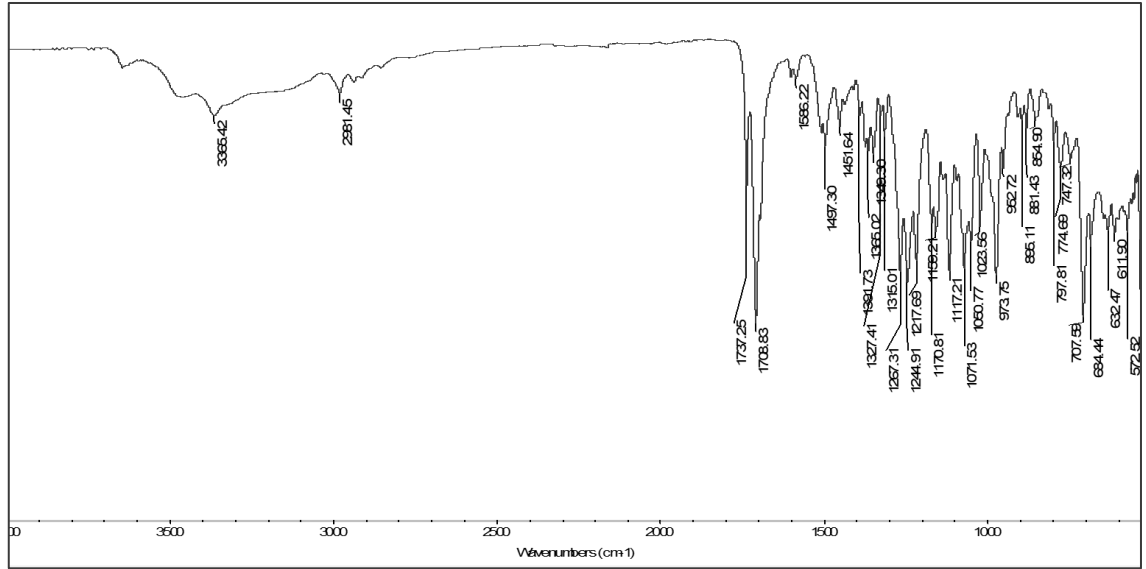


Şekil 4.73. PLGA-BSA-NPs'e ait FTIR spektrumu.

PLGA-BSA-NPs'e ait FTIR spektrumu ve karakteristik pikler ise Şekil 4.73'te sunulmuştur. PLGA-BSA-NPs'e ait spektrumunda küçük kaymalar ile birlikte 3284 cm^{-1} 'deki geniş bant, 2954 cm^{-1} , 1653 cm^{-1} , 1540 cm^{-1} ve 1394 cm^{-1} 'de BSA'ya ait karakteristik piklerin varlığı kanıtlanmıştır. BSA'nın PLGANPs'in yüzeyine başarılı bir şekilde kaplandığı ve PLGA-BSA-NP yapısındaki BSA'nın varlığı FTIR analizi ile doğrulanmıştır (Şekil 4.74).



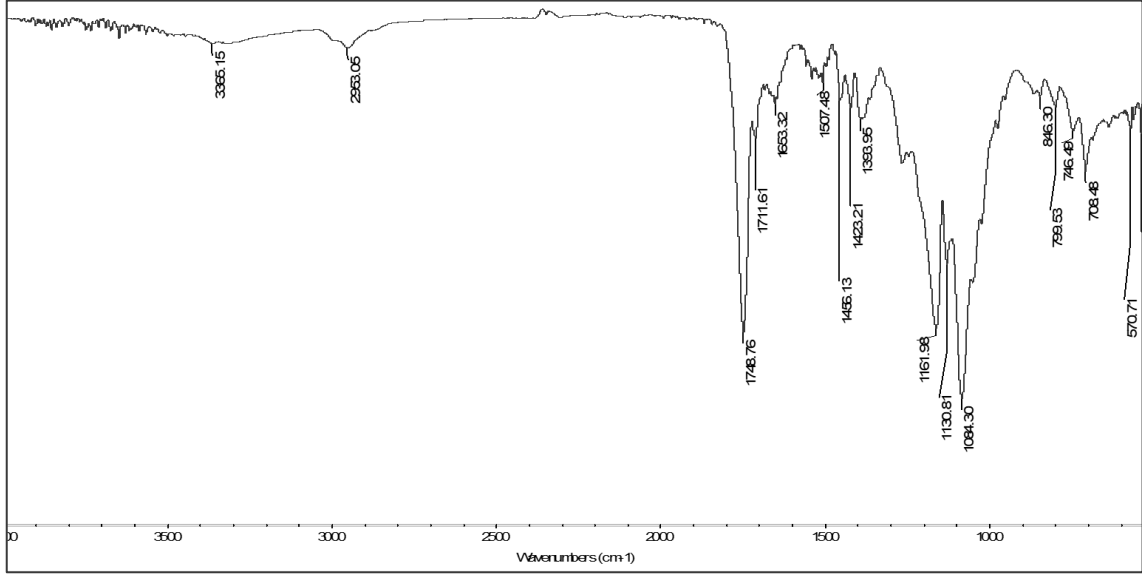
Şekil 4.74. PLGANPs ve PLGA-BSA-NPs'e ait FTIR spektrumlarının karşılaştırılması.



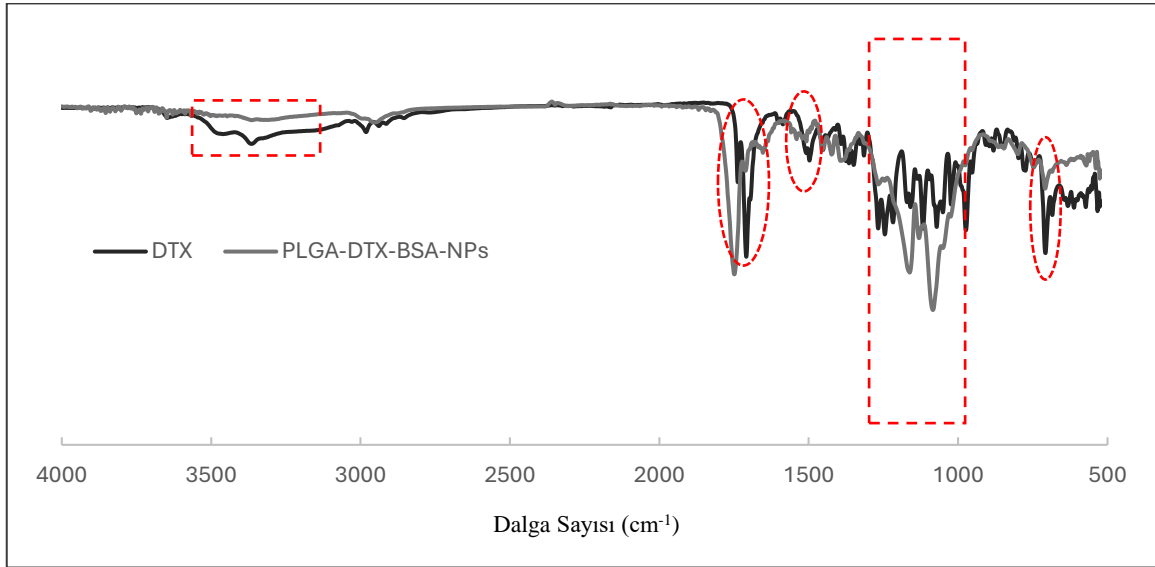
Şekil 4.75. DTX'e ait FTIR spektrumu.

Şekil 4.75'te ise DTX'e ait FTIR spektrumu verilmiştir. DTX'in FTIR spektrumu 3365 cm^{-1} , 2981 cm^{-1} ve 2880 cm^{-1} 'de civarında sırasıyla ikincil amin ve alkan yapısındaki N-H ve C-H germe titreşimlerine atfedilen keskin pikleri göstermektedir. 1636 cm^{-1} 'deki küçük yoğun bir pik N-H bükülme titreşimine, 1451 cm^{-1} CH_2 ve CH_3 'ün C-H bükülme titreşimine karşılık gelmektedir. DTX'de sırasıyla 1117 cm^{-1} , 1050 cm^{-1} ve 881 cm^{-1} 'de karbonil, amid ve alkan gruplarının C=O, C-N ve C=C eğilme titreşimine karşılık gelen karakteristik pikler görülmektedir [142]. Ayrıca DTX spektrumunda 1708 cm^{-1} civarındaki (ester bağındaki C=O gerilmesi), 1117 cm^{-1} civarındaki (ester bağındaki C-O gerilmesi), 1244 cm^{-1} civarındaki (asetat içindeki O=C-O-C gerilmesi) ve 774 cm^{-1}

civarındaki (aromatik C-H bükülmesi) karakteristik piklerin varlığı da Şekil 4.75'te gösterilmiştir [143, 144].



Şekil 4.76. PLGA-DTX-BSA-NPs'e ait FTIR spektrumu.

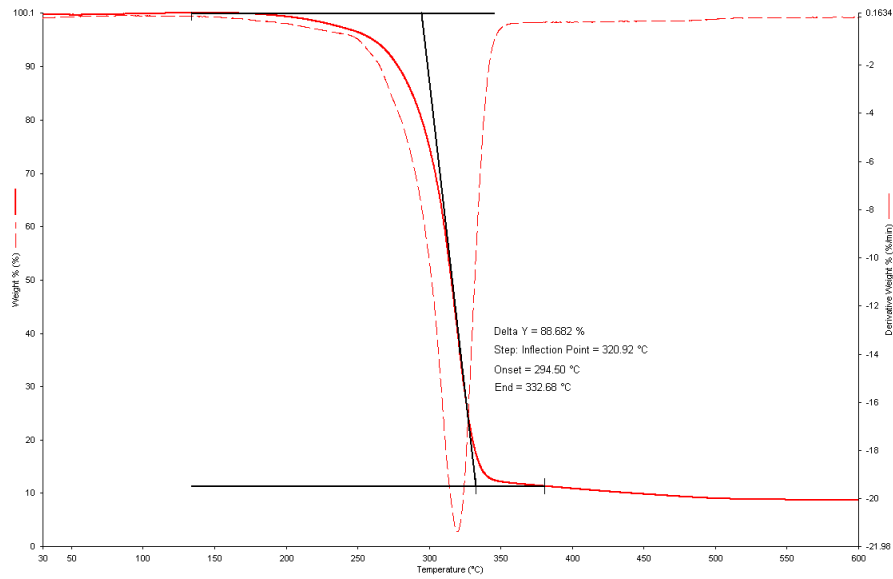


Şekil 4.77. DTX ve PLGA-DTX-BSA-NPs'e ait FTIR spektrumlarının karşılaştırılması.

DTX spektrumunda 3365 cm^{-1} , 1708 cm^{-1} , 1497 cm^{-1} , 1451 cm^{-1} , 1159 cm^{-1} , 973 cm^{-1} , 707 cm^{-1} görülen karakteristik piklerin küçük kaymalarla ifade edilebilecek şekilde yaklaşık 3365 cm^{-1} , 1711 cm^{-1} , 1507 cm^{-1} , 1456 cm^{-1} , 1161 cm^{-1} , 973 cm^{-1} , 708 cm^{-1} 'de PLGA-DTX-BSA-NP yapısında varlığı gösterilmiş ve DTX'in başarılı bir şekilde enkapsüle edildiği kanıtlanmıştır (Şekil 4.77).

4.4.3. TGA Analizleri

PLGA-BSA-NPs'e ait termogravimetrik analiz sonucu Şekil 4.78'de verilmiştir. Bölüm 2.3'de daha önce bahsedilen şekilde toz formundaki saf PLGA'daki ana bozunma olayı 294.83°C- 337.10°C'de %97.85'lik bir kütle kaybı ile, PLGANPs'de bu sıcaklık aralığı 289.62°C-330.41°C ve %95.45 bir kütle kaybı ile gerçekleşmiştir. PLGA-BSA-NPs'deki ana bozunma olayı ise 294.50°C-332.68°C sıcaklık aralığında gerçekleşmiş olup %88.68'lik bir kütle kaybı ölçülmüştür. PLGA-BSA-NP formülasyondaki BSA'nın PLGANP yapısının termal kararlılığını arttırdığı tespit edilmiştir.



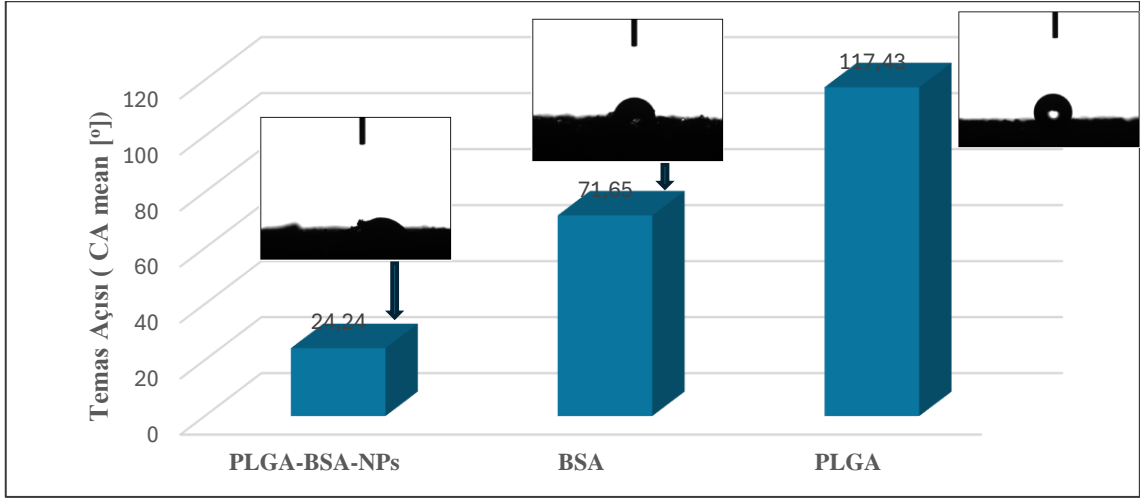
Şekil 4.78. PLGA-BSA-NPs'e ait termogravimetrik analiz sonucu.

4.4.4. Temas Açısı (Gonyometre) Analizi

PLGA-BSA-NPs'in yüzeyindeki kabuk kısmını oluşturan BSA kaplamasının homojenliğinin değerlendirilmesi, formülasyondaki BSA proteini varlığının saf polimerle karşılaştırıldığında ölçülebilir bir şekilde partikül formülasyonun hidrofobik karakterinde bir değişikliğe sebep olup olmadığı, kaplamadan sonraki değişimin değerlendirilmesi amacıyla temas açısı (Gonyometre) ölçümü analizi yapılmıştır.

PLGA polimerinin laktat oranı değiştikçe, polimerin hidrofobikliği de önemli ölçüde değişmektedir [145]. PLGA, laktik asit (LA) ve glikolik asit (GA) monomerlerinin farklı oranlarda birleşmesiyle oluşmakta ve bu oranlar polimerin su ile etkileşimini (hidrofobiklik veya hidrofilik özelliklerini), biyolojik bozuma süresini doğrudan etkilemektedir. PLGA polimerinin 50:50, 75:25, 85:15 ve 65:35 gibi farklı laktik asit: glikolik asit oranına sahip formülasyonları bulunmaktadır. Laktik asit grubu, hidrojen

bağları kurabilen bir yapıya sahip olmasına rağmen, glikolik asit grubuna kıyasla daha az hidrojen bağı kurma eğilimindedir. Yüksek laktik asit oranına sahip PLGA polimerinin hidrofobik özelliğinden dolayı biyolojik olarak bozunma süresinin de uzaması sebebiyle, bu tez çalışması kapsamında 50:50 laktik:glikolik oranına sahip PLGA polimerinin kullanımı tercih edilmiştir. PLGA 50:50 kullanılarak hazırlanan PLGA-BSA-NPs' e ait temas ölçüm açısı sonuçları ve damla görüntüleri Şekil 4.79'da verilmiştir.



Şekil 4.79. Saf PLGA, Saf BSA ve PLGA-BSA-NPs'ine ait belirlenen temas açısı değerleri ve ölçümler sırasında çekilen fotoğraflar.

Şekil 4.79'da saf PLGA, saf BSA ve PLGA-BSA-NPs'ine ait belirlenen temas açısı değerleri ve ölçümler sırasında çekilen damlacıkların fotoğrafları görülmektedir. Tez kapsamında kullanılan 50:50 laktik:glikolik oranına sahip PLGA polimerinin temas açısı ölçümü 117.43 olarak ölçülmüştür ve oldukça hidrofobik özellikte olduğu doğrulanmıştır. Saf BSA'nın temas açısı ölçümü ise 71.65 olarak bulunmuştur. PLGA-BSA-NPs'inin temas açısı ölçüm değeri ise 24.24 olarak bulunmuştur. Bir yüzeyin statik su temas açısı $\theta > 90^\circ$ olduğunda hidrofobik, $\theta < 90^\circ$ olduğunda ise hidrofilik olduğu söylenebilir [146]. BSA proteinin yapıya dahil edilmesi ile hazırlanan PLGA-BSA-NPs'in temas açısı 24.24'e düşmüş ve BSA'nın varlığının hidrofilik karakteri arttırdığı doğrulanmıştır. PLGANP yüzeyine ve gözeneklerine arayüzeye gömme metodu olarak adlandırılan metotla BSA kaplaması gerçekleştirilerek hazırlanan bu kompleks PLGA-BSA-NPs'in hidrofilik özelliği artırılarak daha iyi çözünürlüğe sahip olmaları sağlanmıştır. Literatürde bu metotla hazırlanan çok az çalışma bulunmaktadır, bu metotlarda da kullanılan metotlar ve polimerlerin özellikleri birbirinden oldukça farklıdır. Kovacs ve ark., 2024 yılında yayımladıkları bir çalışmada modifiye edilmiş desolvasyon ve

nanopresipitasyon metodu ile PLGA-BSA-NPs hazırlayıp Vitamin D3 enkapsülasyonunu araştırmışlardır. Bu çalışmada farklı monomer oranlarına sahip PLGA polimerleri kullanılmış ve bu oranların PLGA-BSA-NPs üzerindeki hidrofobik-hidrofilik etkisi araştırılmıştır. 50:50 oranında PLGA (MW=30.000-60.000Da) kullanarak hazırladıkları PLGA-BSA-NPs'in temas açısı değerini 36 olarak ölçmüşlerdir ve bu değer bizim çalışmamızla da tutarlı olarak bulunmuştur.

4.4.5. Enkapsülasyon Verimliliği ve Yükleme Kapasitesi

PLGA-BSA-NPs'in partikül boyutu optimizasyonu için analizler yapıldıktan sonra ortalama partikül boyutu ve polidispersite indeksi sonuçları incelenmiş ve %0.3 ve %0.5 (a/h) BSA olacak şekilde hazırlanan partiküllerin hem boyut hem de polidispersite indeksi ölçüm sonuçlarının birbirine çok yakın değerlerde olduğu tespit edilmiştir. Öte yandan ortalama partikül boyutunun (%0.5 (a/h) BSA ile hazırlanan) hedeflenen partikül boyut aralığı yani partiküllerin pasif hedefleme için gerekli olan 200 nm altında kalma şartını da sağladığı görülmüştür. Bu sebeple PLGANPs'in yüzeyine kaplanan BSA'nın kabuk yapısının yeterli düzeyde ve CUR enkapsülasyonuna da elverişli olabilmesi için %0.5'lik BSA kullanılarak PLGA-BSA-NPs hazırlanmıştır. %0.5'lik BSA ve 3.0 mg DTX kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-NPs'e DTX enkapsülasyonu ve yükleme kapasitesi değerleri hesaplanmış ve PLGA-DTX-NPs ile karşılaştırılmıştır.

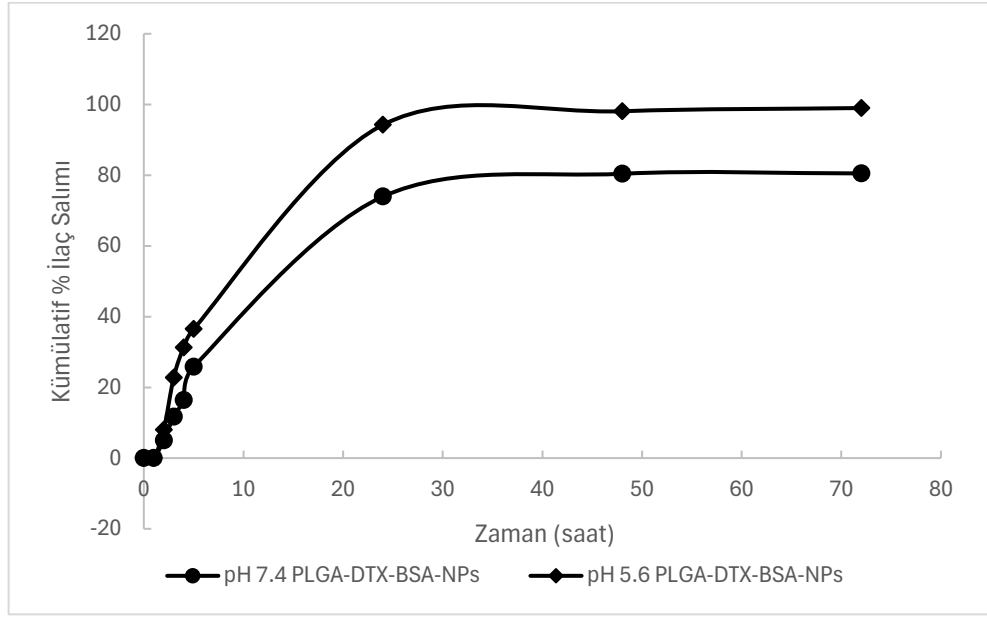
Çizelge 4.16. PLGA-DTX-BSA-NPs'deki DTX enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi (PLGA miktarı 30 mg, BSA konsantrasyonu %0.5 (50mg), sulu faz (BSA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 3 ml).

PLGA-DTX-BSA-NPs hazırlamak için kullanılan DTX miktarı	DTX Enkapsülasyon Verimi (%)	DTX Yükleme Kapasitesi (%)
3.0 mg	87.75	12.48

Optimum DTX konsantrasyonunda (3.0mg/ml) hazırlanan PLGA-DTX-BSA-NP formülasyonundaki DTX enkapsülasyon verimi %87.75 ve DTX yükleme kapasitesi ise %12.48 olarak hesaplanmıştır. PLGA-DTX-NPs ile karşılaştırıldığında DTX yükleme kapasitesinin %78.32'den %87.75'e yükseldiği tespit edilmiştir. DTX yükleme kapasitesi ise her iki formülasyon için yaklaşık olarak aynı değerde bulunmuştur (Çizelge 4.16).

4.4.6. *In vitro* İlaç Salım Çalışmaları

En uygun koşullarda elde edilmiş PLGA-DTX-BSA-NPs'den DTX'in *in vitro* ortamda salımı 37°C'de asidik tümör mikroçevresini simüle eden pH 5.6 ve fizyolojik kanı simüle eden pH 7.4 PBS tampon ortamlarında incelenmiştir. PLGA-DTX-BSA-NPs'den pH 5.6 ve pH 7.4'te gerçekleştirilen DTX kümülatif salım eğrileri Şekil 4.80' de verilmiştir.



Şekil 4.80. PLGA-DTX-BSA-NPs'den DTX salım profillerinin pH 7.4 ve pH 5.6 için karşılaştırılması (T=37°C).

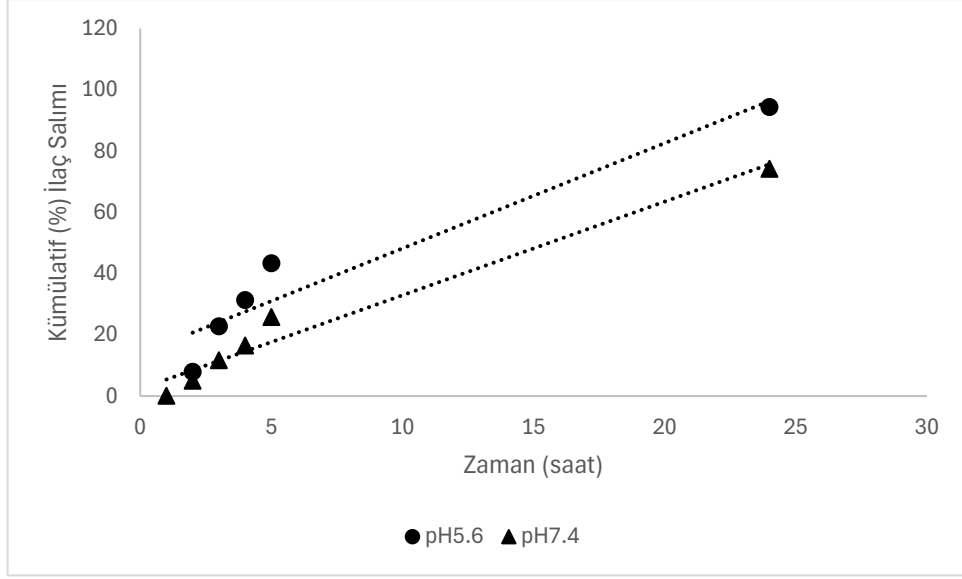
PLGA-DTX-NPs'den DTX salım çalışmaları Bölüm 2.3.6'da verilmiş olup, kümülatif DTX salım verileri incelendiğinde en yüksek %DTX salımı 0.5mg DTX içeren PLGA-DTX-NPs'de bulunmuştur. pH 7.4 ve pH 5.6 salım ortamlarında 0.5mg DTX içeren PLGA-DTX-BSA-NPs'den DTX salımı analizleri de *in vitro* ortamda gerçekleştirilmiş ve DTX salım sonuçları karşılaştırılmıştır. 0.5mg DTX içeren PLGA-DTX-BSA-NPs'den DTX salımı 48 saat sonunda hem pH 7.4 hem de pH 5.6 salım ortamı için stabil bir değere ulaşarak bu değerinde sabit kalmıştır.

Yaklaşık 48 saat sonra pH 7.4' de, nanopresipitasyon metoduyla hazırlanan 0.5 mg DTX yüklü PLGA-DTX-BSA-NPs'den kümülatif DTX salımı %80.4, pH 5.6' da yaklaşık %98.1 olarak bulunmuştur. PLGA-DTX-NPs ile karşılaştırıldığında DTX salımı için çalışılan her iki farklı pH salım ortamında da DTX salımı PLGA-DTX-BSA-NPs'de daha yüksek bulunmuştur. PLGA-DTX-NPs'den DTX salım çalışmalarında ilk 5 saat içinde burst release (ani salım) meydana geldiği gözlemlenmiştir (Bölüm 2.3.6). Ancak PLGA-

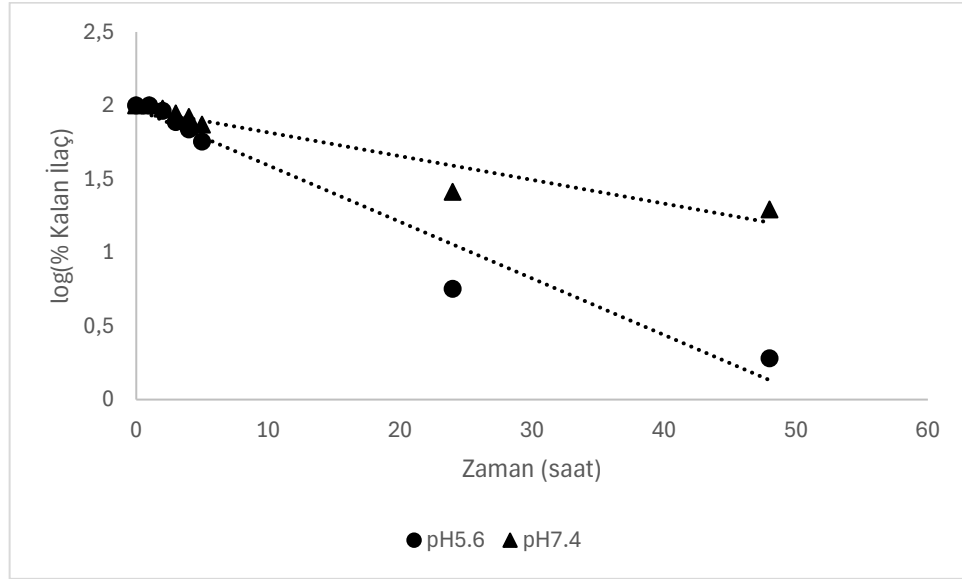
DTX-BSA-NPs'den DTX salım verileri ilk 5 saat için PLGA-DTX-NPs karşılaştırıldığında bu formülasyonla ani salım etkisinin yavaşlatıldığı tespit edilmiştir. *İn vitro* salım ortamında PLGA-DTX-BSA-NPs'den DTX salımı verileri pH 7.4'te 1.saat, 2.saat, 3.saat, 4.saat ve 5. Saat için sırasıyla %0.1, %5.0, %11.7, %16.5 ve %25.8 olarak bulunmuştur. PLGA-DTX-NPs'den ilk 5 saatlik DTX salım verileri ise %2.7, %16.7, %21.4, %29.5 ve %33.4 olarak bulunmuştur. Aynı şekilde *in vitro* salım ortamında PLGA-DTX-BSA-NPs'den DTX salımı verileri pH 5.6'da 1.saat, 2.saat, 3.saat, 4.saat ve 5. Saat için sırası ile %0.03, %7.9, %22.8, %31.3 ve %36.5 olarak bulunmuştur. PLGA-DTX-NPs'den ilk 5 saatlik DTX salım verileri ise pH 5.6'da %7.3, %17.4, %27.4, %34.8 ve %38.1 olarak bulunmuştur. *İn vitro* salım ortamında PLGA-DTX-BSA-NPs'den pH 7.4'te gerçekleştirilen DTX salım çalışmaları, PLGA-DTX-NPs'den DTX salımı verileri ile karşılaştırıldığında ilk 5 saatlik ani salım etkisinin BSA kaplaması ile yavaşladığı ve toplam salınan ilaç miktarının ise %44'ten %80'e arttığını göstermiştir. pH 5.5'ta her iki nanopartikül formülasyonundan salınan DTX miktarı oldukça yüksek olarak hesaplanmış olup, BSA kaplamasının ilk 3 saatlik DTX salımı için etkili olduğu ve salımı yavaşlattığı 5.saat sonunda ise BSA kaplamasının olmadığı formülasyonun salım verilerini yakaladığı ve son noktada ise PLGA-DTX-NPs'den %30'luk bir DTX salım farkı ile salımı tamamladığı tespit edilmiştir.

4.4.7. PLGA-DTX-BSA-NPs'den DTX Salım Kinetiğinin Farklı pH Değerlerinde İncelenmesi

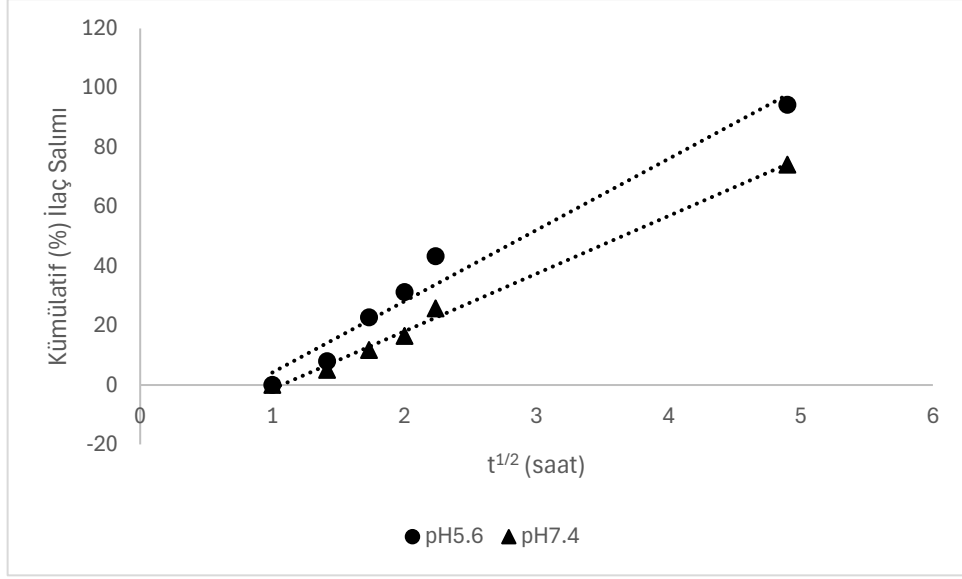
En uygun koşullarda sentezlenen DTX yüklü PLGA-DTX-BSA-NPs'den DTX salım kinetiği çalışmaları iki farklı pH'ta gerçekleştirilmiştir. Fizyolojik kan pH'sı 7.4 ve asidik tümör mikroçevresi pH 5.6'yı simüle eden farklı pH tamponlarında yapılan *in vitro* salım çalışmalarından elde edilen verilerin sıfıncı mertebeden, birinci mertebeden, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowell salım modellerine uyumu araştırılmıştır. Her model için kinetik hız sabitlerinin (k_0 , k_1 , k_H , k_{HC} , k) değerleri ve Korsmeyer-Peppas modeli için n difüzyon üssünün değerleri pH 7.4 ve pH 5.6 için bulunmuş ve bu değerler Çizelge 4.17'de sunulmuştur.



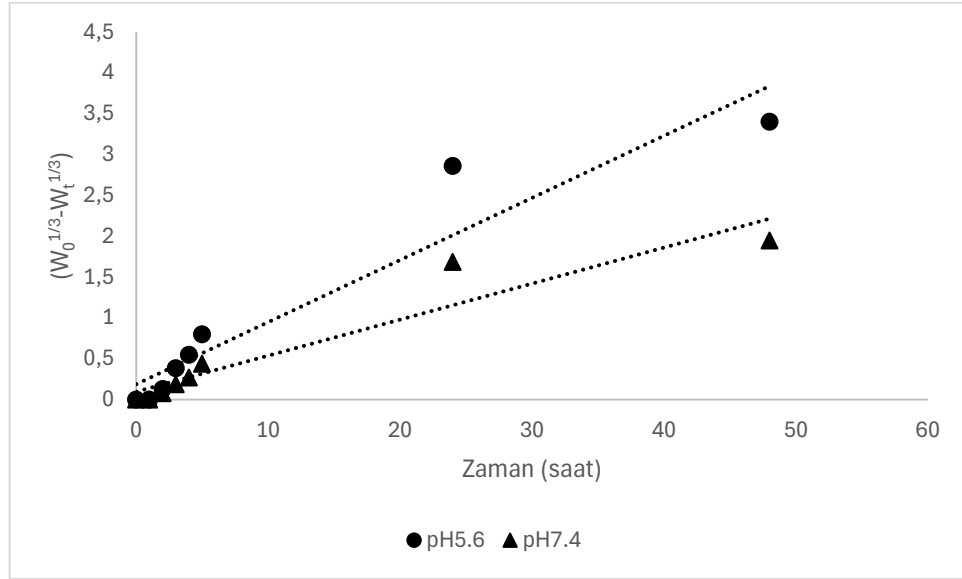
Şekil 4.81. 3.0mg DTX kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-NPs'den DTX salımı için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen sıfırıncı derece kinetik model grafiği.



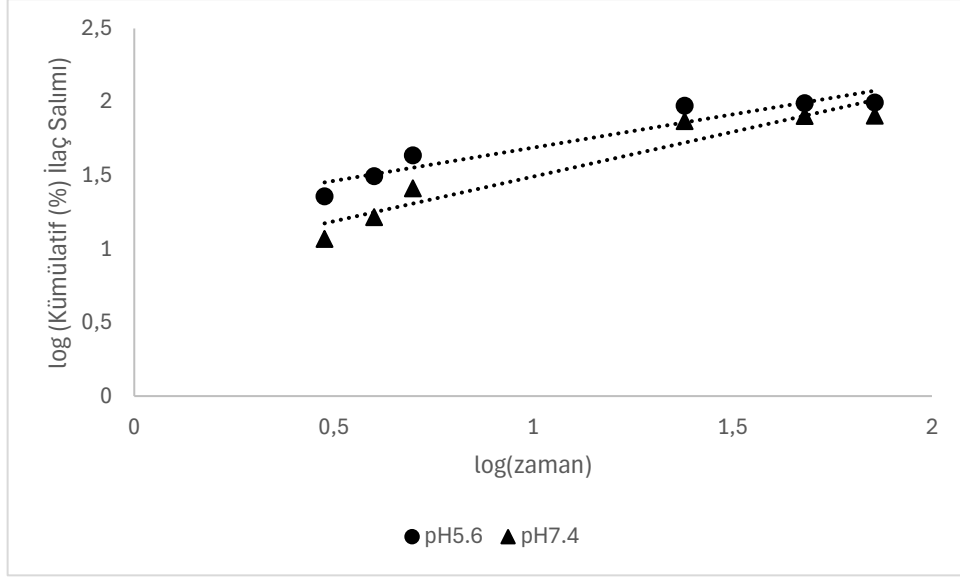
Şekil 4.82. 3.0mg DTX kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-NPs'den DTX salımı için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen birinci derece kinetik model grafiği.



Şekil 4.83. 3.0mg DTX kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-NPs'den DTX salımı için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen Higuchi kinetik model grafiği.



Şekil 4.84. 3.0mg DTX kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-NPs'den DTX salımı için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen Hixson-Crowell kinetik model grafiği.



Şekil 4.85. 3.0mg DTX kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-NPs'den DTX salımı için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen Korsmeyer-Peppas kinetik model grafiği.

Çizelge 4.17. PLGA-DTX-BSA-NPs'den DTX salımının kinetik modellere uyumunun karşılaştırılması (pH 5.6 ve pH 7.4'teki kinetik parametrelerin değerleri ve R² değerlerinin karşılaştırılması).

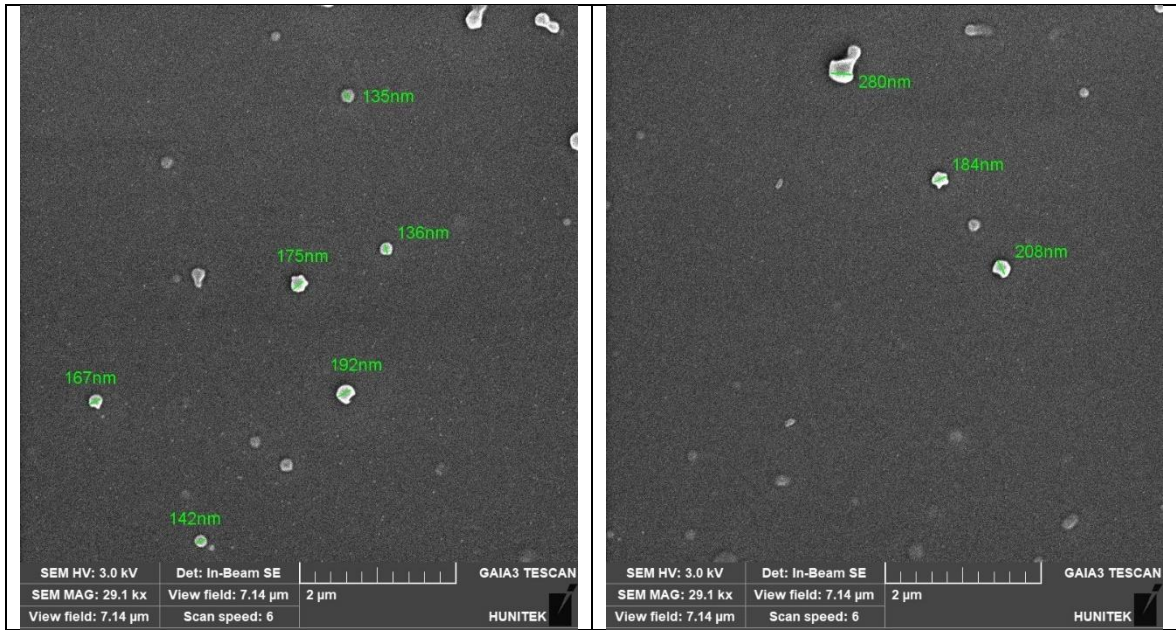
Sıfıncı derece kinetik model (Salım ortamı pH'ı)	$(Q = Q_0 + k_0 \cdot t)$ k_0	R^2		
5.6	3.4367	0.9236		
7.4	3.0560	0.9689		
Birinci derece kinetik model (Salım ortamı pH'ı)	$(\log C = \log C_0 - k_1 \cdot t / 2.303)$ k_1	R^2		
5.6	0.0884	0.9596		
7.4	0.0371	0.9222		
Higuchi kinetik model (Salım ortamı pH'ı)	$(Q = K_H \times t^{1/2})$ K_H	R^2		
5.6	23.9860	0.9706		
7.4	19.4180	0.9949		
Hixson-Crowell kinetik model (Salım ortamı pH'ı)	$(W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = k_{HC} \times t)$ k_{HC}	R^2		
5.6	0.0760	0.9114		
7.4	0.0441	0.9044		
Korsmeyer-Peppas kinetik model (Salım ortamı pH'ı)	$(\log \left(\frac{M_t}{M_\infty} \right) = \log k + n \log(t))$ k	R^2	n	İlaç Salım Mekanizması
5.6	17.2822	0.9106	0.4519	Fickian Transport
7.4	7.6701	0.9220	0.6078	Fickian Transport

PLGA-DTX-BSA-NPs'den DTX salımının kinetik modellere uyumunun değerlendirilmesi için pH 5.6 ve pH 7.4'teki kinetik parametre sabitleri, R^2 değerleri ve model grafikleri Çizelge 4.17 ve Şekil 4.81-4.85'te verilmiştir. Sıfırıncı derece kinetik modeli sabit hızda gerçekleşen salım mekanizmasını ifade etmektedir ve burada pH 5.6 ve pH 7.4 için sırası ile hız sabiti değerleri 3.44 ve 3.06 olarak hesaplanmıştır. Ancak R^2 değerlerinin çok yüksek olmaması, bu modelin DTX salım mekanizmasını tam anlamıyla temsil edemediğini ortaya koymaktadır. Birinci derece kinetik modeli, ilaç salımının kalan ilaç konsantrasyonuna bağlı olarak gerçekleştiğini ifade etmektedir. Hız sabiti daha asidik salım ortamında yüksek bulunmuş, bu da ilacın salımının daha hızlı gerçekleştiğini göstermiştir. Birinci derece kinetik modeli, pH 5.6 ortamında salım mekanizmasına daha iyi uyum sağlamıştır. Higuchi modeli ise, salımın ilaç matrisinden difüzyon kontrollü olduğunu varsaymaktadır. Her iki ortamda da Higuchi modeli 0.97 ve 0.99'luk yüksek uyum katsayıları göstermiştir. Özellikle pH 7.4 ortamında elde edilen R^2 değeri, salım mekanizmasının difüzyon kontrollü olduğunu güçlü bir şekilde desteklemektedir. Hız sabitinin pH 5.6 ortamında daha yüksek olması, asidik ortamda daha hızlı bir difüzyon sürecine işaret etmektedir. Hixson-Crowell modeli, salımın matris boyutundaki değişikliklere (yüzey erimesi) bağlı olduğunu belirtmektedir. Hixson-Crowell modelinde R^2 değerleri diğer modellere kıyasla daha az uyum göstermiştir. Bu durum, yüzey erimesinin DTX salım mekanizmasında baskın bir rol oynamadığını göstermektedir. Korsmeyer-Peppas modeli, ilaç salım mekanizmasının difüzyon ve polimer matrisi şişme süreçleriyle açıklanması sağlamaktadır. Her iki salım ortamında da n model sabiti 0.5 civarındadır ve bu, salımın Fickian difüzyon mekanizmasıyla uyumlu olduğunu göstermektedir. Korsmeyer-Peppas modeline göre hesaplanan hız sabitlerinin pH 5.6 ortamında daha yüksek bulunması, bu ortamda daha hızlı bir difüzyon sürecini işaret etmektedir. Hesaplan hız sabitleri ve uyum katsayıları dikkate alındığında Higuchi modeli, her iki ortamda da en yüksek uyum katsayıları ile salım mekanizmasının difüzyon kontrollü olduğunu desteklemiştir. Korsmeyer-Peppas modeli, salım mekanizmasının Fickian difüzyonla gerçekleştiğini doğrulamıştır. Hız sabitleri, pH 5.6 ortamında genellikle daha yüksek bulunmuş ve bu durum daha asidik ortamlarda salım hızının arttığını göstermiştir. Hixson-Crowell modeli, salım mekanizmasında yüzey erimesinin veya boyut değişimlerinin baskın bir etkisi olmadığını ortaya koymuştur. Bu bulgular, DTX'in pH-bağımlı kontrollü salım sistemlerinde optimize edilebileceğini ve Higuchi modeline dayalı formülasyonların etkili bir tasarım stratejisi sunabileceğini vurgulamaktadır.

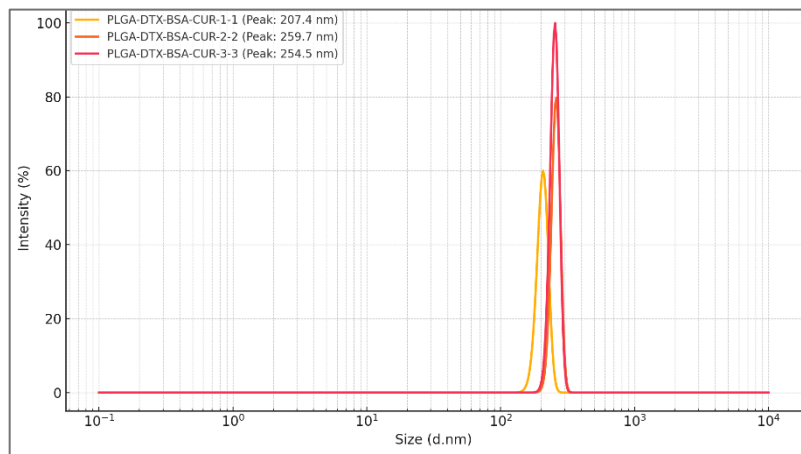
4.5. Kurkumin Yüklü PLGA-DTX-BSA-NPs (PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs)'in Karakterizasyon ve İlaç Salım Çalışmaları

4.5.1. Yüzey Morfolojisi ve Partikül Boyutu Ölçüm Analizleri

CUR ve DTX ikili ilaç yüklü formülasyonun (PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs) yüzey morfolojisinin incelenebilmesi ve ilaç yüklü olmayan nanopartikül formülasyonu ile karşılaştırma yapılabilmesi için SEM görüntüleri çekilmiştir (Şekil 4.86). SEM görüntüleri incelendiğinde PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'in de PLGANPs gibi küresel bir şekilde olduğu ve ilaç yüklü olmayan formülasyonla da (PLGA-BSA-NPs) partikül boyutu dağılımlarının (3 farklı Zetasizer ölçümü) benzer olduğu söylenebilir.



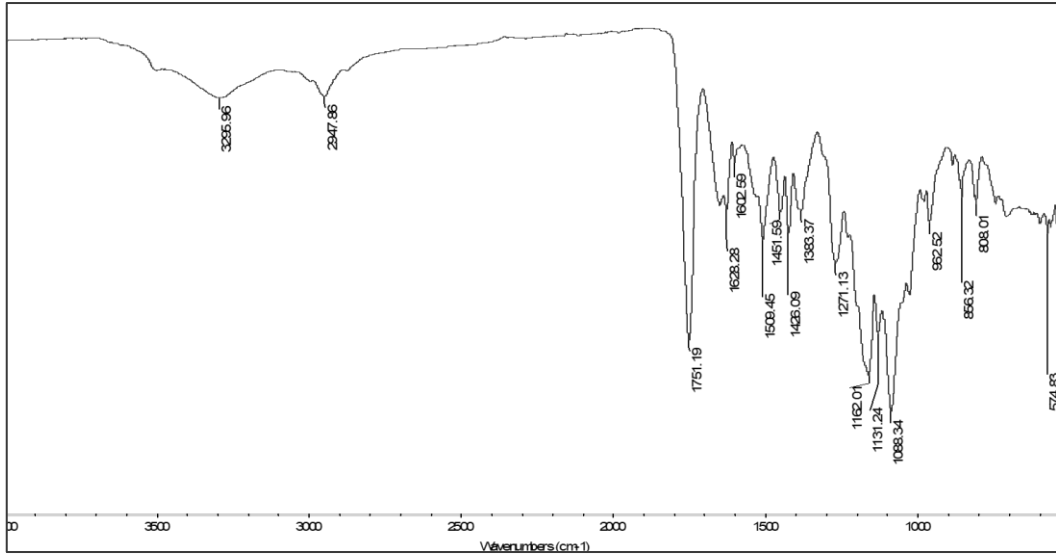
Şekil 4.86. PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'in SEM görüntüleri (PLGA miktarı 30 mg, DTX miktarı 3.0 mg, CUR miktarı 3.75mg, PVA konsantrasyonu %1.0, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 1 ml).



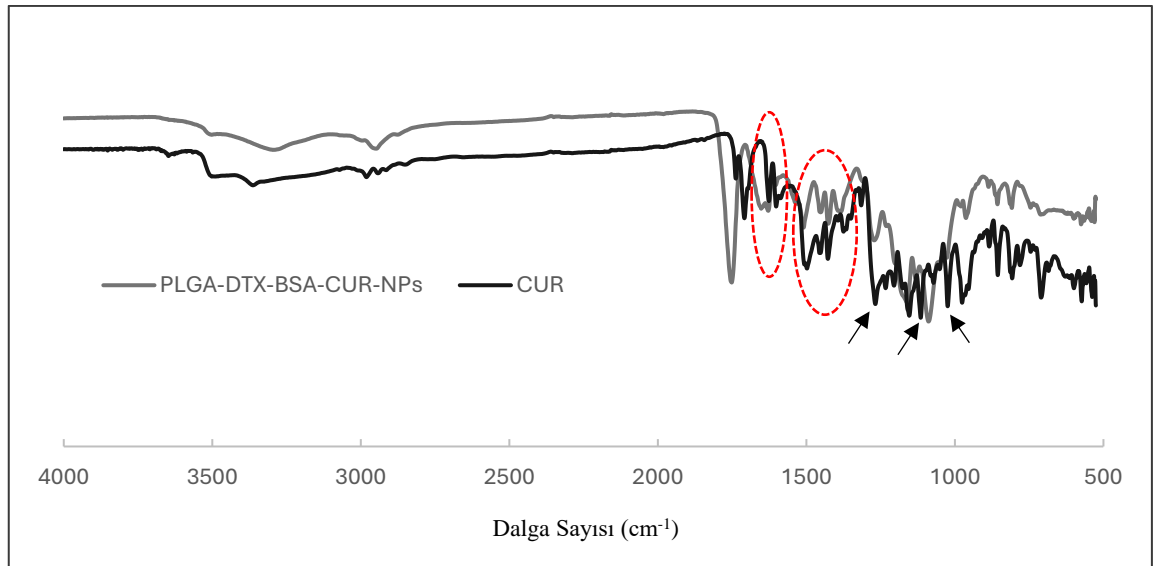
Şekil 4.87. PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'in boyut dağılımı eğrileri (PLGA miktarı 30 mg, DTX miktarı 3.0 mg, CUR miktarı 3.75mg, PVA konsantrasyonu %1.0, sulu faz (PVA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 1 ml).

4.5.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre (FTIR) Analizi

CUR'in FTIR spektrumu ve karakteristik pikleri Bölüm 2.2.3'te gösterildiği şekilde 1601 cm^{-1} ve 1505 cm^{-1} 'de benzen halkasındaki C=C ve C=O bağlarına, 1428 cm^{-1} 'de pik olefinik C-H gruplarına, 1272 cm^{-1} 'de görülen pik aromatik C-O gruplarına, 1110 cm^{-1} 'de görülen pik aromatik C-O gerilme titreşimlerine ve 1025 cm^{-1} 'de görülen pik de C-O-C gruplarına atfedilmiştir.



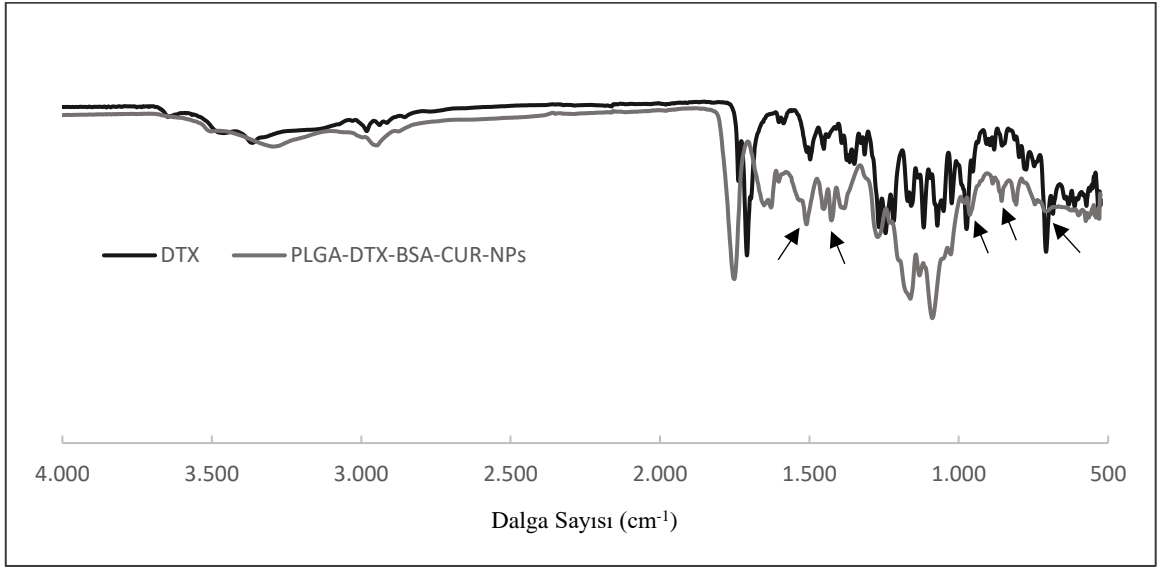
Şekil 4.88. PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'e ait FTIR spektrumu.



Şekil 4.89. CUR ve PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'e ait FTIR spektrumlarının karşılaştırılması.

Şekil 4.88 ve Şekil 4.89 incelendiğinde PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'e ait FTIR spektrumunda çok küçük kaymalar ile CUR'in karakteristik piklerinin hepsi gözlemlenmiştir ve yapıya CUR'in başarılı bir şekilde enkapsüle edildiği doğrulanmıştır.

DTX'in FTIR spektrumunda 3365 cm^{-1} , 2981 cm^{-1} ve 2880 cm^{-1} civarında sırasıyla ikincil amin ve alkan yapısındaki N-H ve C-H germe titreşimlerine, 1636 cm^{-1} 'deki küçük yoğun pik N-H bükülme titreşimine, 1451 cm^{-1} CH_2 ve CH_3 'ün C-H bükülme titreşimine, sırasıyla 1117 cm^{-1} , 1050 cm^{-1} ve 881 cm^{-1} 'de karbonil, amid ve alkan gruplarının C=O, C-N ve C=C eğilme titreşimine, 1708 cm^{-1} civarındaki pik ester bağındaki C=O gerilmesi, 1244 cm^{-1} civarındaki pik asetat içindeki O=C-O-C gerilmesi ve 786 cm^{-1} civarındaki pik ise aromatik C-H bükülmesi ile karakterize edilen piklerin varlığı Bölüm 2.4.3'te gösterilmiştir.

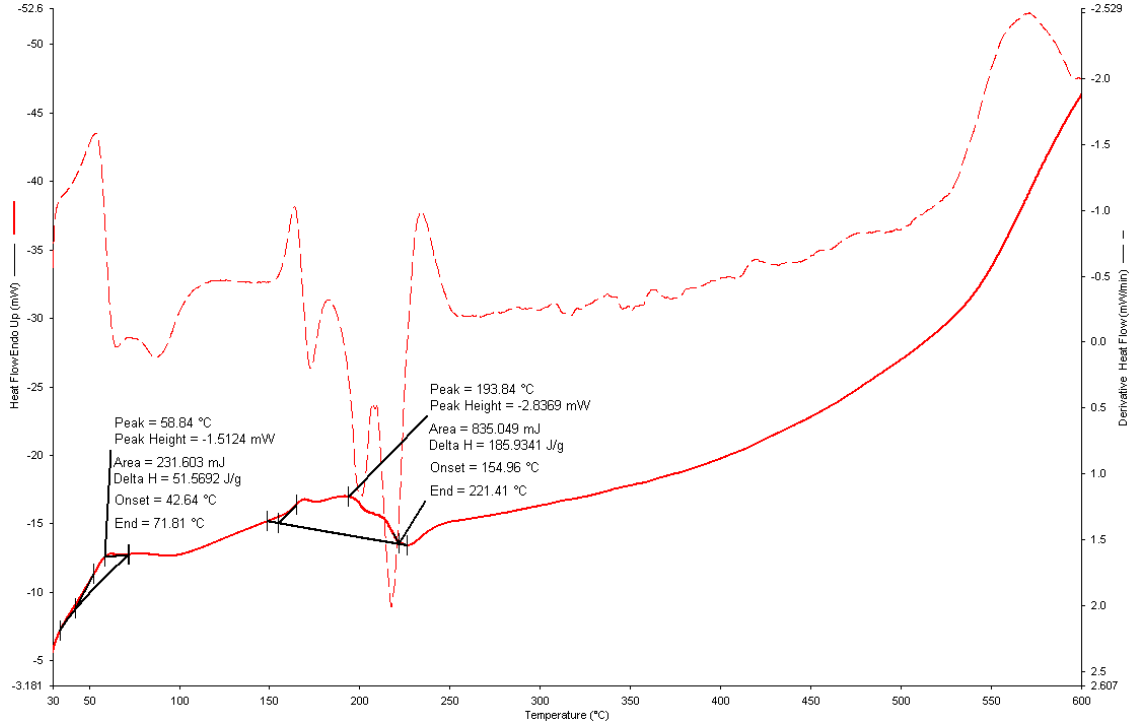


Şekil 4.90. DTX ve PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'e ait FTIR spektrumlarının karşılaştırılması.

Şekil 4.90 incelendiğinde 707 cm^{-1} , 786 cm^{-1} , 881 cm^{-1} , 1050 cm^{-1} , 1117 cm^{-1} , 1636 cm^{-1} 'de görülen ve küçük kaymalarla ifade edilebilecek DTX'e ait karakteristik piklerin varlığı PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'de de doğrulanmıştır ve yapıya DTX'in başarılı bir şekilde enkapsüle edildiği gösterilmiştir.

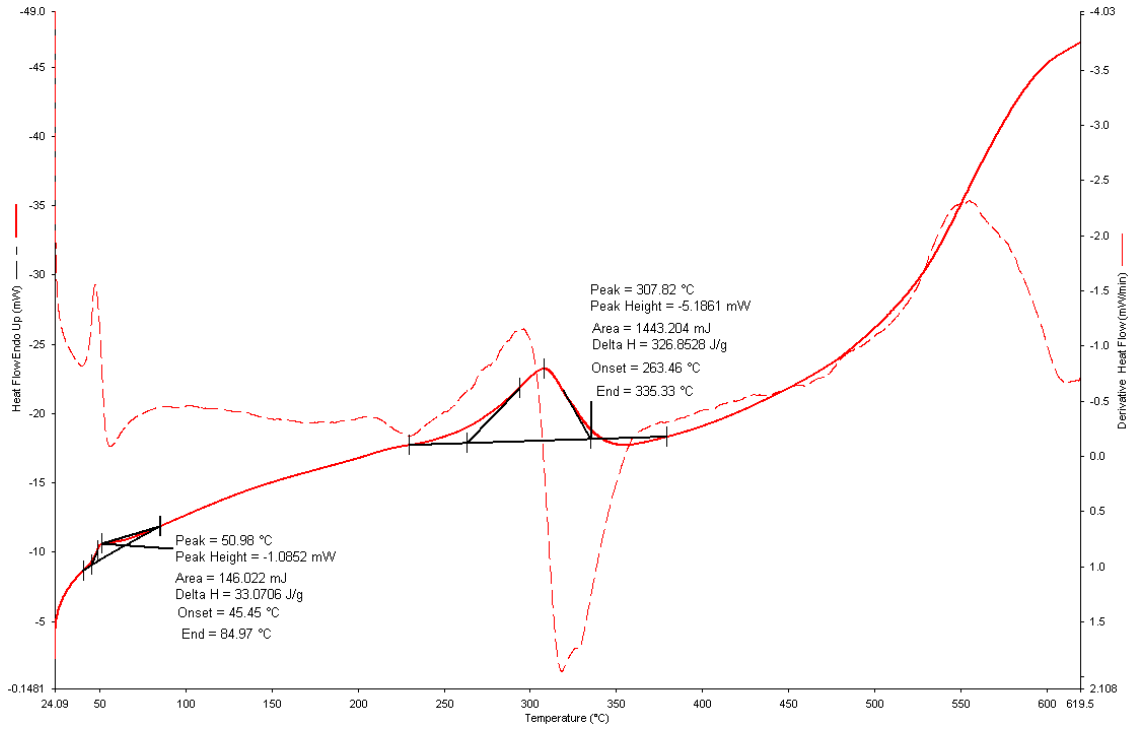
4.5.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizleri

DSC analizi ilaç ve taşıyıcı malzemenin amorf, kristal veya çözünmüş durumlarını belirlemek için kullanılmaktadır ve bu özellikler ilacın çözünürlüğünü, salımını ve biyoyararlanımını doğrudan etkileyebilmektedir. Bu tez kapsamında kullanılan antikanser ilaç DTX, CUR ve hazırlanan ilaç yüklü formülasyonlar PLGA-DTX-BSA-NPs ve PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'in DSC analizleri yapılmış ve Şekil 4.91-4.95' de DSC termogramları sunulmuştur.

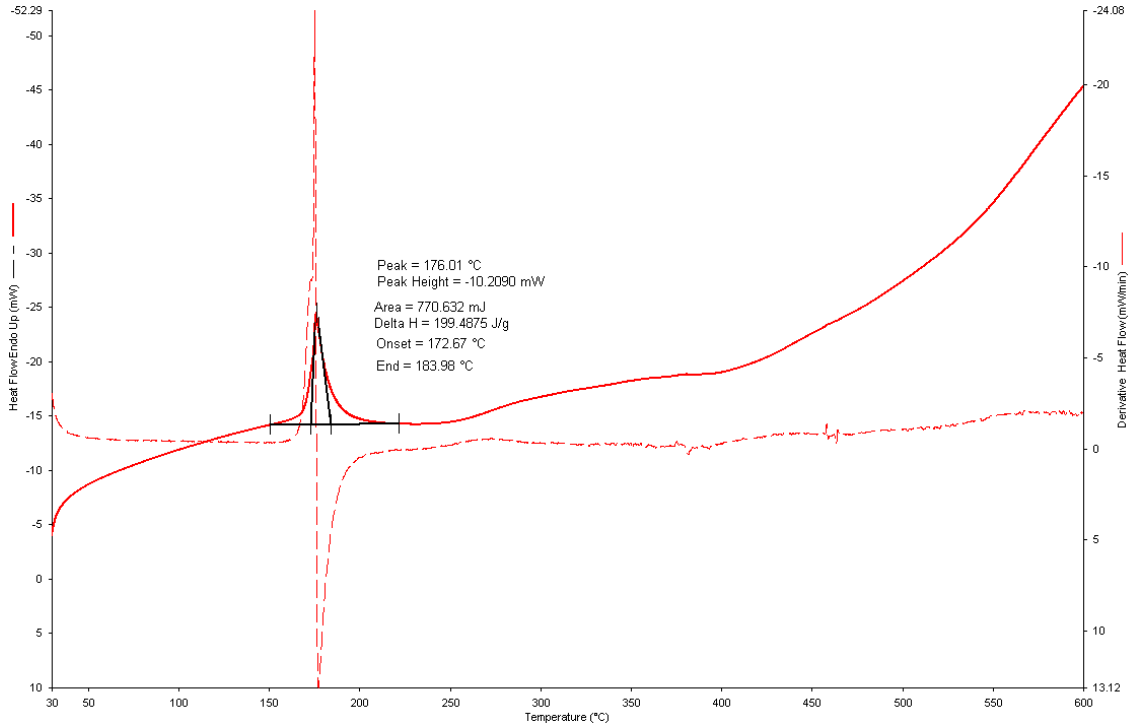


Şekil 4.91. DTX'e ait DSC termogramı.

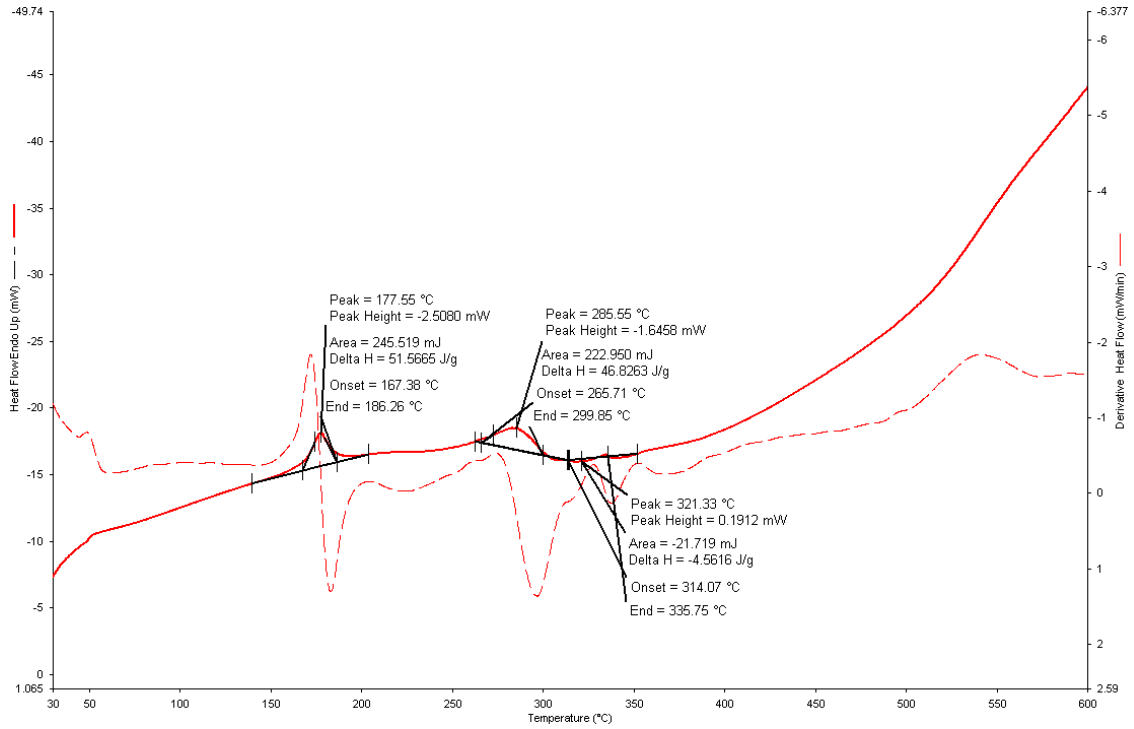
Saf DTX'in erime endotermik pik noktası 193.84 °C'de gözlemlenmiştir (Şekil 4.91). Hem PLGA-DTX-BSA-NP hem de PLGA-DTX-BSA-CUR-NP formülasyonunda DTX'in erime piki tespit edilememiştir ve bu da hazırlanan hibrit nanopartikül formülasyonlarında en azından partikül yüzeyi seviyesinde, kristal ilaç bulunmadığını kanıtlamaktadır [147, 148]. Bu nedenle, DTX'in PLGA-DTX-BSA-NP ve PLGA-DTX-BSA-CUR-NP matrislerinde amorf, düzensiz kristal bir fazda veya katı çözelti halinde olduğu sonucuna varılabilir.



Şekil 4.92. PLGA-DTX-BSA-NPs'e ait DSC termogramı.

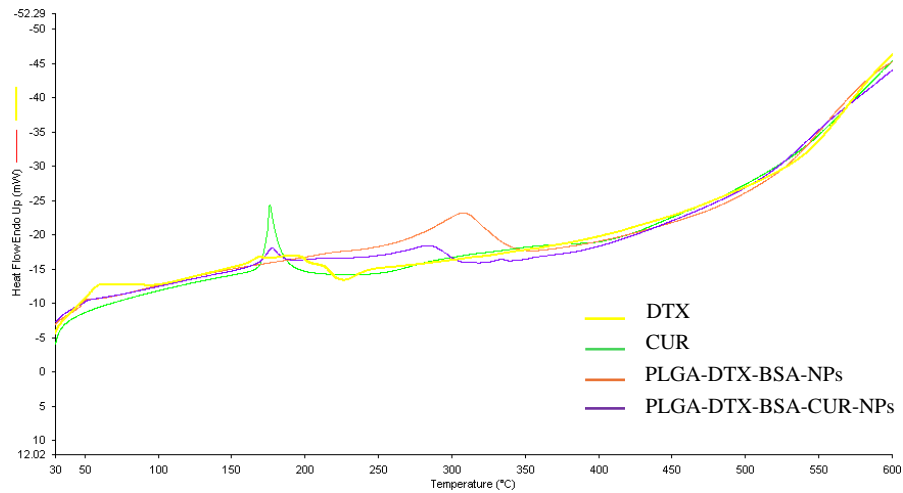


Şekil 4.93. CUR'e ait DSC termogramı.



Şekil 4.94. PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'e ait DSC termogramı.

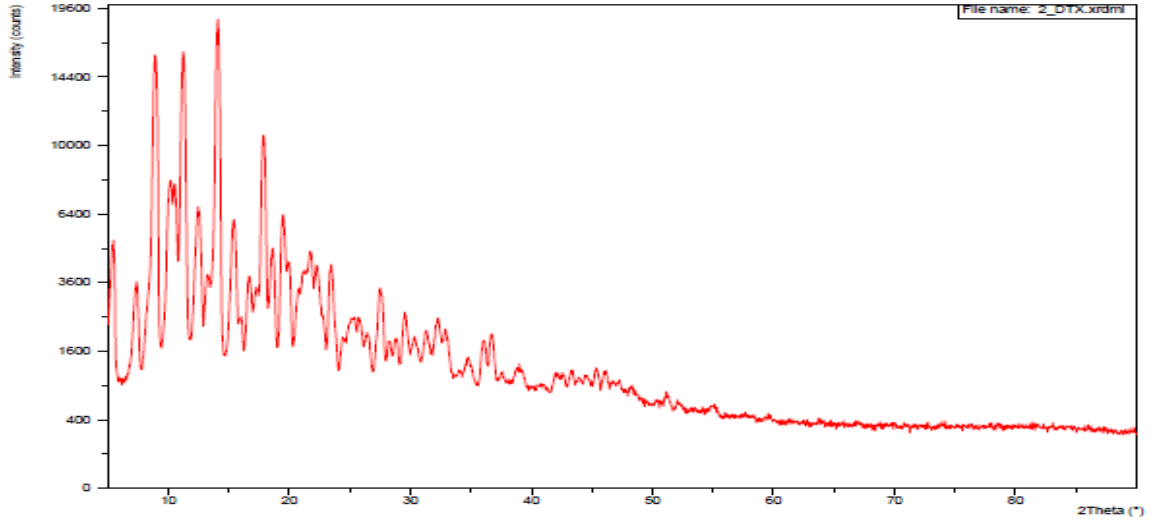
CUR'e ait DSC termogramı değerlendirildiğinde yaklaşık 176.01 °C'de 199.49 J/g entalpi ile erime olayını gösteren güçlü bir endotermik pik görülmektedir (Şekil 4.93). PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'e ait DSC termogramında ise CUR'e ait endotermik pikin şiddetinin oldukça küçüldüğü 177.6 °C'de 51.56 J/g entalpi ile endotermik bir pik gösterdiği tespit edilmiştir. PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'de nanopresipitasyon metoduna göre CUR enkapsüle edildikten sonra CUR'e ait entalpinin azalması kristallikte bir azalmaya işaret etmektedir (Şekil 4.95) [149].



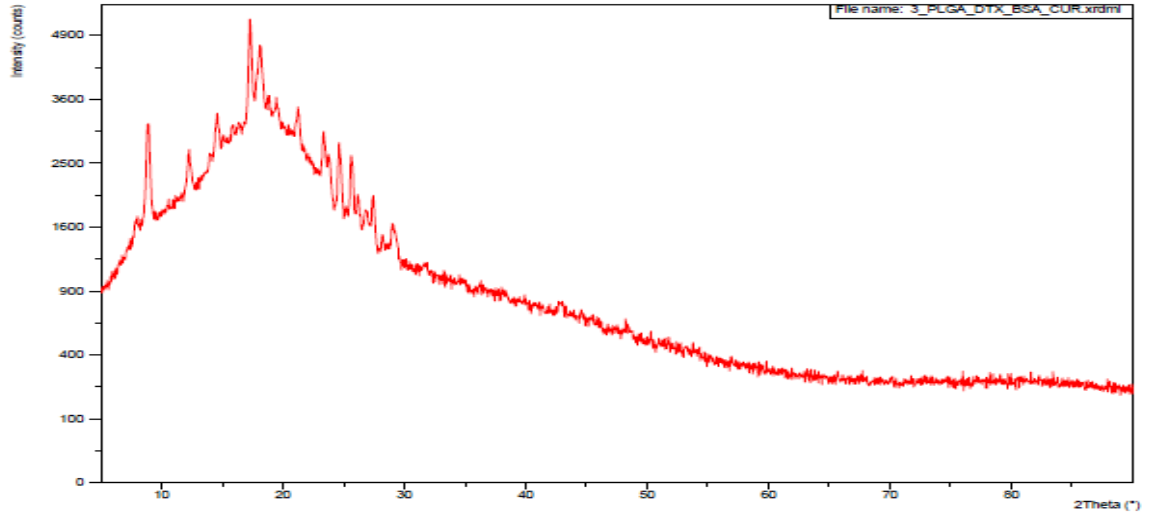
Şekil 4.95. DTX, CUR, PLGA-DTX-BSA-NPs, PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'e ait DSC termogramlarının karşılaştırılması.

4.5.4. XRD Analizleri

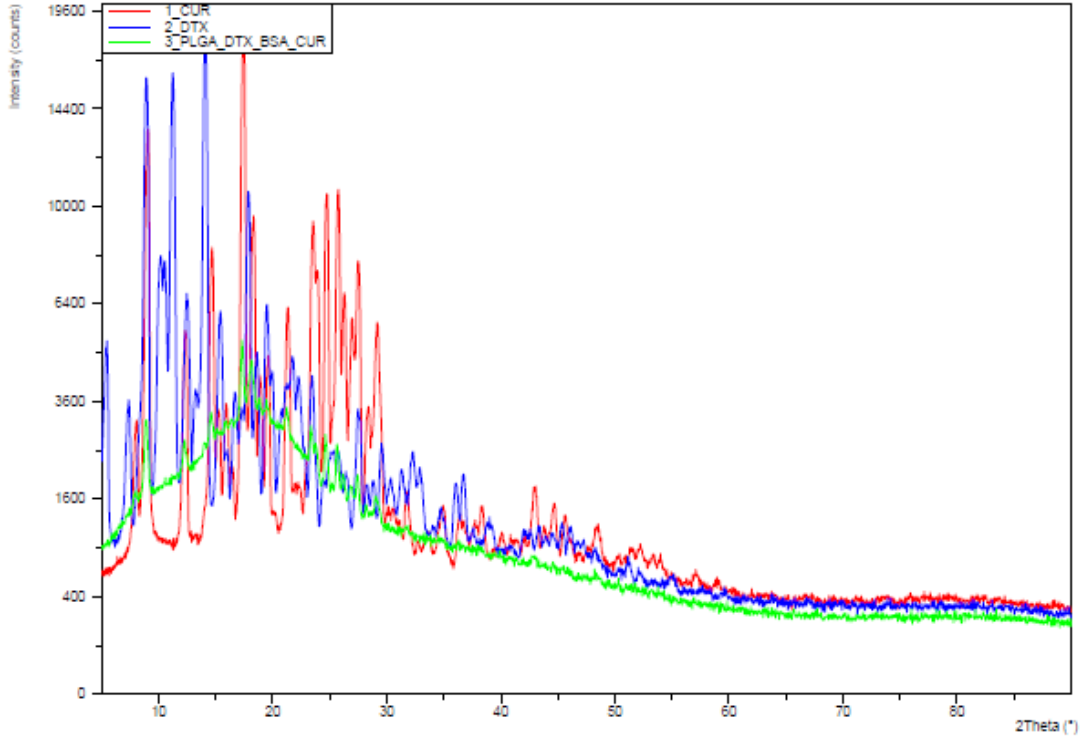
Saf CUR'e ait XRD deseni Bölüm 2.2.4'te Şekil 2.22'de verilmiştir. CUR'in, XRD deseninde görülen yoğun pikler ile karakterize edilen yüksek kristalli bir yapı sunmuştur ve ana pikleri $2\theta = 8.8^\circ, 14.5^\circ, 17.2^\circ, 18.1^\circ, 19.4^\circ, 23.3^\circ$ ve 24.5° 'de ortaya çıkmıştır. PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'de hem DTX hem de CUR'e ait kristal yapıların varlığının araştırılması ve DSC analizleri ile doğrulama yapılabilmesi için XRD analizi yapılmış ve XRD desenleri Şekil 4.96 ve 4.98'de sunulmuştur.



Şekil 4.96. Toz formdaki DTX'in XRD Deseni.



Şekil 4.97. PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'e ait XRD deseni.



Şekil 4.98. Toz formdaki DTX, CUR ve PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'e ait XRD desenlerinin karşılaştırılması.

Toz formdaki saf DTX'in XRD deseni 8.4° , 12.25° , 14.10° 2θ değerlerinde sinyaller sergilemiştir (Şekil 4.96) [150]. Saf DTX ve CUR ile PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'e ait XRD desenleri karşılaştırıldığında her iki etkene ait kristalin piklerinin kaybolduğu veya şiddetinin oldukça zayıfladığı tespit edilmiştir (Şekil 4.98). Öte yandan PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'e ait XRD deseni de geniş bir yayılım göstermiştir. Tüm bu sonuçlardan yola çıkılarak etken maddelerin polimerle etkileşim halinde olduğu ve amorf hale geçtiği sonucuna ulaşılmıştır ve bu durum DSC analizleri ile de doğrulanmıştır.

4.5.5. Enkapsülasyon Verimliliği ve Yükleme Kapasitesi

%0.5'lik BSA ve 3.0 mg DTX kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-NPs'e DTX enkapsülasyonu ve yükleme kapasitesi değerleri Bölüm 4.4.7'de sunulmuştur. Bir sonraki basamakta ise PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs hazırlanmış ve burada hem hazırlanan formülasyon için hem de DTX ve CUR için karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. CUR ve DTX'in hazırlanan formülasyon içinde varlığı, çeşitli karakterizasyon çalışmaları ile doğrulanmıştır. Sentezlenen PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'de ortama eklenen DTX miktarı sabit tutulmuş, formülasyona eklenen CUR miktarı

değiştirilerek kabuk yapısındaki yani BSA katmanındaki CUR'in enkapsülasyon ve yükleme kapasitesi değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.18. PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs 'deki DTX ve CUR enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi değerlerinin karşılaştırılması (PLGA miktarı 30 mg, BSA konsantrasyonu %0.5 (50mg), sulu faz (BSA) hacmi 10 ml ve organik faz hacmi 1 ml).

DTX Miktarı (mg)	CUR Miktarı (mg)	DTX Enkapsülasyon Verimi (%)	DTX Yükleme Kapasitesi (%)	CUR Enkapsülasyon Verimi (%)	CUR Yükleme Kapasitesi (%)
3.0	2.0mg	73.50	8.55	6.12	0.47
3.0	3.75mg	82.33	10.21	12.38	1.80
3.0	5.0mg	56.92	6.61	9.62	1.86

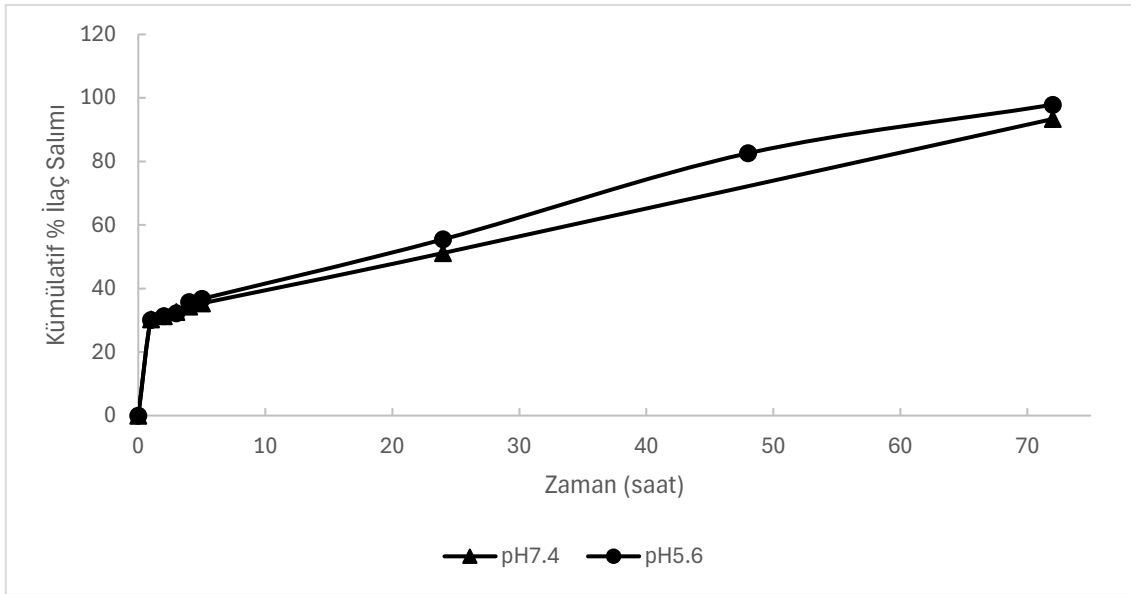
DTX ve CUR kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'de DTX enkapsülasyon verimi, yükleme kapasitesi ve %salım verilerinin PLGA-DTX-BSA-NPs ve PLGA-DTX-NPs ile karşılaştırmasının yapılabilmesi için DTX miktarı 3.0mg'da sabit tutulmuştur. 3.0mg DTX ve 2.0mg CUR kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'de DTX enkapsülasyon verimi %73.50 ve yükleme kapasitesi değeri ise %8.55 olarak hesaplanmıştır. PLGA-DTX-BSA-CUR-NP formülasyonunda kullanılan CUR miktarının artırılması DTX enkapsülasyon verimini ve yükleme kapasitesini büyük oranda etkilememiştir. Ancak CUR miktarı 5.0mg'a çıkarıldığında hem DTX hem de CUR enkapsülasyon veriminin azaldığı tespit edilmiştir. Bu azalışın sebebi CUR miktarının artırılması ile organik fazın sulu faza eklenmesi aşamasında sentez ortamında agregasyonun meydana gelmesi ve homojen partikül dağılımında sentez yapılamamasıdır.

DTX miktarı sabit tutularak ortamdaki CUR miktarının yaklaşık 2 katına çıkarılması ile (3.75mg) ile formülasyonun kabuk kısmına yani BSA katmanına enkapsüle olan CUR'in enkapsülasyon verimi %12.38'e ve CUR yükleme kapasitesi de %1.80'e yükselmiştir.

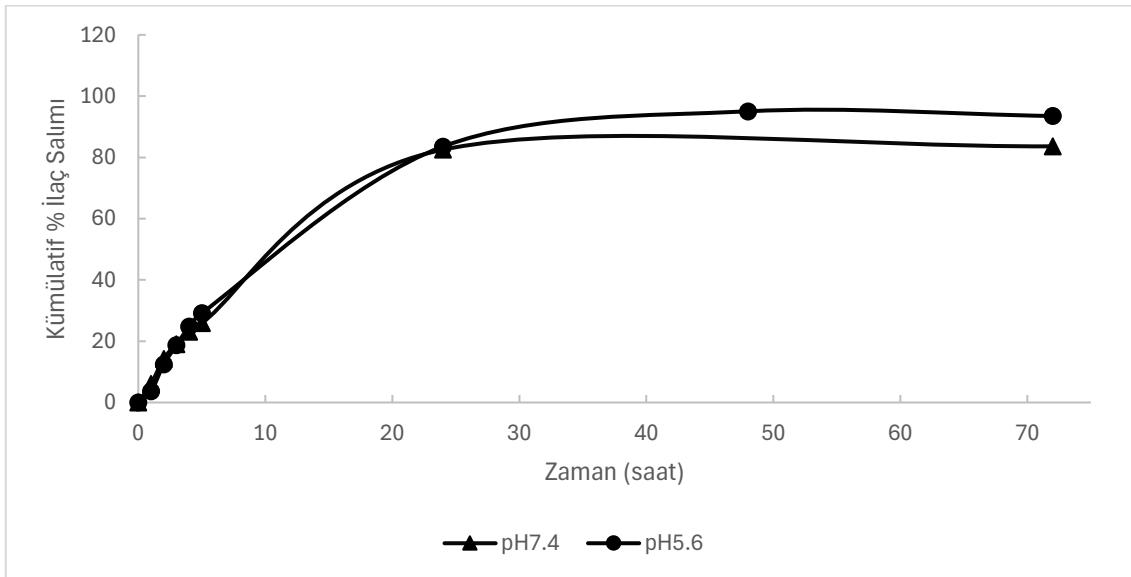
4.5.6. *In Vitro* İlaç Salım Çalışmaları

Her iki etkin maddenin birlikte PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'e yüklendiğinde enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesinin en yüksek olduğu durum gözetilerek Çizelge 4.18'de ayrıntıları verilen 3.0mg DTX ve 3.75mg CUR kullanılarak hazırlanan formülasyondan DTX ve CUR salımı *in vitro* ortamda çalışılmıştır.

En uygun koşullarda elde edilmiş PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den DTX ve CUR'in *in vitro* ortamda salımı 37°C'de asidik tümör mikroçevresini simüle eden pH 5.6 ve fizyolojik kanı simüle eden pH 7.4 PBS tampon ortamlarında incelenmiştir. PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den pH 5.6 ve pH 7.4'te gerçekteştirilen DTX ve CUR ikili ilaç salımı için kümülatif salım eğrileri Şekil 4.99 ve Şekil 4.100'de verilmiştir.



Şekil 4.99. PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den pH 5.6 ve pH 7.4'teki CUR salım profillerinin karşılaştırılması (T=37°C).



Şekil 4.100. PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den pH 5.6 ve pH 7.4'teki DTX salım profillerinin karşılaştırılması (T=37°C).

CUR, düşük biyoyararlanımı ve sınırlı çözünürlük özellikleri nedeniyle, sistemik tedavilerde zorluklar yaratabilen bir bileşiktir. PLGA:BSA protein-polimer hibrit nanopartiküllerinden oluşan ilaç taşıyıcı sistem ile bu sorunu aşmak amaçlanmıştır. PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den CUR salım profili, pH 5.6 ortamında daha hızlı gerçekleşmiştir ve bu durum CUR'in asidik ortamda daha hızlı çözünerek nanopartiküllerden serbest bırakıldığını göstermektedir. Bu ortam CUR'in çözünürlüğünü artırarak salım hızını yükseltebilir. Fizyolojik pH (7.4) ortamında ise CUR'in salımı daha yavaş gerçekleşmiştir ve kısmen daha kontrollü bir salım profili göstermiştir (Şekil 4.99). PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den CUR salımı her iki pH ortamında da ilk 5 saat içerisinde %36'lık bir salım oranına ulaşmıştır ve ilk 5 saat için çalışılan her noktada yaklaşık aynı olarak ölçülmüştür. 24. saat sonunda CUR, pH 7.4'te yaklaşık %51, pH 5.6 ortamında ise %55.5 olarak hesaplanmıştır. 72. saat sonunda da CUR salımı pH 5.6 ve pH 7.4 için sırası ile %98 ve %93 olarak ölçülmüştür. CUR, PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'in büyük oranda kabuk kısmına yani dış katmandaki BSA'ya enkapsüle olduğu düşünüldüğünde salımın ilk saatlerde hızlı ve ani bir şekilde gerçekleşmesi beklenen bir durumdur.

PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den DTX salımı incelendiğinde ise pH 5.6 ortamında DTX, CUR'e benzer şekilde hızlı bir oranda ancak daha kontrollü bir hızda taşıyıcı sistemden serbest kalmıştır. DTX nanopartiküller aracılığıyla daha dengeli ve sistematik bir şekilde taşıyıcı sistemden salım gerçekleştirmiştir. Her iki pH değeri için ilk 5 saatlik salım verileri birbirine yakın değerlerde ölçülmüştür. pH 5.6 salım ortamında DTX salımı 5. saat sonunda %30, pH 7.4 salım ortamında ise yaklaşık %26 olarak ölçülmüştür. 24. saat sonunda DTX salımı her iki ortamda da yaklaşık %83 olarak hesaplanmıştır. PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den DTX salımı 72. saat sonunda pH 5.6 ortamında %94 ve pH 7.4'te ise %84 olarak maksimuma ulaşmıştır. DTX'in özellikle pH 7.4'teki salım profili, kontrollü ve dengeli salımı, kanser tedavisindeki hedeflenmiş etkinlik açısından oldukça önemlidir. PLGA ve BSA'nın birlikte çalışarak bu düzenlemeyi sağlaması, DTX'in etkinliğini artıran bir faktördür.

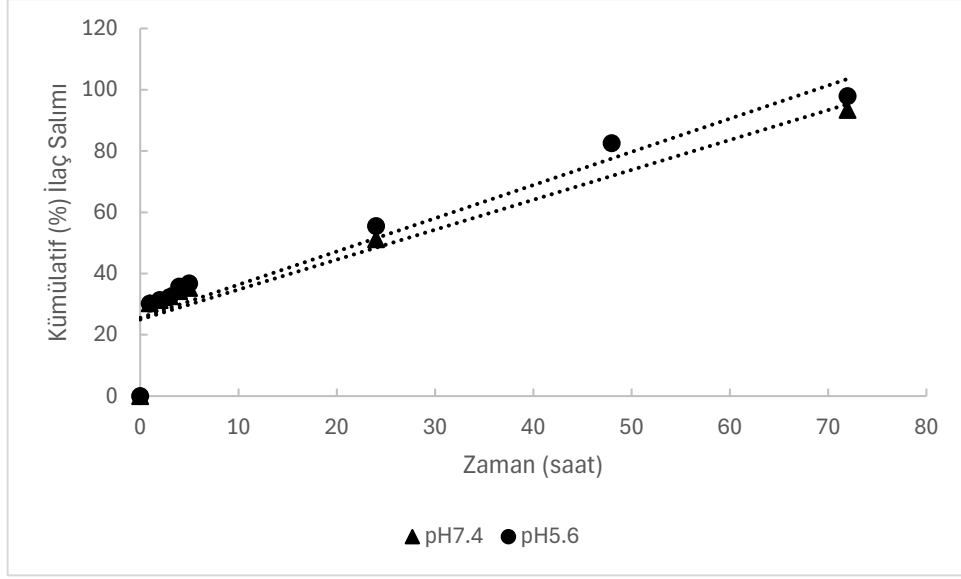
Öte yandan CUR'in ilk başta ani ve hızlı bir salım gösterdiği, 24. saatten sonra da salımın gecikmeli olarak 72. saate kadar devam ettiği tespit edilmiştir. PLGA:BSA hibrit nanopartiküllerin yapısal özelliklerinin, CUR salımını etkilediği ve bu durumun, her iki bileşenin (PLGA çekirdek ve BSA kabuk) etkilerinden kaynaklanıyor olduğu söylenebilir. Nanopartiküllerin BSA katmanında yer alan CUR'in dış kısımdaki bölgeden

hızla salınması ile ilk ani salımın gerçekleştiği tespit edilmiştir. İkinci salım kısmı yani gecikmeli salım durumunun sebebi olarak PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'in sentez aşamasında bir miktar CUR'in PLGA çekirdek kısmında da enkapsüle olması ile açıklanabilir. CUR'in hem PLGA çekirdeği hem de BSA katmanı içinde yer alması, ilacın iki farklı fazda salınmasına yol açabilir. Başlangıçta BSA katmanındaki CUR hızla salınabilir, ancak PLGA çekirdeğindeki CUR, daha uzun süre ve daha kontrollü bir şekilde serbest bırakılabilir. Bu durum, sürekli artan bir salım profili yaratabilir. Bu özelliklerin birleşimi, CUR'in ikinci fazda daha yavaş salınmasını ve kontrollü salım profili oluşturmasını mümkün kılar. Dolayısıyla, CUR'in sürekli artan bir salım profili göstermesi, PLGA ve BSA'nın birlikte çalışarak ilacın salımını farklı hızlarda kontrol etmeleri olarak söylenebilir.

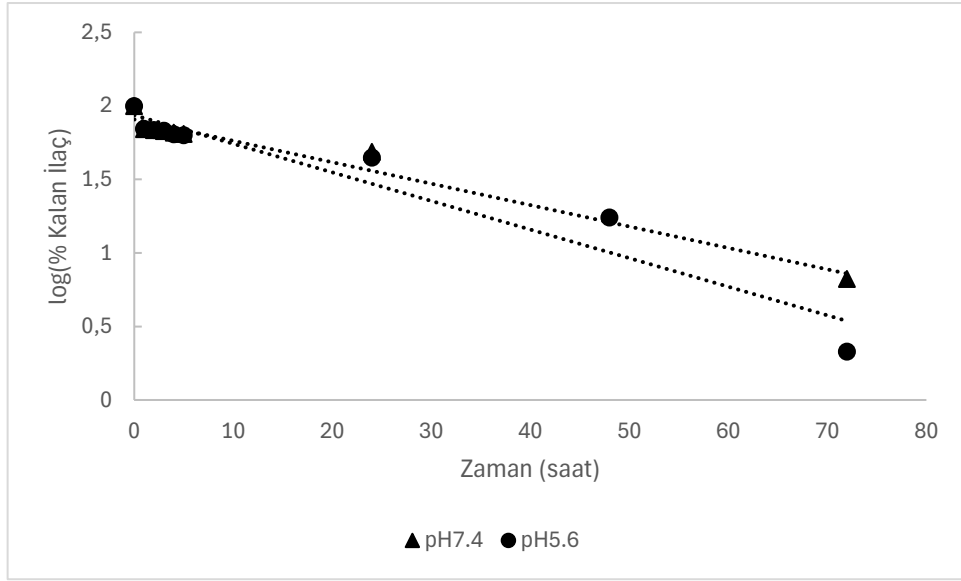
4.5.7. PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den DTX ve CUR Salım Kinetiğinin Farklı pH Değerlerinde İncelenmesi

En uygun koşullarda sentezlenen DTX ve CUR yüklü PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den DTX ve CUR salım kinetiği çalışmaları iki farklı pH'ta gerçekleştirilmiştir. Fizyolojik kan pH'sı 7.4 ve asidik tümör mikroçevresi pH 5.6'yı simüle eden farklı pH tamponlarında yapılan *in vitro* salım çalışmalarından elde edilen verilerin sıfırıncı mertebeden, birinci mertebeden, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowell salım modellerine uyumu araştırılmıştır. Her model için kinetik hız sabitlerinin (k_0 , k_1 , k_H , k_{HC} , k) değerleri ve Korsmeyer-Peppas modeli için n difüzyon üssünün değerleri pH 7.4 ve pH 5.6 için bulunmuş ve bu değerler Çizelge 4.19-Çizelge 4.20'de sunulmuştur.

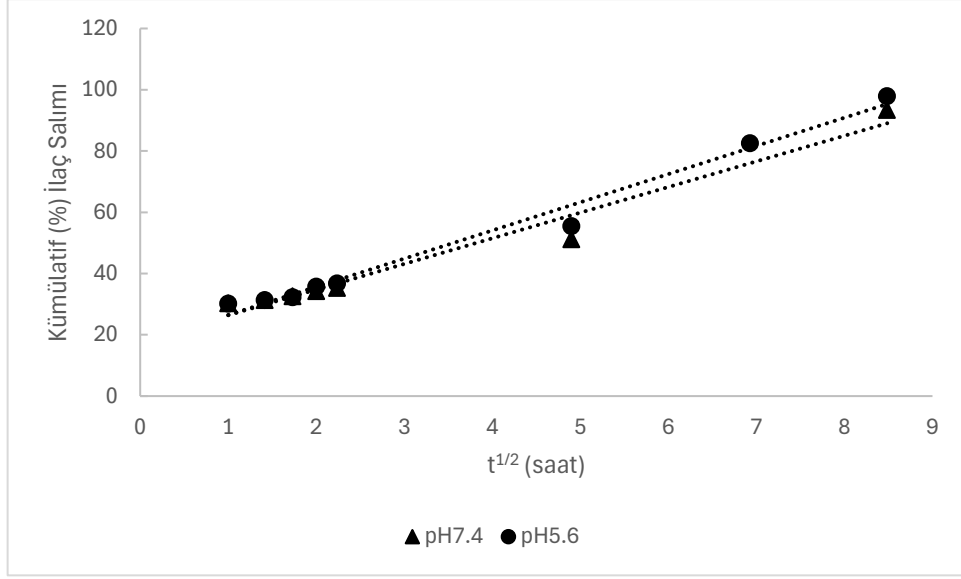
PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den ikili ilaç salımı analizleri için çalışılan her iki pH değerinde de CUR salımı Higuchi kinetik modeline en yüksek uyumu göstermiştir (Çizelge 4.19). CUR'in ilaç taşıyıcı sistemden salımının kontrollü difüzyon mekanizması ile gerçekleştiği tespit edilmiştir. Higuchi modeline göre diğer modeller daha düşük uyum göstermiştir. Korsmeyer-Peppas modeline uyum incelendiğinde $n < 0.5$ olduğundan salımın Fickian difüzyon mekanizması ile gerçekleştiği doğrulanmıştır. Higuchi modeline göre k_H değerleri pH 5.6'da salım hızının daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu durumun pH'nın BSA kabuğunun çözünürlüğü üzerindeki etkisinden kaynaklandığı söylenebilir.



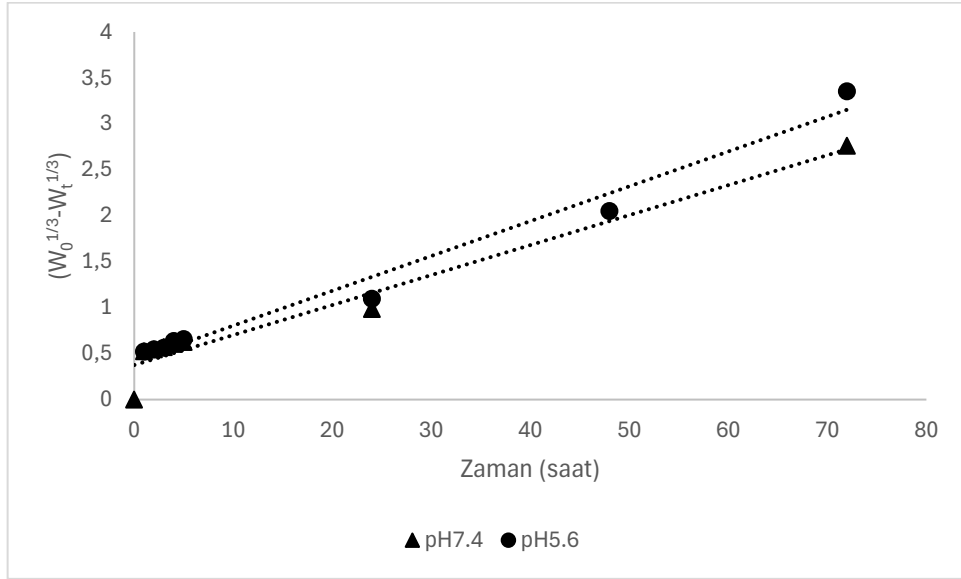
Şekil 4.101. 3.0mg DTX ve 3.75mg CUR kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den CUR için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen sıfırıncı derece kinetik model grafiği.



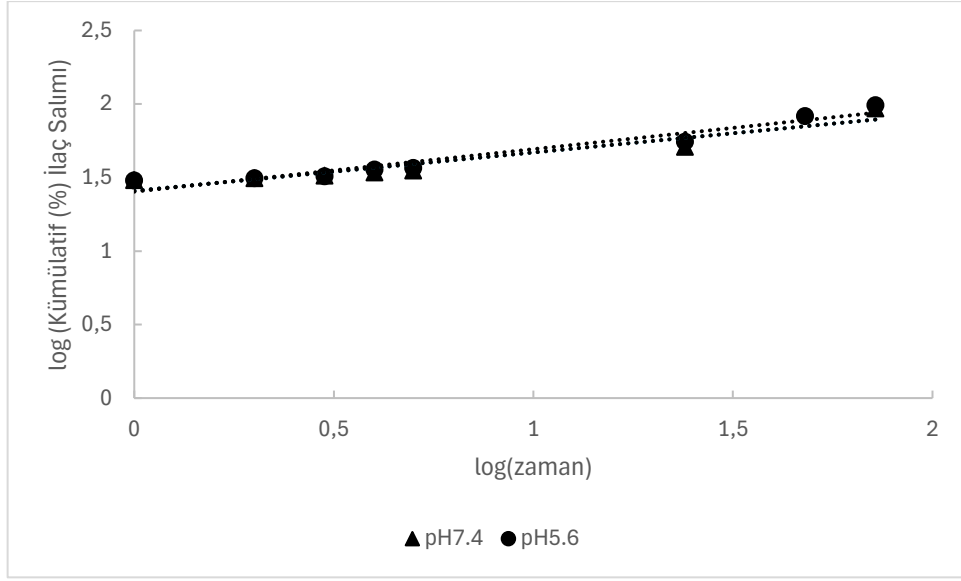
Şekil 4.102. 3.0mg DTX ve 3.75mg CUR kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den CUR için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen birinci derece kinetik model grafiği.



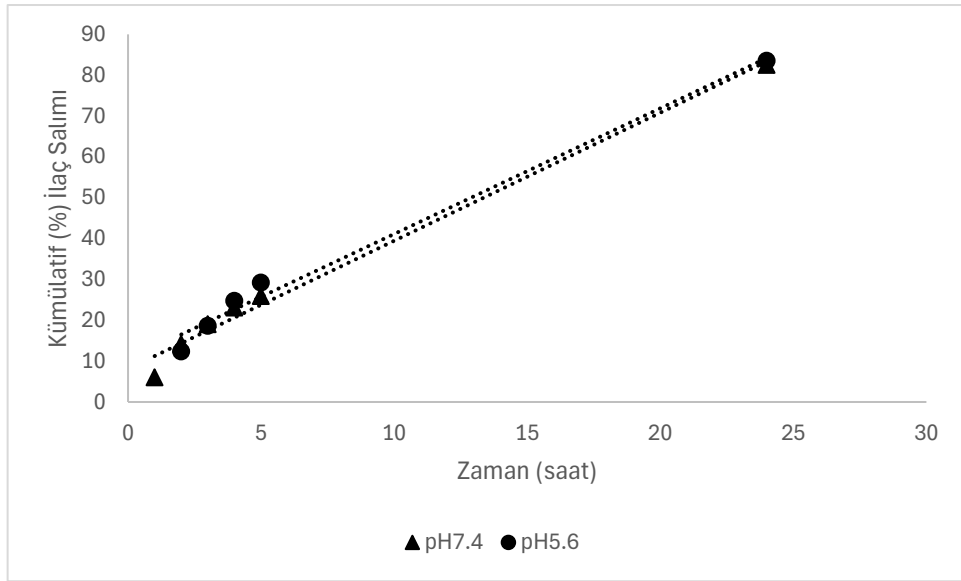
Şekil 4.103. 3.0mg DTX ve 3.75mg CUR kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den CUR için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen Higuchi kinetik model grafiği.



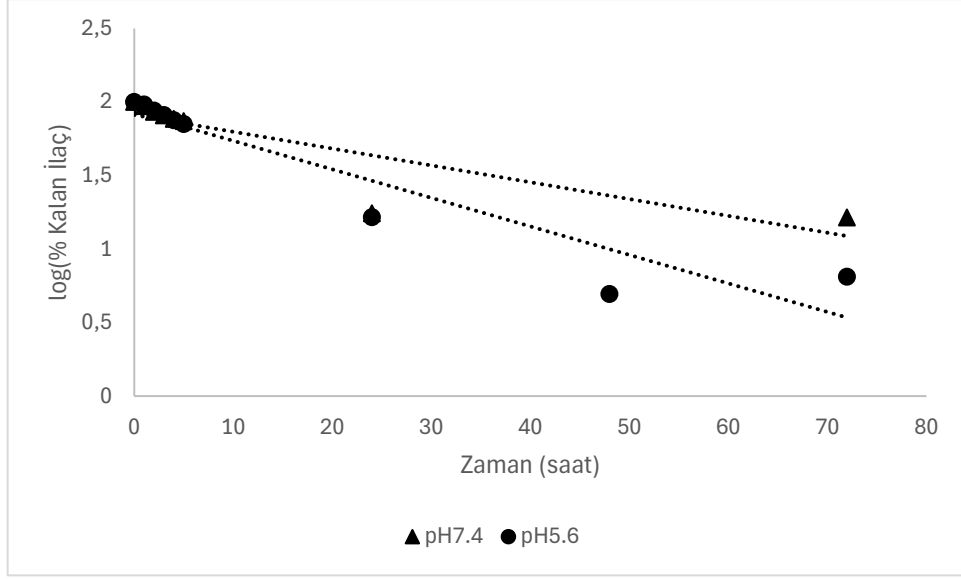
Şekil 4.104. 3.0mg DTX ve 3.75mg CUR kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den CUR için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen Hixson-Crowell kinetik model grafiği.



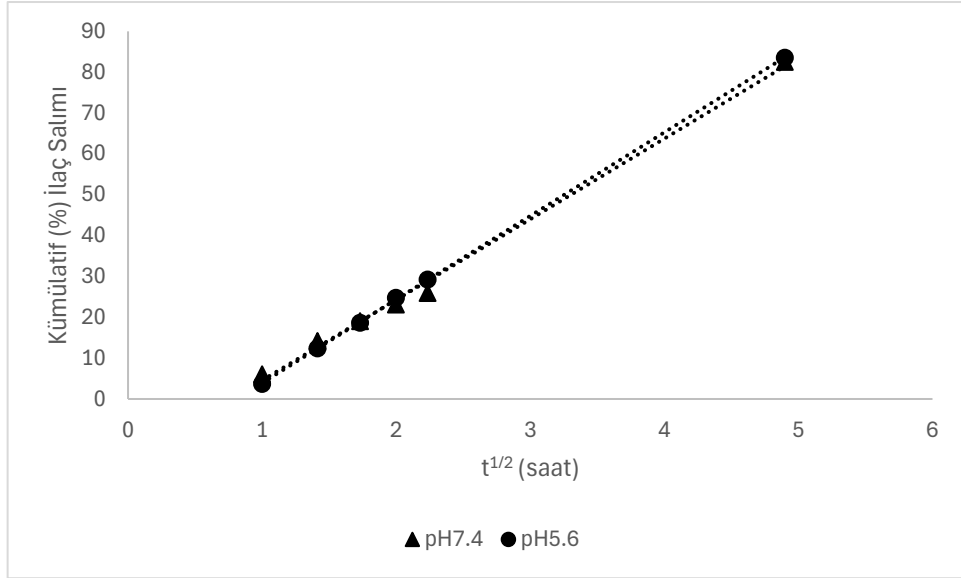
Şekil 4.105. 3.0mg DTX ve 3.75mg CUR kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den CUR için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen Korsmeyer-Peppas kinetik model grafiği.



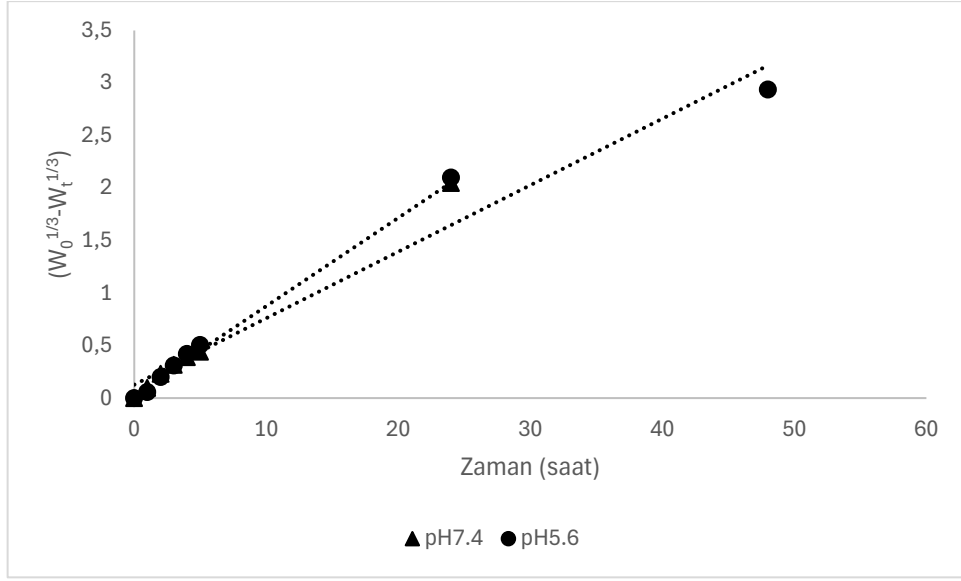
Şekil 4.106. 3.0mg DTX ve 3.75mg CUR kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den DTX için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen sıfırıncı derece kinetik model grafiği.



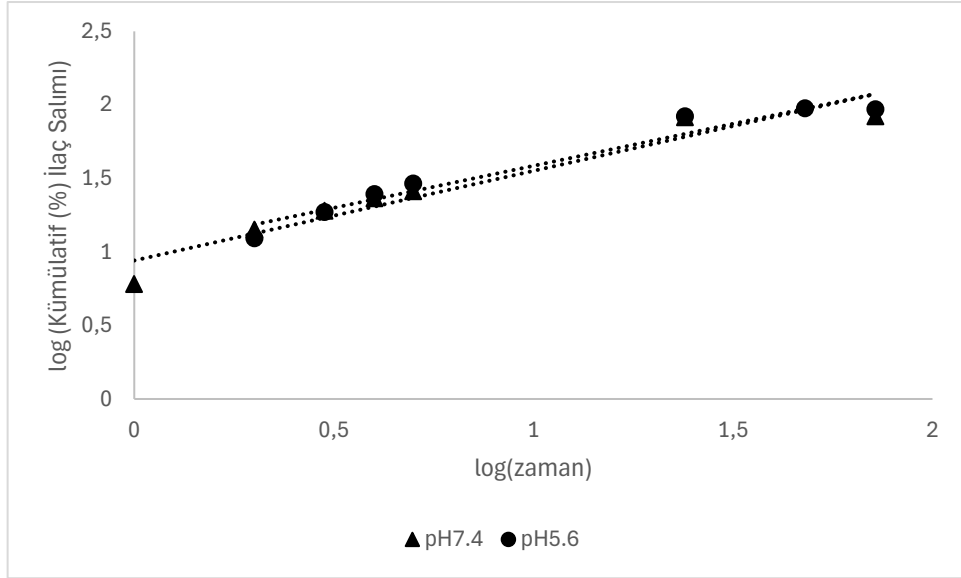
Şekil 4.107. 3.0mg DTX ve 3.75mg CUR kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den DTX için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen birinci derece kinetik model grafiği.



Şekil 4.108. 3.0mg DTX ve 3.75mg CUR kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den DTX için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen Higuchi kinetik model grafiği.



Şekil 4.109. 3.0mg DTX ve 3.75mg CUR kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den DTX için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen Hixson-Crowell kinetik model grafiği.



Şekil 4.110. 3.0mg DTX ve 3.75mg CUR kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den DTX için pH=5.6 ve pH=7.4'te elde edilen Korsmeyer-Peppas kinetik model grafiği.

Çizelge 4.19. PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den CUR salımının kinetik modellere uyumunun karşılaştırılması (pH 5.6 ve pH 7.4'teki kinetik parametrelerin değerleri ve R² değerlerinin karşılaştırılması).

Sıfıncı derece kinetik model (Salım ortamı pH'ı)		$(Q = Q_0 + k_0 \cdot t)$		
		k₀	R²	
5.6		1.0836	0.8824	
7.4		0.9767	0.8438	
Birinci derece kinetik model (Salım ortamı pH'ı)		$(\log C = \log C_0 - k_1 \cdot t / 2.303)$		
		k₁	R²	
5.6		0.0447	0.9301	
7.4		0.0336	0.9639	
Higuchi kinetik model (Salım ortamı pH'ı)		$(Q = K_H \times t^{1/2})$		
		k_H	R²	
5.6		9.2007	0.9850	
7.4		8.3693	0.9681	
Hixson-Crowell kinetik model (Salım ortamı pH'ı)		$(W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = k_{HC} \times t)$		
		k_{HC}	R²	
5.6		0.0379	0.9799	
7.4		0.0326	0.9529	
Korsmeyer-Peppas kinetik model (Salım ortamı pH'ı)		$(\log \left(\frac{M_t}{M_\infty} \right) = \log k + n \log(t))$		
	k	R²	n	İlaç Salım Mekanizması
5.6	25.3454	0.9449	0.2889	Fickian Difüzyon
7.4	25.6567	0.9039	0.2612	Fickian Difüzyon

PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den pH 5.6 ve pH 7.4 salım ortamında DTX salım verilerinin kinetik modellere uyumu incelendiğinde en yüksek uyumu Higuchi modelinin gösterdiği tespit edilmiştir. Higuchi modeli için yaklaşık olarak %99'luk bir regresyon katsayısı değeri hesaplanmıştır ve bu durum DTX salımının da kontrollü difüzyon mekanizmasıyla gerçekleştiğini göstermektedir. Sıfıncı derece kinetik modeli de yüksek uyum göstermiştir ve bu durum salımın sabit hızla gerçekleştiğini ve PLGA matrisi içindeki kontrollü salımı işaret etmektedir. Korsmeyer-Peppas modeline uyum incelendiğinde her iki pH ortamında da n değerini 0.5'ten büyük olarak bulunmuştur ve DTX salımının Fickian difüzyon ve polimer matrisin erozyon mekanizmasının bir kombinasyonu ile gerçekleştiği sonucuna ulaşılmıştır. Tüm modeller için kapsamlı değerlendirme yapıldığında DTX salımı, hem Fickian difüzyon hem de PLGA'nın pH'ya duyarlı bozunması ile ilişkili olduğu söylenebilir. DTX, PLGA matrisi içinde yüklü olduğundan, salımı hem kontrollü difüzyon hem de matris erozyonu mekanizmalarıyla gerçekleşmektedir. Higuchi ve sıfıncı derece modelleri, pH'ya bağlı kinetik profili açıklamada güçlü bir uyum göstermiştir. pH 5.6'da salım hızı biraz daha yüksektir, bu da

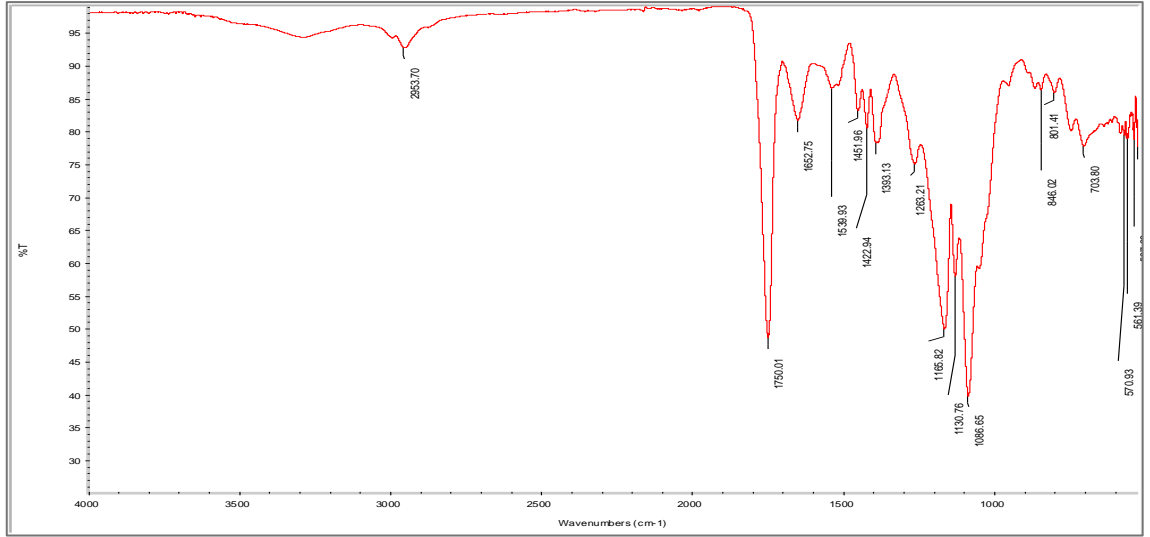
PLGA'nın asidik ortamda daha hızlı bozunmasından kaynaklanabilir. Her iki molekül için de Higuchi modeli kinetik uyumu en iyi açıklamaktadır. CUR ve DTX salımlarının kinetikleri, yükleme yerlerine (BSA veya PLGA) ve salım ortamına (pH 5.6 ve 7.4) bağlı olarak değişim göstermektedir. Bu, farklı biyolojik ortamlar için kontrollü salım profilleri geliştirilmesinde önemli bir avantaj sağlayabilir.

Çizelge 4.20. PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den DTX salımının kinetik modellerle uyumunun karşılaştırılması (pH 5.6 ve pH 7.4'teki kinetik parametrelerin değerleri ve R² değerlerinin karşılaştırılması).

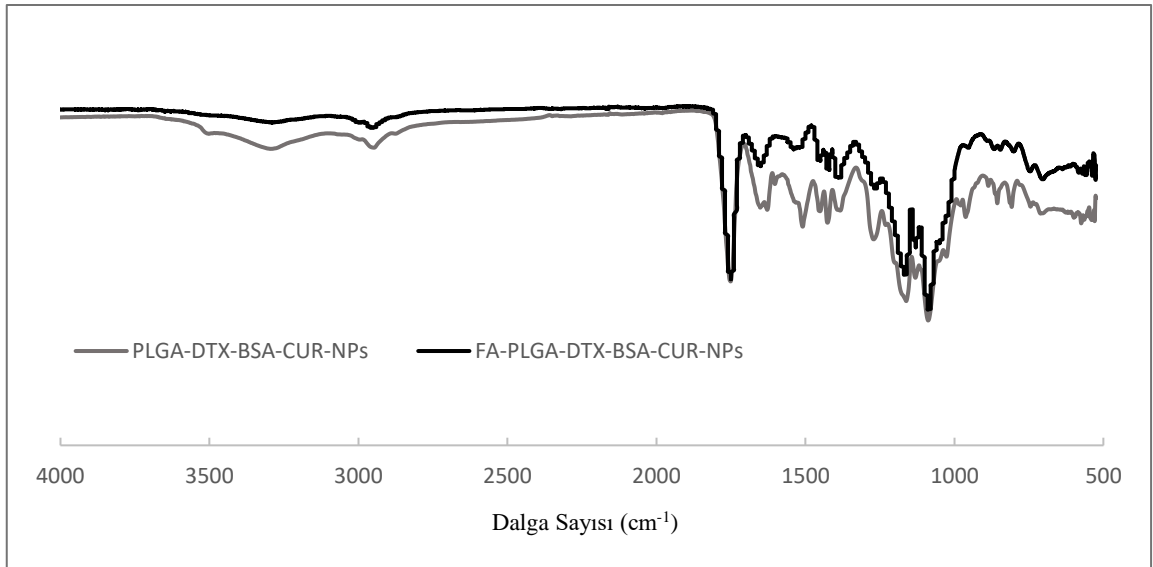
Sıfıncı derece kinetik model ($Q = Q_0 + k_0 \cdot t$) (Salım ortamı pH'ı)		k_0	R^2		
5.6		3.0764	0.9893		
7.4		3.1354	0.9891		
Birinci derece kinetik model ($\log C = \log C_0 - k_1 \cdot t / 2.303$) (Salım ortamı pH'ı)		k_1	R^2		
5.6		0.0447	0.8900		
7.4		0.0263	0.7480		
Higuchi kinetik model ($Q = K_H \times t^{1/2}$) (Salım ortamı pH'ı)		K_H	R^2		
5.6		20.4550	0.9999		
7.4		19.7260	0.9958		
Hixson-Crowell kinetik model ($W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = k_{HC} \times t$) (Salım ortamı pH'ı)		k_{HC}	R^2		
5.6		0.0633	0.9638		
7.4		0.0841	0.9987		
Korsmeyer-Peppas kinetik model ($\log \left(\frac{M_t}{M_\infty} \right) = \log k + n \log(t)$) (Salım ortamı pH'ı)		k	R^2	n	İlaç Salım Mekanizması
5.6		3.7273	0.9529	0.5714	Non-Fickian Difüzyon
7.4		8.7458	0.9255	0.6095	Non-Fickian Difüzyon

4.5.8. Folik Asit ile Konjuge Edilmiş PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs (FA-PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs)'in FTIR, TGA Analizi Sonuçları ve *In Vitro* İlaç Salım Çalışmaları

3. bölüm deneysel çalışmalar kısmında ayrıntıları verilen konjugasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan FA-PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'in FTIR spektrumları çekilmiş ve FA konjugasyonundan sonra nanopartikül formülasyonun içerdiği fonksiyonel gruplardaki değişimler, pik kaymaları, yeni pik oluşumları vb. araştırılmıştır (Şekil 4.111 ve Şekil 4.112).



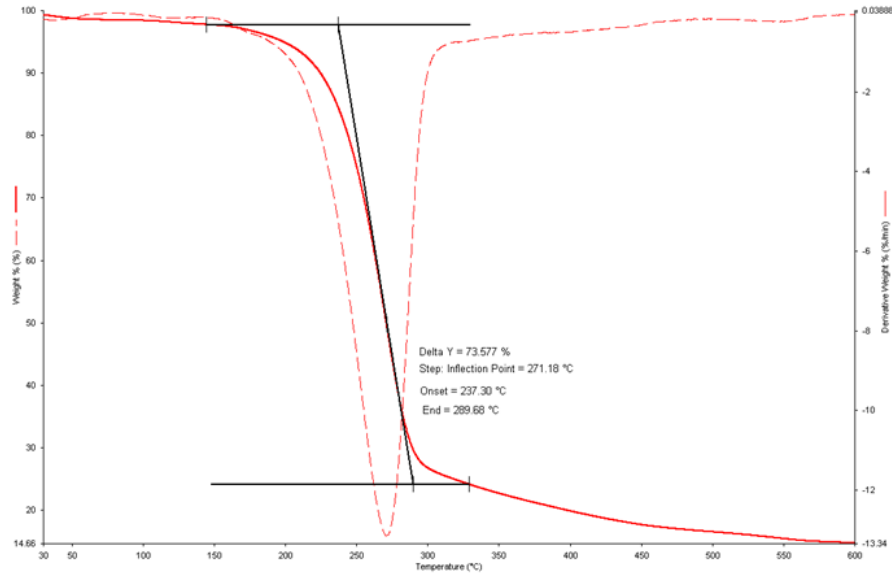
Şekil 4.111. FA-PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'in FTIR spektrumu.



Şekil 4.112. PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs ve FA-PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'in FTIR spektrumlarının karşılaştırılması.

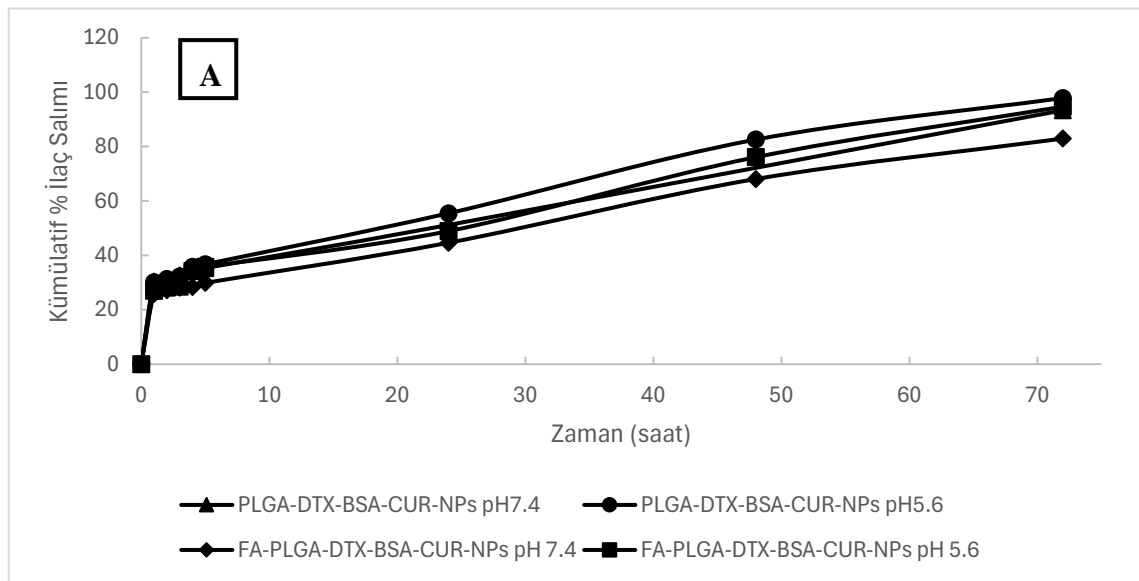
Folik asitin karakteristik pikleri 1176 cm^{-1} , 952 cm^{-1} ve 512 cm^{-1} olarak bilinmektedir [116]. Öte yandan 1607 cm^{-1} ve 1448 cm^{-1} 'deki pikler sırası ile NH_2 eğilme titreşimine ve FA'in fenil halkasına karşılık gelmektedir [117]. Benzer şekilde, saf FA'in FTIR spektrumu, $3100\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ aralığında geniş bir bant göstermiştir. Bu bölge, glutamik asit kısmındaki OH karboksilik grubuna ve pterin halkasının -NH grubu gerilmesine atfedilmiştir. 1760 cm^{-1} 'deki absorpsiyon, C=O karboksilik asit gruplarını temsil etmektedir [151]. Sentezlenen FA-PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'e ait FTIR spektrumu incelendiğinde FA'e ait karakteristik piklerin varlığı gösterilmiş ve konjugasyonun gerçekleştiği doğrulanmıştır. Öte yandan 1652 cm^{-1} 'de sonradan oluşan pik FA'in

karboksilik grubu ve BSA'nın amino grupları arasında amid bağı oluşumu ile ilgili olabilecek karakteristik bir absorpsiyon piki olarak düşünülmektedir.

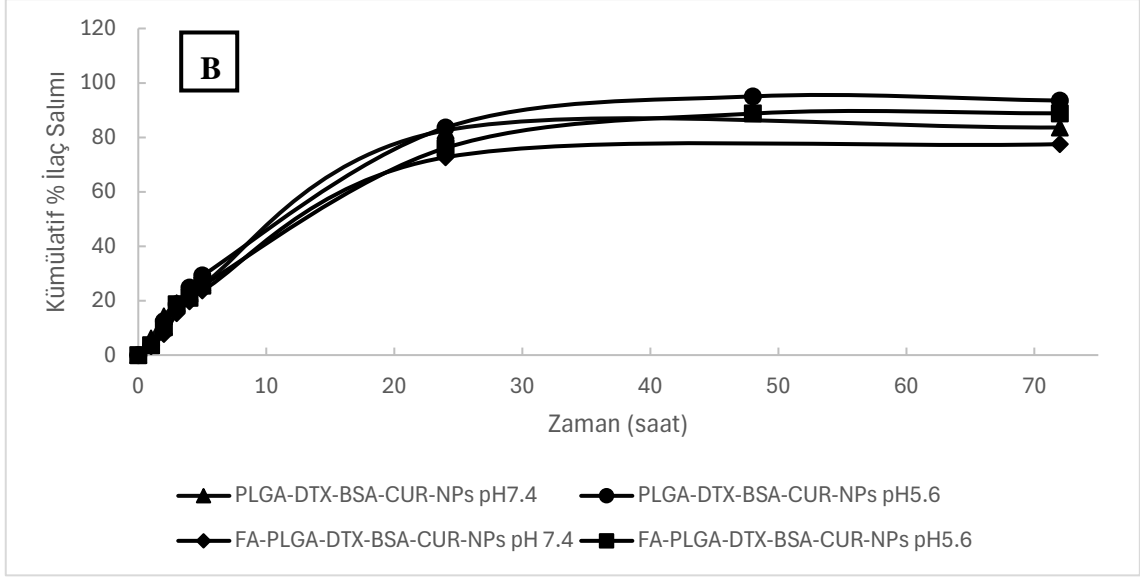


Şekil 4.113. FA-PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'e ait termogravimetrik analiz sonucu.

FA-PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'e ait termogravimetrik analiz sonucu Şekil 4.113'te verilmiştir. FA konjuge edilen formülasyonun ana bozunma olayı 237.30°C-289.68°C sıcaklık aralığında gerçekleşmiş olup %73.58'lik bir kütle kaybı ölçülmüştür. FA-PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'nin toplam ağırlık kaybı (%73.58) PLGA-BSA-NPs'ye (%88.66) göre daha düşük bulunmuştur. Bu farkın FA, DTX ve CUR gibi ek bileşenlerin eklenmesiyle polimer yapısının daha kararlı hale gelmesinden kaynaklandığı söylenebilir.



Şekil 4.114. FA-PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den pH 7.4 ve pH 5.6'da CUR (A) ve DTX (B) salımının PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs ile karşılaştırılması.



Şekil 4.114. (Devam) FA-PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den pH 7.4 ve pH 5.6'da CUR (A) ve DTX (B) salımının PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs ile karşılaştırılması.

FA-PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den her iki pH ortamında da CUR ve DTX salımı incelenmiş ve FA ile konjuge edilmeyen formülasyon ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.114). FA-PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'den pH 7.4'te CUR salımı ilk 5 saat içerisinde yaklaşık %30 olarak ölçülmüştür. Bu değer pH 5.6'da yaklaşık %36 olarak hesaplanmıştır. FA ile konjuge edilmeyen formülasyonda pH 7.4 ve pH 5.6'da bu değerler sırası ile %35.3 ve %36.8 olarak bulunmuştur. FA konjuge edilen formülasyonda pH 7.4'te CUR salımı 72.saatte %82.9 ve DTX salımı ise %77.5 olarak ölçülürken bu değerler FA konjuge edilmeyen formülasyonda sırası ile %93.4 ve %83.6 olarak hesaplanmıştır. Hem pH 5.6 hem de pH 7.4 salım ortamlarında FA'li formülasyon ile hesaplanan ilaç salım değerleri FA ile konjuge edilmeyen formülasyona göre bir miktar daha düşük bulunmuştur, DTX ve CUR salım hızı biraz azalsa da ilaçların sürekli salımını sağlamıştır. Purushothaman ve ark., CUR ilaç salımı için manyetik destekli, folat reseptör hedeflemeli hibrit protein-inorganik taşıyıcıların tasarımı ve kullanımını incelemişlerdir. Kazein ve kalsiyum ferrit nanopartiküller (CFNP) kullanılarak geliştirilen bu sistem, FA ile modifiye edilerek hedefe yönelik ilaç salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Kazein-CFNP-CUR ve Casein-CFNP-CUR-FA sistemlerinde maksimum ilaç salımı %75.8 ve %73.1 olarak, pH 1.2'de gözlemlenmiştir. Nötr pH'da (7.4) ilaç salımı daha düşük bulunmuş, kan dolaşımında stabil kaldığını göstermiştir [125]. Bu tez kapsamında da FA konjugasyonunun, salım hızını azaltmakla beraber ilaçların sürekli salımını sağladığı tespit edilmiştir ve mevcut literatür ile uyumlu bulunmuştur.

5. YORUM

- Nanopresipitasyon metoduna göre hazırlanan BSANPs'in 25mg/ml BSA konsantrasyonunda, 12 saat çapraz bağlama süresinde, pH 10.0'da ve solvent/non-solvent (su/etanol) oranı 1:2 olarak çalışıldığında optimum partikül boyutu elde edilmiştir. Belirlenen bu parametre değerlerinde çalışıldığında optimum BSANP boyutları 157.63 ± 1.42 ve polidispersite indeksi değeri ise 0.114 ± 0.06 olarak ölçülmüştür.
- Optimum koşullarda hazırlanan BSANPs'in SEM görüntüleri çekilmiş ve Zetasizer ölçüm sonuçları ile tutarlı olarak homojen boyut dağılımında ve küresel morfolojide oldukları tespit edilmiştir. BSANPs'e CUR enkapsülasyonu farklı konsantrasyonlarda çalışılmış ve 15mg CUR kullanılarak hazırlanan formülasyonun enkapsülasyon veriminin %90.20 ile literatürde elde edilmiş en yüksek değere çok yaklaştığı görülmüştür. Öte yandan maksimum CUR yükleme kapasitesi %44.22 olarak literatürde elde edilen değerlerden önemli ölçüde yüksek olduğu görülmüştür.
- CUR yüklü ve CUR yüklü olmayan BSANPs'in FTIR, TGA, DSC ve XRD ile karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. FTIR ile CUR'e ait karakteristik piklerin varlığı CUR-BSANPs'de doğrulanmıştır. XRD analizi sonuçlarına göre CUR-BSANP formülasyonu içerisinde CUR'in amorf yapıda olduğu gösterilmiştir.
- En uygun koşullarda elde edilmiş CUR-BSANPs'den CUR'in *in vitro* ortamda salımı 37°C'de asidik tümör mikro çevresini simüle eden pH 5.6 ve fizyolojik kanı simüle eden pH 7.4 PBS tampon ortamlarında incelenmiştir. 0.5, 1 ve 1.5 mg CUR içeren CUR-BSANPs'den kümülatif CUR salım yüzdesi pH 7.4'te 72 saatlik süre sonunda sırasıyla %26.9, %35.1 ve %45.5 olarak bulunmuştur. pH 5.6'da ise 1.0 ve 1.5 mg CUR içeren nanopartiküllerden 144. saate kadar CUR salımı artmış 144-168. saatler arasında sırasıyla %67.3 ve %56.2 sabit bir CUR salım değerine ulaşılmıştır. CUR salımının farklı kinetik modellere uyumu incelenmiş ve fizyolojik kan ve asidik tümör mikro çevresini simüle eden pH 7.4 ve pH 5.6 seviyelerinde tampon çözeltilerdeki CUR salım mekanizmasının Anomalous (non-Fickian) difüzyon ile uyumlu olduğu bulunmuştur.
- Hazırlanan CUR-BSANPs'in yüzeyi sonraki aşamada EDC/NHS çapraz bağlama kimyasına göre FA ile konjuge edilmiştir, karakterizasyon ve CUR salım

çalışmaları gerçekleştirilmiştir. FA ile konjuge edilen formülasyonun CUR salım miktarı konjuge edilmeyen formülasyona göre daha düşük bulunmuştur.

- Bu tez kapsamında özellikle meme kanserine yönelik albümin bazlı, nano boyut aralığında farklı ilaç taşıyıcı formülasyonlar geliştirmek amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda PLGA-BSA çekirdek-kabuk yapısında protein-polimer hibrit nanopartiküller (nanopresipitasyon yöntemi esasına göre sentezlenen) ise ikinci partikül formülasyonu olarak belirlenmiştir. PLGA-BSA çekirdek-kabuk yapısında protein-polimer hibrit nanopartiküllerin haricinde hem polimer hem de proteinin tek başına nanopartikül formülasyonları da hazırlanmıştır. Bu sayede hem polimer-protein hibrit hem de protein nanopartiküllerin boyut, yük, ilaç salımı vb. yönlerden karşılaştırmalarının yapılması mümkün olmuştur.
- PLGANPs nanopresipitasyon metodu kullanılarak sentezlenmiş ve partikül boyutları kritik parametreler olan polimer miktarı, organik faz hacmi ve stabilizer olarak kullanılan PVA'nın konsantrasyonu gibi parametrelere göre optimize edilmiştir. 30mg PLGA, 3 ml organik faz (aseton) ve %1.0 PVA konsantrasyonunda hazırlanan optimum partikül boyutu 128.9 ± 1.33 ve polidispersite indeksi değeri ise 0.178 ± 0.01 olarak bulunmuştur. PLGANPs'in karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildikten sonra DTX enkapsülasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiş ve PLGA-DTX-NPs hazırlanmıştır. Maksimum DTX enkapsülasyon verimi %78.32 ve yükleme kapasitesi %12.90 olarak bulunmuştur. PLGA-DTX-NPs'den DTX salımı farklı pH ortamlarında çalışılmış ve DTX salımının farklı kinetik modellere uyumu araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar literatür ile uyumlu bulunmuştur.
- PLGA-BSA çekirdek-kabuk yapısında protein-polimer hibrit nanopartiküller nanopresipitasyon metodu esasına göre sentezlenmiştir. Bu formülasyonun partikül boyutları 200nm altında tutulmaya çalışılarak pasif hedeflemeye uygun, formülasyonun yüzeyine konjuge edilen albümin tabakası ile de albüminin vücutta bir azot ve enerji kaynağı olması, ikinci bir ilacın enkapsülasyonuna olanak tanınması, tümörlü bölgelerde birikme özelliğinden yararlanılarak aktif hedeflemeye uygun formülasyonlar hazırlanmıştır.
- PLGA-BSA-NPs'in ortalama partikül boyutları 168.5 ± 3.17 ve polidispersite indeksi değerleri 0.213 ± 0.02 olarak bulunmuştur. FTIR ve TGA analizleri, temas açısı (gonyometre) ölçümleri gerçekleştirilerek karakterizasyon çalışmaları

yapılmış ve DTX salımı çalışmaları gerçekleştirilmiştir. PLGANPs'den ve PLGA-BSA-NPs'den gerçekleştirilen DTX salımı sonuçları karşılaştırılmış, BSA kaplamasının DTX salımı üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

- Tez çalışmalarının devamında Poli(laktik-ko-glikolik asit):albümin protein-polimer hibrit nanopartiküllerinde Poli(laktik-ko-glikolik asit)'ten oluşan çekirdek kısmına kemoterapötik bir etkin madde olan DTX enkapsüle edilmiş ve kabuk kısmını oluşturan albümin tabakasına ise kemoduyarlaştırıcı ve kemopreventif özellikte bir etkin madde olan CUR'in enkapsülasyonu sağlanmıştır. 3.0mg DTX ve 3.75mg CUR kullanılarak hazırlanan PLGA-DTX-BSA-CUR-NPs'de DTX enkapsülasyon verimi %82.33 ve yükleme kapasitesi değeri ise %10.21 olarak hesaplanmıştır. Karakterizasyon çalışmaları ile her iki etkin maddenin formülasyondaki varlığı doğrulanmış, enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi değerleri hesaplanmıştır. Sentezlenen bu hibrit nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra, hazırlanan formülasyondan DTX ve CUR'in yani iki etkin maddenin pH 7.4 ve pH 5.6'da ilaç salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Son basamakta ise CUR ve DTX yüklenen PLGA-BSA-NPs'in yüzeyine FA konjuge edilmiştir ve ilaç salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir.
- Meme kanseri tedavisi için yürütülen güncel çalışmalarda özellikle ilaç direncinin üstesinden gelmek, sinerjistik etki yaratarak hücre apoptozunu arttırmak, hücreleri kemoterapiye duyarlı hale getirerek tedavinin etkinliğini arttırmaya yönelik olarak etkin maddelerin bir arada kullanımı ve aynı taşıyıcı sistemlerden salımının önemi belirtilmektedir. Literatür özeti kısmında belirtildiği üzere PLGA ve BSA kullanılarak hazırlanan çekirdek-kabuk yapısında oldukça az çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmalar incelendiğinde PLGA yüzeyine albümin kaplaması (farklı sentez metotları ile) dolaşımında kalma sürelerini uzatma, biyouyumluluğu artırma ve kan beyin bariyerini geçebilme gibi amaçlara yönelik olarak hazırlanmıştır. Bu tez kapsamında ise literatür çalışmalarından farklı olarak PLGA (çekirdek) yüzeyindeki BSA katmanına (kabuk) ikinci bir etkin maddenin enkapsülasyonu araştırılmıştır. Bilindiği kadarı ile PLGA:albümin çekirdek-kabuk nanopartikül formülasyonuna DTX ve CUR ikili etkin maddesinin enkapsülasyonu ve salımının incelenmesine yönelik olarak literatürde yayımlanmış olan bir çalışma bulunmamaktadır. İleriki süreçlerde hibrit kürelerin kabuk kısmına yüklenen etkin maddenin enkapsülasyon verimini arttırmaya

yönelik olarak yapılacak çalışmalar sonrası formülasyon daha da geliştirilerek özellikle hedefe yönelik iki ve daha fazla etkin madde taşıyan nanotaşıyıcıların geliştirilmesi ile ilaç salımı alanlarında fayda sağlayabileceği öngörülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] R. Chaudhari, V. Patel, A. Kumar, Cutting-edge approaches for targeted drug delivery in breast cancer: beyond conventional therapies, *Nanoscale Advances*, 6 (2024) 2270-2286.
- [2] P.Y. Liyanage, S.D. Hettiarachchi, Y. Zhou, A. Ouhtit, E.S. Seven, C.Y. Oztan, E. Celik, R.M. Leblanc, Nanoparticle-mediated targeted drug delivery for breast cancer treatment, *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1871 (2019) 419-433.
- [3] M.J. Mitchell, M.M. Billingsley, R.M. Haley, M.E. Wechsler, N.A. Peppas, R. Langer, Engineering precision nanoparticles for drug delivery, *Nature Reviews Drug Discovery*, 20 (2021) 101-124.
- [4] Z. Chen, R.K. Kankala, L. Long, S. Xie, A. Chen, L. Zou, Current understanding of passive and active targeting nanomedicines to enhance tumor accumulation, *Coordination Chemistry Reviews*, 481 (2023) 215051.
- [5] P.R. Nair, Delivering Combination Chemotherapies and Targeting Oncogenic Pathways via Polymeric Drug Delivery Systems, *Polymers*, 11 (2019) 630.
- [6] Y. Yang, W. Zeng, P. Huang, X. Zeng, L. Mei, Smart materials for drug delivery and cancer therapy, *VIEW*, 2 (2021) 20200042.
- [7] N. Qu, K. Song, Y. Ji, M. Liu, L. Chen, R.J. Lee, L. Teng, Albumin Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems, *Int J Nanomedicine*, 19 (2024) 6945-6980.
- [8] K. Gayathri, M. Bhaskaran, C. Selvam, R. Thilagavathi, Nano formulation approaches for curcumin delivery- a review, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 82 (2023) 104326.
- [9] J. Yakubu, A.V. Pandey, Innovative Delivery Systems for Curcumin: Exploring Nanosized and Conventional Formulations, *Pharmaceutics*, 16 (2024) 637.
- [10] M. Imran, S. Saleem, A. Chaudhuri, J. Ali, S. Baboota, Docetaxel: An update on its molecular mechanisms, therapeutic trajectory and nanotechnology in the treatment of breast, lung and prostate cancer, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 60 (2020) 101959.
- [11] A. Spada, J. Emami, J.A. Tuszynski, A. Lavasanifar, The Uniqueness of Albumin as a Carrier in Nanodrug Delivery, *Molecular Pharmaceutics*, 18 (2021) 1862-1894.
- [12] A.M. Allahverdiyev, E. Parlar, S. Dinparvar, M. Bagirova, E. Abamor, Current aspects in treatment of breast cancer based of nanodrug delivery systems and future prospects, *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 46 (2018) S755-s762.
- [13] A.A. Alexander-Bryant, W.S. Vanden Berg-Foels, X. Wen, Bioengineering strategies for designing targeted cancer therapies, *Adv Cancer Res*, 118 (2013) 1-59.
- [14] A. Sharma, N. Jain, R. Sareen, Nanocarriers for diagnosis and targeting of breast cancer, *Biomed Res Int*, 2013 (2013) 960821.

- [15] P. Yadav, J. Jain, A.P. Sherje, Recent advances in nanocarriers-based drug delivery for cancer therapeutics: A review, *Reactive and Functional Polymers*, 165 (2021) 104970.
- [16] M.H. Zhang, H.T. Man, X.D. Zhao, N. Dong, S.L. Ma, Estrogen receptor-positive breast cancer molecular signatures and therapeutic potentials (Review), *Biomed Rep*, 2 (2014) 41-52.
- [17] D.G. Hicks, S.C. Lester, Hormone Receptors (ER/PR), in: D.G. Hicks, S.C. Lester (Eds.) *Diagnostic Pathology: Breast (Second Edition)*, Elsevier, Philadelphia, (2016), 430-439.
- [18] A. Nicolini, P. Ferrari, M.J. Duffy, Prognostic and predictive biomarkers in breast cancer: Past, present and future, *Semin Cancer Biol*, 52 (2018) 56-73.
- [19] C.A. Purdie, P. Quinlan, L.B. Jordan, A. Ashfield, S. Ogston, J.A. Dewar, A.M. Thompson, Progesterone receptor expression is an independent prognostic variable in early breast cancer: a population-based study, *British Journal of Cancer*, 110 (2014) 565-572.
- [20] L. Brannon-Peppas, J.O. Blanchette, Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56 (2004) 1649-1659.
- [21] E. Pérez-Herrero, A. Fernández-Medarde, Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 93 (2015) 52-79.
- [22] A.A. Alexander-Bryant, W.S. Vanden Berg-Foels, X. Wen, Bioengineering strategies for designing targeted cancer therapies, *Adv Cancer Res*, 118 (2013) 1-59.
- [23] M.E. Davis, Z. Chen, D.M. Shin, Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer, *Nature Reviews Drug Discovery*, 7 (2008) 771-782.
- [24] B.D. Weinberg, E. Blanco, J. Gao, Polymer implants for intratumoral drug delivery and cancer therapy, *J Pharm Sci*, 97 (2008) 1681-1702.
- [25] E.M. Rezler, D.R. Khan, J. Lauer-Fields, M. Cudic, D. Baronas-Lowell, G.B. Fields, Targeted drug delivery utilizing protein-like molecular architecture, *J Am Chem Soc*, 129 (2007) 4961-4972.
- [26] N.K. Jain, U. Gupta, Application of dendrimer-drug complexation in the enhancement of drug solubility and bioavailability, *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 4 (2008) 1035-1052.
- [27] N. Bertrand, J. Wu, X. Xu, N. Kamaly, O.C. Farokhzad, Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology, *Adv Drug Deliv Rev*, 66 (2014) 2-25.
- [28] G.L. Zwicke, G.A. Mansoori, C.J. Jeffery, Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer nanotherapeutics, *Nano Rev*, 3 (2012).

- [29] A. Narmani, M. Rezvani, B. Farhood, P. Darkhor, J. Mohammadnejad, B. Amini, S. Refahi, N. Abdi Goushbolagh, Folic acid functionalized nanoparticles as pharmaceutical carriers in drug delivery systems, *Drug Dev Res*, 80 (2019) 404-424.
- [30] C. Martín-Sabroso, A.I. Torres-Suárez, M. Alonso-González, A. Fernández-Carballido, A.I. Fraguas-Sánchez, Active Targeted Nanoformulations via Folate Receptors: State of the Art and Future Perspectives, *Pharmaceutics*, 14 (2022) 14.
- [31] J.D. Byrne, T. Betancourt, L. Brannon-Peppas, Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60 (2008) 1615-1626.
- [32] N. Bertrand, J. Wu, X. Xu, N. Kamaly, O.C. Farokhzad, Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology, *Adv Drug Deliv Rev*, 66 (2014) 2-25.
- [33] X. Wang, M. Zhang, Y. Li, H. Cong, B. Yu, Y. Shen, Research Status of Dendrimer Micelles in Tumor Therapy for Drug Delivery, *Small*, 19 (2023) 2304006.
- [34] R. Singh, J.W. Lillard, Nanoparticle-based targeted drug delivery, *Experimental and Molecular Pathology*, 86 (2009) 215-223.
- [35] A. Shah, S. Aftab, J. Nisar, M.N. Ashiq, F.J. Iftikhar, Nanocarriers for targeted drug delivery, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 62 (2021) 102426.
- [36] Q. Zhou, L. Zhang, H. Wu, Nanomaterials for Cancer Therapies, *Nanotechnology Reviews*, 6 (2017).
- [37] T. Sun, Y. Zhang, B. Pang, D.C. Hyun, M. Yang, Y. Xia, Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy, *Angewandte Chemie*, 53 46 (2014) 12320-12364.
- [38] D.A. Richards, A. Maruani, V. Chudasama, Antibody fragments as nanoparticle targeting ligands: a step in the right direction, *Chemical Science*, 8 (2017) 63-77.
- [39] K. DeFrates, T. Markiewicz, P. Gallo, A. Rack, A. Weyhmilller, B. Jarmusik, X. Hu, Protein Polymer-Based Nanoparticles: Fabrication and Medical Applications, *International journal of molecular sciences*, 19 (2018).
- [40] R.R. Kudarha, K.K. Sawant, Albumin based versatile multifunctional nanocarriers for cancer therapy: Fabrication, surface modification, multimodal therapeutics and imaging approaches, *Materials Science and Engineering: C*, 81 (2017) 607-626.
- [41] A.O. Elzoghby, W.M. Samy, N.A. Elgindy, Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems, *Journal of Controlled Release*, 157 (2012) 168-182.
- [42] H. Misak, N. Zacharias, Z. Song, S. Hwang, K.P. Man, R. Asmatulu, S.Y. Yang, Skin cancer treatment by albumin/5-Fu loaded magnetic nanocomposite spheres in a mouse model, *J Biotechnol*, 164 (2013) 130-136.

- [43] M. Baneshi, S. Dadfarnia, A.M.H. Shabani, S.K. Sabbagh, S. Haghgoo, H. Bardania, A novel theranostic system of AS1411 aptamer-functionalized albumin nanoparticles loaded on iron oxide and gold nanoparticles for doxorubicin delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 564 (2019) 145-152.
- [44] A. Santos-Rebelo, C. Garcia, C. Eleutério, A. Bastos, S.C. Coelho, M.A.N. Coelho, J. Molpeceres, A.S. Viana, L. Ascensão, J.F. Pinto, M.M. Gaspar, P. Rijo, C.P. Reis, Development of Parvifloron D-loaded Smart Nanoparticles to Target Pancreatic Cancer, *Pharmaceutics*, 10 (2018) 216.
- [45] R.U. Zaman, N.S. Mulla, K. Braz Gomes, C. D'Souza, K.S. Murnane, M.J. D'Souza, Nanoparticle formulations that allow for sustained delivery and brain targeting of the neuropeptide oxytocin, *International Journal of Pharmaceutics*, 548 (2018) 698-706.
- [46] V. Kushwah, S.S. Katiyar, C.P. Dora, A. Kumar Agrawal, D.A. Lamprou, R.C. Gupta, S. Jain, Co-delivery of docetaxel and gemcitabine by anacardic acid modified self-assembled albumin nanoparticles for effective breast cancer management, *Acta Biomaterialia*, 73 (2018) 424-436.
- [47] T. Saleh, T. Soudi, S.A. Shojaosadati, Aptamer functionalized curcumin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles for targeted delivery to HER-2 positive breast cancer cells, *International Journal of Biological Macromolecules*, 130 (2019) 109-116.
- [48] H. Guo, S. Fei, Y. Zhang, Y. Zhang, J. Gou, L. Zhang, H. He, T. Yin, Y. Wang, X. Tang, Teniposide-loaded multilayer modified albumin nanoparticles with increased passive delivery to the lung, *RSC Advances*, 6 (2016) 81110-81119.
- [49] Ö. Akbal, E. Erdal, T. Vural, D. Kavaz, E.B. Denkbaş, Comparison of protein- and polysaccharide-based nanoparticles for cancer therapy: synthesis, characterization, drug release, and interaction with a breast cancer cell line, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45 (2017) 193-203.
- [50] B. Lian, M. Wu, Z. Feng, Y. Deng, C. Zhong, X. Zhao, Folate-conjugated human serum albumin-encapsulated resveratrol nanoparticles: preparation, characterization, bioavailability and targeting of liver tumors, *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 47 (2019) 154-165.
- [51] P. Ghosh, A. Singha Roy, S. Chaudhury, S.K. Jana, K. Chaudhury, S. Dasgupta, Preparation of albumin based nanoparticles for delivery of fisetin and evaluation of its cytotoxic activity, *International Journal of Biological Macromolecules*, 86 (2016) 408-417.
- [52] R. Yang, Y. An, F. Miao, M. Li, P. Liu, Q. Tang, Preparation of folic acid-conjugated, doxorubicin-loaded, magnetic bovine serum albumin nanospheres and their antitumor effects in vitro and in vivo, *Int J Nanomedicine*, 9 (2014) 4231-4243.
- [53] K.A. Gawde, S. Sau, K. Tatiparti, S.K. Kashaw, M. Mehrmohammadi, A.S. Azmi, A.K. Iyer, Paclitaxel and di-fluorinated curcumin loaded in albumin nanoparticles for

targeted synergistic combination therapy of ovarian and cervical cancers, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 167 (2018) 8-19.

[54] A. Santos-Rebelo, C. Garcia, C. Eleuterio, A. Bastos, S.C. Coelho, M.A.N. Coelho, J. Molpeceres, A.S. Viana, L. Ascensao, J.F. Pinto, M.M. Gaspar, P. Rijo, C.P. Reis, Development of Parvifloron D-loaded Smart Nanoparticles to Target Pancreatic Cancer, *Pharmaceutics*, 10 (2018).

[55] S. Chen, Q. Liang, E. Liu, Z. Yu, L. Sun, J. Ye, M.-C. Shin, J. Wang, H. He, Curcumin/sunitinib co-loaded BSA-stabilized SPIOs for synergistic combination therapy for breast cancer, *Journal of Materials Chemistry B*, 5 (2017) 4060-4072.

[56] V. Piazzini, E. Landucci, M. D'Ambrosio, L. Tiozzo Fasiolo, L. Cinci, G. Colombo, D.E. Pellegrini-Giampietro, A.R. Bilia, C. Luceri, M.C. Bergonzi, Chitosan coated human serum albumin nanoparticles: A promising strategy for nose-to-brain drug delivery, *International Journal of Biological Macromolecules*, 129 (2019) 267-280.

[57] B. Lian, M. Wu, Z. Feng, Y. Deng, C. Zhong, X. Zhao, Folate-conjugated human serum albumin-encapsulated resveratrol nanoparticles: preparation, characterization, bioavailability and targeting of liver tumors, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47 (2019) 154-165.

[58] Y.P. Tanjung, M.K. Dewi, V.A. Gatera, M.I. Barliana, I.M. Joni, A.Y. Chaerunisaa, Factors Affecting the Synthesis of Bovine Serum Albumin Nanoparticles Using the Desolvation Method, *Nanotechnol Sci Appl*, 17 (2024) 21-40.

[59] R. Meng, H. Zhu, Z. Wang, S. Hao, B. Wang, Preparation of Drug-Loaded Albumin Nanoparticles and Its Application in Cancer Therapy, *Journal of Nanomaterials*, (2022) 3052175.

[60] L. Ding, P. Agrawal, S.K. Singh, Y.S. Chhonker, J. Sun, D.J. Murry, Polymer-Based Drug Delivery Systems for Cancer Therapeutics, *Polymers*, 16 (2024) 843.

[61] A. Zielińska, F. Carreiró, A.M. Oliveira, A. Neves, B. Pires, D.N. Venkatesh, A. Durazzo, M. Lucarini, P. Eder, A.M. Silva, A. Santini, E.B. Souto, Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology, *Molecules*, 25 (2020) 3731.

[62] H. Bhardwaj, R.K. Jangde, Current updated review on preparation of polymeric nanoparticles for drug delivery and biomedical applications, *Next Nanotechnology*, 2 (2023) 100013.

[63] J. Yang, H. Zeng, Y. Luo, Y. Chen, M. Wang, C. Wu, P. Hu, Recent Applications of PLGA in Drug Delivery Systems, *Polymers*, 16 (2024) 2606.

[64] R. Sun, Y. Chen, Y. Pei, W. Wang, Z. Zhu, Z. Zheng, L. Yang, L. Sun, The drug release of PLGA-based nanoparticles and their application in treatment of gastrointestinal cancers, *Heliyon*, 10 (2024) e38165.

- [65] X. Guo, X. Zuo, Z. Zhou, Y. Gu, H. Zheng, X. Wang, G. Wang, C. Xu, F. Wang, PLGA-Based Micro/Nanoparticles: An Overview of Their Applications in Respiratory Diseases, *Int J Mol Sci*, 24 (2023).
- [66] E. Müderrisoğlu A, T. Çomoğlu, *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 39 (2010) 343-368.
- [67] Y. Wang, P. Li, T. Tran, J. Zhang, L. Kong, Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer, *Nanomaterials*, 6 (2016) 26.
- [68] A.K. Shakya, M. Al-Sulaibi, R.R. Naik, H. Nsairat, S. Suboh, A. Abulaila, Review on PLGA Polymer Based Nanoparticles with Antimicrobial Properties and Their Application in Various Medical Conditions or Infections, *Polymers*, 15 (2023) 3597.
- [69] J.P. Rao, K.E. Geckeler, Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters, *Progress in Polymer Science*, 36 (2011) 887-913.
- [70] S. Acar, K. Kizilbey, Z. Akdeste, *Polymeric Nanoparticles*, *Sigma Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, (2013).
- [71] Q. Sun, Z. Yang, X. Qi, Design and Application of Hybrid Polymer-Protein Systems in Cancer Therapy, *Polymers*, 15 (2023) 2219.
- [72] P. Ghosh, J. Patwari, S. Dasgupta, Complexation With Human Serum Albumin Facilitates Sustained Release of Morin From Polylactic-Co-Glycolic Acid Nanoparticles, *The Journal of Physical Chemistry B*, 121 (2017) 1758-1770.
- [73] P. Kesharwani, A. Jain, A. Jain, A.K. Jain, N.K. Garg, R.K. Tekade, T.R. Raj Singh, A.K. Iyer, Cationic bovine serum albumin (CBA) conjugated poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles for extended delivery of methotrexate into brain tumors, *RSC Advances*, 6 (2016) 89040-89050.
- [74] C.C. Chuang, C.C. Cheng, P.Y. Chen, C. Lo, Y.N. Chen, M.H. Shih, C.W. Chang, Gold nanorod-encapsulated biodegradable polymeric matrix for combined photothermal and chemo-cancer therapy, *Int J Nanomedicine*, 14 (2019) 181-193.
- [75] X. Chen, C. Gao, Influences of surface coating of PLGA nanoparticles on immune activation of macrophages, *Journal of Materials Chemistry B*, 6 (2018) 2065-2077.
- [76] B.L. Tan, M.E. Norhaizan, Curcumin Combination Chemotherapy: The Implication and Efficacy in Cancer, *Molecules*, 24 (2019).
- [77] Z. Liu, P. Huang, S. Law, H. Tian, W. Leung, C. Xu, Preventive Effect of Curcumin Against Chemotherapy-Induced Side-Effects, *Frontiers in Pharmacology*, 9 (2018).
- [78] M.A. Tomeh, R. Hadianamrei, X. Zhao, A Review of Curcumin and Its Derivatives as Anticancer Agents, *Int J Mol Sci*, 20 (2019).

- [79] K. Kaur, A.K. Al-Khazaleh, D.J. Bhuyan, F. Li, C.G. Li, A Review of Recent Curcumin Analogues and Their Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Anticancer Activities, *Antioxidants*, 13 (2024) 1092.
- [80] S.J. Hewlings, D.S. Kalman, Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health, *Foods*, 6 (2017).
- [81] P. Limtrakul, Curcumin as Chemosensitizer, in: B.B. Aggarwal, Y.-J. Surh, S. Shishodia (Eds.) *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease*, Springer US, Boston, MA, (2007), 269-300.
- [82] X. Song, M. Zhang, E. Dai, Y. Luo, Molecular targets of curcumin in breast cancer (Review), *Mol Med Rep*, 19 (2019) 23-29.
- [83] N. Chaurawal, K. Raza, Nano-interventions for the drug delivery of docetaxel to cancer cells, *Health Sciences Review*, 7 (2023) 100101.
- [84] J.P. Desale, R. Swami, V. Kushwah, S.S. Katiyar, S. Jain, Chemosensitizer and docetaxel-loaded albumin nanoparticle: overcoming drug resistance and improving therapeutic efficacy, *Nanomedicine (London, England)*, 13 (2018) 2759-2776.
- [85] R. Thirumaran, G.C. Prendergast, P.B. Gilman, Chapter 7-Cytotoxic Chemotherapy in Clinical Treatment of Cancer, in: G.C. Prendergast, E.M. Jaffee (Eds.) *Cancer Immunotherapy*, Academic Press, Burlington, (2007), 101-116.
- [86] H. Batra, S. Pawar, D. Bahl, Curcumin in combination with anti-cancer drugs: A nanomedicine review, *Pharmacological Research*, 139 (2019) 91-105.
- [87] C. Dian, Z. Qian, M. Ran, X. Yan, L. Dian, Co-Delivery of Docetaxel and Curcumin Functionalized Mixed Micelles for the Treatment of Drug-Resistant Breast Cancer by Oral Administration, *Int J Nanomedicine*, 19 (2024) 8603-8620.
- [88] C.H. Kim, B.D. Kim, T.H. Lee, H.K. Kim, M.J. Lyu, Y.I. Yoon, Y.T. Goo, M.J. Kang, S. Lee, Y.W. Choi, Synergistic co-administration of docetaxel and curcumin to chemoresistant cancer cells using PEGylated and RIPL peptide-conjugated nanostructured lipid carriers, *Cancer Nanotechnology*, 13 (2022) 17.
- [89] M. Bayet-Robert, F. Kwiatowski, M. Leheurteur, F. Gachon, E. Planchat, C. Abrial, M.-A. Mouret-Reynier, X. Durando, C. Barthomeuf, P. Chollet, Phase I dose escalation trial of docetaxel plus curcumin in patients with advanced and metastatic breast cancer, *Cancer Biology & Therapy*, 9 (2010) 8-14.
- [90] Z.E. A. S. Yar Sağlam, H. Kayhan, H. İ. Önen, A. Yılmaz, E. S. Menevşe, The Effects of Sequential Administration of EF24 with Docetaxel Apoptotic Response in Metastatic Breast Cancer Cell Line, *Fırat Tıp Dergisi*, 23 (2018) 58-67.
- [91] M. Askarizadeh, N. Esfandiari, B. Honarvar, S.A. Sajadian, A. Azdarpour, Kinetic Modeling to Explain the Release of Medicine from Drug Delivery Systems, *ChemBioEng Reviews*, 10 (2023) 1006-1049.
- [92] S. Dash, P.N. Murthy, L. Nath, P. Chowdhury, Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems, *Acta Pol Pharm*, 67 (2010) 217-223.

- [93] H. Baishya, Application of Mathematical Models in Drug Release Kinetics of Carbidopa and Levodopa ER Tablets, *Journal of Developing Drugs*, 06 (2017).
- [94] M.P. Paarakh, P.A. Jose, C.M. Setty, G.V. Peterchristoper, Release Kinetics-Concepts and Applications, *International Journal of Pharmacy Research & Technology (IJPR)*, 8 (2023) 12-20.
- [95] K.A. Gawde, P. Kesharwani, S. Sau, F.H. Sarkar, S. Padhye, S.K. Kashaw, A.K. Iyer, Synthesis and characterization of folate decorated albumin bio-conjugate nanoparticles loaded with a synthetic curcumin difluorinated analogue, *J Colloid Interface Sci*, 496 (2017) 290-299.
- [96] E. Türkeş, Y. Sağ Açıkkel, Folic acid-conjugated cancer drug curcumin-loaded albumin nanoparticles: Investigation of curcumin release kinetics, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 91 (2024) 105178.
- [97] C.G. Hiremath, M.Y. Kariduraganavar, M.B. Hiremath, Synergistic delivery of 5-fluorouracil and curcumin using human serum albumin-coated iron oxide nanoparticles by folic acid targeting, *Prog Biomater*, 7 (2018) 297-306.
- [98] J.O. Kotova, N.S. Osipova, J.A. Malinovskaya, P.A. Melnikov, S.E. Gelperina, Properties of core-shell nanoparticles based on PLGA and human serum albumin prepared by different methods, *Mendeleev Communications*, 33 (2023) 676-678.
- [99] M.J. Ramalho, B. Alves, S. Andrade, J. Lima, J.A. Loureiro, M.C. Pereira, Folic-Acid-Conjugated Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles Loaded with Gallic Acid Induce Glioblastoma Cell Death by Reactive-Oxygen-Species-Induced Stress, *Polymers*, 16 (2024) 2161.
- [100] X.P. Chen, Y. Li, Y. Zhang, G.W. Li, Formulation, Characterization And Evaluation Of Curcumin-Loaded PLGA-TPGS Nanoparticles For Liver Cancer Treatment, *Drug Des Devel Ther*, 13 (2019) 3569-3578.
- [101] J. Li, Y. Jiang, J. Wen, G. Fan, Y. Wu, C. Zhang, A rapid and simple HPLC method for the determination of curcumin in rat plasma: assay development, validation and application to a pharmacokinetic study of curcumin liposome, *Biomed Chromatogr*, 23 (2009) 1201-1207.
- [102] B. Fonseca-Santos, M.P.D. Gremião, M. Chorilli, A simple reversed phase high-performance liquid chromatography (HPLC) method for determination of in situ gelling curcumin-loaded liquid crystals in in vitro performance tests, *Arabian Journal of Chemistry*, 10 (2017) 1029-1037.
- [103] L.E.A. Camargo, D. Brustolin Ludwig, T.T. Tominaga, B. Carletto, G.M. Favero, R.M. Mainardes, N.M. Khalil, Bovine serum albumin nanoparticles improve the antitumour activity of curcumin in a murine melanoma model, *J Microencapsul*, 35 (2018) 467-474.
- [104] Z. Song, Y. Lu, X. Zhang, H. Wang, J. Han, C. Dong, Novel curcumin-loaded human serum albumin nanoparticles surface functionalized with folate: characterization and in vitro/vivo evaluation, *Drug Des Devel Ther*, 10 (2016) 2643-2649.

- [105] M.R. Peram, S.S. Jalalpure, S.A. Joshi, M.B. Palkar, P.V. Diwan, Single robust RP-HPLC analytical method for quantification of curcuminoids in commercial turmeric products, Ayurvedic medicines, and nanovesicular systems, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 40 (2017) 487-498.
- [106] N. Nateghian, N. Goodarzi, M. Amini, F. Atyabi, M.R. Khorramizadeh, R. Dinarvand, Biotin/Folate-decorated Human Serum Albumin Nanoparticles of Docetaxel: Comparison of Chemically Conjugated Nanostructures and Physically Loaded Nanoparticles for Targeting of Breast Cancer, *Chem Biol Drug Des*, 87 (2016) 69-82.
- [107] G. Jin, M. Jin, X. Yin, Z. Jin, L. Chen, Z. Gao, A comparative study on the effect of docetaxel-albumin nanoparticles and docetaxel-loaded PEG-albumin nanoparticles against non-small cell lung cancer, *Int J Oncol*, 47 (2015) 1945-1953.
- [108] H. Niknejad, R. Mahmoudzadeh, Comparison of Different Crosslinking Methods for Preparation of Docetaxel-loaded Albumin Nanoparticles, *Iran J Pharm Res*, 14 (2015) 385-394.
- [109] W. Shi, Z.J. Zhang, Y. Yuan, E.M. Xing, Y. Qin, Z.J. Peng, Z.P. Zhang, K.Y. Yang, Optimization of parameters for preparation of docetaxel-loaded PLGA nanoparticles by nanoprecipitation method, *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 33 (2013) 754-758.
- [110] S. Jiang, X. Gong, X. Zhao, Y. Zu, Preparation, characterization, and antitumor activities of folate-decorated docetaxel-loaded human serum albumin nanoparticles, *Drug Deliv*, 22 (2015) 206-213.
- [111] B. Storp, A. Engel, A. Boeker, M. Ploeger, K. Langer, Albumin nanoparticles with predictable size by desolvation procedure, *J Microencapsul*, 29 (2012) 138-146.
- [112] H. Abolhassani, S.A. Shojaosadati, A comparative and systematic approach to desolvation and self-assembly methods for synthesis of piperine-loaded human serum albumin nanoparticles, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 184 (2019) 110534.
- [113] E.S. Bronze-Uhle, B.C. Costa, V.F. Ximenes, P.N. Lisboa-Filho, Synthetic nanoparticles of bovine serum albumin with entrapped salicylic acid, *Nanotechnol Sci Appl*, 10 (2017) 11-21.
- [114] X.-L. Hsu, L.-C. Wu, J.-Y. Hsieh, Y.-Y. Huang, Nanoparticle-Hydrogel Composite Drug Delivery System for Potential Ocular Applications, *Polymers*, 13 (2021) 642.
- [115] M. Salehiabar, H. Nosrati, E. Javani, F. Aliakbarzadeh, H. Kheiri Manjili, S. Davaran, H. Danafar, Production of biological nanoparticles from bovine serum albumin as controlled release carrier for curcumin delivery, *Int J Biol Macromol*, 115 (2018) 83-89.
- [116] N. Ahmadi Nasab, H. Hassani Kumleh, M. Beygzadeh, S. Teimourian, M. Kazemzad, Delivery of curcumin by a pH-responsive chitosan mesoporous silica nanoparticles for cancer treatment, *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 46 (2018) 75-81.

- [117] T. Keskin, S. Yalcin, U. Gunduz, Folic acid functionalized PEG coated magnetic nanoparticles for targeting anti-cancer drug delivery: Preparation, characterization and cytotoxicity on Doxorubicin, Zoledronic acid and Paclitaxel resistant MCF-7 breast cancer cell lines, *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*, 48 (2018) 150-159.
- [118] S. Wijayawardana, C. Thambiliyagodage, M. Jayanetti, Kinetic study of in vitro release of curcumin from chitosan biopolymer and the evaluation of biological efficacy, *Arabian Journal of Chemistry*, 17 (2024) 105896.
- [119] P. Yadav, A.B. Yadav, Preparation and characterization of BSA as a model protein loaded chitosan nanoparticles for the development of protein-/peptide-based drug delivery system, *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7 (2021) 200.
- [120] J.-j. Fu, C. Sun, Z.-f. Tan, G.-y. Zhang, G.-b. Chen, L. Song, Nanocomplexes of curcumin and glycated bovine serum albumin: The formation mechanism and effect of glycation on their physicochemical properties, *Food Chemistry*, 368 (2022) 130651.
- [121] R. Luo, M. Lin, C. Zhang, J. Shi, S. Zhang, Q. Chen, Y. Hu, M. Zhang, J. Zhang, F. Gao, Genipin-crosslinked human serum albumin coating using a tannic acid layer for enhanced oral administration of curcumin in the treatment of ulcerative colitis, *Food Chemistry*, 330 (2020) 127241.
- [122] J. Li, T. Chen, F. Deng, J. Wan, Y. Tang, P. Yuan, L. Zhang, Synthesis, characterization, and in vitro evaluation of curcumin-loaded albumin nanoparticles surface-functionalized with glycyrrhetic acid, *Int J Nanomedicine*, 10 (2015) 5475-5487.
- [123] R. Thadapakally, A. Aafreen, J. Aukunuru, M. Habibuddin, S. Jogala, Preparation and Characterization of PEG-albumin-curcumin Nanoparticles Intended to Treat Breast Cancer, *Indian J Pharm Sci*, 78 (2016) 65-72.
- [124] W. Qu, B. Meng, Y. Yu, S. Wang, Folic acid-conjugated mesoporous silica nanoparticles for enhanced therapeutic efficacy of topotecan in retina cancers, *Int J Nanomedicine*, 13 (2018) 4379-4389.
- [125] B. K. Purushothaman, M. Harsha S, P.U. Maheswari, K.M.M. Sheriffa Begum, Magnetic assisted curcumin drug delivery using folate receptor targeted hybrid casein-calcium ferrite nanocarrier, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 52 (2019) 509-520.
- [126] H. Nosrati, N. Sefidi, A. Sharafi, H. Danafar, H. Kheiri Manjili, Bovine Serum Albumin (BSA) coated iron oxide magnetic nanoparticles as biocompatible carriers for curcumin-anticancer drug, *Bioorg Chem*, 76 (2018) 501-509.
- [127] M.P. Paarakh, P.A. Jose, C.M. Setty, G.V.P. Christoper, Release Kinetics-Concepts and Applications, *International Journal of Pharmacy Research & Technology*, (2019).
- [128] P. R.S, K. Bomb, R. Srivastava, R. Bandyopadhyaya, Dual drug delivery of curcumin and niclosamide using PLGA nanoparticles for improved therapeutic effect on breast cancer cells, *Journal of Polymer Research*, 27 (2020) 133.

- [129] G. Singh, K. Tanurajvir, K. Ravinder, A. Kaur, Recent biomedical applications and patents on biodegradable polymer-PLGA, *International Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences*, 1 (2014) 30-42.
- [130] Y. Wang, P. Li, L. Kong, Chitosan-Modified PLGA Nanoparticles with Versatile Surface for Improved Drug Delivery, *AAPS PharmSciTech*, 14 (2013) 585-592.
- [131] A. Mathew, T. Fukuda, Y. Nagaoka, T. Hasumura, H. Morimoto, Y. Yoshida, T. Maekawa, K. Venugopal, S. Kumar, Curcumin Loaded-PLGA Nanoparticles Conjugated with Tet-1 Peptide for Potential Use in Alzheimer's Disease, *PloS one*, 7 (2012) e32616.
- [132] Y. Shi, J. xue, L. Jia, Q. Du, J. Niu, D. Zhang, Surface-modified PLGA nanoparticles with chitosan for oral delivery of tolbutamide, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 161 (2018) 67-72.
- [133] M. Xu, Z. Liao, Y. Liu, S. Guo, H. Hu, T. Chen, Y. Wu, S. Wan, M. Zhou, M. Lu, S. Jiluo, L. Yao, X. Pu, S. Wang, Q. Fan, Preparation and optimization of poly (lactic-co-glycolic acid) rod-shaped particles in nano size range for paclitaxel delivery, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10 (2022).
- [134] M. Noori Koopaei, M.R. Khoshayand, S.H. Mostafavi, M. Amini, M.R. Khorramzadeh, M. Jeddi Tehrani, F. Atyabi, R. Dinarvand, Docetaxel Loaded PEG-PLGA Nanoparticles: Optimized Drug Loading, In-vitro Cytotoxicity and In-vivo Antitumor Effect, *Iran J Pharm Res*, 13 (2014) 819-833.
- [135] P. Tran, T.N. Nguyen, Y. Lee, P.N. Tran, J.S. Park, Docetaxel-loaded PLGA nanoparticles to increase pharmacological sensitivity in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells, *Korean J Physiol Pharmacol*, 25 (2021) 479-488.
- [136] J. Gao, J. Liu, F. Xie, Y. Lu, C. Yin, X. Shen, Co-Delivery of Docetaxel and Salinomycin to Target Both Breast Cancer Cells and Stem Cells by PLGA/TPGS Nanoparticles, *Int J Nanomedicine*, 14 (2019) 9199-9216.
- [137] N. Mody, R.K. Sharma, S.P. Vyas, Assessment of release kinetics of Docetaxel loaded PLGA nanoparticles, *Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology*, (2019).
- [138] S. Ünal, O. Doğan, Y. Aktaş, Orally administered docetaxel-loaded chitosan-decorated cationic PLGA nanoparticles for intestinal tumors: formulation, comprehensive in vitro characterization, and release kinetics, *Beilstein J Nanotechnol*, 13 (2022) 1393-1407.
- [139] P. Jiang, D. Yu, W. Zhang, Z. Mao, C. Gao, Influence of bovine serum albumin coated poly(lactic-co-glycolic acid) particles on differentiation of mesenchymal stem cells, *RSC Advances*, 5 (2015) 40924-40931.
- [140] Q. Peng, S. Zhang, Q. Yang, T. Zhang, X.Q. Wei, L. Jiang, C.L. Zhang, Q.M. Chen, Z.R. Zhang, Y.F. Lin, Preformed albumin corona, a protective coating for nanoparticles based drug delivery system, *Biomaterials*, 34 (2013) 8521-8530.

- [141] L. Palanikumar, S. Al-Hosani, M. Kalmouni, V.P. Nguyen, L. Ali, R. Pasricha, F.N. Barrera, M. Magzoub, pH-responsive high stability polymeric nanoparticles for targeted delivery of anticancer therapeutics, *Communications Biology*, 3 (2020) 95.
- [142] S. Thambiraj, R. Vijayalakshmi, D. Ravi Shankaran, An effective strategy for development of docetaxel encapsulated gold nanoformulations for treatment of prostate cancer, *Sci Rep*, 11 (2021) 2808.
- [143] M.F. Seifu, L.K. Nath, D. Dutta, Hyaluronic Acid-Docetaxel Conjugate Loaded Nanoliposomes for Targeting Tumor Cells, *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 12 (2020) 88-99.
- [144] S.S.B. Rizvi, N. Akhtar, M.U. Minhas, A. Mahmood, K.U. Khan, Synthesis and Characterization of Carboxymethyl Chitosan Nanosponges with Cyclodextrin Blends for Drug Solubility Improvement, *Gels*, 8 (2022) 55.
- [145] N. Varga, V. Hornok, L. Janovák, I. Dékány, E. Csapó, The effect of synthesis conditions and tunable hydrophilicity on the drug encapsulation capability of PLA and PLGA nanoparticles, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 176 (2019) 212-218.
- [146] K.-Y. Law, Definitions for Hydrophilicity, Hydrophobicity, and Superhydrophobicity: Getting the Basics Right, *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 5 (2014) 686-688.
- [147] L. Mei, Y. Zhang, Y. Zheng, G. Tian, C. Song, D. Yang, H. Chen, H. Sun, Y. Tian, K. Liu, Z. Li, L. Huang, A Novel Docetaxel-Loaded Poly (ε-Caprolactone)/Pluronic F68 Nanoparticle Overcoming Multidrug Resistance for Breast Cancer Treatment, *Nanoscale research letters*, 4 (2009) 1530-1539.
- [148] L. Prasanna, T. Chandran, Prathap, N. Shastri, S. Rizvi, M. D'Souza, Development and evaluation of polycaprolactone based docetaxel nanoparticle formulation for targeted breast cancer therapy, *Journal of Nanoparticle Research*, 22 (2020).
- [149] R. Mauludin, D. Mudhakar, S. Soewandhi, A. Ainurofiq, The effect of compression on solid-state properties of desloratadine and multicomponent crystal, *Journal of Research in Pharmacy*, 22 (2018) 240-247.
- [150] I. Youm, J.D. Bazzil, J.W. Otto, A.N. Caruso, J.B. Murowchick, B.B. Youan, Influence of surface chemistry on cytotoxicity and cellular uptake of nanocapsules in breast cancer and phagocytic cells, *Aaps j*, 16 (2014) 550-567.
- [151] S. Ullah, A.K. Azad, A. Nawaz, K.U. Shah, M. Iqbal, G.M. Albadrani, F.A. Al-Joufi, A.A. Sayed, M.M. Abdel-Daim, 5-Fluorouracil-Loaded Folic-Acid-Fabricated Chitosan Nanoparticles for Site-Targeted Drug Delivery Cargo, *Polymers (Basel)*, 14 (2022).