

**MALİGN GLİOMLARIN TEDAVİSİ İÇİN LİPİT İLE
İŞLEVSELLEŞTİRİLMİŞ PLGA NANOPARTİKÜLLERİNİN
TASARIMI, İN VİTRO VE İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ**

**DESIGN, IN VITRO AND IN VIVO EVALUATION OF LIPID-
FUNCTIONALIZED PLGA NANOPARTICLES FOR THE
TREATMENT OF MALIGNANT GLIOMAS**

ABBAS KAFFASHI

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

NANOTEKNOLOJİ ve NANOTİP Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2013

Malign Gliomların Tedavisi İçin Lipit ile İşlevselleştirilmiş PLGA Nanopartiküllerinin Tasarımı, İn Vitro ve İn Vivo Değerlendirilmesi

Abbas Kaffashi

ÖZET

Malign gliomların tedavisinde en önemli sınırlayıcı faktör kemoterapötik ilaçların istenmeyen yan etki oluşturmaksızın terapötik konsantrasyonlarda tümöre taşınmasıdır. Diğer bir sınırlayıcı faktör de pek çok antineoplastik ilacın beyne ulaşmasını engelleyen Kan Beyin Engeli (KBE)' dir. Bu zorlukların aşılmasında uygulanan yaklaşımlardan biri lipit-poli(etilenglikol) (PEG) veya katyonik lipit-PEG sistemleri ile hibrit nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasıdır. Bu çalışmada yeni nesil antineoplastik bir ilaç olan farnesil tiyosalisilik asit (FTS) içeren Poli(laktik-ko-glikolik asit)-1,2-distearol-sn- glisero-3- fosfoetanolamin-N-[metoksi(poli(etilenglikol))-2000] (amonyum tuzu) kopolimeri (PLGA-DSPE-PEG), PLGA-DSPE-PEG-(1,2-dioleil-3-trimetilamonyum-propan) (DOTAP) hibrit nanopartikülleri hazırlanmış ve in vitro karakterizasyon (partikül büyüklüğü, yüzey özellikleri, ilaç yükleme ve in vitro salım çalışmaları) çalışmaları ve hücre kültürü çalışmalarının ardından beyin tümörü oluşturulmuş sıçanlarda in vivo çalışmalar yapılmıştır. Taramalı Elektron Mikroskopisi ile gerçekleştirilen morfolojik değerlendirme sonucunda tüm formülasyonlarda, FTS yüklü nanopartiküllerin küresel şekle ve pürüzsüz bir yüzeye sahip olduğu belirlenmiştir. Formülasyonlara DOTAP ilavesinin formülasyonların in vitro karakteristiklerini değiştirdiği tespit edilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında, FTS'in ve hazırlanan formülasyonların RG2 gliom hücreleri üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. İn vivo çalışmalarda sıçanlara intravenöz ve intratümöral yol ile formülasyonların uygulamasından sonra intratümöral yoldan formülasyon uygulanmasının intravenöz yola göre daha yüksek oranda tümörü küçülttüğü bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Malign gliom, hibrit nanopartiküller, farnesil tiyosalisilik asit, RG2 hücre dizisi, in vivo çalışma

Destekleyen Kurumlar: TÜBİTAK (SBAG 112S017)

Design, In Vitro and In Vivo Evaluation of Lipid-Functionalized PLGA Nanoparticles for the Treatment of Malignant Gliomas

Abbas Kaffashi

ABSTRACT

A significant limiting factor in treating malignant glioma is the inability to deliver therapeutic concentrations of chemotherapeutic drugs to the tumor without incurring unacceptable systemic side effects. Another limiting factor is the Blood Brain Barrier (BBB) which hinders reaching of antineoplastic drugs to the brain. One of the approaches to overcome these difficulties is the preparation of nanoparticles using polyethylene glycol (PEG) or cationic lipid-PEG combination. In the present study, a new generation antineoplastic drug, farnesyl thiosalicylic acid (FTS) loaded Poly(Lactic-co-glycolic acid)-1,2– distearoyl- glycerol-3 phospho-ethanolamine-N [methoxy (polyethylene glycol) - 2000] ammonium salt (DSPE-PEG), PLGA-DSPE-PEG-(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane) (DOTAP) have been prepared and evaluated for in vitro characterization study (particle size, morphology, drug loading and in vitro drug release). Furthermore, cell culture studies and in vivo studies on glioma bearing rats have been done. Scanning Electron Microscopy studies showed that all formulations prepared had smooth surface and spherically shape. It has been found that the addition of DOTAP to the formulations changed the in vitro characteristics of the formulations. Cell culture studies have showed that FTS and FTS loaded nanoparticle formulations are active against RG2 glioma cell lines. The in vivo results have showed that the intratumorally administered formulations more reduced to the tumor in compared to intravenously administered formulations.

Key words: Malign glioma, hybrid nanoparticles, farnesyl thiosalicylic acid, RG2 cell lines, in vivo studies

This study supported by a grant (112S017) from TÜBİTAK

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| ÖZET | ii |
| ABSTRACT | iii |
| İÇİNDEKİLER | iv |
| SİMGELER VE KISATMALAR DİZİNİ | x |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | xv |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Nanoteknolojinin Tanımı ve Uygulama Alanları | 3 |
| 2.2. İlaç Taşınmasında Nanoteknoloji | 4 |
| 2.3. İlaç Hedeflendirilmesinde Nanoteknoloji | 7 |
| 2.3.1. Tümöre Hedeflendirmede Nanoteknoloji | 11 |
| 2.4. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler | 12 |
| 2.4.1. Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler | 15 |
| 2.4.1.1. Biyoparçalanmayan Polimerler | 18 |
| 2.4.1.2. Biyoparçalanır Polimerler | 18 |
| 2.4.2. Nanopartiküllerin Hazırlama Yöntemleri | 21 |
| 2.4.2.1. Emülsifikasyon/çözücü difüzyon metodu | 22 |
| 2.4.2.2. Emülsifikasyon/ çözücü buharlaştırma metodu | 22 |
| 2.4.2.3. Nanoçöktürme metodu | 24 |
| 2.4.2.4. Polimerizasyon Metodu | 24 |
| 2.5. Beyin Tümörü | 25 |
| 2.5.1. Beyin Tümörlerinin Sınıflandırılması | 25 |
| 2.5.2. Tedavi Yaklaşımları | 26 |
| 2.5.2.1. Cerrahi | 26 |
| 2.5.2.2. Radyasyon Terapisi | 26 |
| 2.5.2.2.1. Partikül Işın Tedavisi | 27 |

| | | |
|--------------|--|----|
| 2.5.2.2.2. | Dokuarası (Interstitial) Radyasyon Uygulaması ve Hipertermi | 27 |
| 2.5.2.2.3. | Radyosensitizerler | 28 |
| 2.5.2.3. | İmmünoterapi | 28 |
| 2.5.2.3.1. | Biyolojik Cevabı Değiştiriciler (BCD) | 28 |
| 2.5.2.4. | Fototerapi | 29 |
| 2.5.2.4.1. | Fotodinamik Terapi | 29 |
| 2.5.2.5. | Gen Terapisi | 29 |
| 2.5.2.6. | Kemoterapi | 30 |
| 2.5.2.6.1. | İlaç Uygulama Bölgeleri | 30 |
| 2.5.2.6.1.1. | İntravenöz (i.v.) uygulama | 30 |
| 2.5.2.6.1.2. | İnatümöral uygulama | 30 |
| 2.5.2.6.1.3. | İntrakarotid (intra-arterial) uygulama | 31 |
| 2.6. | Kan Beyin Engeli (KBE) | 31 |
| 2.6.1. | KBE' ni Aşmak İçin Uygulanan Stratejiler | 34 |
| 2.6.1.1. | İlaç Modifikasyonu | 34 |
| 2.6.1.2. | KBE' de Geri Dönüşümlü Açıklık Oluşturma | 35 |
| 2.6.1.2.1. | Ozmotik Yaklaşım | 35 |
| 2.6.1.2.2. | Biyokimyasal Yaklaşım | 35 |
| 2.6.1.2.3. | Polimerik İlaç Taşıyıcı Sistemlerin İmplantasyonu | 35 |
| 2.6.1.3. | Nanopartiküllerin Beyin Tümöründe Uygulanmaları | 35 |
| 2.6.1.3.1. | İntravenöz Uygulama | 36 |
| 2.6.1.3.2. | Nanopartiküllerin sürfaktan ile kaplanması | 36 |
| 2.6.1.3.3. | Nanopartiküllerin Poli(etilen glikol) (PEG) ile konjugasyonu veya kaplanması | 37 |
| 2.6.1.3.4. | Nanopartiküllerin Lipid/Lipid-PEG ile konjugasyonu veya Kaplanması | 38 |
| 2.6.1.3.5. | Nanopartiküllere Katyonik Yük Kazandırılması | 39 |
| 2.6.1.3.6. | Nanopartiküllerin Beyin Tümörüne Spesifik Hedeflendirilme Ajanları ile Konjugasyonu/Kaplanması | 39 |
| 2.6.1.3.7. | İnatümöral Uygulama | 40 |
| 2.7. | Hücre Kültürü Çalışmalar | 42 |

| | | |
|--------------|---|----|
| 2.7.1. | Hücre Kültürünün Kullanım Alanları | 43 |
| 2.7.2. | Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi | 44 |
| 2.8. | Farnesil tiyosalisilik asit (Salirasib) | 45 |
| 2.9. | Poli(Etilen Glikol)-Lipid Konjugatları | 46 |
| 2.10. | DOTAP | 47 |
| 3. | DENEYSEL ÇALIŞMALAR | 48 |
| 3.1. | Araç ve Gerçeler | 48 |
| 3.1.1. | Kullanılan Kimyasal Maddeler | 48 |
| 3.1.2. | Kullanılan Aletler | 50 |
| 3.2. | Yöntem | 52 |
| 3.2.1. | FTS'in Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar | 52 |
| 3.2.1.1. | UV Spektrumu | 52 |
| 3.2.1.2. | FT-IR Spektrumu | 52 |
| 3.2.1.3. | Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi | 52 |
| 3.2.2. | Farnesil Tiyosalisilik Asit' in (FTS) HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) ile Miktar Tayini Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu | 52 |
| 3.2.2.1. | Kalibrasyon Doğrusu | 53 |
| 3.2.2.2. | Analitik Yöntem Validasyonu | 53 |
| 3.2.2.2.1. | Doğrusallık ("Linearity") | 54 |
| 3.2.2.2.2. | Doğruluk ("Accuracy") | 54 |
| 3.2.2.2.3. | Keskinlik ("Precision") | 55 |
| 3.2.2.2.3.1. | Tekrarlanabilirlik ("Repeatability") | 55 |
| 3.2.2.2.3.2. | Tekrar Elde Edilebilirlik ("Reproducibility") | 56 |
| 3.2.2.2.4. | Duyarlılık (Sensitivity) | 56 |
| 3.2.2.2.4.1 | Saptama Sınırı ("Limit of Detection") | 56 |
| 3.2.2.2.4.2 | Miktar Tayin Sınırı ("Limit of Quantitation") | 56 |
| 3.2.2.2.5. | Özgünlük ("Specificity") | 56 |
| 3.2.2.2.6. | Stabilite | 57 |
| 3.2.3. | FTS Çözünürlük Çalışmaları | 57 |
| 3.2.4. | Nanopartikül Formülasyon Çalışmaları | 58 |
| 3.2.4.1. | Hibrit Nanopartiküllerin Hazırlanması | 58 |

| | | |
|------------|--|----|
| 3.2.4.2. | DOTAP İçeren Hibrit Nanopartiküllerin Hazırlanması | 59 |
| 3.2.5. | Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonları Üzerinde Karakterizasyon Çalışmaları | 61 |
| 3.2.5.1. | Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli Analizi | 61 |
| 3.2.5.2. | Nanopartiküllere FTS Yükleme Etkinliğinin Değerlendirmesi | 61 |
| 3.2.5.3. | Nanopartiküllerin Yüzey Özelliklerinin Tayini | 62 |
| 3.2.5.4. | İn vitro salım çalışmaları | 62 |
| 3.2.6. | Hücre Kültürü Çalışmaları | 63 |
| 3.2.6.1. | FTS' nin İn Vitro Biyoaktivitesinin Hücre Kültüründe Değerlendirilmesi | 63 |
| 3.2.6.1.1. | FTS' in Letal Doz 50 (LD50) Değerinin Belirlenmesi | 64 |
| 3.2.6.1.2. | Nanopartikül Formülasyonlarının İn Vitro Biyoaktivitelerinin Değerlendirilmesi | 65 |
| 3.2.6.2. | Hücre Alımının Değerlendirilmesi | 66 |
| 3.2.7. | İn Vivo Çalışmalar | 66 |
| 3.2.7.1. | İn Vivo Çalışmalarda Kullanılan Hayvanlar ve Anestezi | 66 |
| 3.2.7.2. | Sıçanlarda Beyin Tümörü Oluşturulması | 66 |
| 3.2.7.3. | Magnetik Rezonans Görüntüleme. | 68 |
| 3.2.7.4. | Sıçanlara Tedavi Gruplarının Uygulanması | 70 |
| 3.2.7.5. | Sıçanlarda Tedavi Sonrası Yapılan Değerlendirmeler | 71 |
| 3.2.7.5.1. | MR Görüntüleme ile Tümör Büyüklüğünün Tespiti | 71 |
| 3.2.7.5.2. | Histolojik Değerlendirme | 72 |
| 4. | BULGULAR | 73 |
| 4.1. | UV Spektrumu | 73 |
| 4.2. | Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektrumu | 74 |
| 4.3. | Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizi | 76 |
| 4.4. | FTS' in Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini ve Validasyonu | 77 |
| 4.4.1. | Özgünlük | 77 |
| 4.4.2. | Doğrusallık | 79 |
| 4.4.3. | Keskinlik | 79 |
| 4.4.3.1. | Tekrar Edilebilirlik | 80 |
| 4.4.3.2. | Tekrar Elde Edilebilirlik | 80 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 4.4.4. | Doğruluk | 81 |
| 4.4.5. | Stabilite | 81 |
| 4.4.6. | Saptama ve Miktar Tayini Sınırı | 81 |
| 4.5. | FTS' in Çözünürlük Çalışması | 82 |
| 4.5.1. | FTS' in Çözünürlük Çalışmasında Kullanılan Ortamlardaki Kimyasal Stabilitesi | 84 |
| 4.6. | Hazırlanan Hibrit Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonları | 84 |
| 4.6.1. | Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Değerleri | 84 |
| 4.6.2. | Nanopartiküllere Yüklenen FTS miktarı | 87 |
| 4.6.3. | Formülasyonların Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi | 88 |
| 4.7. | İn Vitro Salım Çalışmaları | 93 |
| 4.8. | FTS' in İn Vitro Biyoaktivitesinin Hücre Kültüründe Değerlendirilmesi | 93 |
| 4.9. | Hücre Alımın Değerlendirmesi | 96 |
| 4.10. | İn Vivo Deneyler | 98 |
| 4.10.1. | Sıçanlarda Beyin Tümörü Oluşturulması ve Magnetik Rezonans (MR) Görüntüleme | 98 |
| 4.10.2. | Sıçanlara Tedavi Gruplarının Uygulanması ve Tedavi Sonrası Yapılan Değerlendirmeler | 98 |
| 4.10.3. | Histolojik Değerlendirme | 107 |
| 5. | TARTIŞMA | 110 |
| 5.1. | Etkin Madde Üzerinde Yapılan Çalışmalar | 112 |
| 5.1.1. | Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özelliklerinin Saptanması | 112 |
| 5.1.2. | Analitik Yöntem Validasyonu | 112 |
| 5.1.3. | FTS'in Çözünürlük Çalışması | 114 |
| 5.2. | Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması | 114 |
| 5.3. | Hazırlanan Mikrokürelerin Karakterizasyonu | 116 |
| 5.3.1. | Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel | 116 |
| 5.3.2. | Nanopartiküllere Yüklenen FTS Miktarı | 118 |
| 5.3.3. | Yüzey Özellikleri | 119 |
| 5.3.4. | İn Vitro Salım Bulgularının İrdelenmesi | 119 |
| 5.4. | Hücre Kültürü Çalışmaları | 120 |

| | | |
|------|--------------------------|-----|
| 5.5. | İn Vivo Çalışmalar | 122 |
| 6. | SONUÇ ve ÖNERİLER | 126 |
| | KAYNAKLAR | 127 |
| | EKLER | 156 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|----------|--|
| AFM | Atomik Kuvvet Mikroskobu |
| DMF | Dimetil formamid |
| DMSO | Dimetil sülfoksit |
| DOTAP | 1,2-dioleoyil-3-trimetilamonyum-propan |
| DSC | Diferansiyel Taramalı Kalorimetre |
| DSPE-PEG | 1,2–distearol-sn- glisero-3- fosfoetanolamin-N- [metoksi(polietilenglikol)-2000] (amonyum tuzu) |
| ELISA | “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” |
| EDTA | Etilen Diamin Tetra Asetik asit |
| FDA | Amerikan İlaç ve Gıda Kurumu |
| FSS | Fetal sığır serumuna |
| FT-IR | Fourier Dönüşümü Kızıl Ötesi |
| FTS | Farnesil tiyosalisilik asit |
| HNP | Hibrit nanopartikül |
| HPLC | Yüksek basınç sıvı kromatografisi |
| i.v. | İntravenöz |
| i.p. | İntraperitonal |
| i.t. | İntratümöral |
| KBE | Kan beyin engeli |
| MTT | Metil-tiyazol-tetrazolyum |
| NP | Nanopartikül |
| PBS | Fosfat tamponlu tuz çözeltisi |
| PLGA | Poli(laktid-ko-glikolid) |
| PGA | Poliglikolik asit |
| PLA | Polilaktik asit |
| RES | Retikülo endotelial sistem |

| | |
|-----------|---|
| SDS | Sodyum dodesil sülfat |
| SEM | Taramalı Elektron Mikroskobu |
| TPBS | Tween 20 içeren PBS |
| VK | Varyasyon katsayısı |
| \bar{X} | Ortalama |
| SS | Standart sapma |
| WST-1 | 4-[3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolyo]-1,3-benzen disülfonat |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| Şekil 2.1. Nanoteknolojinin kullanım alanları | 4 |
| Şekil 2.2. Nanoteknoloji temelli bazı ilaç taşıyıcı sistemler | 6 |
| Şekil 2.3. Çeşitli ligandlar takılarak aktif hedeflendirmede kullanılmak üzere tasarlanmış nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem | 10 |
| Şekil 2.4. Nanoküre ve nanokapsül şeklindeki nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin şematik görünümü | 13 |
| Şekil 2.5. PLA, PGA ve PLGA' in kimyasal yapıları | 20 |
| Şekil 2.6. Kan Beyin Engeli (KBE)'nin şematik gösterimi | 33 |
| Şekil 2.7. 3,(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid) MTT | 45 |
| Şekil 2.8. FTS'in kimyasal yapısı | 47 |
| Şekil 2.9. 1,2–distearoil–sn–glisero–3–fosfoetanolin-N- [metoksi (polietilen glikol)-2000] (amonyum tuzu) | 47 |
| Şekil 2.10. 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) | 48 |
| Şekil 3.1. PLGA-PEG-PE hibrit nanopartikül formülasyonlarının (DOTAP içeren veya içermeyen) hazırlanmasının şematik gösterimi | 60 |
| Şekil 3.2. Nanopartikül formülasyonlarının in vitro salım çalışmalarında kullanılan düzeneğin şematik görünümü | 63 |
| Şekil 3.3. Sıçanların stereotaksik çerçeveye yerleştirilmesi ve RG2 hücrelerinin enjeksiyonu | 67 |
| Şekil 3.4. Sıçanların MR görüntülemesi. | 69 |
| Şekil 3.5. MR görüntülemesi için UMRAM'da geliştirilen FOV. | 69 |
| Şekil 3.6. Stereotaksiye yerleştirilen sıçana nanopartikül süspansiyonu uygulanması. | 71 |
| Şekil 4.1. FTS' in asetonytril içindeki UV spektrumu | 73 |
| Şekil 4.2. FTS' in FT-IR spektrumu | 75 |
| Şekil 4.3. FTS' in DSC termogramı | 76 |
| Şekil 4.4. 25 µg/ml konsantrasyonda FTS standart çözeltisinin örnek HPLC kromatogramı. | 77 |

| | | |
|--------------------|--|----|
| Şekil 4.5. | Analitik yöntem validasyonunda özgünlük bulguları | 78 |
| Şekil 4.6. | FTS için kullanılan HPLC yönteminden elde edilen kalibrasyon doğrusu ve denklemi | 79 |
| Şekil 4.7. | FTS'in farklı salım ortamlarındaki çözünürlük deneylerine ait HPLC kromatogramları, %10 (h/h) fetal sığır serumu ve a) %0.1 DMSO (h/h) içeren PBS, b) PBS (pH 7.4), c) %0.1 (a/h) Tween 20 içeren PBS. | 83 |
| Şekil 4.8. | FTS yüklü Hibrit Nanopartiküller (HNP)in partikül büyüklüğü dağılım grafikleri. a) PLGA 50:50 HNP, b) PLGA 50:50 DOTAP içeren HNP, c) PLGA 85:15 HNP, d) PLGA 85:15 DOTAP içeren HNP. | 86 |
| Şekil 4.9. | FTS yüklü hibrit nanopartiküllerin SEM görüntüleri. A) PLGA 85:15 HNP (10000x), B) PLGA 50:50 HNP (10000x), C) PLGA 85:15 HNP (40000x), D) PLGA 50:50 HNP (40000x). | 89 |
| Şekil 4.10. | FTS yüklü, DOTAP içeren HNP'lerin SEM görüntüleri. A) PLGA 50:50 HNP (10000x), B) PLGA 85:15 HNP (10000x), C) PLGA 50:50 HNP (40000x), D) PLGA 85:15 HNP (40000x). | 90 |
| Şekil 4.11. | FTS yüklü HNP'lerin AFM görüntüleri. A) PLGA 50:50 HNP formülasyonları. B) PLGA 50:50 DOTAP içeren HNP. | 91 |
| Şekil 4.12. | FTS yüklü HNP'lerin AFM görüntüleri. A) PLGA 85:15 HNP formülasyonları. B) PLGA 85:15 DOTAP içeren HNP formülasyonları. | 92 |
| Şekil 4.13. | FTS içeren formülasyonların zamana bağlı in vitro salım profilleri. | 93 |
| Şekil 4.14. | RG2 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda FTS uygulamasını takiben 3. ve 5. günün sonunda elde edilen hücre canlılığı değerleri. | 94 |
| Şekil 4.15. | 100 µM konsantrasyonda FTS içeren nanopartikül formülasyonlarının RG2 hücreleri ile muamele edilmesinden 5 gün sonra elde edilen % hücre canlılığı değerleri. | 95 |
| Şekil 4.16. | DOTAP içermeyen formülasyonlarının RG2 hücreleri tarafından alımlarının Floresan mikroskop ile değerlendirmesi. | 96 |
| Şekil 4.17. | DOTAP içeren HNP formülasyonlarının RG2 hücreleri tarafından alımlarının Floresan mikroskop ile değerlendirmesi. a) 10x, b) 100x. | 97 |
| Şekil 4.18. | RG2 hücresi ekiminden 10 gün sonra sıçanların örnek MR görüntüleri. | 98 |

| | | |
|--------------------|---|-----|
| Şekil 4.19. | Tümör oluşturulmuş sıçanların tedavi öncesi ve sonrasında ölçülen tümör alanları (mm ²). | 99 |
| Şekil 4.20. | İntravenöz ilaç çözeltisi uygulanan tedavi gurubundaki bir sıçana ait MR görüntüsü. A) tedaviden önce, B) tedaviden sonra. | 101 |
| Şekil 4.21. | İntravenöz boş nanopartikül formülasyonu uygulanan tedavi gurubundaki bir sıçana ait MR görüntüsü. A) tedaviden önce, B) tedaviden sonra. | 102 |
| Şekil 4.22. | İntravenöz FTS içeren nanopartikül formülasyonu uygulanan tedavi gurubundaki bir sıçana ait MR görüntüsü. A) tedaviden önce, B) tedaviden sonra. | 103 |
| Şekil 4.23. | İntratümöral ilaç çözeltisi uygulanan tedavi gurubundaki bir sıçana ait MR görüntüsü. A) tedaviden önce, B) tedaviden sonra. | 104 |
| Şekil 4.24. | İntratümöral boş nanopartikül formülasyonu uygulanan tedavi gurubundaki bir sıçana ait MR görüntüsü. A) tedaviden önce, B) tedaviden sonra. | 105 |
| Şekil 4.25. | İntratümöral FTS içeren nanopartikül formülasyonu uygulanan tedavi gurubundaki bir sıçana ait MR görüntüsü. A) tedaviden önce, B) tedaviden sonra. | 106 |
| Şekil 4.26. | Tümör oluşmamış (a) ve tümör oluşmuş (b) sıçan beynine ait kesitlerinin Hematoksilin Eosin boyası ile boyanması sonucu elde edilen ışık mikroskobu görüntüntülerine ait bir örnek (10 x büyütme ile). | 107 |
| Şekil 4.27. | Tümör oluşmuş sıçanda beyin kesitinin Hematoksilin Eosin boyası ile boyanması sonucu elde edilen ışık mikroskobu görüntüntülerine ait bir örnek A) 40 x B) 100x büyütme. | 108 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| Çizelge 2.1. İlaçların hedeflendirilme nedenleri | 8 |
| Çizelge 2.2. FDA onaylı nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler | 16 |
| Çizelge 2.3. Nanopartikül hazırlamada kullanılan doğal ve sentetik polimerler | 17 |
| Çizelge 3.1. FTS miktar tayininde kullanılan HPLC yönteminin parametreleri | 53 |
| Çizelge 3.2. DOTAP içeren hibrit nanopartiküllerinin hazırlanmasında ön formülasyon çalışmalarından sonra seçilen formülasyon bileşen miktarları | 61 |
| Çizelge 4.1. FTS miktar tayin yönteminin validasyon çalışmasında elde edilen tekrar edilebilirlik sonuçları | 80 |
| Çizelge 4.2. FTS miktar tayin yönteminin validasyon çalışmasında elde edilen tekrar elde edilebilirlik sonuçları | 80 |
| Çizelge 4.3. FTS için kullanılan HPLC yönteminde elde edilen doğruluk parametresi sonuçları | 81 |
| Çizelge 4.4. FTS' nin çözünürlük çalışmasında kullanılan farklı ortamlardaki çözünürlük değerleri | 83 |
| Çizelge 4.5. FTS' in çözünürlük çalışmasında kullanılan farklı ortamlarda zamana bağlı olarak bozunmadan kalan miktarlarına ait stabilite sonuçları | 84 |
| Çizelge 4.6. Hazırlanan hibrit nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu ve zeta potansiyel değerleri | 85 |
| Çizelge 4.7. Hibrit nanopartikül formülasyonlarına yüklenen FTS miktarı | 87 |
| Çizelge 4.8. DOTAP içeren hibrit nanopartikül formülasyonlarına yüklenen FTS miktarları | 88 |
| Çizelge 4.9. Tedavi gruplarının <i>intravenöz</i> uygulamasından sonra MR görüntüleme ile ölçülen tümör alanı | 100 |
| Çizelge 4.10 Tedavi gruplarının <i>intratümöral</i> uygulamasından sonra MR görüntüleme ile ölçülen tümör alanı | 100 |

1. GİRİŞ

Malign gliomlar, hızlı proliferasyon, beyin dokularına infiltrasyon gibi özellikleri nedeniyle en agresif beyin tümörleridir.

Günümüzde gliomların tedavisinde genellikle cerrahi, radyasyon terapisi ve kemoterapi yöntemleri tek veya kombinasyon halinde uygulanmaktadır. Cerrahi yöntemle tedavide tümör dokusunun büyük bir bölümü çıkarılsa bile gliomların infiltratif doğasına bağlı olarak bir miktar tümör hücresi ortamda kalabilmekte ve bu durum tümörün yeniden ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Radyoterapi ve kemoterapi cerrahi işleme destek tedaviler olarak uygulanmaktaysa da erken evredeki gliom tedavisinde daha etkin olmaktadır. Sistemik kemoterapide etkin sonuçların elde edilebilmesi için yüksek doz antineoplastik ilaç uygulaması, sağlıklı hücrelere de büyük zarar verdiği için hastanın kaybına yol açabilmektedir. Ayrıca, kan beyin engeli (KBE) pek çok antineoplastik ilacın beyne ulaşmasını engellemektedir. Bu nedenle, çoklu tedavi yaklaşımlarındaki son ilerlemelere rağmen, malign gliomlu hastaların ortalama hayatta kalış süreleri 3 ile 16 ay arasında değişmektedir.

Malign gliomların daha etkin bir şekilde tedavi edilmesi için, sistemik olarak herhangi bir zarar vermeden tümör dokusuna yüksek/istenen miktarda antineoplastik ilacı ulaştıracak ilaç taşıyıcı sistemlere büyük ihtiyaç bulunmaktadır.

Nanopartiküller, 10-1000 nm arasında değişen partikül büyüklükleri nedeniyle terapötik ve diagnostik ilaçların hedef dokulara daha iyi penetre olmasını sağlayan, içerdikleri etkin maddenin salımını kontrol altında tutabilen ve uzun süreli etki sağlayan sistemlerdir. Bu açıdan bakıldığında, beyin tümörlerinin tedavisinde konvansiyonel tedavilere göre üstünlük göstermektedirler. Nanopartiküller, hedefleme ajanları ile tasarlanırsa veya istenen bölgelere enjekte edilirse, hedeflenmiş dokularda sürekli ve yüksek miktarlarda ilaç bulunmasını sağlarlar. Bununla birlikte, KBE'den ilaçların geçişini ve alımını artırmak için özel bir şekilde tasarlanmalıdırlar. Bu durum, son yıllarda bu sistemler üzerinde özellikle gliomaların tedavisine yönelik olarak yoğun bir biçimde araştırma yapılmasına neden olmuştur. Bu amaçla bu çalışmada uygulanan yaklaşımlardan biri nanopartiküllerin lipit-poli(etilenglikol) (PEG) veya katyonik lipit-PEG sistemleri ile fonksiyonelleştirilmeleri yani hibrid formülasyonların hazırlanmasıdır.

S-trans, trans-farnesil tiyosalisilik asit (Salirasib, FTA) malign tümörlerin çoğunda yüksek oranda bulunan Ras proteinlerinin spesifik inhibitörü olan yeni nesil antineoplastik bir ilaçtır. İn vitro olarak hücre kültürlerinde beyin tümörlerine karşı etkin olduğu bulunmasına rağmen bu konuda sınırlı sayıda in vivo çalışma yapılmıştır. Yapılan literatür taramalarında FTA içeren nanopartiküler bir sisteme rastlanmamıştır. Ayrıca, FTA etkin konsantrasyonlarda KBE'yi geçememektedir. Malign gliomların tedavisi için FTA içeren nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesi lipid-PEG-polimer hibrit özelliği nedeniyle, alternatif bir yaklaşım olabilir. Bu şekilde, hem intratümoral uygulamaya yönelik (taşıdığı ilacın tümör hücrelerince alımını artırabilen), hem i.v. uygulamaya yönelik, (taşıdığı ilacın KBE'den geçişini sağlayabilen) formülasyonlar geliştirilebilir.

Bütün bu bilgilerin ışığında, bu çalışmanın amacı; tümör dokusunda yüksek miktarda bulunan, uzun süre ve/veya kontrollü etkin madde salımı sağlayan lipit/katyonik lipit-poli(etilen glikol)-poli(laktik-ko-glikolik asit) [lipit/katyonik lipit-PEG-PLGA] hibrit nanopartiküllerinin geliştirilmesidir. İn vitro karakterizasyon, sitotoksikite çalışmaları ve seçilen formülasyonların RG2 tümörü taşıyan sıçanlarda etkinliğinin değerlendirilmesi de yapılacaktır. Hazırlanan formülasyonlar intratümoral veya i.v. olarak uygulanacak ve tümör alanında meydana gelen değişiklikler in vivo çalışmalar esnasında araştırılacaktır

2. GENEL BİLGİLER

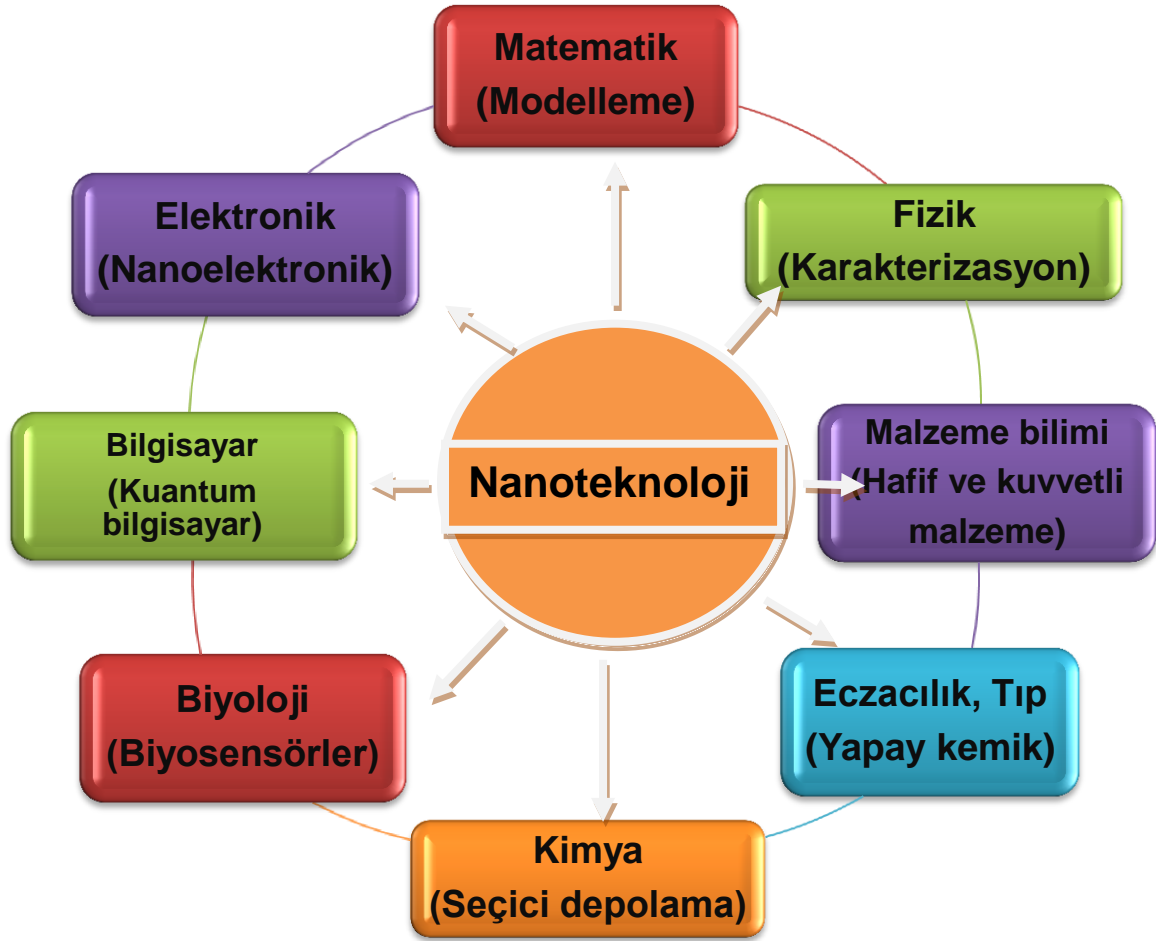
2.1. Nanoteknolojinin Tanımı ve Uygulama Alanları

Nanoteknoloji terimindeki “nano” ön eki, milyarda bir (1×10^{-9}) anlamına gelmektedir. Nanoteknoloji, metrenin milyarda biri ölçeğine sahip olan çeşitli madde yapılarını konu alan bir disiplindir [1].

Nanoteknoloji ile, nanometre ölçeğindeki malzemelerin sahip oldukları üstün fiziksel özellikler kullanılarak çeşitli alanlarda (bilişim ve iletişim, elektronik, biyoteknoloji, farmakoloji, tıp, savunma, tekstil, makine ve inşaat sanayileri vb) teknolojik devrim niteliğinde yeni ürünler elde edilebilmektedir [2] (Şekil 2.1).

Nanoteknolojinin kapsamı, uygulama alanlarına göre şu iki konu ile ilişkilendirilebilir:

- a) Pozisyonel (moleküler) kontrol: ürün ve yan ürünlerin moleküler düzeyde kontrolü esasına dayanır. Endüstriyel ya da doğal tüm ürünlerin özellikleri atomların nasıl düzenlendiklerine bağlıdır. Günümüzün makroskobik üretim yöntemleri ise moleküler düzeyde çalışmada oldukça yetersiz kalmaktadırlar. Moleküler nanoteknoloji, moleküler kimya ve fizik ile mekaniksel tasarım, yapısal analiz, bilgisayar bilimi, elektrik mühendisliği ve sistem mühendisliğinin mühendislik temellerini birleştiren, yeni gelişen disiplinler arası bir sahadır. Moleküler üretim, istenen ürünlerin eldesi için atomların düzenlenmesini amaçlayan bir metottur.
- b) Kolay tekrarlanabilirlik: Nanoteknolojinin kritik bir diğer özelliği ürünlerin teminini ucuzlatması olmaktadır. Düşük maliyetli üretimin gerçekleşmesi için nanoteknoloji uygulamasının kolay tasarlanması ve kolay tekrarlanması gerekmektedir. Atomik özellikli ürünler, mukavemet, sertlik, hız ve verimlilikte yüksek oranlar gösterirler, yüksek kaliteli ve düşük maliyetlidirler [1, 3].



Şekil 2.1. Nanoteknolojinin kullanım alanları [4].

Şekil 2.1' den görüldüğü gibi, nanoteknoloji araştırmaları özellikle malzeme ve tıp alanında hızlı bir gelişme göstermiştir. Kısa vadede, insanlığın hizmetine sunulacak ürünlerin bu alanlarda olması beklenmektedir [5].

2.2. İlaç Taşınmasında Nanoteknoloji

İlaç endüstrisi için yeni ilaç taşıyıcı sistemler ilaç pazarında stratejik bir seçenek oluşturmaktadır. Ayrıca, şu anda piyasada olan ilaçların ürün ömrünün uzatılması, güvenilirliğinin geliştirilmesi, etkinliğinin artırılması veya ürünün performansının iyileştirilmesi gibi konular endüstrinin üzerinde yoğun çalıştığı alanlar olup,

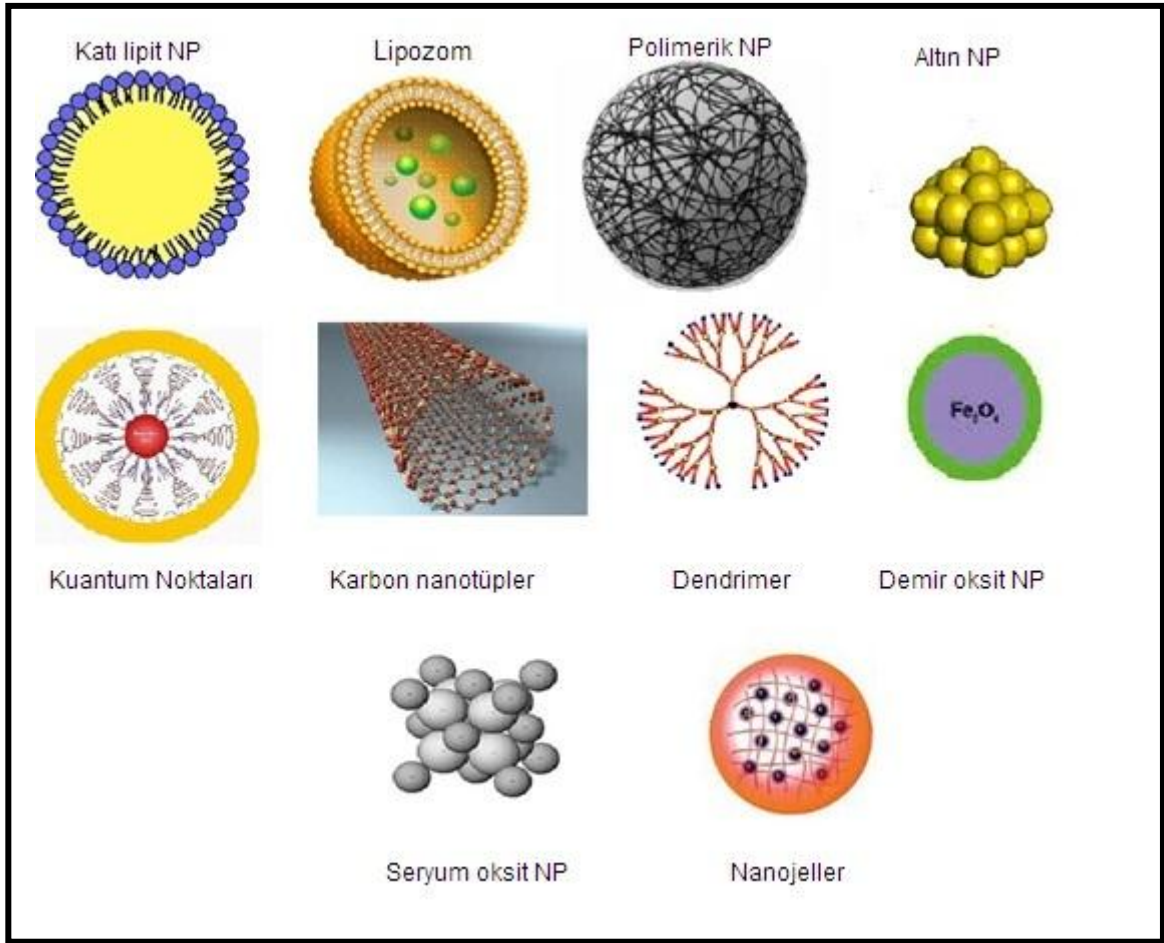
nanoteknoloji, bu alanlardaki pek çok avantajı nedeniyle ilaç endüstrisi tarafından yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [6].

Yakın gelecekte, yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin global ilaç satışında büyük bir artış sağlayacağı öngörülmektedir. Sadece Amerika Birleşik Devletlerinde 2010 yılında yeni ilaç taşıyıcı sistemlere olan talebin yıllık yaklaşık olarak %9 oranında artması beklenmektedir. Son yıllarda global ilaç endüstrisinde yeni ilaç taşıyıcı sistemler pek çok ilaç firmasının faaliyet alanına girmiştir. Buna ilaveten, ilaç endüstrisi performans esaslı ve daha etkin yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar da yürütmektedir[1, 7, 8].

Yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında nanoteknoloji çok yoğun olarak kullanılmaktadır. Nanoteknoloji temelli ilaç taşıyıcı sistemlerin klasik tedavi yöntemlerine göre avantajları; düşük toksisite, artırılmış biyoyararlanım, azalmış tedavi maliyeti ve hastanın tedaviye uyuncunun artması olarak sıralanabilir. Nanoteknoloji temelli ilaç taşıyıcı sistemler tedavinin yanı sıra teşhiste de kullanılmaktadırlar. Ayrıca gen tedavisinde de bu ürünlerden faydalanabileceği bildirilmektedir.

Nanoteknoloji temelli ilaç taşıyıcı sistemlerden bazıları lipozomlar, kuantum noktalar, karbon nanotüpler, miseller, dendrimerler, polimerik veziküller, nanokapsüller ve nanopartiküller olarak sıralanabilir [9, 10] (Şekil 2.2).

Lipozomlar hücre membranına benzer yapıda olan çift tabakalı lipid yapısından oluşan ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Kanser tedavisi konusunda ilk ve en sık çalışılan sistemler olan lipozomlar PEGilasyon işleminin ardından "gizli" formda hazırlanabilecekleri gibi, antikör konjugasyonu yapılarak hedeflendirmede de kullanılabilirler [11-13].



Şekil 2.2. Nanoteknoloji temelli bazı ilaç taşıyıcı sistemler [14].

Miseller kendiliğinden oluşan blok ko-polimerlerdir. Sulu çözelti içinde dışta hidrofilik katman, içte hidrofobik çekirdek olacak şekilde düzenlenirler. Misel çekirdek, çözünmeyen bir etkin madde ile yüklü olabilir [15].

Dendrimer kelimesi, Yunan'cada ağaç benzeri anlamına gelen “dendra” kelimesinden gelmektedir. Esas olarak dendrimerler ağaç dallanması gibi bir yapıda olan küresel makromoleküllerdir. Yapıyı oluşturan tekrarlayan birimlerin her biri jenerasyon olarak adlandırılmakta ve G1, G2, v.b. şekilde ifade edilmektedir. Büyüklük olarak genellikle 1-10 nm arasında olan dendrimerlerde dallanma sayısı arttıkça farklı çözücülerde çözünürlükleri de artmaktadır [14, 16].

Kanser teşhis ve tedavisinde kullanılacak bir diğer ilaç taşıyıcı sistem karbon nanotüplerdir. DNA moleküllerinin yarısı kadar bir çapa sahip olan karbon nanotüpler özellikle kanser mutasyonlarının belirlenmesinde kullanılmak üzere

araştırılmaktadır. İşlevselleştirilen karbon nanotüpler hücreler için toksik değildir ve kanser tedavisi için ilaç, protein ya da siRNA gibi biyomolekülleri hücrelere ve endositoz yoluyla da hücre içerisine taşıyabilir [17, 18].

Nanokabuk ('NanoShell') (NK) 'lar, kanser teşhis ve tedavisi için geliştirilmiş nano yapılarıdır. NK 'lar, merkezinde silisyum çekirdek bulunan ve üzeri altın tabaka ile kaplı küreciklerdir. Altın tabakanın kalınlığı değiştirilerek istenen dalga boylarındaki ışığın emilmesi sağlanabilir. Uygun dalga boyundaki yakın kızılötesi (NIR) ışığa maruz bırakılan NK, içinde bulunduğu hücreyi öldürebilecek, fakat etraftaki sağlıklı hücrelere zarar vermeyecek derecede ısı yayar. NK'ların yüzeyine ilgili antikor ve/veya antikanser ilaçlar yerleştirilerek kanserli hücrelere yönlendirilebilir [2, 19, 20].

Kuantum noktalar ('Quantum Dots') (KN) kadmiyum selenid, kadmiyum telurid ve indiyum fosfit gibi yarı iletkenlerden meydana gelen, 2 ile 10 nm çapında nanokristallerdir. Teşhis, görüntüleme ve tedavide floresan problemleri olarak kullanılırlar ve organik floresan proteinlerine göre eşsiz optik ve elektrik özelliklere sahiptirler[20-23].

Bu tezde hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemler olan nanopartiküllerden detaylı bir şekilde ilerleyen bölümlerde bahsedilecektir.

2.3. İlaç Hedeflendirmesinde Nanoteknoloji

İlaçların hedeflendirilmesinin amacı, konvansiyonel tedavide gözlenen olumsuzlukları elimine etmek ya da en aza indirmek, hücresel düzeylere taşınmayı artırmak, ilaçların dolaşımında ya da diğer biyolojik sıvılardaki konsantrasyonunu ve salım kinetiklerini optimize etmek, ilaçların farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini değiştirmek, düşük yada yüksek dozlarda etkin ve güvenli tedavi sağlamak, toksik ve immünojenik özellikleri gidermek ya da aza indirmek, ilaçların stabilitesini artırmak ve vücudun diğer bölgelerinde herhangi bir istenmeyen etkileşmeye neden olmadan hedef bölgede istenilen düzeyde farmakolojik yanıt elde etmektir [24, 25].

İlaçların klinik, farmasötik, farmakokinetik / farmakodinamik, biyofarmasötik ve ticari yönlerden hedeflendirilme nedenleri Çizelge 2.1'de özetlenmiştir [26].

Çizelge 2.1. İlaçların hedeflendirilme nedenleri [26].

| | |
|-----------------------|---|
| Farmasötik | Dayanaksız olması Çözünürlük sorunu olması |
| Biyofarmasötik | Absorpsiyonun düşük olması Membrana fazla bağlanması |
| Farmakokinetik | Yarılanma ömrünün kısa olması |
| Farmakodinamik | Dağılma hacminin büyük olması |
| Klinik | Terapötik indeksin düşük olması Anatomik/hücrel engellerin bulunması |
| Ticari | İlacın hasta ve hekime yeni şekilde Sunulması |

Hedeflendirmede "Sihirli formül" kavramı, 1981 yılında Paul Ehrlich tarafından ilaç hedeflendirme yaklaşımının en erken tanımını sunmuştur [27].

İlaç hedeflendirmesinin amacı, doğru zamanda, doğru konsantrasyonda, doğru yere ilacın taşınmasıdır. Etkinliğin tanımlanmasını sağlayan, kimyasal bileşim, moleküler boyut, hidrofilitate ve proteine bağlama gibi ilaca ait esansiyel özellikler oldukça komplekstir. İlaçların hedeflendirilmesi için kullanılan yöntemler arasında; ilaçların endojen bileşikler ile kimyasal modifikasyonu sonucunda konjugatların hazırlanması, hedefle yüksek oranda etkileşme özelliğine sahip doğal ya da sentetik hedeflendirici moleküllerin doğrudan ilaca veya nanopartiküler taşıyıcıya kovalan bağlanması sıralanabilir [28-30]. İlaç hedeflendirmenin önemli bir nedeni de konvansiyonel, biyoteknoloji ve gen kökenli ilaçların, ya da teşhis maddelerinin vücudun spesifik bölgesine seçici olarak taşınmasıdır [31-34].

Tüm terapötik sınıflar için nanoteknoloji temelli etkin ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine ihtiyaç bulunmakla beraber, solunum, santral sinir sistemi ve kardiyovasküler sistemle ilgili hastalıklar için taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi finansal ve terapötik açıdan hayati bir öneme sahiptir. Buna ek olarak, konvansiyel uygulama yöntemlerine nazaran ilaç taşıyıcı sistemlerin daha güvenli ve iyi sonuçlar vermesinden dolayı, antikanser ilaçlar, hormonlar ve aşılarda çok hızlı gelişmeleri beklenmektedir [29, 32, 35].

İlaç taşınması uygulamalarında nanoteknoloji, bütün ilaçlar için uygun olmayabilir. Özellikle etkinliği düşük, dozu yüksek etkin maddeler ilaç taşıyıcı sistemin boyutunu arttırır bu da uygulamayı güçleştirir [36-40]. İlaçların hedeflendirilmesinde kullanılan yaklaşımlardan bazıları aşağıdaki şekilde özetlenebilir [38].

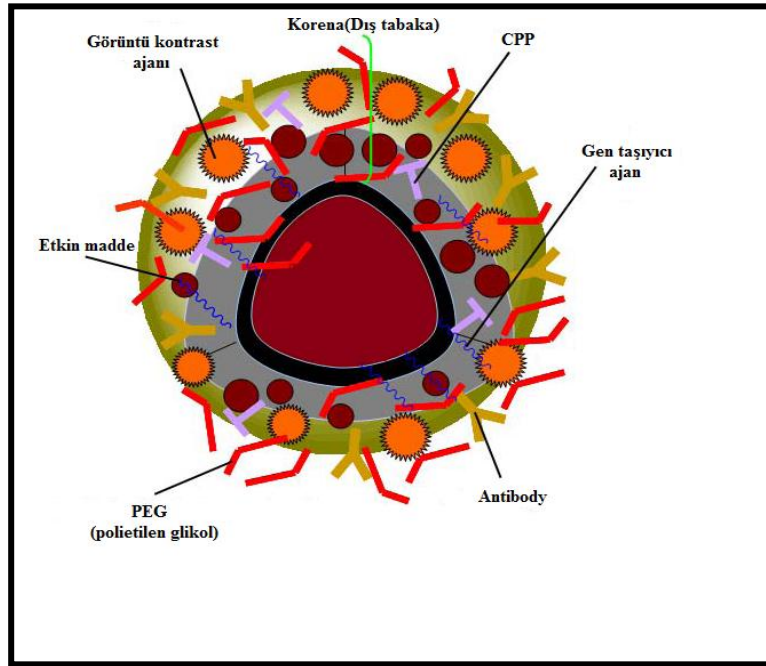
Pasif Hedeflendirme

Pasif hedeflendirme ilacın veya ilaç taşıyıcı sistemlerin fizikokimyasal ve farmakolojik faktörlere göre belli bir bölgede birikmesidir. İlaç ve ilaç taşıyıcı sistemler patofizyolojik ve anatomik olanakları kullanarak pasif olarak hedeflendirilir.

Aktif Hedeflendirme

Pasif hedeflendirmede yaklaşımların sınırlı olması, ilaç hedeflendirme alanında aktif hedeflendirmeye yönelmeyi gerektirmiştir. Aktif hedeflendirme, taşıyıcı sistemlerin RES'de toplanmaması, ancak doğal dağılım modelini değiştirmesi sonucu spesifik hücrelere, dokulara ya da organlara yönlendirilmesi esasına dayanır. İlaçların spesifik hedef bölgesine taşınmasındaki bir yaklaşım, taşıyıcıya ligand bağlanmasıdır (Şekil 2.3). Bazı ligandlar, monoklonal antikor ve peptidleri içermektedir [41, 42]. Uygun ligand seçimi, bu ligandın hedef hücredeki seçilim, stabilite, kullanılabilirlik ve özgünlüğüne dayanır [38, 43].

Dolayısıyla ilaç hedeflenmesi, çeşitli reseptörler, hücre membranları üzerindeki antijen-proteinler ve lipid bileşenleri varlıkları sayesinde gerçekleşmektedir. Bazı reseptörler ve yüzey antijenler normal hücrelere oranla hastalık taşıyan hücreler üzerinde daha fazla bulunurlar [44, 45].



Şekil 2.3. Çeşitli ligandlar takılarak aktif hedeflendirmede kullanılmak üzere tasarlanmış nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem [41].

Aktif hedeflendirme genel olarak manyetik, ultrasonik ve ligand-reseptör aracılı olmak üzere 3'e ayrılabilir:

a) Manyetik Hedeflendirme

Belirli bir bölgeye tedavi amacıyla manyetik partiküller gönderildikten sonra manyetik alan uygulanarak partiküllerin yönlendirilmesi ve yine manyetik alan etkisi ile ilacın taşıyıcı sistemden salımının kontrol edilmesine dayanan hedeflendirme yöntemidir [39, 46].

b) Ultrasonik Hedeflendirme

Dışarıdan uygulanan ultrasonik dalga sayesinde ilacın hedeflenen bölgede yoğunlaşmasını ve salımını kontrol eden sistemlerdir [47, 48].

c) Ligand-Reseptör Aracılı Hedeflendirme

Hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlere yönlendirilen taşıyıcı sistemlerin hücre içine alınması, ligandın ve reseptörün yapısına bağlı olarak reseptör aracılı

endositoz veya transitoz ile gerçekleşmektedir. Ligand-reseptör aracılı hedeflendirmede kullanılan belli başlı ligandlar, lektinler, monoklonal antikor-enzim konjugatları, monoklonal antikor fragmanlar, vitaminler, sitokinler, peptid yapıdaki büyüme faktörleri, glikoproteinler, toksinler, apolipoproteinler, hücre adezyon ve glikoaminoglikanlar olarak sıralanabilir [49-51].

Ligand doğrudan ilaca, polimer-ilaç konjugatına kovalent bağlanabildiği gibi, lipozomal taşıyıcılarda lipozom membranına veya yüzeyde kaplı bulunan polimerin dış ucuna da bağlanabilmektedir [52].

2.3.1. Tümöre Hedeflendirmede Nanoteknoloji

Klasik kanser tedavileri genellikle, kemoterapiye izin veren kataterlerin uygulamasını içeren kolay uygulanmayan işlemleri içerir. Günümüzdeki araştırma alanları, alternatif yollardan ilaç taşıyıcı sistemlerin uygulanmasına izin verecek taşıyıcıların geliştirilmesini kapsamaktadır. Yeni ilaç taşıyıcı sistemler, kanser hastalarının yaşam kalitesini ve hayatta kalma sürelerini artırmak için tasarlanmaktadır [53, 54]. Tümör aktive edilmiş önilaç tedavisinin kullanımı, ilaç ile tümöre spesifik molekülün konjugasyonunun yapıldığı bir yaklaşımdır, bu konjugat tümöre ulaşana kadar inaktiftir [40, 46, 55, 56].

Bu sistemler ideal şartlarda, sağlıklı hücrelerde olmayıp kanserli hücrelerin yüzeyinde olan reseptörlerle etkileşilir. Bağlayıcıların çoğu, aside karşı dayanıksız veya peptidaz ile parçalanabilir ve istenen klinik sonuçları verebilmesi için in vivo ortamda yeteri kadar stabil olmayabilirler. Hedefleme kısmı tam olarak bağlanamadığında veya hücre içinde konjugatla olan bağın kırılmaması durumunda etkinliği azalır veya yok olur. Enzimatik olarak ayrılabilen peptid zincirler aracılığıyla, poli(etilen glikol) (PEG) ile konjuge edilmiş adriamsin üzerinde yapılan son çalışmalar, ayrılmanın tümör hücrelerinde daha selektif olduğunu gösterilmiştir [57-59].

Hedeflendirilmiş konjugatın hedef hücreye bağlandıktan sonra hücre içine girip girmediği, uygun hedeflendirme ligandının seçiminde önemli bir kriterdir. Hücre içine alım genellikle reseptör aracılı endositoz ile gerçekleşir. Nanopartikül üzerindeki tümör spesifik ligandlar veya antikorlar, hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanırlar, bu da nanopartiküllerin hücre içindeki endozoma alınmasını tetikler.

Endozomun iç kısmındaki pH asidik hale gelir ve ilaç nanopartiküllerden salınmaya başlar, sitoplazmaya geçer. İlaç yüklü nanopartiküller aktif akış pompası olan P-glikoprotein tarafından tanınamadıkları için buraya uğramadan hücre içine geçmiş olurlar, böylece ilacın konsantrasyonu hücre içinde artırılabilir [60, 61].

Hem aktif hemde pasif hedeflendirilme stratejilerinde kullanılan nanopartiküller, sağlıklı hücrelerde toksisiteye neden olmadan ilacın tümör hücreleri içindeki konsantrasyonunu artırılmasını sağlar [62-64]. Ayrıca, nanopartiküller spesifik reseptörlere bağlanıp hücre içine girerler ve endozomlar tarafından kuşatılırlar, böylelikle ana ilaç direnç mekanizmalarından olan P-glikoproteinler tarafından tanınmazlar [52, 65, 66].

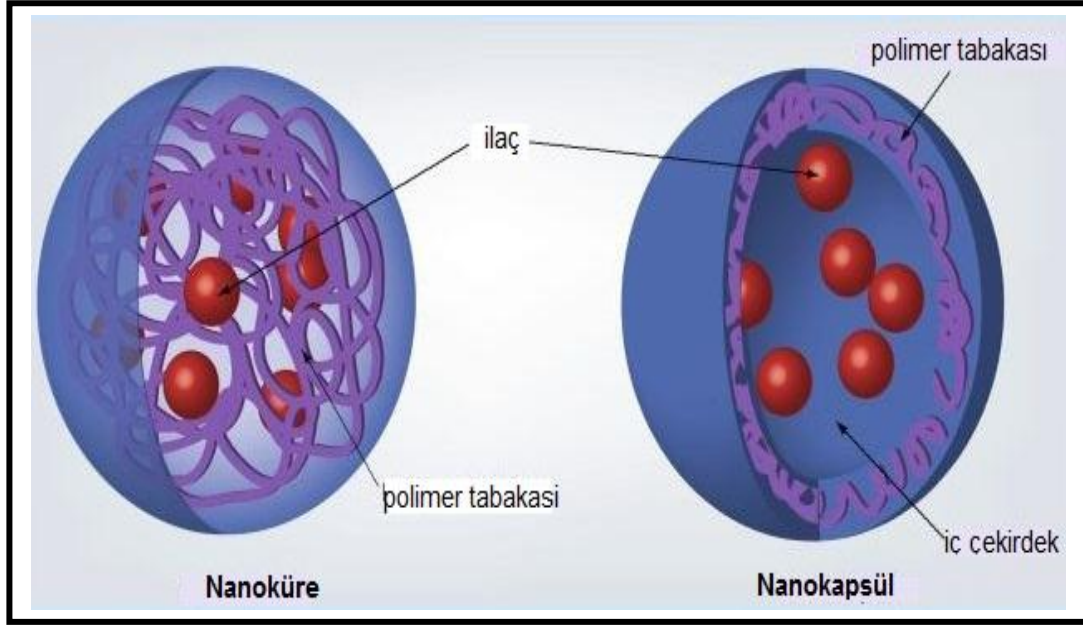
2.4. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nanopartiküller, büyüklükleri 10 – 1000 nm arasında değişen, çözünmüş, hapsedilmiş veya adsorbe olan etkin maddeyi kontrollü olarak salan katı kolloidal partiküllerdir. Etkin ilaç taşıyıcı sistem olarak biyoparçalanabilir nanopartiküllerin geliştirilmesi son birkaç on yılda büyük ilgi odağı olmuştur [32, 67].

Nanopartiküller, terapötik ilaç molekülünün limitleyici karakteristik özelliklerini maskeleyerek, ilaç stabilitesini artırarak ilaç molekülünün membran bariyerleri aşmasını sağlarlar [63, 64]. Nanopartikül istenilen bölgeye ulaştığında ilaç salımı desorpsiyon, nanopartikül matriksi ya da polimer duvardan ilacın difüzyonu, nanopartikül erozyonu gibi mekanizmaların biri ya da birkaçı vasıtasıyla gerçekleşebilir [68, 69]. Nanopartiküllerin, nanokürelerin ve nanokapsüllerin elde edilme yöntemlerine göre ilaç molekülü çözündürülebilir, hapsedilebilir, ya da nanopartikül matriksine eklenebilir. Nanopartiküller nanoküreler ve nanokapsüller olarak isimlendirilebilir. Nanokapsüller veziküler sistemlerdir, etkin madde bir polimerik membranla çevrilidir. Nanokürede ise etkin madde bir polimerik matriks sistem içinde homojen olarak dağıtılmıştır [57, 65] (Şekil 2.4.).

Nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin hedef dokuda etki gösterebilmeleri için sistemin tasarımı oldukça önem taşımaktadır. Nanopartiküllerin ilaç olarak geliştirilmesindeki ana amaç partikül büyüklüğü, yüzey özellikleri ve farmakolojik

aktif ajanların salım kinetiklerinin kontrol edilerek ilacın etki bölgesine spesifik salımını terapötik olarak optimum dozda ve oranda sağlamaktır [70-72].



Şekil 2.4. Nanoküre ve nanokapsül şeklindeki nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin şematik görünümü [73].

Bu amaçla potansiyel taşıyıcı olarak lipozomlar da kullanılmıştır. Ancak lipozomların kullanımı, düşük enkapsülasyon etkinliği, suda çözünen ilaçların dolaşımında hızlıca salınması ve zayıf saklama stabilitesi nedeniyle sınırlıdır. Diğer yandan polimerik nanopartiküllerin lipozomlara karşı çeşitli spesifik üstünlükleri bulunmaktadır. Örnek olarak, nanopartiküller ilaçların (proteinlerin) stabilitesini artırır ve hedef bölgeye uygun, kontrollü salım profili gösterirler [74, 75].

Nanopartiküller polimerik yapıları sayesinde biyolojik sıvılarda ve saklama süresi boyunca lipozomlardan daha stabildirler [76-78]. Nanopartiküllerden istenen özellikler şu şekilde sıralanabilir [79, 80]:

- İlaı kontrollü olarak salması,
- Etki etmeleri istenen bölgede toplanması,

- Stabilite sorunlarının olmaması,
- Fizyolojik ortamda parçalanması,
- Toksik olmamaları,
- Sterilize edilebilmesi.

İlaç taşıyıcı sistem olarak nanopartiküllerin sunduğu üstünlükler aşağıda sıralanmıştır [24]:

- nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ya da yüzey özellikleri değiştirilerek aktif ya da pasif olarak hedeflendirilebilirler,
- nanopartiküller, ilacın hedef bölgede salımını kontrol edip uzatabilir, organ dağılımını ve devamında klerensini değiştirebilir, dolayısıyla terapötik etkinlik artar ve yan etkiler azaltılabilir,
- nanopartiküllerin yüzeyine hedeflendirici ligandlar bağlanarak ya da manyetik hedeflendiriciler kullanılarak spesifik hedeflendirme yapılabilir,
- nanopartiküllerin matriks bileşenleri değiştirilerek kontrollü salım ve partikül degradasyon özellikleri değiştirilebilir,
- nanopartiküllerin ilaç yükleme kapasitesi yüksektir ve ilaçlar sisteme herhangi bir kimyasal reaksiyona girmeden yüklenebildikleri için aktiviteleri korunur,
- nanopartiküller pek çok yoldan (oral, nasal, parenteral, intraoküler...) kullanılabilir.

Bu sistemler genel olarak, hedefleme (hücre/doku) sağlamak, oral biyoyararlanımı arttırmak, hedef dokuda etkin maddenin etkisini uzatmak, intravasküler etkin maddenin taşınması için maddenin çözünmesini sağlamak, enzimatik

degradasyonuna karşı özellikle protein, peptid ve nükleik asit yapısındaki etkin maddelerin stabilitesini arttırmak için kullanılmaktadır[81].

FDA tarafından onaylanmış nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler Çizelge 2.2'de gösterilmiştir [82, 83].

2.4.1. Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler

Biyolojik olarak parçalanmayan ve parçalanmayan polimerler ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında sıklıkla kullanılır. Polimerlerin yapısal çeşitlilikleri ve istenen kimyasal, yüzeyleyerası, mekanik ve biyolojik fonksiyonlarını sağlayan yüzey ve "bulk" özelliklerinin tam anlaşılması gerekliliği nedeni ile polimer seçimi ve tasarımı aktif bir araştırma alanıdır. Polimer seçimi, polimerin fizikokimyasal özelliklerine ek olarak güvenilirliğinin kanıtlanabilmesi için gerekli olan klinik öncesi spesifik testler ve kapsamlı biyokimyasal karakterizasyon çalışmalarına bağlıdır. Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan farmasötik amaçlı doğal ve sentetik polimerler Çizelge 2.3'de özetlenmiştir [84-86].

Hidrofilisite, kayganlık, püzürsüzlük ve yüzey enerjisi gibi yüzey özellikleri ve bunlara ek olarak, dayanıklılık, geçirgenlik ve biyoparçalanabilirlik gibi fiziksel özellikler kan ve doku ile olan biyoyumluluğa etki eden özelliklerdir. Yüzey özellikleri ayrıca, polimerin su alma kapasitesini de belirler bu da hidrolitik parçalanma ve şişme için önemlidir [87-89].

Çizelge 2.2. FDA onaylı nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler [82].

| Endikasyon | İlaç / Terapötik ajan (ticari isim) |
|---|--|
| Mantar enfeksiyonları | Lipozomal amfoterisin (<i>Ambisome, Ablecet, Amphotec</i>) |
| Kombine bağışıklık yetmezliği hastalıklarında | PEG-adenozin deaminaz (<i>Pegademase</i>) |
| Kaposi sarkoma, tekrarlayan ovaryum kanseri | PEG-stabilize lipozomal doksorubisin (<i>Doxil, Evacet</i>) |
| Lenfomatik ve neoplastik menenjit | Lipozomal sitozin arabinozid (<i>DepoCyt</i>) |
| Kütanöz T-hücre lenfoması | İnterlökin 2-diferi toksini füzyon proteini (<i>Denileikin Diffitox</i>) |
| Maküler dejenerasyon | Lipozomal verteporfin (<i>Visudyne</i>) |
| Hepatit C | PEG-İnterferon α -2b (<i>Pegasys</i>) |
| Kemoterapi nedenli nötropeni | PEG-granülosit kolon stimüle edici faktör (<i>Neulasta</i>) |
| Metastatik meme kanseri | Protein bağlı paklitaksel (<i>Abraxane</i>) |
| Akut lenfositik lösemi | PEG L-asparajinaz (<i>Oncaspar</i>) |
| Maküler dejenerasyon | PEG aptanib (<i>Macugen</i>) |
| Malign plevral mezotelioma | Pemetrakset |

Çizelge 2.3. Nanopartikül hazırlamada kullanılan doğal ve sentetik polimerler [31].

| Sınıflandırma | Polimer |
|---|---|
| Doğal Polimerler | |
| Protein bazlı polimerler | Kollajen, albumin, jelatin |
| Polisakaritler | Agaroz, aljinat, hiyalurnik asit, dekstera, kitin ve kitozan |
| Sentetik Polimerler | |
| <u>Biyoparçalanabilir</u> | |
| Poliesterler | Poli(laktik asit), poli(gliko asit), poli(hidroksi), poli(β -malik asit), poli(dioksanon), poli(laktid-ko-glikolik asit) |
| Polianhidritler | Poli(sebasik asit), poli(adipik asit), poli(tereftelik asit), çeşitli kopolimerler |
| Poliamidler | Poli(imino karbonatlar), poliamino asit |
| Fosfor bazlı polimerler | Polifosfatlar, polifosfonatlar, polifosfazenler |
| Diğerleri | Poli(siyano akrilatlar), poliüretanlar, poliasetatlar, Poliesterler, polihidropiranlar |
| <u>Biyoparçalanabilir olmayanlar</u> | |
| Selüloz türevleri | Karboksimetil selüloz, etil selüloz, selüloz asetat, selüloz asetat propiyanat, hidroksipropil metil selüloz |
| Silikonlar | Polidimetilsiloksan, koloidal silika |
| Akrilik polimerler | Polietakrilatlar, poli(metil metakrilat), poli hidro(etil-metakrilat) |
| Diğerler | Polivinil piroidon, etil vinil asetat, poloksamerler, polokasminler |

2.4.1.1. Biyoparçalanmayan Polimerler

Biyoparçalanabilir olmayan polimerler biyolojik ortamlarda parçalanmazlar. Bu nedenle bu polimerlerin en önemli sakıncaları, kronik toksisite göstermeleridir. Bu polimerler hidrofilik veya hidrofobik yapıda olabilirler [90-92].

Biyolojik olarak parçalanmayan polimerlere örnek olarak, selüloz türevleri (karboksil metil selüloz, selüloz asetat, etil selüloz), silikonlar (polidimetil siloksan) ve akrilik türevleri (poli(hidroksi etil metakrilat), poli(metoksil etil metakrilat), poli(metakrilik asit) verilebilir [93-96].

2.4.1.2. Biyoparçalanır Polimerler

Nanopartikül tasarımında bioparçalanabilir bir matriks seçimi ile polimer artıklarının vücutta birikmesi engellenmekte ve uygulanan nanopartiküllerin uzaklaştırılması için ikinci bir cerrahi işlemi gerektirmemektedir [97]. Biyoparçalanabilir polimerler, ilaçların, makromoleküllerin, hücrelerin ve enzimlerin taşınması için sentezlenirler. Bu polimerlerin tolere edilebilirlikleri omurga yapıları içerisine, ester, anhidrit, amid, orto-ester, üre, karbonat ve üretan gibi bir çeşit değişken grupların ilave edilmesi ile parçalanabilirliklerinin kontrol edilebilmesinden ileri gelmektedir [98].

Biyoparçalanmayan polimerler suda çözünmezler fakat biyolojik sıvılarla temas edince fiziksel ve kimyasal değişime uğrarlar [99, 100]. Polimerlerin biyolojik olarak parçalanması enzimatik, kimyasal, ya da mikrobiyolojik yollarla olabilir. Bu parçalanma mekanizmaları ayrı ayrı olabileceği gibi eş zamanlı olarak da meydana gelebilir [101].

Polimerlerin biyolojik olarak parçalanmasını etkileyen faktörler aşağıdaki gibi sıralanabilir [102]:

- Fiziksel faktörler (şekil, büyüklük),
- Fizikokimyasal faktörler (iyon değişimi, iyonik güç, pH),
- Kimyasal yapı ve kompozisyon,
- Morfoloji (amorf, yarı kristal, kristal, içyapı),

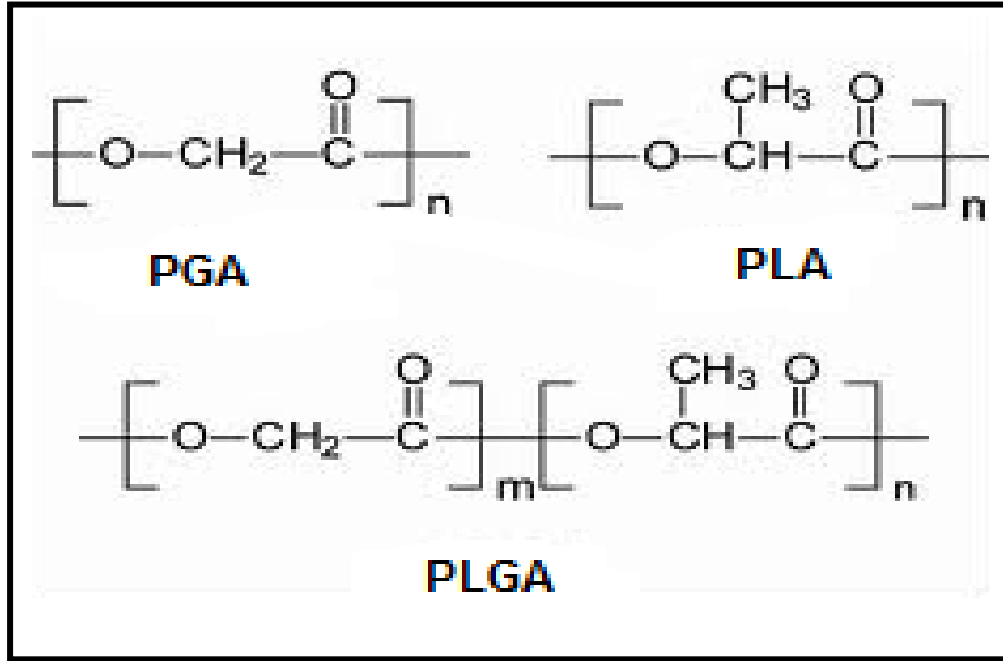
- Moleküler ağırlık dağılımı,
- Üretim şartları ve sterilizasyon işlemi,
- Degradasyonun mekanizması (hidroliz, mikrobiyolojik, enzimatik),
- Etki bölgesi,
- Sertleştirme ve saklama koşulları,
- Uygulama yolları.

Çizelge 2.3'den de görüleceği üzere, ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında kullanılan polimerler sentetik ve doğal polimerler olarak da sınıflandırılabilirler. Doğal polimerlere örnek olarak kitin, kitozan, albumin, kolajen verilebilirken sentetik olanlara poli(laktik asit) (PLA), poli(glikolik asit)(PGA), poli(laktik-ko-glikolik asit), karboksimetil selüloz, etil selüloz verilebilir. Tez çalışmamızda formülasyonların hazırlanması aşamasında poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) kullanıldığından bu bölümde sadece bu polimer hakkında detaylı bilgi verilecektir.

Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)

Orta ve yüksek molekül ağırlıklı PLGA başlangıç materyalleri olarak siklik dimerlerin (laktik ve/veya glikolik asitlerin siklik diesteri) halka açılma polimerisasyonu veya direk polikondenzasyon metodları ile glikolik asit ve laktik asitten sentezlenirler [103, 104]. PLGA en sık kullanılan, biyoparçalanabilir polimerdir. Literatürde PLGA'nın molekül ağırlığı, laktid/glikolid oranı ve terminal fonksiyonel grup gibi farklı özelliklerinin ilaç taşıyıcı sistemlerin karakterizasyonları üzerine olan etkileri incelenmiştir [105, 106].

PLGA %25-75 arasında değişen oranlarda glikolid yapısı taşımaktadır. PLGA'in yapısı Şekil 2.5'de gösterilmektedir. PLGA kopolimerinin sonuç kristalinitesi, kopolimer zincirinde monomer bileşenlerinin tipine ve molar oranına bağlıdır. D,L-PLA'yı içeren kopolimer daha amorf yapıdadır [107].



Şekil 2.5. PLA, PGA ve PLGA' in kimyasal yapıları [108].

Molekül ağırlığı ve polidispersite indeksi gibi fiziksel özellikler PLGA' in mekanik gücünü ve ilaç taşıyıcı sistem olarak formüle edilebilme özelliğini etkiler. Bu özellikler aynı zamanda bu polimerin biyolojik olarak parçalanması ve hidrilizini de etkiler [109]. PLGA kopolimerlerinin camsı geçiş sıcaklıkları (T_g) fizyolojik sıcaklığın ($37\text{ }^\circ\text{C}$) üzerindedir ve bu sıcaklıkta yapıları cam gibidir. Jamshidi ve ark [110] tarafından yapılan bir çalışmada PLGA kopolimerinin bileşimindeki laktid içeriğinin ve molekül ağırlığının azalması ile T_g değerlerinin azaldığı bildirilmiştir [111].

Mekanik güç, şişme davranışı, hidrolize uğrama kapasitesi ve biyoparçalanma hızı direkt olarak PLGA polimerinin kristalinitesinden etkilenir. PLGA kopolimerlerinin sonuç kristalinitesi, kopolimer zincirinde monomer bileşenlerinin molar oranlarına ve tipine bağlıdır [111]. D,L-PLA ve PGA'dan sentezlenen PLGA kopolimeri amorf yapıda iken L-PLA ve PGA'dan sentezlenen kopolimer kristal özellik gösterir. Polimerlerin kristalinite derecesi ve erime noktası polimerin molekül ağırlığı ile doğrudan ilişkilidir [112-114].

PLGA kopolimerlerinin biyolojik olarak parçalanma hızı, polimer zincirindeki laktik ve glikolik asitlerin molar oranına, polimerin molekül ağırlığına, kristalinite

derecesine ve polimerin camsı geçiş sıcaklıklarının (T_g) değerine bağlıdır. PLGA'in biyolojik olarak parçalanması için 3 fazlı mekanizma önerilmektedir [115].

I. Rastgele zincir yarılmaması işlemi: polimerin molekül ağırlığı önemli bir şekilde azalır ancak kayda değer bir kütle kaybı ve çözünür monomer ürünleri meydana gelmez.

II. Orta faz: bu fazda molekül ağırlığının azalmasına hızlı bir kütle kaybı ve çözünür oligomerik ve monomer ürünlerinin oluşumu eşlik eder.

III. Polimer çözülmesinin tamamlanması: çözünür oligomerik parçalardan çözünür monomer bileşenleri oluşur.

PLGA'in biyolojik olarak parçalanmasında enzimlerin rolü net değildir. PLGA biyolojik olarak parçalandığında laktik ve glikolik asit meydana gelmektedir. Laktik asit, trikarboksilik asit döngüsüne girerek metabolize edilir ve vücuttan CO_2 ve H_2O olarak uzaklaştırılır. PLGA polimerlerinin biyolojik olarak parçalanma hızı, polimer zincirindeki laktik ve glikolik asitlerin molar oranına, polimerin molekül ağırlığına, polimerin camsı geçiş sıcaklığına ve kristalinite derecesine bağlıdır [116-118]. PLGA 50:50 stabilitesi en az olan ve homopolimerlerden daha hızlı parçalanan kopolimerdir [119].

PLGA kopolimerleri, üretim kolaylığı, polimer karakteristiklerindeki çok yönlülük ve insan üzerinde kullanım için FDA tarafından onaylı olmaları gibi pek çok tercih edilen özelliğe sahiptirler [120]. Bu polimerler peptid ve protein yapıdaki ilaçların taşınması, kimyasal ve enzimatik parçalanmaya karşı korunması ve kontrollü salınması için üzerinde yoğun çalışılan materyallerdir [121-123].

2.4.2. Nanopartiküllerin Hazırlama Yöntemleri

Nanopartikül hazırlama yöntemleri pek çok araştırmacı tarafından incelenmiş olup hazırlama sırasında polimerin ve etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerine uygun yöntemi seçmek gerekmektedir. Formülasyon şartları, polimerik koloidal sistemin iç yapısını da belirlemektedir. Nanopartikül hazırlama yöntemlerine tarihsel olarak bakıldığında, ilk yıllarda monomerlerin çeşitli ortamlarda in situ polimerizasyonuna

dayanmaktadır. İlerleyen yıllarda, tam olarak karakterize edilmiş önceden sentezlenmiş polimer veya doğal makromoleküllerin dispersiyonlarına dayalı yöntemler geliştirilmiştir[124, 125].

2.4.2.1. Emülsifikasyon/çözücü difüzyon metodu

Partiküler sistem hazırlama şekillerinden biri olan emülsifikasyon-çözücü difüzyon yönteminin esası, suda çözünmeyen etkin madde ile polimerin ortak çözündükleri bir organik çözücüde çözündürülmesi ve yüzey etkin madde içeren ortama karıştırılarak ilave edilmesidir. Bu metotta suyla karışabilen aseton ya da metanol gibi bir solvan ve diklorometan ya da kloroform gibi suyla karışmayan bir solvan organik fazı oluşturmak amacıyla kullanılır. Suyla karışabilen solvanın kendiliğinden ani uçması iki fazın yüzeyleri arasında türbülans ve küçük partiküllerin oluşumu ile sonuçlanır. Suyla karışan solvanın konsantrasyonunun artırılması ile daha küçük partikül büyüklüğüne sahip partiküller elde edilebilir [126, 127].

2.4.2.2. Emülsifikasyon/ çözücü buharlaştırma metodu

Emülsifikasyon/ çözücü buharlaştırma yönteminde ilk olarak sulu faz içerisinde polimer çözeltisinin emülsifikasyonu sağlanır sonrasında ikinci adımda, polimerin içinde çözüldüğü solvan buharlaştırılır ve polimerin nanopartikül olarak çökmesi sağlanır. Etkin maddeyi içeren polimerin organik fazdaki çözeltisi, dispersiyon ajanı ve yüksek hızlı hemojenizatör kullanarak nano buyuttaki parçacıklar halinde disperse edilir. İlaç polimer matriks sistemi içine iyi bir şekilde disperse olmuş ise, polimer, nanopartikül şeklinde çöker. Çözücü sürekli karıştırılarak veya sıcaklığın basınç altında artırılması ile uçurulur [128].

Nanopartiküllerin boyutu, karıştırma hızı, organik ve sulu fazın viskozitesi, dispersiyon ajanının tipi ve miktarı ve sıcaklık ile ayarlanabilir. Bu yöntemde sıkça kullanılan polimerler, poli(laktik asit) (PLA), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), etilselüloz(EC), selüloz asetat ftalat, poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) ve poli(hidroksibütirat)'tır(PHB).

Etkin maddenin hidrofilik ya da hidrofobik olmasına göre, hazırlanan emülsiyonun tipi farklılık gösterir. Peptid, protein yapısındaki ilaçların bu yöntem ile

enkapsülasyonlarının sağlanabilmesi için, S/Y/S tipinde çoklu emülsiyonu oluşturulur [129].

Hidrofilik ilaçların hapsedilme etkinliğini artırılması için S/Y/S emülsifikasyon/solvan buharlaştırma yöntemi geliştirilmiştir. Organik faz bu sistemde iki sulu faz arasında ilacın dış sulu faza difüzyonunu önleyici bir bariyer görevi görmektedir. Bu yöntemde etkin maddenin sulu çözeltisi (su veya tampon), polimer içeren organik faz içinde dağıtılır. Elde edilen S/Y emülsiyonu hazırlanır, bu emülsiyon PVA gibi bir emülgatör içeren büyük hacimdeki suya ilave edilir ve karıştırarak S/Y/S emülsiyonunun oluşumu sağlanır. Çözücü, buharlaştırma ya da ekstraksiyon işlemi ile ortamdan uzaklaştırılır. Daha sonra hazırlanan partiküller santrifüj edilir, yıkanır ve son basamakta kurutulur. Polimer çözücü olarak etil asetatın ve peptid/protein ilaçlar için hidrofilik stabilizan olarak Pluronic F68, Polietilen glikol, sığır serum albumini, insan serum albumini ya da sodyum glutamat kullanılabilir [130].

Yağda çözünen hidrofobik ilaçlar için Y/S tipinde basit emülsiyon oluşturulur. Bu yöntemde, öncelikle polimer su ile karışabilen uçucu bir organik solvan (etil asetat, diklorometan, aseton vb.) içerisinde çözünür. Daha sonra elde edilen çözelti içerisine etkin madde eklenir. Etkin madde, polimer ve organik fazı içeren bu çözelti Y/S tipinde bir emülsiyon elde etmek üzere, emülgatör (poli(vinilalkol) (PVA) gibi) varlığında büyük hacimde bir sulu faz içine uygun karıştırma ve sıcaklık koşullarında emülsifiye edilir [131]. Organik fazın uzaklaştırması için buharlaştırma ya da ekstraksiyon yöntemi kullanılır. Bu yöntemde en sık kullanılan emülgatörler poli(vinil alkol) (PVA), aljinat, jelatin, metil selüloz, hidroksialkil selüloz, hidroksipropil metil selüloz (HPMC), Tween'ler ve sodyum oleat olarak sıralanabilir. Y/S emülsiyon yönteminin en büyük dezavantajı suda çözünen ilaçlar için düşük enkapsülasyon etkinliğinin meydana gelmesidir. Bu nedenle bu yöntem steroidler gibi yağda çözünen ilaçlar için yaygın olarak kullanılmaktadır. Suda çözünen ilaçlar için ilaç yükleme kapasitesini arttırmak amacıyla Y/Y emülsiyon yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde asetonitril gibi su ile karışabilen bir organik çözücüde polimer ve ilaç çözülür. Daha sonra bu çözelti hafif mineral bir yağ içine disperse edilerek Y/Y emülsiyonu oluşturulur [132].

2.4.2.3. Nanoçöktürme metodu

Nanoçöktürme yöntemi, hemen ve tek bir aşamada nanopartikül oluşumuna olanak vermesi, uygulaması basit ve hızlı bir teknik olması nedeniyle avantajlıdır. Bu yöntemde birbiriyle karışan iki çözücü gerekmektedir. İlaç ve polimer çözücü olarak adlandırılan ilk fazda çözünmeli, çözücü olmayan faz olarak isimlendirilen ikinci fazda ise çözünmemelidir. Polimer çözeltisi çözücü olmayan faza ilave edildiğinde polimerin hızla katılaşmasıyla nanoçöktürme meydana gelmektedir. Polimeri içeren çözücünün karışan faza difüze olmasıyla polimerin çökmesi gerçekleşmektedir [133].

Nanoçöktürme yöntemi, genellikle PLGA, selüloz türevleri, poli ϵ -kaprolakton gibi polimerlerle, dar bir dağılım aralığında 80-300 nm büyüklüğünde nanopartiküllerin hazırlanmasına olanak vermektedir . Bu yöntem, artırılmış karıştırma hızları, sonikasyon veya yüksek sıcaklık dereceleri gerektirmediğinden protein yapıda ilaçlar için uygundur. Buna ilaveten, bu yöntem etanol veya asetonda çözünen hidrofobik karakterde olan ilaçların yüklenmesi açısından da uygundur ve dış faza ilaç geçişini en aza indirerek yüksek enkapsülasyon etkinliği sağlamaktadır. Nanoçöktürme yöneminde, çözücü ve çözücü olmayan fazın yapısı, çözücü/ çözücü olmayan faz hacim oranı ve polimer konsantrasyonu nanopartiküllerin büyüklüğünü etkiler.

2.4.2.4. Polimerizasyon Metodu

Nanopartiküller monomerlerin polimerizasyonu ile hazırlanabilir. Bu yöntemde bir ilacı nanopartikül haline getirmede akrilamid gibi suda çözünen bir monomer kullanılır. Dış faz olarak bir hidrokarbon kullanılabilir. İlk basamakta suda çözünen polimerize edilecek olan monomerler ve kaplanacak maddeler suda çözündürülür. Daha sonra bu çözelti, yüzey etkin maddeler yardımıyla hidrofobik fazda dağıtılır ve böylece partiküller elde edilir. Bu yöntemde ilaç molekülü monomerin eklenmesi ya da polimerizasyon işleminin tamamlanması sonrasında ortama eklenebilir. İşlem sonrasında elde edilen nanopartikül süspansiyonu ultrasantrifüjasyon ya da izotonik, sürfaktan olmayan ortamda resüspande edilerek saflaştırılabilir[134].

Polimerizasyon esasında dekstran -70, -40, -10, poloksamer-188, -237 gibi stabilizerler, polisorbitat-80, -40, -20 gibi sürfaktanlar ortama eklenebilmektedir.

Nanopartiküllerin partikül büyüklüğü stabilizerin tipi, kullanılan sürfaktan tipi ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir.

2.5. Beyin Tümörü

Beyin tümörü, intrakraniyal solid neoplasm olarak veya beyin içinde veya santral spinal kanalda anormal ölçüde hücre çoğalmasına bağlı meydana gelen kitle olarak tanımlanabilir. Belirtileri baş ağrısı, kusma(ileri düzeyde), sara nöbetlerine benzer seri bayılmalar, tümörün beyindeki yerine göre vücutta bazı kısımlarda felç, kişilik ve ruhsal bozukluklar, isim hatırlamama, hesap yapamama gibi sayısal ve sözel hafıza bozuklukları olarak sıralanabilir [135].

Beyin tümörleri, kanser sonucu meydana gelen ölümlerin yaklaşık %2'sini oluşturmaktadır. Popülasyonda beyin tümörlerinin bir yıl (2011) içindeki insidensi 8-10 /100 000' dir. Primer beyin tümörleri çocuklarda en sık rastlanan ikinci tümör olup insidensi 3.8/100 000'dir.

Amerikan Ulusal Kanser Derneği (National Cancer Institute) 2011 yılında bu ülkede yaklaşık 22340 yeni intrakraniyel tümör tanısı konulacağını ve 13110 kişinin bu nedenle kaybedileceğini hesaplamaktadır [136].

2.5.1. Beyin Tümörlerinin Sınıflandırılması

Literatürde beyin tümörlerinin sınıflandırılmasında çeşitli yaklaşımlar bulunmakla birlikte tümörün kaynaklandığı hücre grubu açısından yapılan genel bir sınıflandırma bulunmaktadır. Gliomlar glial hücreler astrositler ve oligodendrositlerden kaynaklanan tümörlerdir. Malign beyin tümörleri son derece öldürücüdür [137, 138]. 1×10^6 hücre içerebilen ve yaklaşık 10 g ağırlığında olan bu tümörler, klinik olarak semptomatik hale gelmeden önce lokalizasyon ve derecelerine bağlı olarak ödem ile birlikte görülebilir. Malign gliomlar, glial hücreler, astrositler ve oligodendrositlerden kaynaklanan tümörlerdir ve tüm beyin tümörlerinin % 13-22' sini meydana getirmektedir [139]. Bazı gliomlar 1×10^{11} adet ya da daha fazla hücre içerip 100 g ağırlığında olabilir, hatta bazıları semptomatik hale gelmeden önce daha da büyüyebilir [140]. Gliomlar Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) tarafından tümörün histolojik görünümünü baz alarak I'den IV'e kadar

derecelendirilmişlerdir. Yüksek dereceli gliomlar III. ve IV. derece gliomlardır. Yüksek dereceli gliomların büyük kısmı Glioblastoma Multiforme'nin alt tipleri olan Anaplastik Astrositom ve Anaplastik Oligodendrositom'dur [141].

2.5.2. Tedavi Yaklaşımları

Günümüzde malign gliomların tedavisinde 3 ana yöntem tek veya kombinasyon halinde kullanılmaktadır. Bunlar; cerrahi, radyasyon terapisi ve kemoterapi olarak sıralanabilir [142].

2.5.2.1. Cerrahi

Beyin tümörlerinde uygulanan cerrahi işlemlerde amaç: a) teşhisi kesinleştirmek, b) artan intrakraniyel basıncın semptomlarını hafifletmek amacıyla tümörü küçültmek, c) yardımcı (adjuvan) tedaviler için ön işlem olarak tümör kütlesini azaltmak, olarak sıralanabilir.

Genellikle tüm primer malign tümörlerde uygulanan cerrahi işlem tümör kütlesinin % 99'unun etkin bir biçimde uzaklaştırılması ile sonuçlanır. Bunun sonucunda intrakraniyel basınç düşer, çoğalan, hareketsiz ve ölü tümör hücrelerinin uzaklaştırılmasıyla semptomlar hafifler. Ancak, çoğu beyin tümörünün infiltratif doğasına ve malign dokudan normal dokuya dönüşümün zor olmasına bağlı olarak geride 1×10^8 - 1×10^9 tümör hücresi geri kalabilmektedir. Sonuç olarak, sadece cerrahi girişim çok başarılı sonuçlar vermez ve hastaların ortalama hayatta kalış süresi (OHKS)'ni yaklaşık 17 hafta kadar artırabilir [143].

2.5.2.2. Radyasyon Terapisi

Cerrahi işlem sonrası uygulanan radyasyon terapisi genellikle yüksek dereceli gliomların tedavisinde etkin bir yardımcıdır ve gliomlu hastalarda OHKS' ni yaklaşık 37.5 hafta artırabilir [144].

Radyasyon terapisi, seçilen tümör hacmine ulaşan radyasyon dozunun homojenitesinin optimizasyonu ve normal beyin bölgelerinde dozun minimuma indirilmesi yönünde planlanır. Günlük alınan radyasyon miktarı komplikasyonların

sıklığı ile ilişkili olup maksimum doz 1.8–2.0 Gy/gün' dür. Uygulanan toplam radyasyon dozu tümörün tipine, lokalizasyonuna ve alanın büyüklüğüne bağlı olmakla birlikte gliomlar için genellikle 45-60 Gy' dir. Daha yüksek dozlar beyin nekrozu riskini artırır [145].

2.5.2.2.1. Partikül Işın Tedavisi

Radyasyon terapisinin daha etkin olabilmesi için farklı tipte partikül ışınlarının kullanımı önemlidir. Özellikle nöronlar yüksek derecede Göreceli Biyolojik Etki (GBE) sağlarlar. Protonlar ve helyum çekirdeği normal dokularda kabul edilebilir risk düzeyinde doz sağlarken tümörde artan doz dağılımı görülür. Bor nötron yakalama terapisi (boron neutron capture therapy, BNCT), radyoaktif olmayan bor izotopunun (^{10}B) düşük enerjili nötronlar ile ışınlanması sonucu meydana gelen nükleer reaksiyona dayanır. Reaksiyon sonucunda yüksek sitotoksositeye sahip parçacıklar meydana gelir ve izotopu içine almış olan ya da izotopun bağlı olduğu hücreler tahrip edilir. BNCT için klinikte kullanılan maddelere örnek olarak borokatat sodyum (BSH) ve P-bronofenilalanin (BPA) verilebilir. Bu maddelerin hedef hücrelere taşınmasında lipozom, immünolipozom ve mikrokapsül gibi dozaj şekilleri kullanılmaktadır [146, 147].

2.5.2.2.2. Dokuarası (Interstitial) Radyasyon Uygulaması ve Hipertermi

Brakiterapi, dokuarası ya da tümöre yakın bölgede ışınlamada olduğu gibi yakın mesafede gerçekleştirilen ve radyasyon kaynağının doğrudan tümörün içine yerleştirildiği bir radyasyon terapisi şeklindedir. Dokuarasına implante edilen radyasyon kaynağı tümöre yüksek doz verilmesini sağlarken, civardaki sağlıklı dokulara çok düşük bir dozun ulaşmasına yol açmaktadır. Brakiterapi için radyasyon kaynağı olarak literatürde İyot-125, Altın-198, İridyum-192 gibi radyoaktif elementlerin kullandığı görülmektedir.

Sıcaklığın 41 °C nin üzerinde uygulanması, hücreleri zamanın ve sıcaklığın fonksiyonu olarak öldürür ve hücrelerin radyasyonun verdiği hasarı onarmasını engeller. Hipertermi, doğrudan tümör hücresi öldürülmesi, tümör reoksijenasyonu (tümördeki hipoksik bölgelerin radyasyona hassasiyetini artırmak amacıyla) ve radyosensitizasyonunda lokal kontrolün geliştirilmesi için brakiterapi ile birlikte

değerlendirilmektedir. Hipertermi tekniği brakiterapiden önce ve sonra 15-30 dk süreyle uygulanır [148].

2.5.2.2.3. Radyosensitizerler

Minimum normal doku ve maksimum tümör hasarı oluşturmak amacıyla kullanılan radyosensitizerler, radyasyon ile beraber uygulandıkları zaman basit bir ilave etkiden çok daha fazla tümör hücresinin ölümüne yol açan maddelerdir (örneğin; metronidazol, misonidazol, 5-bromodeoksiüridin(BUDR), 5-iyododeoksiüridin (IUDR) vb.). Çoğu kemoterapötik madde radyasyon dozunda artışa neden olan etkiye sahiptir [149].

2.5.2.3. İmmünoterapi

2.5.2.3.1. Biyolojik Cevabı Değiştiriciler (BCD)

İmmünokonjugatlar, bir antikor ve efektör molekülden meydana gelmektedir. Efektör madde tümör hücresi tahribine neden olabilecek bir radyoizotop, protein toksini ya da ilaç olabilir. Efektör maddenin etki mekanizması bir antijene hedeflenerek etkileşme biçiminde ise uygulama daha etkilidir [150-152].

BCD, tümör hücrelerinin fenotipik karakterlerinin değiştirebilen heterojenik bir gruptur. Beyin tümörlerinin tedavisinde BCD'in kullanılma nedenleri:

- Hastanın immün durumunun anomali göstermesi,
- Tümör hücrelerinin büyümesi ve "immün denetim sisteminden bu hücrelerin kaçabileceği" görüşü,
- Sitokinler gibi pek çok BCD'in tümör hücrelerinin biyolojik çevrelerini modüle etmesi olarak sıralanabilir [152].

2.5.2.4. Fototerapi

2.5.2.4.1. Fotodinamik Terapi

Fotodinamik terapi lokal adjuvan tümör tedavisinin iki aşamalı şeklidir. Fotodinamik terapi, tümör dokusu tarafından bir fotosensitizerin selektif alımı ve/veya alıkonmasını takiben uygun dalga boyundaki ışığın uygulanması sonucunda sensitizerin aktive olarak tümörün selektif bir şekilde tahribi şeklinde tanımlanabilir.

Bu terapi fotoradyasyon terapisi, fototerapi ve fotokemoterapi gibi değişik şekillerde adlandırılmaktaysa da günümüzde fotodinamik terapi terimi kabul görmektedir [153]. İdeal bir fotosensitizerin özellikleri:

- Sistemik olarak toksik olmamalı,
- Maksimum tümör-beyin selektivitesine sahip olmalı,
- Tek bir bileşik olmalı,
- İnfiltrate olan hücrelere ulaşmak için hasar görmeden kan-beyin engelini geçebilmeli ancak normal beyine girmemeli,
- Maksimum doku penetrasyonu sağlayan ışık dalga boyu (650-800 nm) ile yüksek düzeyde aktivasyona uğramalı
- Çevre dokularda minimum, tümörde ise maksimum sitotoksik etki göstermeli,
- Sistemik dokulardan hızla uzaklaşmalı olarak sıralanabilir.

Birinci nesil fotosensitizerlere fotofrin, hematoprofrin türevleri, ikinci nesle ise Rodamin-123, Klorinler ve bakterioklorinler gibi maddeler örnek olarak verilebilir [154, 155].

2.5.2.5. Gen Terapisi

Genetik vektörler eksik ya da hatalı genleri yerine koymak ya da alıcı hücrelere yeni fonksiyonlar öğretmek için kullanılabilir. Beyin tümörü tedavisinde gen transferi:

- a) Tümörün immunojenitesini artırmak ve immün kaynaklı antitümör etkileri etkin hale getirmek.
- b) Bazı ürünleri, alıcı tümör hücrelerinde selektif toksisite sağlayabilecek bir genin transferi için spesifik olarak bu hücrelere hedeflemek amacıyla yapılabilmektedir.

Patojenik virüsler seçilen hücre popülasyonu üzerinde toksik etkilerini selektif olarak gösterebileceği için beyin tümörlerinin biyolojik tedavisinde bir potansiyele sahiptirler. Bu amaçla adenovirüsler ve retrovirüsler kullanılmaktadır [156, 157].

2.5.2.6. Kemoterapi

Bu bölümde beyin tümörü kemoterapisinde kullanılan ilaçların farmakoloji özelliklerinde değil, ilaçların beyine taşınmasında önemli bir yer tutan kan-beyin engelinden, uygulama yollarından ve dozaj şekillerinden bahsedilecektir [158].

2.5.2.6.1. İlaç Uygulama Bölgeleri

2.5.2.6.1.1. İntravenöz (i.v.) uygulama

Konvansiyonel beyin tümörü kemoterapisinde ilaç uygulanması için en sık kullanılan uygulama yoludur. Uygulama yapılırken herhangi bir cerrahi girişime ihtiyaç duyulmaması nedeniyle tedavide ilk olarak tercih edilir. Ancak, bu yolla uygulanan sitotoksik ilaçların birçoğu kan beyin engeli nedeniyle etkin konsantrasyonda tümör bölgesinde bulunamamaktadır. Bu bölgede etkin konsantrasyonda ilaç düzeyini sağlamak için uygulanan stratejilerden biri, uygulanan ilaç dozunun artırılmasıdır ancak bu durum ciddi sistemik toksisiteye neden olmaktadır [159].

2.5.2.6.1.2. İntratümöral uygulama

Malign gliomlar genellikle lokal tümör kontrolündeki başarısızlık nedeniyle gelişirler. Bu durumun önlenmesi için lokal olarak ilaç uygulaması geliştirilmiştir. İntratümöral kemoterapi, direk olarak tümör içine veya tümörün çıkarılmasını takiben oluşan kaviteye ilacın uygulanmasıdır. İntratümöral kemoterapinin avantajları:

- tümör içi ilaç konsantrasyonunun ve tümör-ilaç temas süresinin artırılması,
- kan beyin engelinden etkin bir kaçışın sağlanması,
- tümör içinde damarsız bölgelere de ilaç taşınması,
- uygulanan toplam ilaç dozundaki azalmaya bağlı olarak yan etkilerde azalma sağlanması

olarak sıralanabilir. Bu yöntemin ana sakıncası olarak, invazif bir yöntem olması ve tümörün düzenli olmayan yapısı nedeniyle ilacın tümör içinde eşit bir şekilde dağılamaması bildirilmiştir [160].

2.5.2.6.1.3. İntrakarotid (intra-arterial) uygulama

Diğer odaksal tedavilerde olduğu gibi intra-arterial (i.a.) uygulamanın amacı, ilacın maksimum oranda tümöre taşınırken minimum oranda sistemik dolaşıma geçmesidir. Beyin tümörleri için i.a. kemoterapinin matematiksel modellenmesi yapıldığında, i.v. tedaviye göre i.a. kemoterapinin tümöre taşınan ilaç miktarı açısından 5 kat daha yüksek sonuçlar verebileceği hesaplanmaktadır. İ.a. ilaç infüzyonu daha çok intatümöral ilaç konsantrasyonunu artırmakta, tümör-ilaç teması süresini uzatma yönünde bir avantaj sağlamamaktadır [161]. Bu yöntemin ana sakıncaları olarak, özellikle infiltratif tümörün düzenli olmayan yapısı nedeniyle ilacın tümör içinde eşit bir şekilde dağılamaması ve uygulama bölgesinin (karotid arter) oftalmik artere yakın olması nedeniyle görme kaybı ve nörotoksik etkilerin görülmesi bildirilmiştir [162].

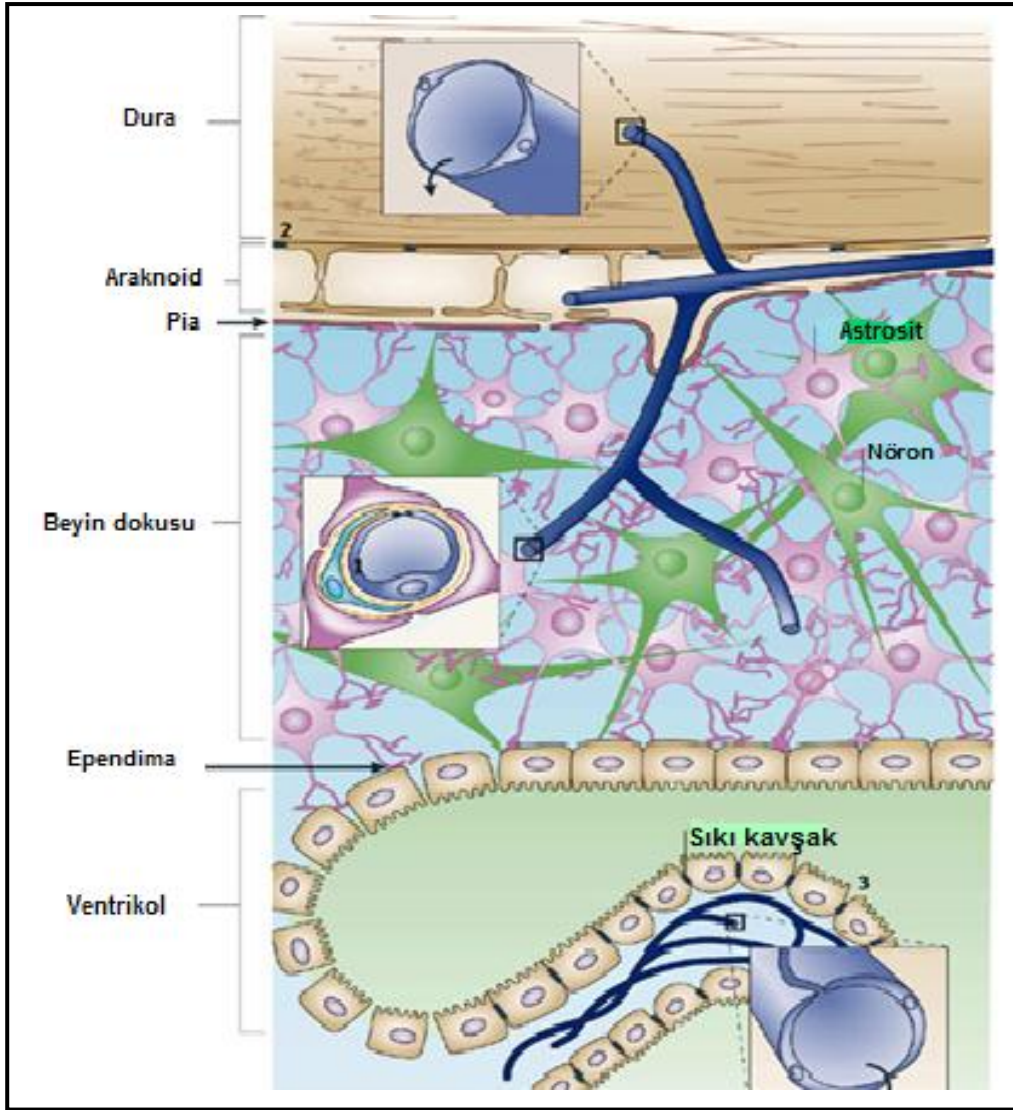
2.6. Kan Beyin Engeli (KBE)

KBE, beyin kapillerlerinin luminal yüzeyini oluşturan, sıkı kavşaklar (tight junctions) ile birbirine bağlanan endotel hücrelerinden meydana gelen bir engeldir [163] . Fenestrasyonların (endotel hücreleri arasında görülen boşluklar) bulunmaması, hücrelerarası sıkı kavşakların bulunması, pinositik veziküllerin azlığı ve çok sayıda mitokondri bulunması KBE'ni periferik endotelden farklı kılan özelliklerdir (Şekil 2.6) [164-166].

KBE'nin fonksiyonları:

- a) kan ile santral sinir sistemi (SSS) arasında besinlerin ve suda çözünen maddelerin serbest alış-verişini kısıtlamak,
- b) özel taşıma sistemleri aracılığı ile spesifik moleküllerin taşınmasını sağlamak,
- c) kan ve/veya beyin kaynaklı maddelerin modifikasyonu/metabolizasyonunu sağlamak, olarak sıralanabilir.

Beyin kapillerinde değişim genellikle transselüler yoldan olur. Pinositoz ve hücre içi geçiş yoktur. Bu nedenle sadece kapiller endotel membranından serbestçe difüze olabilen, yağda çözünebilir maddeler KBE'ni pasif olarak geçebilir. KBE'nin 12m² yüzey alanına ve toplamda 650 km uzunluğa sahip olmasına rağmen bariyer oldukça etkili olduğu için polar moleküller ve küçük iyonlar gibi yağda çözünmeyen maddelerin KBE'den geçişi pratik olarak imkansızdır. Bu nedenle terapötik değeri oldukça yüksek olan çoğu ilaç sistemik olarak kullanılmamaktadır [167].



Şekil 2.6. Kan Beyin Engeli (KBE)'nin şematik gösterimi [168].

Klinik gelişmelerde SSS'ye etki eden aday ilaçlar için geçiş çok düşük başarı oranına sahiptir [169]. KBE'yi geçişte düşük permeabiliteye sahip olduğu için aday ilaçların %98'inden fazlasının gelişimi devam etmektedir, bu da ilaç endüstrisi için önemli bir sorun oluşturmaktadır [170, 171]. Bunun üstesinden gelebilmek için, KBE'deki geçiş mekanizmalarının moleküler düzeyde anlaşılır hale getirilmesi ve daha sonra ilaç geliştirme aşamasında bu bilgilerin kullanılması gerekmektedir.

Beyin tümörlerinde KBE, kapillerlerin kısmi tahribi sonucunda vazogenik ödem ile sonuçlanan daha geçirgen bir hal alır [172]. Bununla birlikte bir ilacın KBE'den geçebilmesi için, lipidte çözünür olması, fizyolojik pH da iyonize olmamış durumda bulunması, düşük molekül ağırlıklı olması ve serum proteinlerine düşük oranda

bağlanması gerektiği bildirilmiştir. KBE'den ilaçların geçişinde lokal serebral kan akımı hızının da önemli olduğu bildirilmiştir [173].

2.6.1. KBE' ni Aşmak İçin Uygulanan Stratejiler

KBE'den ilaç taşınmasında çeşitli stratejiler mevcuttur, bunlar invaziv ve invaziv olmayan olmak üzere iki grup altında toplanabilir. İnvaziv teknikler kan-beyin engelinin bozulması ve direk ilaç enjeksiyonunu içermektedir. İnvaziv olmayan teknikler ise kendi arasında ikiye ayrılmaktadır, bunlardan birincisi, ön ilaç tasarımı ve lipidizasyon içeren kimyasal yoldur. KBE'den ilaç taşınmasında gelişmesini sürdüren bir platform olan invaziv olmayan ikinci yol ise, biyolojik temelli stratejidir [174].

2.6.1.1. İlaç Modifikasyonu

Düşük molekül ağırlıklı lipofilik ilaçlar transselüler difüzyon ile kolayca KBE' den geçebilmektedirler. KBE' den geçemeyen ilaçların lipofilik analoglarının hazırlanması önemli bir yaklaşımdır [175]. Griep ve ark. [176] fizyolojik pH larda iyonize durumda olan, plazma proteinlerine yüksek derecede bağlanan ve KBE'nden geçişi minimum olan klorambusilin'in karboksilik asit gruplarını maskeleyerek lipofilik ester formlarını hazırlamışlardır. Sıçanlara madde ve ester formlarının uygulanması sonucunda ester formlarının beyinde daha yüksek konsantrasyonda bulunduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca ön ilaç kullanımı da KBE' nin aşılması konusunda uygulanan yaklaşımlar arasındadır. Buna göre ilaç kimyasal bir madde ile bağlanarak lipofilik bir konjugat haline getirilir. Bu ön ilaç, beyin dokusuna ulaştığında redoks bazlı oksidasyon ya da esterazlar ile hedef doku olan beyinde hidroliz edilebilir. Bu sayede ön ilaç konjugatından kurtulan etkin madde serbest hale gelerek etkisini gösterebilir.

2.6.1.2. KBE' de Geri Dönüşümlü Açıklık Oluşturma

2.6.1.2.1.Ozmotik Yaklaşım

Hipertonik çözeltilerin ozmotik etkisi, beyine ilaç taşınımında geçici olarak KBE' nin açılması için kullanılmaktadır. Mannitol, arabinoz, dehidrokolat gibi maddelerin hipertonik çözeltilerinin uygulanması ile beyinde sıralanan endotel hücrelerin su kaybı ile büzülmesi ve sıkı kavşakların açılması sonucunda KBE' de açıklıklar meydana gelmektedir. Bu yolla farklı beyin tümörleri tedavi edilebilmektedir [177].

2.6.1.2.2. Biyokimyasal Yaklaşım

Lökotrienler, periferik kapillerlerin geçirgenliğini büyük ölçüde artıran maddelerdir. Normal beyin kapillerleri γ -glutamil transpeptidaz gibi periferik kapillerlerde bulunmayan ve C4 - D4 ve E4 – F4 lökotrienleri inaktive eden enzimlere sahiptir. Ancak beyin tümörü varlığında bu kapillerler söz konusu özelliklerini kaybeder ve C4 lökotrien infüzyonu uygulamasından sonra geçirgenliklerinde bir artış görülür [178, 179].

2.6.1.2.3. Polimerik İlaç Taşıyıcı Sistemlerin İmplantasyonu

KBE'nin aşılmasında diğer bir yaklaşım ilaç taşıyıcı polimerik sistemlerin geliştirilmesidir [180]. Bu sistemler ile KBE aşılarak lokal ilaç konsantrasyonu ve etkinliğinde artış ve ilacın sistemik toksisitesinde azalma sağlanmaktadır.

2.6.1.3. Nanopartiküllerin Beyin Tümöründe Uygulanmaları

Son yıllarda nanopartiküllerin beyin tümörlerinin teşhis, görüntüleme ve tedavisinde kullanılmaları üzerinde araştırmalar yoğun bir biçimde devam etmektedir [181].

Beyin tümörlerinin kemoterapisinde antikanser ilaç yüklü nanopartiküler sistemler, ilacın tümör dokusuna penetrasyonunu artırmaları ve sağlıklı dokularda görülebilecek yan etkileri azaltmaları nedeniyle klasik tedavilere üstünlük göstermektedirler [181].

2.6.1.3.1. İntravenöz uygulama

İntravenöz (i.v.) uygulamadan sonra nanopartiküller diğer tüm koloidal ilaç taşıyıcı sistemlerde olduğu gibi plazma proteinleriyle etkileşirler. Bu proses 'opsonizasyon' olarak adlandırılır. Hidrofobik yüzey özelliği taşıyan nanopartiküller plazma bileşenleri tarafından yabancı bileşenler olarak tanımlanırlar. Plazma bileşenleri, bu yabancı nanopartikülleri kandan uzaklaştırabilmek için yüzeylerini etkin bir şekilde kaplarlar ve bunun sonucunda karaciğer ile dalakta bulunan makrofajlar nanopartikül yüzeyindeki opsoninleri tanıyan özel reseptörleri sayesinde bu yapıları hızla dolaşımdan uzaklaştırılırlar. Bununla birlikte yeterince küçük ve hidrofilik yüzey özelliğine sahip nanopartiküller bu uzaklaştırmadan kaçabilir ve kan dolaşımında uzun süre kalabilir [182].

Beyin tümörlerinin tedavisinde i.v. olarak kullanılacak nanopartiküllerin KBE' ni geçerek tümör dokusuna ulaşabilmeleri için öncelikle uygulamadan sonra kan dolaşımında uzun süre kalabilmeleri gerekmektedir. Kanda dolaşım süresi uzatılmış nano boyutlu taşıyıcı sistem olarak kullanılacak nanopartiküllerin geliştirilmesi için özel bir şekilde tasarlanmaları gerekmektedir [182, 183].

2.6.1.3.2. Nanopartiküllerin sürfaktan ile kaplanması

Kreuter ve ark. [184] tarafından nanopartiküllerin KBE'nden geçişini artırmaya yönelik olarak yapılan bir çalışmada, dalarjin poli(bütilsiyanoakrilat) nanopartiküllerine adsorbe ettirilmiş daha sonra bu nanopartiküllerin üzeri bir sürfaktan (polisorbata-80) ile kaplanarak formülasyonlar hazırlanmıştır. Çalışmada, farelere dalarjinin tek başına i.v. olarak uygulandığında KBE'den geçemediği, geliştirilen nanopartikül içinde verildiğinde ise artan translokasyona bağlı olarak uygulamadan 45 dakika sonra analjezik etkinin gözlemlendiği bildirilmiştir. Polisorbat-80 kaplı nanopartiküllerin KBE'den geçiş mekanizması tam olarak aydınlatılamamakla beraber, maddenin deterjan özelliğinin sıkı kavşakları açtığı ve nanopartikül geçişini artırdığı bildirilmiştir [185, 186]. Benzer şekilde, literatürde KBE' den geçemeyen ilaçların polisorbata-80, poloksamer 188, poloksamer 407 gibi yüzey aktif madde (sürfaktan) kaplı nanopartiküllere adsorbe ettirilerek veya yüklenerek bu engelden geçişlerinin sağlandığı pek çok çalışmaya rastlanmaktadır [184-188].

Wohlfart ve ark. [189], antikanser bir ilaç olan doksorubisin yüklü, polisorbat 80 (Tween 80) kaplı poli(izohekzil siyanoakrilat) (PIHCA) nanopartikül formülasyonlarını hazırlamışlar ve beyin tümörü (glioblastom 101/8) oluşturulan sıçanlara i.v. olarak uygulamışlardır. Çalışmada, doksorubisin yüklü, polisorbat 80 kaplı PIHCA nanopartikülleri, doksorubisin çözeltisi ve boş nanopartikül formülasyonları uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında tümör hacminde 10 kata kadar daha fazla azalma sağladıkları bildirilmiştir.

Kulkarni ve ark [190] kumarin-6 ve doketaksiel yüklü PLGA nanopartiküllerini poloksamer 188, poloksamer 407 veya polisorbat-80 ile kaplamışlar ve hazırlanan formülasyonlarda bulunan ilaçların KBE' den geçişlerini değerlendirmişlerdir. Çalışmada kaplı olmayan gruplara göre, polisorbat-80 ve poloksamer 407 ile kaplı nanopartikül formülasyonlarının beyin dokusunda ilaç miktarını önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir. Bu çalışmaların ışığında nanopartiküllere uygulanacak bir kaplamanın (süfaktan) KBE geçişine yardımcı olması, intravenöz uygulamada kullanılan bir yaklaşım olmuştur.

2.6.1.3.3. Nanopartiküllerin Poli(etilen glikol) (PEG) ile konjugasyonu veya kaplanması

Nanopartiküllerin kan dolaşımında uzun süre kalabilmeleri için uygulanan yaklaşımlardan biri poli(etilen glikol)(PEG) gibi hidrofilik polimerler ile kaplanmaları veya kullanılan polimerlerin PEG ile ko-polimerize edilmeleridir (PEGilasyon). PEGilasyon işleminin nano boyutlu ilaç taşıyıcıları opsonizasyondan bunu izleyen kandan uzaklaştırma işleminden koruduğu bir çok araştırmada ayrıntılı olarak çalışılmıştır. PEG gibi esnek ve hidrofilik bir polimer ile nanopartiküllerin yüzeylerinin kaplanmasının bu sistemlerin etrafında konformasyonel bir bulutumsu tabaka oluşturduğu ve bu tabaka sayesinde nanopartiküllerin başka polimerik yapılarla (kan bileşenleri gibi) etkileşmesinin önüne geçildiği gösterilmiştir [191]. Bu sterik engelleme sayesinde kanda kalış süreleri uzatılmış olan nano boyutlu sistemlerin tümör dokularında birikimi arttırılabildiği [192].

Brigger ve ark. (2005) [192] tarafından yapılan bir çalışmada, poli(hekzadesilsiyanoakrilat) polimeri ile nanopartikül formülasyonları hazırlanmış ve PEG ile kaplanarak, etkinliği 9L gliosarkoma taşıyan sıçanlara i.v. uygulanarak

değerlendirilmiştir. Çalışmada kaplanmamış nanopartikül formülasyonları ile karşılaştırıldığında, PEG kaplı nanopartiküllerin dolaşımında çok daha uzun süre kaldığı ve tümör dokusunda 3 kat daha fazla biriktiği tespit edilmiştir.

Cole ve ark [193] tarafından glioblastomaların görüntülenmesine yönelik yapılan bir çalışmada, nişasta kaplı demir oksit nanopartiküllerinin dolaşımdan hızla uzaklaşmasını engellemek için yüzeylerine PEG zincirleri bağlanmış ve 9L gliom hücreleri ile beyin tümörü oluşturulmuş sıçanlara i.v. uygulanmaları sonucundaki beyinde birikme oranları tespit edilmiştir. Çalışmada PEG bağlanmamış nanopartiküllere göre PEG bağlı nanopartiküllerin beyinde 15 kat daha fazla bulunduğu tespit edilmiştir.

PEGilasyon nanopartiküllerin kanda kalış sürelerini uzatmanın yanısıra, hücrel alımlarının arttırılmaları konusunda da üstünlükler sağlamaktadır [194]. Kısaca PEGilasyon ile nanopartiküllerin yüzey modifikasyonu etkin maddelerin tümör dokularına ulaştırılmasında ve hücrel düzeyde alımlarının arttırılmasında uygulanan en önemli yaklaşımlardan birisidir.

2.6.1.3.4. Nanopartiküllerin Lipid/Lipid-PEG ile konjugasyonu veya kaplanması

Nanopartiküllerin KBE'ni geçişini arttırmak üzere uygulanan yaklaşımlardan biri de lipid veya lipid-PEG ile kaplanmalarıdır. Fenart ve ark.[195] tarafından yapılan bir çalışmada, 60 nm büyüklüğünde hazırlanan maltodekstrin nanopartikülleri anyonik, katyonik veya non-iyonik lipidlerle kaplanmış ve KBE'den geçişleri değerlendirilmiştir. Çalışmada anyonik veya katyonik lipid kaplı nanopartiküllerin kaplı olmayanlara göre KBE'den geçişi 3 veya 4 kat artırdığı bildirilirken, non-iyonik lipid ile kaplı formülasyonlarda geçişte kontrol grubuna göre herhangi bir değişiklik tespit edilememiştir.

Huang ve ark [196] demiroksit nanopartiküllerini hazırlamış ve katyonik lipid (DOTAP (1,2 dioleoil-3-(trimetilamonyum) propan) ve PEG ile modifiye edilmiş katyonik lipid (PEG-DSPE(poli(etilenglikol)-2000-1,2-distearil-3-sn-fosfatidil etanol-amin) karışımı (3:1 molar oran) ile kaplayarak formülasyonların insan servikal kanser (HeLa), insan prostatik adenokarsinom (PC-3), fare nöroblastom (Neuro-

2a) ve fare kolorektal adenokarsinoma hücrelerine alımlarını incelemiştir. Çalışmada kontrol grubuna göre kaplanmış nanopartiküllerin hücre içine alımlarının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

2.6.1.3.5. Nanopartiküllere katyonik yük kazandırılması

Nanopartiküllerin KBE'nden geçişini artırmak için literatürde yer alan yaklaşımlardan biri de nanopartiküllere katyonik yük kazandırmaktır. Bu yaklaşımın gerçekleştirilmesi için; biyouyumlu katyonik polimerler kullanarak nanopartikül hazırlanması, nanopartiküllerin katyonik maddelerle konjugasyonu veya kaplanması gibi yöntemler kullanılmaktadır [197, 198].

Agarwal ve ark [197] tarafından yapılan bir çalışmada, antikanser bir ilaç olan doksisisiklin yüklü katı lipid nanopartikülleri hazırlanmış ve katyonik sıgır serum albumini ile konjuge edilerek i.v. uygulamayı takiben KBE' den geçişi değerlendirilmiştir. Çalışmada koagülasyona tabi tutulmuş formülasyonların, tabi tutulmamış formülasyonlar ve serbest doksisisikline göre daha sitotoksik olduğu ve KBE'den çok daha yüksek oranda geçtiği tespit edilmiştir.

Chertok ve ark [198], beyin tümörlerinin tedavisi için hazırladıkları katyonik demiroksit nanopartiküllerinin yüzeyine heparin-PEG adsorpsiyonu sağlamışlar ve i.v. olarak sıçanlara uygulayarak KBE'den geçişlerini değerlendirmişlerdir. Çalışmada heparin-PEG adsorbe ettirilmiş nanopartiküllerin kontrol grubuna göre dolaşımda daha uzun süre kaldıkları ve tümörde iki kat daha fazla oranda biriktikleri bildirilmiştir.

2.6.1.3.6. Nanopartiküllerin beyin tümörüne spesifik hedeflendirilme ajanları ile konjugasyonu/kaplanması

Nanopartiküllerin KBE'ni geçişini artırmak ve sağlıklı dokulara zarar vermeden tümöre spesifik olarak hedeflenmesini sağlamak üzere literatürde; nanopartiküllerin tümör reseptörlerine hedeflendirilmesi, biyomimetik özelliklerde hazırlanmaları, antikor bağlı olarak hazırlanmaları, immünolojik ve genetik materyali içerecek şekilde hazırlanmaları gibi yaklaşımlar bulunmaktadır [199, 200].

Chang ve ark [201] tarafından yapılan bir çalışmada PLGA nanopartikülleri hazırlanmış ve albumin veya transferin proteinleri ile kaplanarak sağlıklı veya F98 glioma hücreleri ile beyin tümörü oluşturulmuş fare ve sıçanlardaki i.v. uygulama sonrası dağılımı değerlendirilmiştir. Çalışmada protein kaplamanın hem sağlıklı hem tümör taşıyan hayvanların plazmasında nanopartiküllerin uzun süre kalmasına neden olduğu ve transferin ile kaplı formülasyonların tümör taşıyan hayvanlarda glioma hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilen transferin reseptörü nedeniyle daha yüksek miktarda tümör dokusunda bulunduğu bildirilmiştir.

Guo ve ark [202] tarafından yapılan bir çalışmada paklitaksel yüklü PEG-PLGA nanopartiküllerinin yüzeyine bir DNA aptameri olan ve glioma hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilen AS1411 (Ap) konjuge edilmiş ve C6 glioma hücreleri ile beyin tümörü oluşturulmuş sıçanlarda i.v. uygulamadan sonraki dağılımı ve etkinliği incelenmiştir. Çalışmada, kontrol gruplarına göre, Ap konjuge edilmiş PEG-PLGA nanopartiküllerinin kan dolaşımında daha uzun süre kaldığı ve tümör bölgesinde yüksek miktarda bulunarak tümör hacminde etkin bir azalma ve sıçanların hayatta kalış sürelerinde önemli derecede artmaya neden olduğu bildirilmiştir.

2.6.1.3.7. İntratümöral uygulama

Beyin tümörlerinin birçoğu “solid/katı” tümörler olduğu için kemoterapötik ilaçlar KBE’ den geçerek tümör bölgesine ulaşsa bile, tümör içindeki dağılımları, avasküler yapı nedeniyle istenen etkinlikte olamamaktadır. Pekçok “solid” tümörde hücre popülasyonu damarlardan 100 µm veya daha fazla miktarda uzaklıkta olabilir, bu durum uzakta bulunan hücrelere besin, oksijen, ilaç gibi moleküllerin ulaşmasını sınırlamaktadır. Buna ilaveten, yüksek hücre dansitesi, artmış dokular arası basınç, hipoksi ve asidik pH, tümör bölgesine ulaşan ilaçların tümör içine penetrasyonunu, dağılımını ve hücre içine birikmesini yetersiz kılmaktadır [203]. Kemoterapötik ilaçların intratümöral olarak tümör merkezine uygulanması ile intravenöz uygulamaya göre tümör içindeki ilaç konsantrasyonu artırılabilir ve dağılımı iyileştirilebilir [204-206].

Beyin tümörlerinin bazılarının yerleşimi cerrahiye uygun bir konumda olmaz (görme, konuşma merkezlerinin yakınında olmaları veya çok derin yerleşimde olmaları) ve bu tür tümörlerin tedavisinde intratümöral kemoterapi uygulaması büyük önem taşımaktadır. Bu yöntemle, cerrahi olmayan bir teknikle (injeksiyon) tümörde yüksek miktarda ilaç bulunmasının sağlanması, tedavi için büyük avantajlar sağlamaktadır [206].

Literatürde beyin tümörlerinin tedavisi için mikropartiküler sistemlerin intratümöral olarak uygulandığı çalışmalara rastlanmaktadır [207]. Menei ve ark. [208], 5-Flourourasil (5-FU) yüklü PLGA mikrokürelere hazırlamışlar ve gliom taşıyan hastalara intrakaviter (tümörünün çıkarılmasını takiben oluşan kavite) olarak injekte ederek lokal radyasyon uygulamışlardır. Çalışmada kontrol grubuna göre tedavi uygulanan grubun 2 kat daha uzun ortalama hayatta kalış süresine sahip olduğu bildirilmiştir. Yine aynı grup[208] tarafından yapılan bir başka çalışmada, 5-FU yüklü PLGA mikrokürelere hazırlanarak, 9L hücreleri ile gliom oluşturulmuş sıçanlara intratümöral olarak uygulanmış ve boş mikroküre ve etkin madde çözeltisine göre artmış ortalama hayatta kalış süresi elde edildiği bildirilmiştir.

Literatürde nanopartiküler sistemlerin de beyin tümörlerinin tedavisinde intratümöral olarak uygulandığı çalışmalar bulunmaktadır [205, 209]. Allard ve ark [209], antikanser bir ilaç olan ferrosipenol yüklü lipid nanopartikül formülasyonlarını hazırlayarak 9L glioma hücresi ile tümör oluşturulmuş sıçanlara intratümöral olarak uygulamış ve etkinliğini değerlendirmişlerdir. Çalışmada kontrol gruplarına göre nanopartikül formülasyonları ile tümör hacminde daha fazla küçülme sağlandığı bildirilmiştir.

Roger ve ark [210] tarafından yapılan bir çalışmada ise kumarin-6 yüklü poli(laktik asit)(PLA) nanopartikülleri ve lipid nanopartiküller hazırlanarak mezenkimal kök hücrelere yüklenmiş ve intratümöral olarak U87MG hücreleri ile beyin tümörü oluşturulmuş farelere uygulanmıştır. Çalışmada nanopartikül yüklü hücrelerin tümör içinde etkin bir şekilde dağıldığı ve gliomların tedavisinde kullanılmak üzere ümit verici olduğu bildirilmiştir.

2.7. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü, hücrelerin kontrollü koşullar altında yaşatılmasına dayanan bir laboratuvar işlemidir. Tarihsel olarak hücre kültürü alanındaki gelişmeler doku ve organlardan elde edilen hücrelerin yaşatılması ve çoğaltılması için geliştirilen metodlara dayanmaktadır [210, 211].

Hücre kültürünün üstünlük ve sakıncaları aşağıdaki gibi özetlenebilir [212-214]:

Üstünlükleri:

- Canlı ortama göre fizikokimyasal koşulların (pH, sıcaklık, ozmotik basınç, oksijen ve karbondioksit kısmi basınçları) daha iyi kontrol edilmesi,
- Homojenitesinin kontrol edilebilmesi,
- İlaçların permeabilitesinin ve metabolizmasının hızlı değerlendirilmesi,
- Kontrollü koşullar altında ilaç absorpsiyon mekanizmasını çalışma imkanı,
- Ön ilaç, absorpsiyon artırıcı veya diğer farmasötik maddeler kullanarak ilaç absorpsiyonunu artırma yöntemlerinin hızlı değerlendirilmesi,
- İlaçların sitotoksitesini değerlendirme imkanı,
- Hayvan deneylerinde karşılaşılan yasal, ahlaki ve etik problemlerin giderilebilmesi olarak sıralanabilir.

Sakıncaları:

- Deneyim gerektiriyor olması,
- Aseptik şartlarda çalışılması gereği,

- Stabilité problemleri (çoğu sürekli hücre hattının stabil olmayan anoploid kromozomal bileşiminden kaynaklanan stabilite problemleri söz konusudur) olarak sıralanabilir.

2.7.1.Hücre Kültürünün Kullanım Alanları

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

- Viral aşular ve viral teşhis amaçlı,
- Monoklonal antikor, interferon, enzim, aşı, büyüme faktörü, interlökin gibi immunoregülatörler, hormon üretimi,
- Somatik gen tedavisi,
- Tümör tedavisi,
- Canlı hücrelerinin farklı amaçlarla kullanılması,
- Eritrositlerin transfüzyon amaçlı kullanımı,
- Kemik ilięi nakli,
- Kompleks üç boyutlu dokular, yapay deri, kıkırdak, karaciğer ve yapay pankreas.

Son zamanlarda çeşitli polimerik materyallerin hücre kültürü alanındaki kullanımları artmıştır. Nanopartiküllerin yüzeyine tutunarak üreyen hücreler sayesinde yüzey alanının artmasıyla küçük bir alanda daha fazla hücrenin üremesi ve bu sayede daha fazla ürün eldesi sağlanabilir. Bütün bu uygulamalarda kullanılacak olan materyallerin biyolojik olarak geçimli olması ve toksik olmaması gerekmektedir.

2.7.2. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

Hücre canlılığının değerlendirilmesi amacıyla aşağıdaki yöntemler kullanılabilir [215]

Hücre İçine Madde Sızması

Boyalar (tripan mavisi gibi) [216, 217], floresan maddeler (propidyum iyodür) kullanılarak yapılabilir. ATP yokluğunda pompalar çalışamayacağından ölü hücreler boyayı dışarı atamaz ve boyanırlar.

Sitoplazmik Enzimlerin Salımı

Sitoplazmik enzimlerden örneğin glutamat-bağımlı transaminaz veya laktat dehidrogenaz enziminin değerlendirilmesi ile hücre canlılığı tespit edilebilir [218].

Nükleotid Tutma Testi

Nükleotit (^3H -timidin, ^{125}I iyododeoksiüridin, ^{32}P fosfat, ^{14}C glukoz, ^3H amino asitler) [219, 220] tutma testi DNA sentezinin izlenmesiyle hücresel çoğalmanın izlenmesinde kullanılır. İşaretili timidin çoğalan hücrelerin replike olan DNA'sına inkorpore olur. Bu ölçüm maddelerin proliferatif veya sitostatik etkilerinin izlenmesini sağlar.

MTT Testi

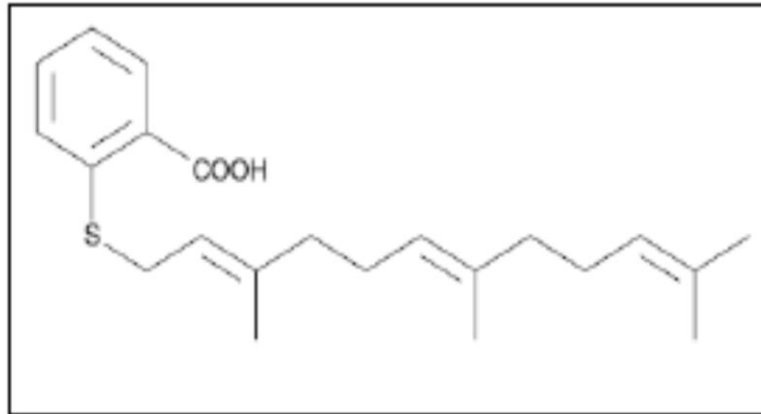
Çoğalma ve sitotoksosite çalışmalarında yaşayan hücre sayısını tespit için kullanılan, enzim aktivitesine dayalı kolorimetrik bir yöntemdir. Bu yöntem canlı hücrelerin renksiz ya da az renkli MTT (3,(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid)'yi, renkli formazan türevlerine dönüştürmesi esasına dayanır. Metot ilk kez 1983 yılında Mosmann tarafından immünolojik çalışmalar için hızlı bir kolorimetrik yöntem olarak tanımlanmıştır[221, 222]. MTT (sarı) mitokondriyal süksinik dehidrogenaz enzimi tarafından çoğalan hücrelerde formazana (kırmızı-mor) dönüşür. Sadece indirgenen şekil (formazan) spektrofotometrik olarak ölçülebilir, bu nedenle orijinal boya ile herhangi bir girişim olmaz [223].

WST Testi

Bu test MTT testine çok benzer bir test olup, testte MTT yerine WST-1 terrazolyum tuzu (WST-1[2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazoli-um]) kullanılmaktadır.

2.8. Farnesil tiyosalisilik asit (Salirasib)

Salirasib (S-trans, trans-farnesil tiyosalisilik asit, FTS), malign tümörlerin çoğunda yüksek oranda bulunan Ras proteinlerinin spesifik inhibitörü olan bir ilaçtır (şekil 2.7). FTS, etanol, DMSO, dimetilformamid gibi organik çözücülerde çözünür (20 mg/mL). FTS, suda çözünürlüğü olmayan anti kanser bir maddedir, çözünürlüğünü sağlamak için öncelikle etanolde çözülüp tampon ile seyreltilmelidir. FTS'nin, etanol:pH 7.2 tamponu (1:1) karışımındaki çözünürlüğü 0.5 mg/mL'dir [224].



Şekil 2.7. FTS'in kimyasal yapısı[224].

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda FTS' nin in vitro hücre kültürlerinde gliomlara karşı etkili olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte Salirasib KBE' ni etkin konsantrasyonda geçememektedir [225].

Goldberg ve ark [226] tarafından yapılan bir çalışmada, FTA beyin tümörü taşıyan sıçanlara "convection enhanced delivery" (CED) tekniği ile intratümöral olarak uygulanmış ve kontrol grubuna göre tümör hacmini azalttığı bildirilmiştir. Yapılan literatür taramalarında FTS içeren nanopartiküler bir sisteme rastlanmamıştır.

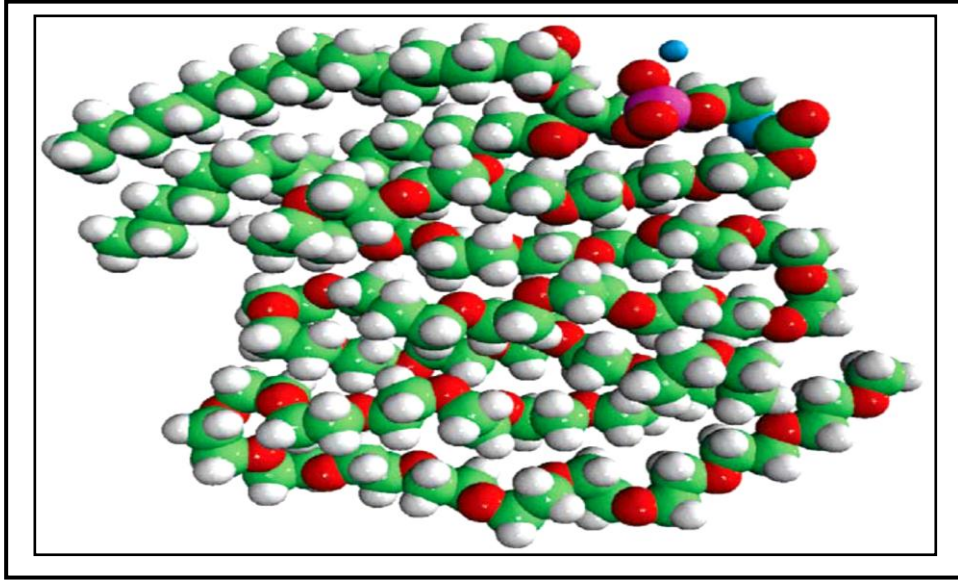
Beyin tümörlerinin etkin tedavisi için antikanser ilaçların tümör bölgesinde yüksek konsantrasyonda bulunması ve tümör ile temasının uzun süreli olması gerekmektedir. FTA'nın beyin tümörü tedavisinde uygulaması için literatürde in vivo çalışma sayısı sınırlı olup, bu çalışmalarda da tümör bölgesinde etkin miktarda bulunması CED tekniği (etkin maddenin bir katater yardımıyla, pozitif bir basınçla ve uzun sürede tümör içine verilmesi) ile sağlanmaktadır. CED tekniği, cerrahi bir işlem olması, işlem süresinin uzun olmasına bağlı olarak enfeksiyon riski, yüksek ilaç konsantrasyonuna bağlı olarak sağlıklı çevre dokularda toksisite riski gibi nedenlerden dolayı tercih edilmemektedir [227-229].

2.9. Poli(Etilen Glikol)-Lipid Konjugatları

Genellikle misel oluşturan amfifilik unimerler uzunluğu 1 – 15 kDa arasında değişen poli(etilen glikol) (PEG) zincirleri içerirler [230, 231]. PEG pahalı olmayan, düşük sitotoksisite gösteren, bir çok biyolojik aktif makromoleküllere karşı sterik koruma gösteren ve dahilen uygulama için yasal otoritelerden izin almış olan bir polimerdir [232-234]. PEG' e alternatif olarak bir çok farklı polimer seçeneği de kullanılmaktadır. Bunlar arasında poli(N-vinil-2-pirolidon) (PVP) [235], polivinil alkol [236]ya da polietilenimin ve poli(D,L-laktid-ko-glikolid) (PLGA) de yer almaktadır [237]. Fakat PEG halen seçenekler arasında en çok kullanılan ve üstünlükleri en çok olan polimer olarak yerini korumaktadır.

Bazı durumlarda, kısa ama bununla birlikte iki uzun zincirli yağ açıl grubu içeren son derece hidrofobik fosfolipidler kullanılarak, hidrofobik çekirdek yapısına sahip miseller de oluşturulabilir. Hidrofilik yapıdaki PEG zincirlerinin ucunda yer alan bu fosfolipidler alışlagelmiş amfifilik misellere oranla daha yüksek stabilite göstermeleri bakımından kullanılırlar. Yağ açıl zincirlerinin varlığı misel çekirdeğindeki hidrofobik polimer etkileşmelerini arttırmaktadır. Sonuçta PEG-diaçil lipid konjugatları, hidrofilik PEG zinciri ve kısa ama çok hidrofobik diaçil lipid kısmından ötürü amfifilik bir polimer gibi davranmaktadır.

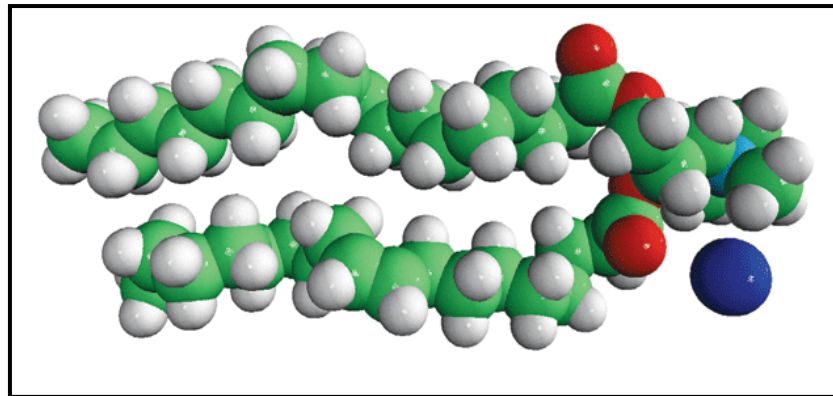
Bu özellikler sayesinde daha önce bahsedilen diğer ko-polimerler gibi sulu ortamda misel yapıları oluşturabilmektedirler. 1994 yılında 1,2-distearoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin-N- [metoksi (polietilen glikol)-2000] (amonyum tuzu) moleküllerinin (DSPEG-PE) bu özellikleri taşıdığı gösterilmiştir [238].



Şekil 2.8. 1,2–distearoil–sn–glisero–3–fosfoetanolamin-N- [metoksi (polietilen glikol)-2000] (amonyum tuzu) [230]

2.10. DOTAP

1,2-dioleoyil-3-trimetilamonyum-propan (DOTAP) pozitif yüklü (monokatyonik) bir lipiddir (şekil 2.9). Özellikle hücrelere etkin bir şekilde DNA taşınması için kullanılan bir lipid olan DOTAP, taşıdığı pozitif yük sayesinde, formülasyonunda yer aldığı taşıyıcıyı (Lipozom, nanopartikül, gibi) hem hücre içerisine etkin bir şekilde taşıyabilmekte, hem de DNA ile kompleks yapısı oluşturmasını sağlayan bir maddedir. Nanopartiküler sistemlerin yüzeylerinin modifikasyonunda PEG-DSPE ile birlikte kullanılarak sistemin pozitif yük kazanması ve hücre alımının artırılmasına neden olabilir [239, 240].



Şekil 2.9. 1,2-dioleoyil-3-trimetilamonyum-propan (DOTAP) [240].

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

| | |
|---|------------------------------------|
| Asetik asit | Merck, Almanya |
| Asetonitril (HPLC grade) | Sigma Aldrich, ABD |
| 1,2–distearoil–sn–glisero–3–fosfoetanolamin-N-[metoksi (polietilen glikol)-2000] (amonyum tuzu) | Avanti, ABD |
| Lesitin (from egg yolk, Type XVI-E, ≥99% (TLC), liyofilize toz) | Avanti, ABD |
| “Dulbecco’s Modified Eagle’s / Ham’s F12” (DMEM/Ham’s F12) (1:1) | Biochrom AG, Almanya |
| Farnesil tiyosalisilik asit (FTS) | Concordia Pharmaceuticals Inc, ABD |
| Fetal sığır serumu (FBS) | Biochrom AG, Almanya |
| Fosfat tamponu tuzu (PBS) | Biochrom AG, Almanya |
| Metanol (HPLC grade) | Sigma Aldrich, ABD |
| MTT | Sigma, ABD |
| L-glutamin | Biochrom AG, Almanya |
| 1,2-dioleoyil-3-trimetilamonyum-propan (DOTAP) | Avanti, ABD |
| Penisilin/Streptomisin (10000U/10000µg/mL) | Biochrom AG, Almanya |
| PLGA (50:50) (Resomer RG 503) | Boehringer-Ingelheim, Almanya |
| PLGA (85:15) (Resomer RG 753 S) | Boehringer-Ingelheim, Almanya |
| PBS içinde, Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺ içermeyen | Biochrom AG, Almanya |

Tripan mavisi (tripan blue)

Sigma, ABD

Nil kırmızı (nile red)

Biochrom AG, Almanya

Tripsin – EDTA çözeltisi

Biochrom AG, Almanya

WST-1

Clontech, ABD

3.1.2. Kullanılan Aletler

| | |
|-----------------------------------|--|
| Diferansiyel Taramalı Kalorimetre | DSC Q 100TA Instruments, ABD |
| ELISA Okuyucu | ASYS-UVM 304, Avusturya |
| Erime Derecesi Tayin Cihazı | Thomas Hoover Melting Point Apparatus, ABD |
| Floresan Mikroskop | Leica, ABD |
| FT-IR Spektrometresi | FT-IR 420 Spec, ABD |
| Hassas Terazı | Shimadzu AX 200, Japonya |
| HPLC Sistemi | Agilent 1100 Series, Almanya |
| HPLC Kolon | Waters Spherisorb S10 ODS2 C18 200 x 4.6 mm, ABD |
| Hücre Kültürü için Flask | Greiner bio-one, Almanya |
| Hücre Kültür Kuyucukları | Greiner bio-one, Almanya |
| Işık Mikroskobu | Leica, Almanya |
| İnkübatör | Sanyo MCO-18AIC, Japonya |
| Laminar Hava Akımlı Kültür Kabini | BHG 2000 S/D, D: Grou Company, Almanya |
| Liyofilizatör | Heto PowerDry PL 3000, Danimarka |
| Manyetik Karıştırıcı | Heidolph, Almanya |
| Manyetik Karıştırıcı | Variomag, Almanya |
| Membran Filtre | Millipore, ABD |
| Mikropipet | Eppendorf, Almanya |

| | |
|---|---------------------------------------|
| pH metre | Sartorius, Almanya |
| Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli Ölçüm Cihazı | Zetasaizer Nanoseries ZS, Malvern |
| Santrifüj, soğutmalı, değişken rotorlu | Hermle Z383 K, Almanya |
| Su Banyosu | SBD 300, Şimşek Labor Teknik, Türkiye |
| Steril Pipet | Greiner bio-one, Almanya |
| Steril Santrifüj Tüpü | Greiner bio-one, Almanya |
| Taramalı Elektron Miroskobu | Joel-SEM-ASID 10, Japonya |
| Ultra Saf Su Sistemi | Simplicity 185-Millipore, ABD |
| Ultrasonik Prob | Bandelin D-12207, Almanya |
| Ultrasonk Banyo | Branson B 220 Smith Kline, ABD |
| UV Spektrofotometresi | UV-1800, Shimadzu, Japonya |

3.2. YÖNTEM

3.2.1. FTS'in Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

3.2.1.1. UV Spektrumu

FTS'in asetonitril içinde hazırlanan 25 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisinin 200-700 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alınmış ve çözeltinin gösterdiği λmaks değeri tespit edilmiştir.

3. 2.1.2. FT-IR Spektrumu

Yaklaşık 2 mg FTS 400 mg potasyum bromür ile karıştırılmıştır. Homojen hale getirilen karışım, 10000 kg/cm³lük hidrolik basınç yardımı ile 5 dakika süre ile sıkıştırılıp, oluşan disklerin FT-IR spektrumları FT-IR spektroskopisi JASCO 420 (Japonya) kullanılarak 500-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında çekilmiştir.

3. 2.1.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

FTS'in DSC termogramı, Mettler-Toledo (Fransa) aleti kullanarak alınmıştır. Örnekler, alüminyum örnek kaplarına yerleştirilmiş ve ısıtma hücresine konmuştur. 50-400 °C sıcaklık aralığında, azot atmosferi altında, dakikada 10°C sıcaklık artış uygulanarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Farnesil Tiyosalisilik Asit' in HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) ile Miktar Tayini Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu

FTS' nin HPLC ile miktar tayininin gerçekleştirilmesi için Shimek ve ark. [241] tarafından geliştirilen metod modifiye edilerek kullanılmıştır. FTS' nin miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar Çizelge 3.1' de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1. FTS miktar tayininde kullanılan HPLC yönteminin parametreleri [241].

| | |
|-------------------------|---|
| Mobil faz | Asetonitril:Su:Asetik asit (90:10:0.1) |
| Enjeksiyon hacmi | 100 µL |
| Akış hızı | 1 mL/dak. |
| Dedektör | UV dedektör |
| Dalga boyu | 322 nm |
| Sıcaklık | 25°C |
| Analitik kolon | C18, 5µm, 4,6x250 mm |

3.2.2.1. Kalibrasyon Doğrusu

FTS' nin kalibrasyon doğrusunun elde edilmesi için, etkin maddenin asetonitril içerisinde 1 mg/mL konsantrasyonda birinci ana stok çözeltisinden hareketle 100 µg/mL konsantrasyonda ikinci stok çözeltisi ve bu stok çözeltiden hareketle 25 µg/mL konsantrasyonda üçüncü stok çözeltisi hazırlanmıştır (n=6). Üçüncü stok kullanılarak 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.781, 0.390, 0.195, 0.097 µg/mL konsantrasyonda FTS içerek şekilde asetonitril ile gerekli seyretmeler yapılarak 9 farklı seri oluşturulmuştur. Kalibrasyon doğrusu, çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı elde edilen pik alanları kullanılarak çizilmiştir.

3.2.2.2. Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, analizi yapılacak maddenin tayininde kullanılacak olan analitik yöntemin belirlenen koşullarda doğru, özgün ve tekrarlanabilir olduğunu garanti etmek için uygulanan prosedürdür. Metod validasyonu, kullanılan analitik yöntemin güvenilirliğinin teminatıdır [242]. HPLC analitik metodun değerlendirilmesinde aşağıdaki parametreler incelenmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak yorumlanmıştır.

- Doğrusallık (“Linearity”)
- Doğruluk (“Accuracy”)
- Kesinlik (“Precision”)
- Duyarlılık (“Sensitivity”)
- Özgünlük (“Specificity”)
- Tutarlılık (“Ruggedness”)/ Tekrar Uygulanabilirlik (“Robustness”)
- Stabilité (“Stability”).

3.2.2.2.1. Doğrusallık (“Linearity”)

Doğrusallık, bir analitik yöntemin belirli bir aralıkta, analizi yapılan maddenin konsantrasyonu ile deney sonuçlarının direk olarak orantılı olmasını sağlama yeteneğidir [243]. Bu amaçla etkin maddenin asetonitril içindeki 1 mg/mL konsantrasyonda birinci ana stok çözeltisinden hareketle 100 µg/mL konsantrasyonda ikinci stok çözeltisi ve bu stok çözeltiden hareketle 25 µg/mL konsantrasyonda üçüncü stok çözeltisi hazırlanmıştır (n=6). Üçüncü stok kullanılarak 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.781, 0.390, 0.195, 0.097 µg/mL konsantrasyonda FTS içerek şekilde asetonitril ile gerekli seyretmeler yapılarak 9 farklı seri oluşturulmuştur. Kalibrasyon doğrusu, çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı elde edilen pik alanları kullanılarak çizilmiştir.

3.2.2.2.2. Doğruluk (“Accuracy”)

Doğruluk, kullanılan analitik yöntem ile elde edilen deney sonuçlarının gerçek değerlere yakınlığını ifade eder. FTS’in miktar tayini için kullanılan yöntemin deney içi (intra-assay) ve deneylerarası (inter-assay) doğruluğunun değerlendirilmesinde aşağıda verilen formül kullanılmıştır (Formül 3.1) [244].

$$\text{Doğruluk} = \frac{\text{Ortalama tayin edilen konsantrasyon} - \text{İlave edilen konsantrasyon}}{\text{İlave edilen konsantrasyon}} \times 100$$

(3.1)

Deney içi doğruluğun tespiti için kalibrasyon doğrusu yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 25, 0.780 ve 0.097 µg/mL), her bir konsantrasyondan altı adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı gün içinde arka arkaya ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Ortalama bağıl hata değerleri tespit edilmiştir.

3.2.2.2.3. Kesinlik (“Precision”)

Kesinlik, bir analitik yöntemin tekrarlanabilirlik derecesinin ölçümü olarak tanımlanır [243]. Spesifik analiz koşulları altında elde edilen bağımsız analitik sonuçlar arasındaki uyumun derecesidir. Kesinlik, yalnız tesadüfi hataların dağılımı ile ilişkilidir, gerçek değerlerle ilgisi yoktur. Bir analitik yöntemin kesinliği, istatistiksel açıdan yeterli değerlendirmenin yapılacağı sayıda, aynı konsantrasyonda numune ardı ardına ölçülerek, örnekler için varyasyon katsayısı (VK) hesaplanarak değerlendirilir. Kesinlik, tekrarlanabilirlik (“repeatability”) ve tekrar elde edilebilirlik (“reproducibility”) olarak ifade edilir [245].

3.2.2.2.3.1. Tekrarlanabilirlik (“Repeatability”)

Kullanılan analitik yöntemin farklı deney zamanlarında güvenilirliğinin kanıtlanması için yapılmaktadır.

Analitik yöntemin tekrar edilebilirliğinin tespiti için, kalibrasyon çalışmalarında hazırlanan çözeltilerden orta konsantrasyon 3.12 µg/mL seçilmiş ve bu konsantrasyondaki standart çözeltinin arka arkaya altı kez HPLC analizi yapılmıştır. Elde edilen konsantrasyon değerlerinin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. Analitik yöntemin tekrar edilebilirliğinin uygunluğunun gösterilmesi için varyasyon katsayısının %2’den küçük olması gerekmektedir. [243].

3.2.2.2.3.2. Tekrar Elde Edilebilirlik (“Reproducibility”)

Aynı konsantrasyondaki çözeltiden hareketle, aynı laboratuvar, aynı analist ve aynı cihaz kullanılarak gerçekleştirilen ölçümlerde uyum ve uygunluk incelenir. Dört farklı derişim düzeyinde uygun sayıda bağımsız çözeltiler kullanılarak aynı gün ve farklı günlerde yapılır.

Tekrar elde edilebilirliğin tespiti için kalibrasyon doğrusunda yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 25, 0.780 ve 0.097 µg/mL) her bir konsantrasyondan altı adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve tayin edilmiştir.

Tekrar elde edilebilirliğin değerlendirilmesinde, pik alanlarına karşılık gelen derişimler için varyasyon katsayısı değerleri hesaplanmıştır. Analitik yöntemin tekrar edilebilirliğinin uygunluğunun gösterilmesi kesinlik çalışmalarında VK % 2’ den küçük olmalıdır [245].

3.2.2.2.4. Duyarlılık (“Sensitivity”)

3.2.2.2.4.1. Saptama Sınırı (“Limit of Detection”)

Analizi yapılan maddenin kalitatif olarak saptanabildiği en düşük konsantrasyondur. Bu değer, sinyal:gürültü oranının 3:1 olduğu konsantrasyon ile ifade edilir.

3.2.2.2.4.2. Miktar Tayin Sınırı (“Limit of Quantitation”)

Analitik yöntemin belirlenen şartlarında, analizi yapılan maddenin kabul edilebilir kesinlik ve doğruluk ile tayin edilebildiği en düşük konsantrasyon olarak tanımlanır. Bu değer, sinyal:gürültü oranının 10:1 olduğu konsantrasyon ile ifade edilir [243, 244].

3.2.2.2.5. Özgünlük (“Specificity”)

Bir analitik yöntemin özgünlüğü; ortamda bulunan etkin madde dışındaki yardımcı maddelerin, safsızlıkların veya parçalanma ürünlerinin varlığında, analiz edebilme yeteneğini göstermektir, sayısal olarak ifade edilmez. Bu ölçülerin değerlendirilmesine yönelik olarak formülasyonda kullanılan diğer maddelerin

(poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) (50:50), PLGA(85:15), DOTAP, DSPE-PEG, Lesitin) formülasyonda buldukları konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmış ve etkin madde ile aynı şartlarda pik verip vermediklerinin incelenmesi için HPLC kromatogramları alınmıştır. Ayrıca, ilaç yükleme ve in vitro salım çalışmalarında etkin madde yüklü nanopartikül formülasyonlarına uygulanan işlemler boş nanopartiküllere de uygulanarak HPLC kromatogramları elde edilmiştir [244].

3.2.2.2.6. Stabilite

FTS' nin deney süresince stabil kaldığının gösterilmesi amacıyla 400 ng/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri, (asetonitril ortamındaki) 37 °C'de karanlıkta 24 saat bekletilmiş ve analiz edilmiştir.

3.2.3. FTS Çözünürlük Çalışmaları

Çalışmamızda etkin madde olarak kullanılan FTS'nin, etanol, DMSO, dimetilformamid gibi organik çözücülerde çözündüğü (20 mg/mL), suda çözünürlüğünün olmadığı ve etanol:pH 7.2 tamponu (1:1) karışımındaki çözünürlüğünün 0.5 mg/mL olduğu bildirilmiştir.

Etkin madenin çözünürlük sorununun özellikle in vitro salım ve hücre kültürü çalışmalarında zorluklar yaşanmasına neden olacağı düşünüldüğünden, in vitro salım ortamı ve hücre kültürü ortamı olarak kullanılacak ortamlardaki çözünürlüğünün tespit edilmesine karar verilmiştir.

Buna göre çözünürlük çalışmaları için üç farklı ortam: PBS (pH 7.4); %0.1 (a/h) Tween 20 içeren PBS (TPBS); %10 (h/h) fetal sıgır serumu (FSS) ve %0.1 DMSO (h/h) içeren PBS hazırlanmıştır. Bu çözeltiler amber renkli viallere alınarak her bir vialde fazlası üzerinden 1 mg FTS eklenmiştir. Daha sonra karışım manyetik karıştırıcıda, 37°C' de 12 saat boyunca karıştırılmış ve 12 saatin sonunda örnekler alınarak zaman kaybetmeden 0.2 µm' lik filtrelerden süzölmüş ve Bölüm 3.2.2' de verilen HPLC yöntemine göre analiz edilmiştir.

FTS' in olası in vitro salım ortamlarında kimyasal stabilitesinin incelenmesi için HPLC ile 72 saatlik analiz gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla TPBS ve %10 FBS ile %0.1 DMSO içeren PBS ortamlarında FTS' in 3.6 µg/mL' lik çözeltileri

hazırlanmıştır. Bu çözeltiler kapalı kaplarda, ışıktan uzakta, 37°C' lik çalkalayıcı su banyosuna yerleştirilmişlerdir. Bu çözeltilerden 18, 24, 48 ve 72. saatlerde örnekler alınmış ve süzöldükten sonra HPLC ile analizleri yapılmıştır. Bu analizler sonucunda ortamda parçalanmadan kalan FTS miktarı bulunarak başlangıç miktarına göre %' si bulunmuştur.

3.2.4. Nanopartikül Formülasyon Çalışmaları

3.2.4.1. Hibrit Nanopartiküllerin Hazırlanması

Literatürde nanopartiküllerin KBE'ni geçişini artırmak üzere uygulanan yaklaşımlardan birinin de lipid veya lipid-PEG ile kaplanmaları olduğu bildirilmiştir [196, 246]. Bu nedenle tez çalışmamızda, formülasyonlarda polimer olarak PLGA 50:50 veya 85:15 kopolimer oranında kullanılırken, lipid-PEG konjugatı olarak 2000 Da'luk PEG zinciri içeren 1,2-distearoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin-N-[metoksi (polietilen glikol)-2000] (amonyum tuzu) kopolimeri (DSPE-PEG) kullanılmıştır.

PLGA-DSPE-PEG hibrit nanopartikülleri emülsiyon sonikasyon yöntemi ile (Şekil 3.1) hazırlanmıştır [247].

Nanopartikül formülasyonları geliştirilirken öncelikle ön formülasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar çerçevesinde, farklı miktar ve oranlarda su ve organik faz kullanılarak; farklı güç ve sürede sonikasyon uygulanarak optimum partikül büyüklüğü elde edilmeye çalışılmıştır. Optimum partikül büyüklüğü ve dağılımının elde edildiği formülasyon oranları kullanılarak ilaç yüklü formülasyonlar hazırlanmış ve ileri karakterizasyon çalışmalarına geçilmiştir.

PLGA-PEG-PE hibrit nanopartiküllerinin hazırlanması için, PLGA asetonitrilde çözülerek (2,5 µg/mL) organik faz hazırlanmıştır. FTS içeren formülasyonlarda formülasyondaki polimer oranının %5, %10 veya %20'si olacak şekilde FTS organik faza eklenmiştir. Sulu fazın hazırlanması için, lesitin ve DSPE-PEG ayrı ayrı %4 etanolde çözülmüş, daha sonra bu çözeltilerden belirli miktarlarda alınarak deiyonize su ile karıştırılarak sulu faz elde edilmiştir. Daha sonra, hazırlanan sulu faz organik faza ilave edilerek (10:1 oranında) kapalı bir flakon içine alınmış ve

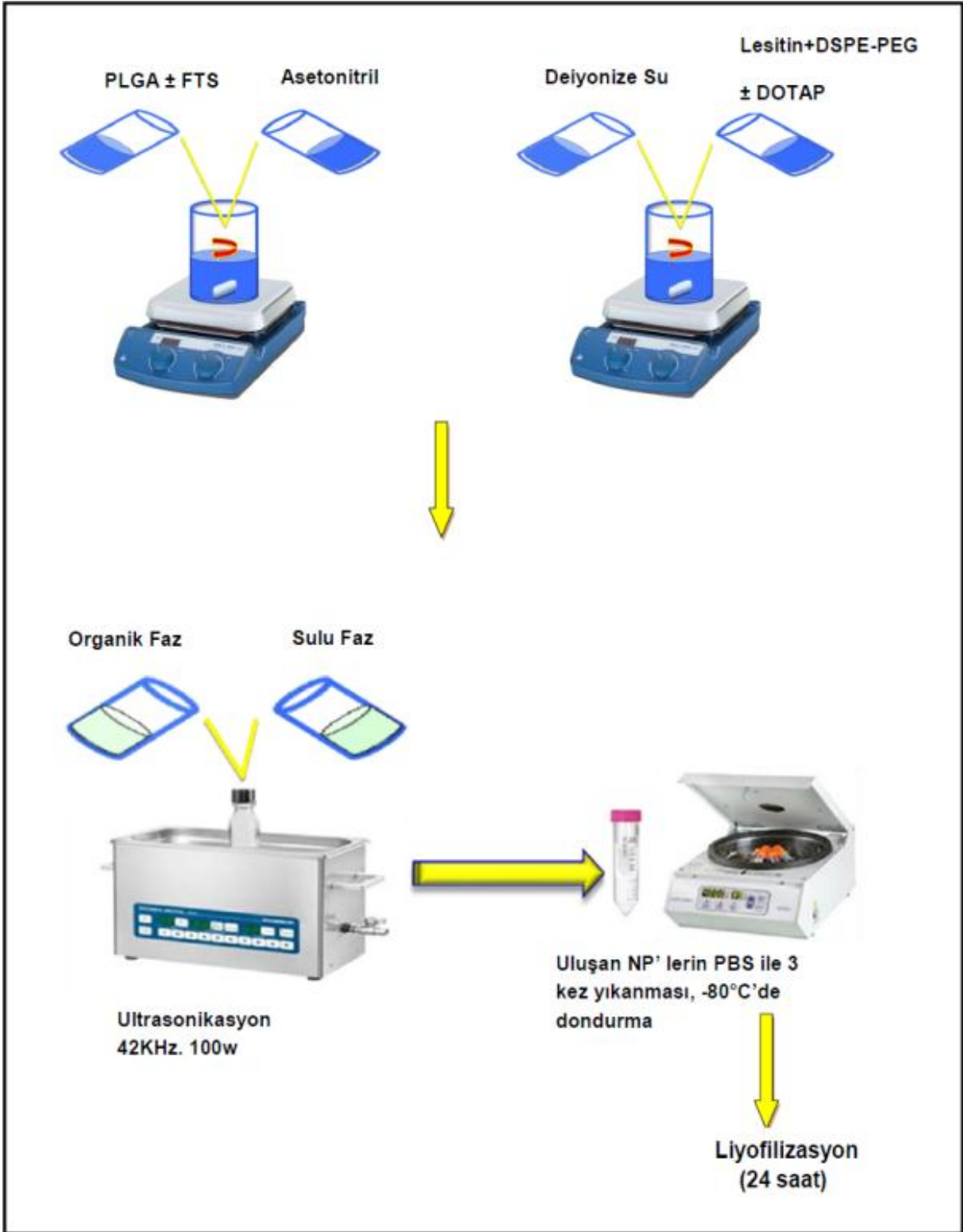
ultrasonik banyoda 5 dakika sonikasyona (42 kHz, 100 W) tabi tutulmuştur. Oluşan nanopartiküller 10 kDa' luk molekül büyüklüğü geçirgenliğine sahip membran içeren filtrelili santrifüj tüplerinde (Millipore, 10 kDa) santrifüj edilmiş ve tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) (pH 7.4) kullanılarak 3 kez yıkanmıştır. Elde edilen nanopartikül dispersiyonları -80 C° de dondurulmuş ve 24 saat liyofilize edilmiştir (Şekil 3.1).

3.2.4.2. DOTAP İçeren Hibrit Nanopartiküllerin Hazırlanması

1,2-dioleoyil-3-trimetilamonyum-propan (DOTAP) pozitif yüklü (monokatyonik) bir lipiddir. Literatürde yapılan çalışmalarda DOTAP'ın taşıdığı pozitif yük sayesinde, formülasyonunda yer aldığı taşıyıcıyı hem hücre içerisine etkin bir şekilde taşıdığı, hem de DNA ile kompleks yapısı oluşturmasını sağladığı bildirilmiştir. Buna ilaveten, literatürde KBE'nin nanopartiküller sistemlerle aşılmasına yönelik olarak yapılan araştırmalarda pozitif yüklü nanopartiküllerin bu engeli aşmada başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir [197, 248]. Bu nedenle, tez çalışmamızda hazırladığımız formülasyonlarda benzer bir katkı sağlayıp sağlamayacağını araştırmak üzere bazı formülasyonlara DOTAP ilave edilmiştir.

DOTAP içeren nanopartikül formülasyonları geliştirilirken öncelikle ön formülasyon çalışmaları yapılmıştır. Ön formülasyon çalışmaları sırasında farklı DOTAP/DSPE-PEG miktarları kullanılmıştır. Denemeler sonunda, DOTAP içermeyen formülasyonlarda elde edilen optimum partikül büyüklüğü ve dağılımına yakın değerler veren formülasyon oranları kullanılarak ilaç yüklü formülasyonlar hazırlanmış ve ileri karakterizasyon çalışmalarına geçilmiştir.

DOTAP içeren hibrit nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması için PLGA asetonitrilde çözülerek (2,5 µg/mL) organik faz hazırlanmıştır. FTS içeren formülasyonlarda formülasyondaki polimer oranının %5, %10 veya %20'si olacak şekilde FTS organik faza eklenmiştir. Sulu fazın hazırlanması için, lesitin, DSPE-PEG ve DOTAP ayrı ayrı %4 etanolde çözülmüş, daha sonra bu çözeltilerden belirli miktarlarda alınarak (Çizelge 3.2) deiyonize su ile karıştırılarak sulu faz elde edilmiştir. Daha sonra, hazırlanan sulu faz organik faza ilave edilerek kapalı bir flakon içine alınmış ve ultrasonik banyoda 5 dakika sonikasyona (42 kHz, 100 W)



Şekil 3.1. PLGA-PEG-PE hibrit nanopartikül formülasyonlarının (DOTAP içeren veya içermeyen) hazırlanmasının şematik gösterimi.

tabi tutulmuştur. Oluşan nanopartiküller 10 kDa' luk molekül büyüklüğü geçirgenliğine sahip membran içeren filtreli santrifüj tüplerinde (Millipore, 10 kDa) santrifüj edilmiş ve tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) (pH 7.4) kullanılarak 3 kez yıkanmıştır. Elde edilen nanopartikül dispersiyonları -80 C° de dondurulmuş ve 24 saat liyofilize edilmiştir (Şekil 3.1).

Çizelge 3.2. DOTAP içeren hibrit nanopartiküllerinin hazırlanmasında ön formülasyon çalışmalarından sonra seçilen formülasyon bileşen miktarları.

| Formülasyon | PLGA (µmol) | Lesitin (µmol) | DOTAP (µmol) | PEG-PE (µmol) |
|---------------------|-------------|----------------|--------------|---------------|
| PEG-PE | 0,015 | 0,017 | - | 0,07 |
| PEG-PE/DOTAP(50:50) | 0,015 | 0,017 | 0,143 | 0,035 |
| PEG-PE/DOTAP(75:25) | 0,015 | 0,017 | 0,072 | 0,053 |

3.2.5. Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonları Üzerinde Karakterizasyon Çalışmaları

3.2.5.1. Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli Analizi

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüklerinin ve zeta potansiyellerinin ölçülmesinde Malvern Zetasizer Nano Series ZS cihazı (İngiltere) kullanılmıştır. PBS içerisinde hazırlanan nanopartikül dispersiyonları tek kullanımlık ölçüm küvetlerine konmuş ve önce partikül büyüklükleri sonrasında da zeta potansiyelleri ölçülmüştür. Ölçümler üçer tekrarlı yapılmıştır.

3.2.5.2. Nanopartiküllere FTS Yükleme Etkinliğinin Değerlendirmesi

Nanopartikül formülasyonlarında bulunan FTS miktarının tespit edilmesi için, hassas bir şekilde tartılmış nanopartikül formülasyonlarına asetonitril ilave edilerek organik çözücünün nanopartikül yapısını parçalayarak içerdiği FTS' yi serbest hale getirmesi sağlanmıştır. Serbest halde FTS içeren çözelti 0.2 µm' lik filtrelerde süzölmüş ve HPLC kolonuna enjekte edilmiştir.

3.2.5.3. Nanopartiküllerin Yüzey Özelliklerinin Tayini

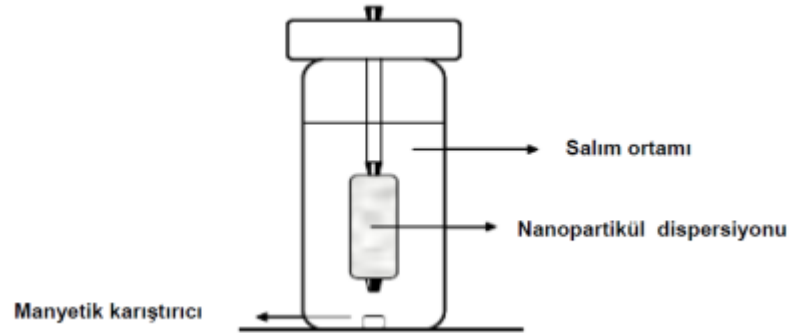
Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının yüzey özellikleri Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ve Atomik Güç Mikroskobu (AFM) kullanılarak tespit edilmiştir.

SEM incelemeleri için, hazırlanan örnekler, metal levhalar üzerine iki taraflı yapışkan bant ile tespit edilmiştir. Bu işlemin ardından, örnekler marka kaplama cihazında (BIO-RAD) 100 Å kalınlıkta altın ile kaplanmıştır. Kaplama işlemini takiben, örnekler (FEI Nova Nanosem 430, ABD), SEM ile görüntülenmiştir.

AFM değerlendirmeleri için nanopartiküller Q-Scope™ 350 Multimode Atomik Güç Mikroskopu-AFM (Questant-ABD) aleti ile görüntülenmiştir. Nanopartikül örnekleri iki taraflı yapışkan bant ile tespit edilerek görüntüleri alınmıştır.

3.2.5.4. İn vitro salım çalışmaları

İn vitro salım çalışmaları “Diyaliz Torbası Yöntemi” kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2) [249]. FTS’ nin çözünürlük çalışmaları sonucunda en yüksek çözünürlük gösterdiği ortam TPBS olarak bulunmuş ve bu ortamın in vitro salım ortamı olarak kullanılmasına karar verilmiştir. Çalışmalarda hibrit nanopartikül formülasyonlarından hassas bir şekilde tartılan miktarlar alınarak TPBS içinde disperse edilmiş ve elde edilen dispersiyon molekül büyüklüğü geçirgenlik sınırı (MWCO) 2000 Da olan diyaliz membranı içerisine yerleştirilmiştir. Kapaklı tüpler içerisine alınan bu diyaliz torbalarının üzerine 3 mL salım ortamı eklenmiştir. FTS’ nin çözünürlük çalışmasından elde edilen değerler dikkate alındığında sink koşullar sağlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan düzenek manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan (100 rpm), sıcaklığı 37°C’ ye ayarlanmış olan su banyosuna yerleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Nanopartikül formülasyonlarının in vitro salım çalışmalarında kullanılan düzeneğin şematik görünümü.

Çalışma sırasında, her örnek alma zamanında salım ortamının tümü alınmış ve tüp içerisine taze 3 mL salım ortamı eklenmiştir. Örneklerdeki FTS miktarı HPLC ile tespit edilmiştir. İn vitro salım çalışmalarına formülasyonlardan FTS salımı son bulana kadar devam edilmiştir.

3.2.6. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.2.6.1. FTS' in İn Vitro Biyoaktivitesinin Hücre Kültüründe Değerlendirilmesi

FTS' nin in vitro biyoaktivitesinin (sitotoksik etkisi) araştırılması amacıyla RG2 (rat glioma hücreleri) üzerinde çalışmalar yapılmıştır.

RG2 hücreleri için kültür ortamı olarak glukoz (4.5 g/L^{-1}), fetal sığır serumu (FBS) (% 10), L-glutamin ($0,584 \text{ g/L}^{-1}$), sodyum pirüvat ($0,11 \text{ g/L}^{-1}$), penisilin G sodyum (50 ünite/mL^{-1}) ve streptomisin sülfat ($50 \text{ } \mu\text{g/mL}^{-1}$) içeren "Dulbecco's Modified Eagle's" (DMEM) ortamı kullanılmıştır.

RG2 hücrelerinin deneylere hazırlanması için; -180°C ' de sıvı nitrojen tankında bulunan RG2 tümör hücreleri çıkarıldıktan sonra hava akımlı kültür kabininde, içinde kültür ortamı bulunan 25 cm^2 lik flasklara alınarak çoğaltılmışlardır. Daha sonra flasklar %5 CO_2 içeren 37°C ' lik inkübatöre yerleştirilmişlerdir. RG2 hücreleri

deney öncesi tripsin-EDTA çözeltilisi (%0.002 tripsin-%0.005 EDTA) ile iki dakika muamele edilerek hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan hücre süspansiyonuna kültür ortamı ilave edilerek 2000 rpm' de 5 dakika santrifüjlenmiş, süpernatant uzaklaştırılmış ve taze kültür ortamı ilave edilerek hücreler yeniden süspande edilmiştir. Tümör hücrelerinin canlılığı %0,5 tripan mavisi ile kontrol edilmiştir. Deneylerde büyüme fazındaki hücreler kullanılmıştır.

3.2.6.1.1. FTS' in Letal Doz 50 (LD50) Değerinin Belirlenmesi

FTS' nin RG2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi ve LD50 değerinin tespit edilmesi amacıyla, RG2 hücreleri kültür ortamı içinde düz tabanlı 96 kuyucuklu ve düz tabanlı kültür plaklarına (Castor, ABD), 5×10^3 hücre/100 μ L olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler kuyucuk yüzeylerine tutunmaları için 24 saat inkübasyona bırakılıp, 24 saat sonunda hücrelerin üzerindeki ortam uzaklaştırılmıştır. FTS'in suda çözünürlüğünün olmaması nedeniyle, hücre kültür çalışmalarında FTS %0.1 DMSO içeren kültür ortamı içinde çözülerek numuneler hazırlanmış [250] ve hücrelere uygulanmıştır. Ayrıca kontrol grubu olarak sadece % 0.1 DMSO içeren kültür ortamı hücrelere uygulanmıştır. Uygulama sonrasında plaklar 37°C' de % 5 CO₂ içeren inkübatöre konularak 72 ve 120 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Inkübasyondan sonra hücre canlılığı WST- 1(4-[3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolyo]-1,3-benzen disülfonat) ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için inkübasyon süresi sonunda WST-1 karışımı (Clontech, CA, ABD) 1:10 seyreltme olacak şekilde (10 μ L) kuyucuklara ilave edilmiştir. Plakalar 2 saat inkübatörde (37°C, % 5 CO₂) tutulmuş ve sonrasında mikropilaya okutucuda 440 nm'de absorbans okumaları yapılmıştır.

Sonuçlar değerlendirilirken, kontrol grubunun canlılığı %100 kabul edilerek karşılaştırılmalı olarak grafiklenmiş ve gerekli istatistiksel analizler yapılarak gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirilmiştir.

3.2.6.1.2. Nanopartikül Formülasyonlarının İn Vitro Biyoaktivitelerinin Değerlendirilmesi

Hazırlanan formülasyonların RG2 rat glioma hücreleri üzerindeki aktivitelerinin değerlendirilmesinde WST-1 (4-[3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolyo]-1,3-benzen disülfonat) yöntemi kullanılmıştır.

Çalışmamızda hücre kültürü deneylerine taşınacak formülasyonlar olarak, in vitro karakterizasyon bulguları göz önüne alınarak, PLGA 50:50 kopolimer oranına sahip (DOTAP içeren ve içermeyen) formülasyonlar seçilmiştir.

RG2 tümör hücreleri Bölüm 3.2.4.1.' de anlatıldığı gibi hazırlanmış ve kültür ortamı içinde 96 kuyucuklu düz tabanlı plaklara (Castor, ABD), 5×10^3 hücre/100 μ L olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler kuyucuk yüzeylerine tutunmaları için 24 saat inkübasyona bırakılıp, 24 saat sonunda hücrelerin üzerindeki ortam uzaklaştırılmıştır. Etkin madde final konsantrasyonu her bir kuyucukta 100 μ M olacak şekilde hazırlanan formülasyonlardan alınmış ve seyreltme işlemi %0.1 DMSO içeren kültür ortamı ile gerçekleştirilmiştir. Her bir formülasyon için dört kuyucukla çalışılmıştır. Her bir kuyucuk için kullanılan etkin madde içeren formülasyon miktarı ile aynı miktarda boş nanopartikül kullanılarak aynı işlemler yapılmıştır. Ayrıca kontrol grubu olarak sadece % 0.1 DMSO içeren kültür ortamı hücrelere uygulanmıştır. Uygulama sonrasında plaklar 37°C' de % 5 CO₂ içeren inkübatöre konularak 120 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda, WST-1 karışımı (Clontech, CA, ABD) 1:10 seyreltme olacak şekilde (10 μ L) kuyucuklara ilave edilmiştir. Plakalar 2 saat inkübatörde (37°C, % 5 CO₂) tutulmuş ve sonrasında mikroparka okutucuda 440 nm'de absorbans okumaları yapılmıştır.

Sonuçlar değerlendirilirken, kontrol grubunun canlılığı %100 kabul edilerek karşılaştırılmalı olarak grafikleştirilmiş ve gerekli istatistiksel analizler yapılarak gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirilmiştir.

3.2.6.2. Hücresel Alımın Değerlendirilmesi

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının hücresel alımlarını incelemek amacıyla, formülasyonlara floresan marker (Nil kırmızısı, Rodamin 123 ya da Rodamin B) yüklenerek, RG2 hücreleri ile muamele edilip, sonrasında örnekler H.Ü. Tıp Fakültesi Beyin Araştırmaları Laboratuvarı'nda bulunan Floresan Mikroskop (Nikon Microscope, Eclipse E600) ile incelenmiştir. Bunun için, formülasyonların hazırlama sırasında organik faza belirli bir mol oranında Nil kırmızı eklenmiş ve nanopartikül hazırlama yöntemine Bölüm 3.2.2.1' de açıklandığı şekilde devam edilmiştir. Daha sonra RG2 hücreleri, kültür ortamı içeren, 96 kuyucuklu düz tabanlı plakalar üzerinde büyütülüp konfluent hale geldikten sonra, nanopartikül formülasyonları ile 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir ve PBS ile yıkandıktan sonra numuneler floresan mikroskopta incelenmiştir [251].

3.2.7. İn Vivo Çalışmalar

3.2.7.1. İn Vivo Çalışmalarda Kullanılan Hayvanlar ve Anestezi

İn vivo çalışmaların gerçekleştirilmesi için H.Ü. Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu'ndan 2011/68-4 nolu izin alınmıştır (Ek-1). Çalışmalarda Yemişçi ve ark [252] ve Geletneky ve ark [253] tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bunun için 49 adet Wistar dişi sıçan (250-300 g) üzerinde çalışılmıştır. Sıçanlara anestezi amacıyla 2/3 oranda ketamin (100 mg/mL) ve 1/3 oranda ksilazin (10mg/mL) karışımı 0.75-1.5 mL/kg dozda intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

3.2.7.2. Sıçanlarda Beyin Tümörü Oluşturulması

Sıçanlarda beyin tümörü oluşturulması amacıyla Yemişçi ve ark [223] ve Geletneky ve ark [253] tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bunun için öncelikle tümör ekiminde kullanılacak olan RG2 hücreleri hazırlanmıştır. RG2 hücreleri için kültür ortamı olarak 37°C'de %5 CO₂'de glukoz (4.5 g/L⁻¹), fetal sığır serumu (FBS) (% 10), L-glutamin (0,584 g/L⁻¹), sodyum pirüvat (0,11 g/L⁻¹), penisilin G sodyum (50 ünite/mL⁻¹) ve streptomisin sülfat (50

$\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) içeren “Dulbecco’s Modified Eagle’s” (DMEM) kullanılmıştır. Hücreler deney öncesi tripsin-EDTA çözeltisi (%0.002 tripsin-%0.005 EDTA) ile iki dakika muamele edilerek hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan hücre süspansiyonuna kültür ortamı ilave edilerek 2000 rpm’ de 5 dakika santrifüjlenmiş, süpernatant uzaklaştırılmış ve taze kültür ortamı ilave edildikten sonra mikroskopta sayım yapılmış ve $5 \mu\text{L}$ ’ de 50×10^4 RG2 hücresi olacak şekilde numuneler ekim için hazırlanmıştır.

Sıçanlarda beyin tümörü oluşturmak için, öncelikle sıçanlar stereotaktik çerçeveye (Lab Standard Stereotaxic, Stoelting, Chicago, IL) yerleştirilmiştir. Kafa derisi açıldıktan sonra, 50×10^4 RG2 hücresi içeren $5 \mu\text{L}$ hücre süspansiyonu, $10 \mu\text{L}$ ’lik Hamilton cam şırınga (Hamilton, 32G, 700 seri RN) kullanılarak anteroposterior, -0.5 mm; lateral, +3.0 mm ve ventral, -6 mm koordinatları doğrultusunda sağ striatuma tek taraflı olarak enjekte edilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Sıçanların stereotaktik çerçeveye yerleştirilmesi ve RG2 hücrelerinin enjeksiyonu.

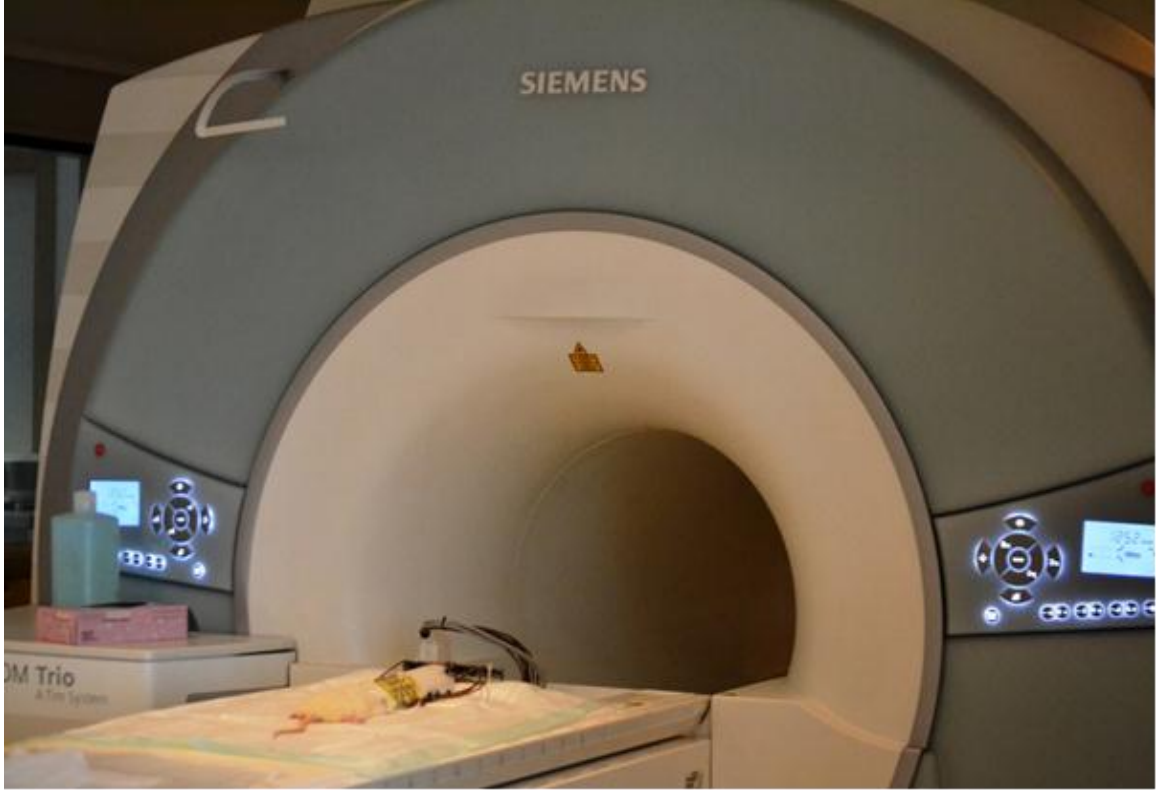
Sıçanlar RG2 hücre implantasyonunun ilk günden itibaren günlük aktivitelerinin ve genel durumlarının takibi amacı ile gözlem altına alınmıştır. Yapılan değerlendirmeler sonrasında etrafları ile ilgileri kesilen, kendi kendilerine beslenmeyen, gözleri kızaran ve dışarıdan verilen uyarılara yanıt vermeyen sıçanların yaşamlarına son verilmiştir.

3.2.7.3. Magnetik Rezonans Görüntüleme

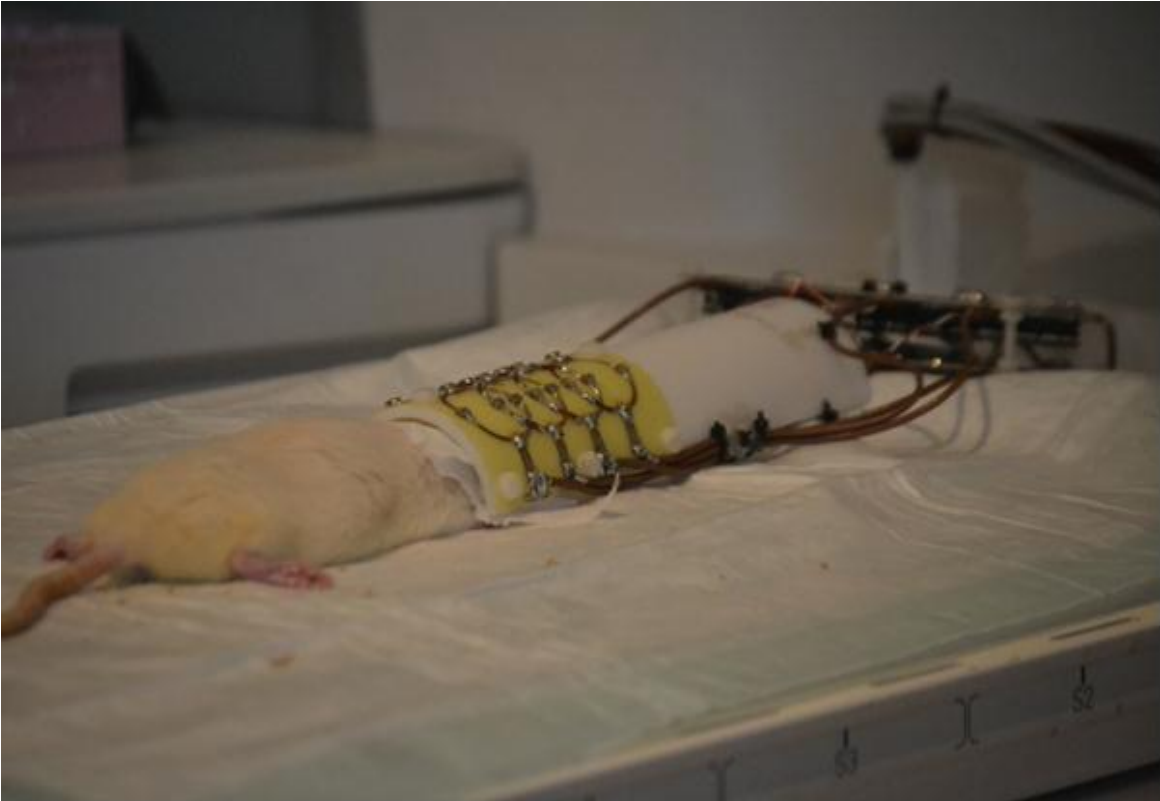
İn vivo deneylerde tümör oluşumunun tespiti ve alan olarak büyüklüğünün hesaplanması için Magnetik Rezonans Görüntüleme kullanılmıştır. Bunun için Bilkent Üniversitesi 'Ulusal Manyetik Rezonans Araştırma Merkezi (UMRAM)' nde bulunan MR görüntüleme cihazı görüntüleme (3Tesla, Magnetom Trio, Siemens, Almanya [slew rate:200mT/m/ms, maksimum amplitude 45mT/m]) kullanılmıştır.

Tümör hücresi ekimini takiben 10 gün sonra hayvanların ilk MR görüntülemesi yapılarak tümör oluşumunun tespiti ve alan ölçümü yapılmıştır (Şekil 3.4). Görüntüleme sırasında hayvanlara anestezi uygulaması yapılmış olup, küçük FOV ile görüntü elde edebilmek için bu çalışmada kullanılmak üzere UMRAM' da küçük sarmallar geliştirilmiş ve kullanılmıştır (Şekil 3.5).

MR görüntülemesi için, 2 mm koronal düzlemde çekim sayısı (NEX: 5), T2A (TR/TE; 3900/100ms) koronal görüntüler elde edilmiştir. Görüntülerin değerlendirilmesi ve tümör alanının tespiti Prof.Dr. Kader Karlı Oğuz (Hacettepe Üniversitesi Radyoloji Anabilim Dalı) tarafından gerçekleştirilmiştir. Ölçümler tümörün en büyük görüldüğü kesit üzerinde en büyük çaplar üzerinden gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4. Sıçanların MR görüntülemesi.



Şekil 3.5. MR görüntülemesi için UMRAM'da geliştirilen FOV.

3.2.7.4. Sıçanlara Tedavi Gruplarının Uygulanması

Sıçanlara tümör ekiminden 10 gün sonra ilk MR görüntülemesi yapılarak tümör oluşumu tespit edilmiş ve alan hesabı yapılmıştır. Tedavi gruplarının uygulanacağı ileri aşamalara tümör büyüklüğü 15-30 mm² arasında olan sıçanlar alınmıştır. Tedavi grupları tümör tespiti ve ölçümü ile aynı gün hayvanlara uygulanmıştır.

İn vivo deneylerde, tedavide uygulanan formülasyonların (ilaç çözeltisi, boş veya dolu hibrit nanopartiküller, tedavi olmayan grup (kontrol)) etkisinin değerlendirilmesinin yanında uygulama yolunun da etkisinin değerlendirilebilmesi için, sıçanlara intravenöz (kuyruk venine uygulama) veya intratümöral uygulama yapılmıştır (şekil 3.6).

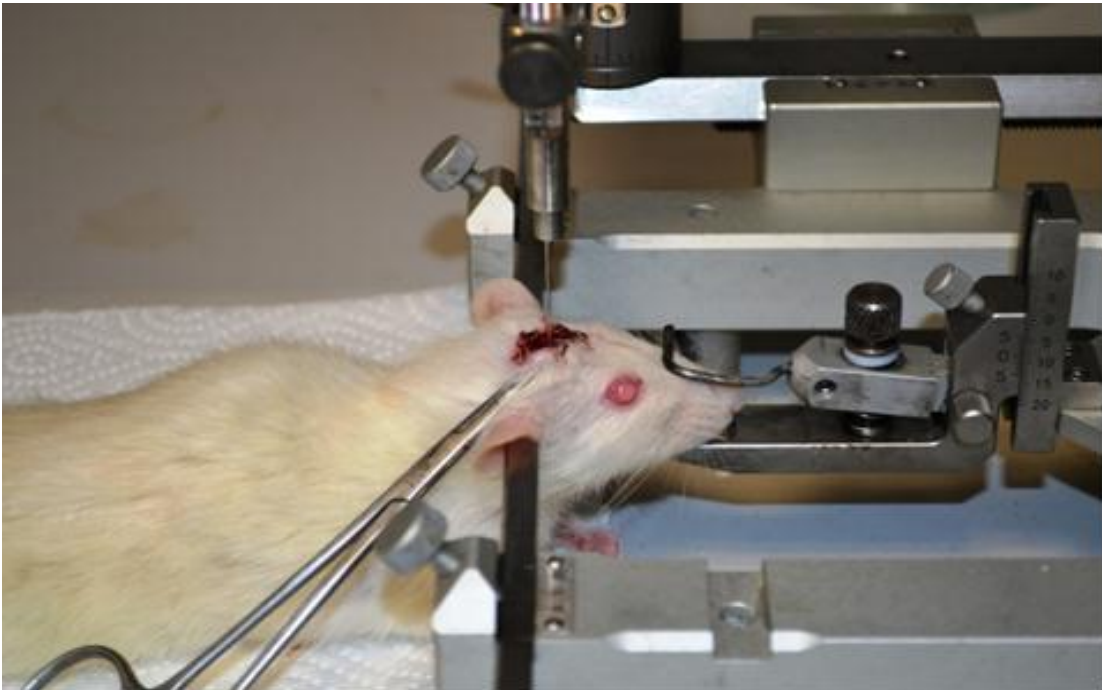
Hazırlanan formülasyonlar hayvanlara verilmeden önce steril kabin içinde UV ışığı altında 30 dakika tutularak sterilize edilmiştir [253].

Tedavi dozu tüm gruplarda aynı tutulmuştur. Tedavi dozunun belirlenmesinde hücre kültürü çalışmalarında elde edilen LD50 değeri temel alınmıştır. Bunun için, hücre kültürü LD50 deneylerinden elde edilen değer olan 100 µM FTS'i içerecek şekilde formülasyonlar ve etkin madde çözeltisi hazırlanmış ve tedavide uygulanmıştır. Uygulanan hacim intratümöral ve intravenöz uygulamalar için aynı (20 µL) tutulmuş olup bu miktar özellikle intratümöral uygulamalar için sıçanların tolere edebileceği maksimum miktar olarak ön denemelerde tespit edilmiştir.

Tedavi uygulamaları için gruplar şu şekilde planlanmıştır.

- A) Tümör görüntülemesinden sonra hiçbir tedavi uygulanmayacak grup (n= 6)
- B1) Tümör görüntülemesinden hemen sonra boş (FTA içermeyen) hibrit PLGA nanopartiküllerinin intratümöral uygulanacağı grup (n= 6)
- B2) Tümör görüntülemesinden hemen sonra dolu (FTA içeren) hibrit PLGA nanopartiküllerinin intratümöral uygulanacağı grup (n= 6)
- B3) Tümör görüntülenmesinden hemen sonra nanopartikül grupları ile aynı miktarda FTA içeren etkin madde çözeltisinin intratümöral uygulanacağı grup (n= 6)

- C1) Tümör görüntülenmesinden hemen sonra boş (FTA içermeyen) hibrit PLGA nanopartiküllerinin intravenöz (kuyruk veni) uygulanacağı grup (n= 6)
- C2) Tümör görüntülenmesinden hemen sonra dolu (FTA içeren) hibrit PLGA nanopartiküllerinin intravenöz (kuyruk veni) uygulanacağı grup (n= 6)
- C3) Tümör görüntülenmesinden hemen sonra nanopartikül grupları ile aynı miktarda FTA içeren etkin madde çözeltisinin intravenöz (kuyruk veni) uygulanacağı grup (n= 6)



Şekil 3.6. Stereotaksiye yerleştirilen sıçana nanopartikül süspansiyonu uygulanması.

3.2.7.5. Sıçanlarda Tedavi Sonrası Yapılan Değerlendirmeler

3.2.7.5.1. MR Görüntüleme ile Tümör Büyüklüğünün Tespiti

Bölüm 3.2.7.3 'de belirtildiği üzere, sıçanlara tümör hücresi ekiminden 10 gün sonra MR görüntüleme yapılarak oluşan tümörün başlangıç büyüklüğü tespit edilmiştir. Bu işlemi takiben, uygun büyüklükte tümör taşıyan hayvanlar gruplara ayrılarak tedaviler uygulanmıştır (kontrol grubuna uygulanmayarak). Sıçanlara

uygulanan tedaviden 5 gün sonra tekrar MR görüntüleme yapılarak tedavi sonrası tümör alanındaki değişim tespit edilip, başlangıçtaki büyüklüğü ile karşılaştırma yapılmıştır.

3.2.7.5.2. Histolojik Değerlendirme

Sıçanlarda MR ile tespit edilen tümör oluşumunun teyidi için histolojik değerlendirme yapılmıştır. Bunun için, sıçanlara uygulanan son MR görüntüleme sonrası aynı gün hayvanlar sakrifiye edilmiş ve beyinleri çıkarılarak % 10'luk formalin içinde fikse edilmiştir. Daha sonra beyinler 2 mm' lik parçalara ayrılarak parafine gömülmüştür. Bu işlemi takiben, parafine gömülmüş parçalar 6 µm'lik kesitlere ayrılmış ve her bir kesit Hematoksilin Eosin ile boyanarak ışık mikroskopunda Prof.Dr. Figen Söylemezoğlu (Hacettepe Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı) tarafından incelenerek tümör varlığı değerlendirilmiştir.

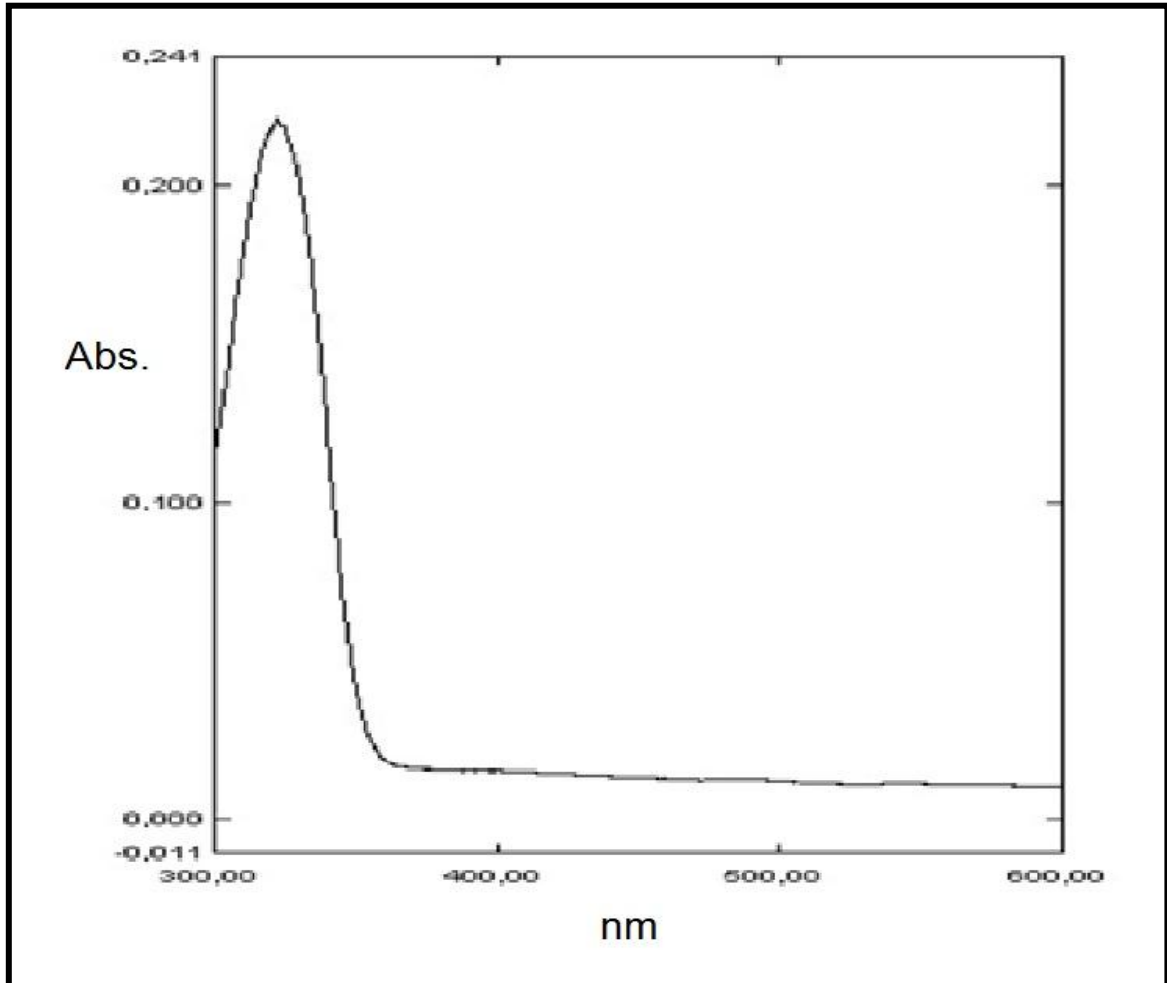
3.2.7.5.3. İstatiksel Değerlendirme

Tez çalışmasında elde edilen bulguların istatistiki değerlendirilmesinde ANOVA, t-testi, Mann Whitney U testi ve tek yönlü varyans analizi gibi uygun parametrik ve non-parametrik testler kullanılacaktır.

4. BULGULAR

4.1. UV Spektrumu

Bölüm 3.2.1.1' de verilen şartlar kullanılarak Farnesil tiyosalisilik asit (FTS)' in asetonitril içinde hazırlanan UV spektrumu alınmış ve FTS'in gösterdiği λ_{maks} değeri 322 nm olarak tespit edilmiştir. Elde edilen grafik Şekil 4.1'de verilmektedir.



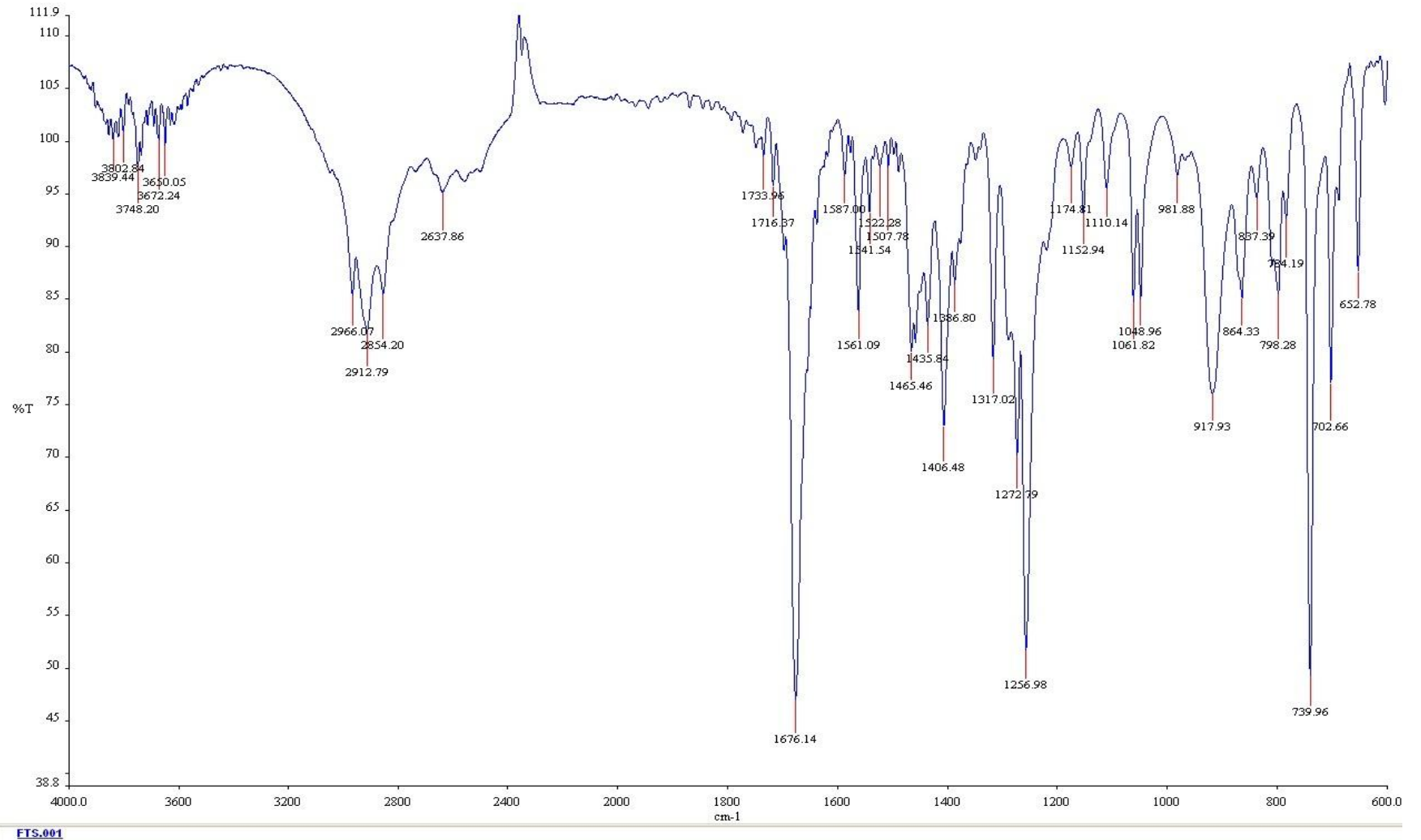
Şekil 4.1. FTS' in asetonitril içindeki UV spektrumu (25 $\mu\text{g/ml}$).

4.2. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektrumu

Etkin maddenin FT-IR spektrumunun çekilmesine ilişkin çalışmalar, Bölüm 3.2.1.2'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

Perkin – Elmer Spectrum BX FT-IR spektrofotometresinde ve 600-4000 cm^{-1} dalga sayıları arasında kaydedilen FTS' in FT-IR spektrumu Şekil 4.2'de verilmiştir. FT-IR spektrumunda gözlenen FTS' e ait karakteristik pikler aşağıda sıralanmıştır:

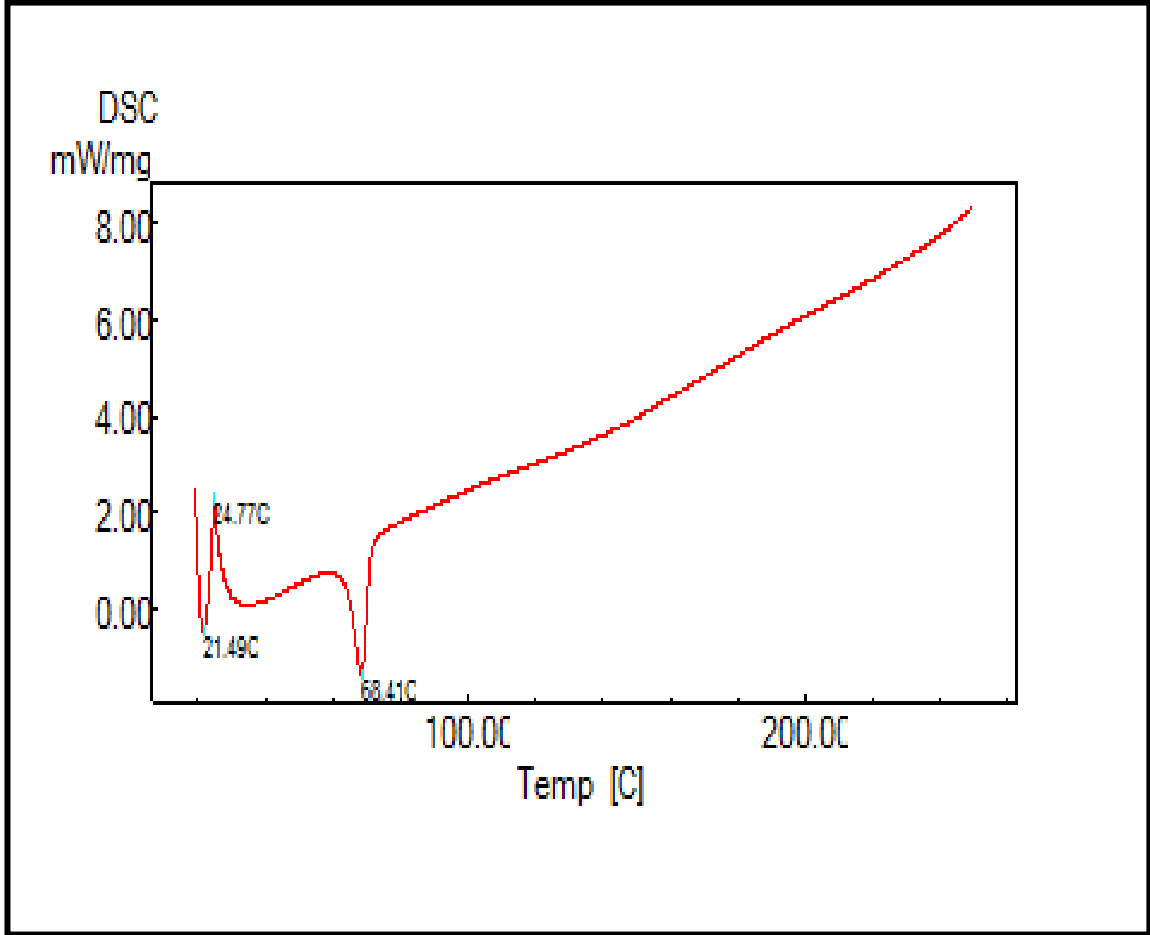
1. 2500-3000 cm^{-1} 'de torba şeklinde karakteristik O-H gerilim bantları
2. 3000 cm^{-1} 'de aromatik yapıya ait C-H gerilim bantları
3. 2912 cm^{-1} 'de kuvvetli alifatik C-H gerilim bantları
4. 1676 cm^{-1} 'de C=O gerilim bantları
5. 1561 cm^{-1} 'de C=C gerilim bantları
6. 1256 cm^{-1} 'de C-O gerilim bantları
7. 702 cm^{-1} 'de C-S gerilim bantları



Şekil 4.2. FTS' in FT-IR spektrumu

4.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizi

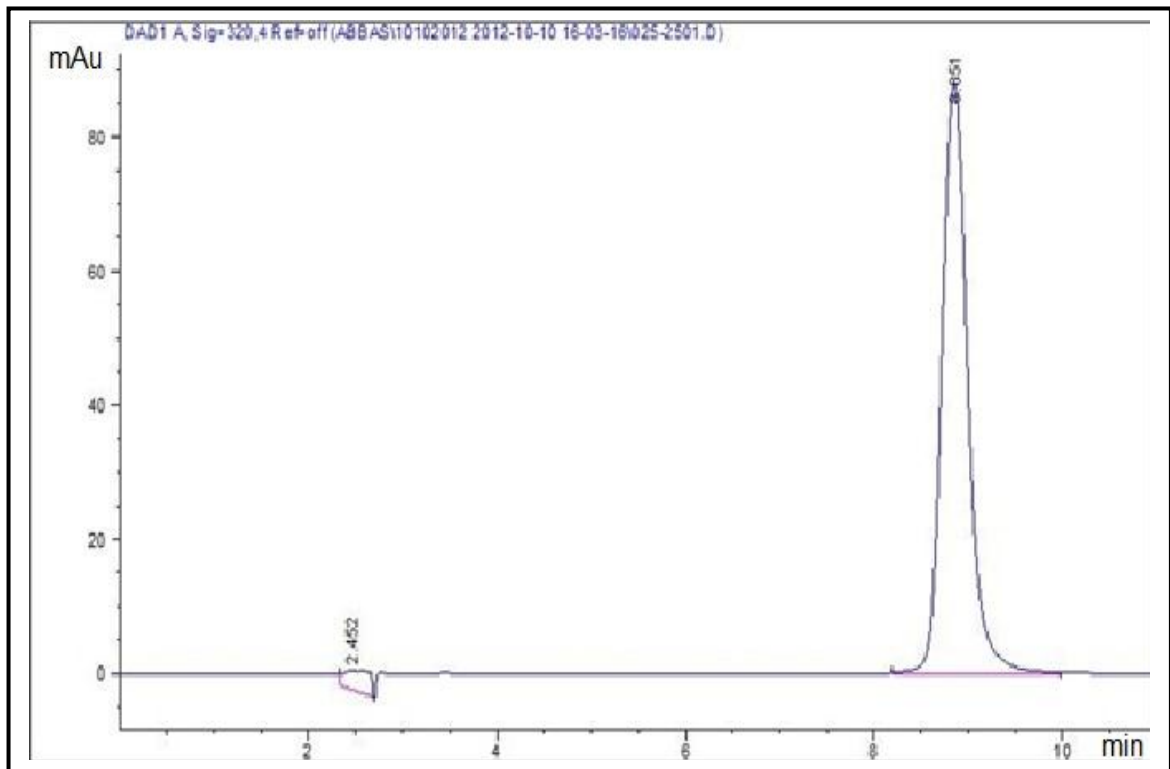
FTS' in diferansiyel taramalı kalorimetri analizi (DSC), Bölüm 3.2.1.3' de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. FTS'in DSC termogramı Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.3. FTS' in DSC termogramı.

4.4. FTS' in Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini ve Validasyonu

Bölüm 3.2.2' de verilen şartlar kullanılarak yapılan miktar tayininde öncelikle FTS standart çözeltisi (0.097- 25 µg/mL, asetonitril içerisinde) sisteme verilerek mobil fazın bileşimi ayarlanmış ve bu sayede FTS' ye ait cevap pikinin 11 dakikalık analiz süresi içerisinde çekilmesi sağlanmıştır. Şekil 4.4' de FTS' e ait cevap pikinin bulunduğu örnek HPLC kromatogramı verilmiştir.



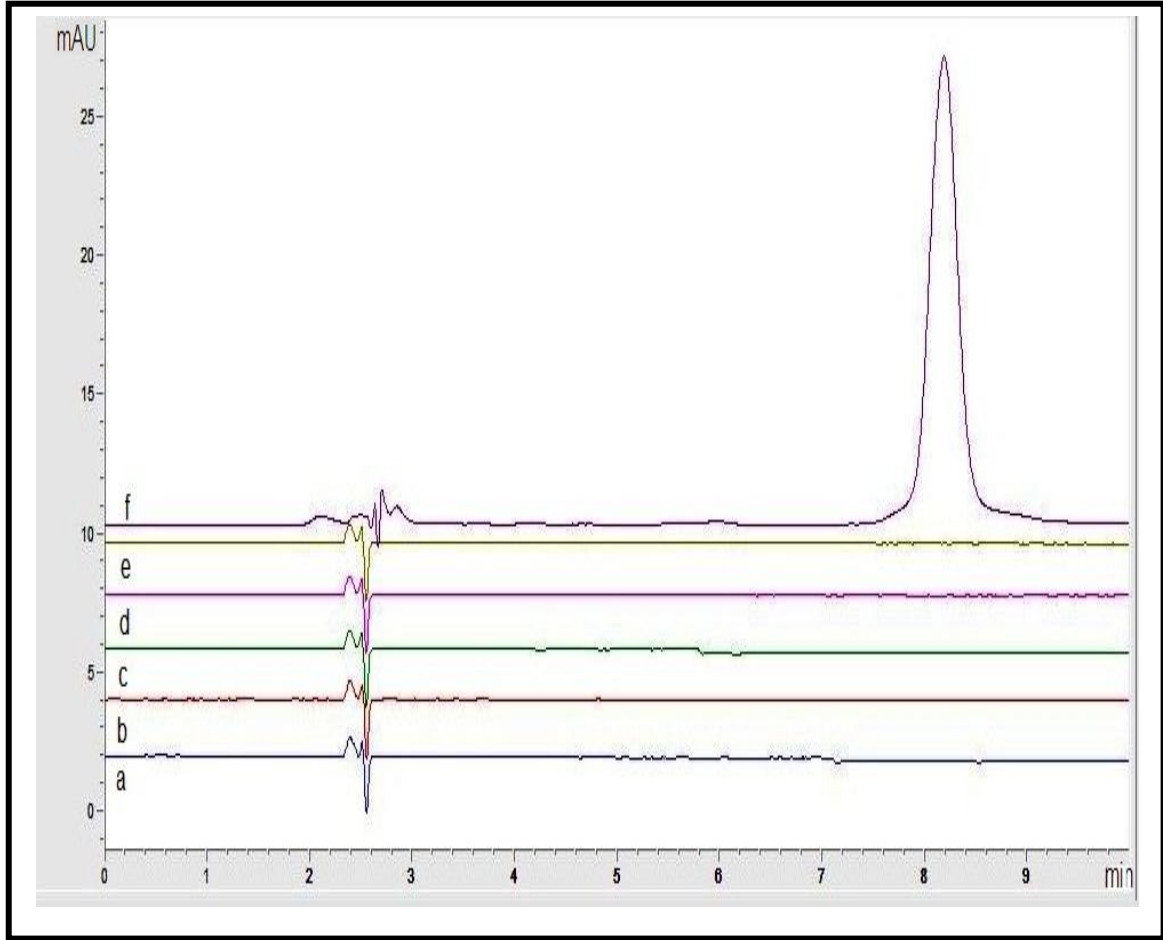
Şekil 4.4. 25 µg/mL konsantrasyonda FTS standart çözeltisinin örnek HPLC kromatogramı.

Aşağıda sırası ile Bölüm 3.2.2.2' de verilen yöntemlere göre incelenen validasyon parametreleri ile ilgili bulgular verilmiştir.

4.4.1. Özgünlük

Miktar tayininde kullanılan HPLC yönteminin FTS' i özgün bir şekilde tayin edip etmediğinin araştırılması için incelenen özgünlük parametresinde,

formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddeler ve salım ortamı HPLC sistemine enjekte edilmiş ve herhangi birine ait cevap pikinin FTS' ye ait cevap piki ile çakışmadığı ve bir girişim yapmadığı görülmüştür (Şekil 4.5.). Bu sayede kullanılacak analitik yöntemin, analizi yapılacak etkin maddeyi özgün bir şekilde ve yeterli hassaslıkla tayin edebildiği gösterilmiştir.

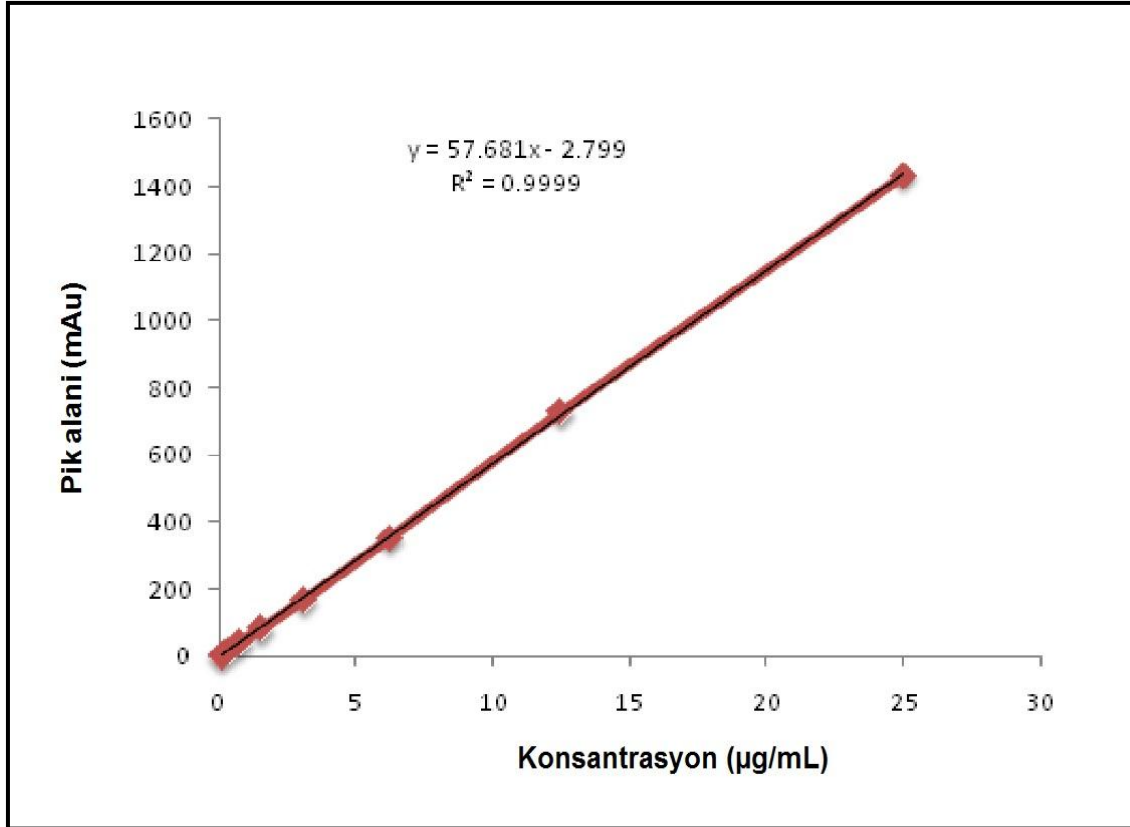


Şekil 4.5. Analitik yöntem validasyonunda özgünlük bulguları

- | | |
|---------------|----------------|
| a) DSPE-PEG | b) Lestin |
| c) DOTAP | d) PLGA 50.50 |
| e) PLGA 85:15 | f) Etkin madde |

4.4.2. Doğrusallık

Bölüm 3.2.2.2.1' de verilen yöntemle göre hazırlanan standart çözeltilerin sisteme enjekte edilmesi ile elde edilen cevap piklerinin alanları kullanılarak hazırlanan kalibrasyon doğrusu ve denklemi Şekil 4.6' da verilmiştir.



Şekil 4.6. FTS için kullanılan HPLC yönteminden elde edilen kalibrasyon doğrusu ve denklemi (n=6)

Şekil 4.6'dan da görülebileceği üzere kalibrasyon denkleminin r^2 (regresyon katsayısı) değeri 1' e çok yakın bir değerdir. Bu durum FTS konsantrasyonu ile pik alanı arasındaki ilişkinin incelenen konsantrasyon aralığında doğrusal olduğunu göstermektedir.

4.4.3. Kesinlik

Tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirliğin incelendiği kesinlik parametresine ait sonuçlar Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2' de verilmiştir.

4.4.3.1. Tekrar Edilebilirlik

Analitik yöntemin tekrar edilebilirliğini göstermek için yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1' de verilmiştir. % Varyasyon katsayısı 1.55 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.1. FTS miktar tayin yönteminin validasyon çalışmasında elde edilen tekrar edilebilirlik sonuçları (n=6)

| Konsantrasyon (µg/ml) | Ölçülen konsantrasyon (µg/mL) | $\bar{X} \pm SS$ | %VK |
|-----------------------|-------------------------------|------------------|------|
| 3,12 | 3,10 | 3,06 ± 0,010 | 1,55 |
| 3,12 | 3,07 | | |
| 3,12 | 3,05 | | |
| 3,12 | 2,99 | | |
| 3,12 | 3,04 | | |
| 3,12 | 3,11 | | |

4.4.3.2. Tekrar Elde Edilebilirlik

Yöntemin tekrar elde edilebilirliğini göstermek için çalışılan 0,097, 0,781 ve 25 µg/ml' lik konsantrasyonlara ait sonuçlar Çizelge 4.2' de verilmiştir.

Çizelge 4.2. FTS miktar tayin yönteminin validasyon çalışmasında elde edilen tekrar elde edilebilirlik sonuçları (n=6, $\bar{X} \pm SS$)

| Konsantrasyon (µg/mL) | $\bar{X} \pm SS$ | %VK |
|-----------------------|------------------|------|
| 0.097 | 0,097 ± 0,001 | 1,77 |
| 0.781 | 0,749 ± 0,014 | 1,90 |
| 25 | 25,001 ± 0,033 | 0,13 |

Çizelge 4.1 ve 4.2'den de görülebileceği üzere, çalışılan bütün konsantrasyonlarda %VK değeri %2' lik kabul sınırının altında bulunmuştur.

4.4.4. Doğruluk

Bölüm 3.2.2.2.2.' de açıklanan yönteme göre yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar ve aynı bölümde verilen denklemden elde edilen değerleri Çizelge 4.3' de verilmiştir.

Çizelge 4.3. FTS için kullanılan HPLC yönteminde elde edilen doğruluk parametresi sonuçları (n=6, $\bar{X} \pm SS$)

| Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$) | $\bar{X} \pm SS$ | % Ortalama Bağlı Hata |
|------------------------------------|--------------------|-----------------------|
| 0,097 | 0,097 \pm 0,001 | - 0,082 |
| 0,781 | 0,749 \pm 0,014 | - 3,88 |
| 25 | 25,001 \pm 0,033 | 0,006 |

4.4.5. Stabilité

FTS'in deney süresince stabil kaldığının gösterilmesi için deneyler, Bölüm 3.2.2.2.6.'da belirtildiği şekilde yapılmıştır. Başlangıçta 400 ng/ml konsantrasyonda olan FTS çözeltisinde 24. saatin sonunda %3'lük bir değişiklik meydana gelmemiştir ve bu sonuç etkin maddenin deney süresince stabil olduğunu göstermiştir.

4.4.6. Saptama ve Miktar Tayini Sınırı

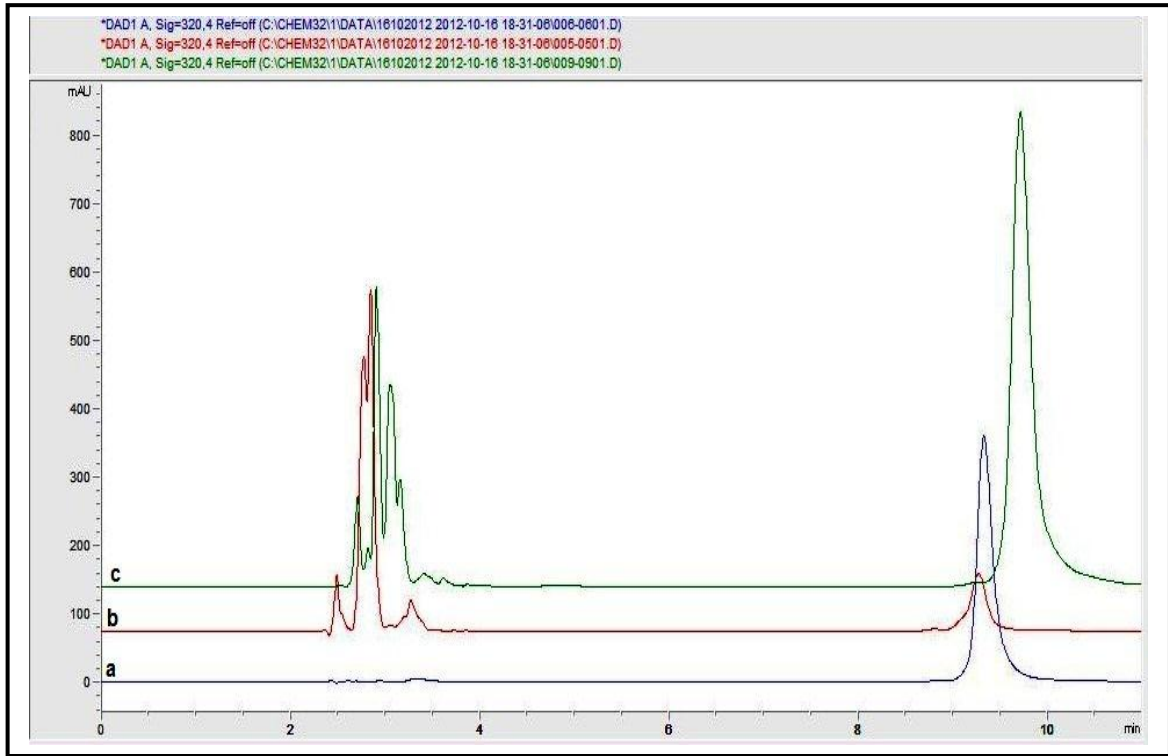
FTS'in HPLC ile miktar tayininde saptama sınırı 0.050 $\mu\text{g/ml}$, miktar tayini sınırı 0.097 $\mu\text{g/ml}$ olarak tespit edilmiştir.

4.5. FTS' in Çözünürlük Çalışması

Etkin maddenin çözünürlük sorununun özellikle in vitro salım ve hücre kültürü çalışmalarında zorluklar yaşanmasına neden olacağı düşünüldüğünden, in vitro salım ortamı ve hücre kültürü ortamı olarak kullanılacak ortamlardaki çözünürlüğünün tespit edilmesine karar verilmiştir.

Buna göre çözünürlük çalışmaları için üç farklı ortam olarak: PBS (pH 7.4), %0.1 (a/h) Tween 20 içeren PBS (TPBS); %10 (h/h) fetal sığır serumuna (FSS) ek olarak %0.1 DMSO (h/h) içeren PBS çözeltileri hazırlanmıştır. Bölüm 3.2.3' de belirtilen yöntemle göre gerçekleştirilen bu çalışmadan elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4' de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, salım ortamında sink koşulların rahatlıkla sağlanabilmesi ve FTS' in yüksek oranda ortamda çözünebilmesi için TPBS çözeltilisinin salım ortamı olarak kullanılmasına, %0.1 DMSO ve %10 FSS içeren hücre kültür ortamının hücre kültürü deneylerinde kullanılmasına karar verilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. FTS'in farklı salım ortamlarındaki çözünürlük deneylerine ait HPLC kromatogramları, %10 (h/h) fetal sığır serumu ve a) %0.1 DMSO (h/h) içeren PBS, b) PBS (pH 7.4), c) %0.1 (a/h) Tween 20 içeren PBS.

Çizelge 4.4. FTS' nin çözünürlük çalışmasında kullanılan farklı ortamlardaki çözünürlük değerleri (n=6, $\bar{X} \pm SS$)

| Salım ortamı | Çözünen ilaç miktarı (µg/ml) | Çözünen ilaç miktarı (%) |
|---|------------------------------|--------------------------|
| PBS (pH 7.4) | 21,2 ± 2,0 | 2,12 ± 1,8 |
| TPBS | 184,0 ± 3,1 | 18,4 ± 2,1 |
| %10 fetal sığır serumu (FSS) ve %0.1 DMSO içeren PBS | 401,2 ± 4,6 | 40,1 ± 3,1 |

4.5.1. FTS' in Çözünürlük Çalışmasında Kullanılan Ortamlardaki Kimyasal Stabilitesi

Bölüm 3.2.3' te verilen yöntemle göre gerçekleştirilen stabilite deneyleri sonucunda elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5' de sunulmuştur.

Çizelge 4.5. FTS' in çözünürlük çalışmasında kullanılan TPBS içindeki zamana bağlı olarak bozunmadan kalan miktarlarına ait stabilite sonuçları (n=6)

| Zaman (saat) | FTS' in TPBS içindeki bozunmadan kalan miktar ($\mu\text{g/ml}$) |
|--------------|--|
| 0 | $3,6 \pm 0,05$ |
| 18 | $3,39 \pm 0,04$ |
| 24 | $3,35 \pm 0,07$ |
| 48 | $3,32 \pm 0,03$ |
| 72 | $3,29 \pm 0,01$ |

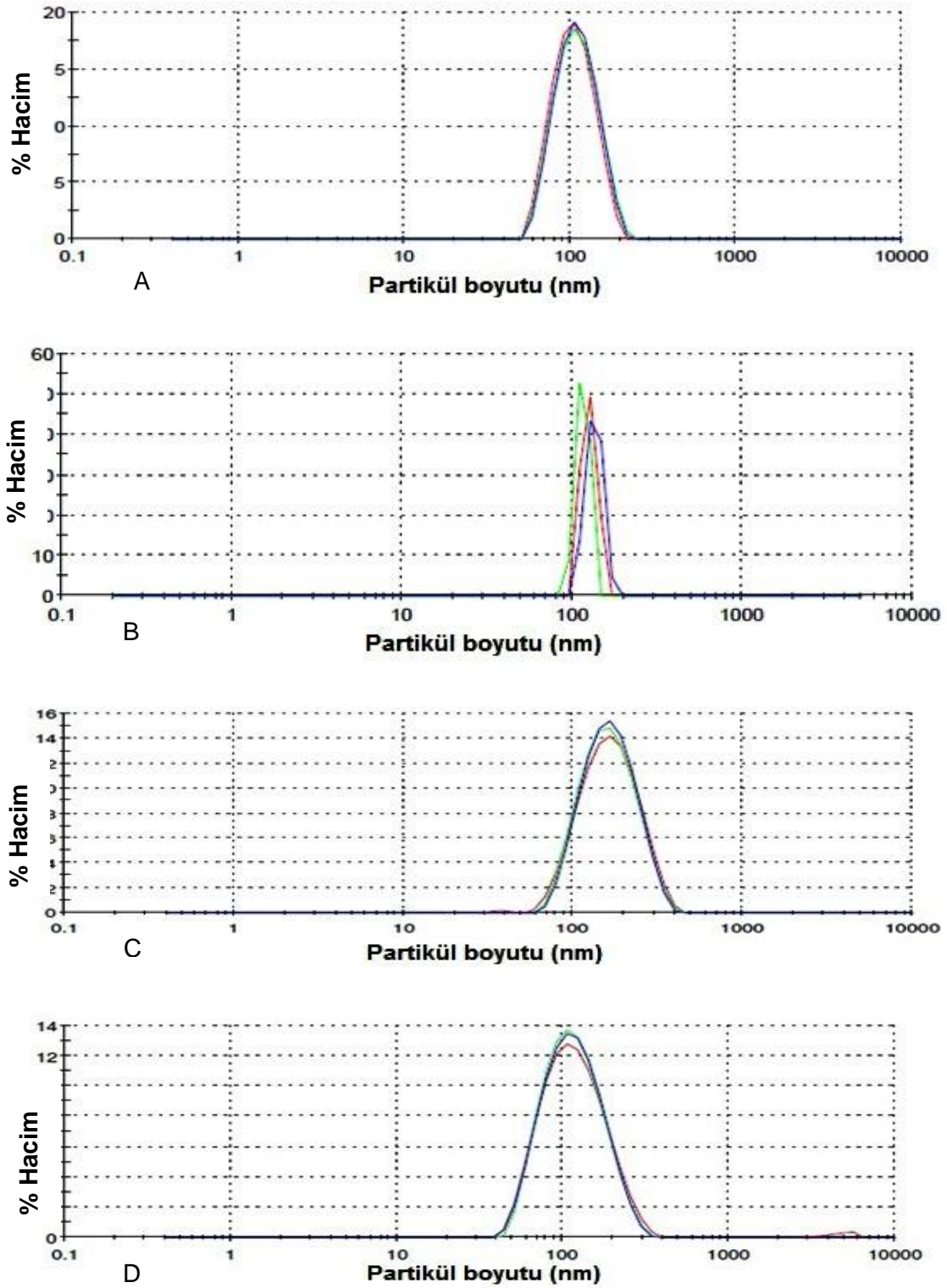
4.6. Hazırlanan Hibrit Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonları

4.6.1. Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Değerleri

Hazırlanan hibrit nanopartikül formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel bulguları Çizelge 4.6' da verilmiştir. Buna ilaveten formülasyonların partikül büyüklüğü dağılım grafikleri Şekil 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Hazırlanan hibrit nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu ve zeta potansiyel değerleri (n=6, $\bar{X} \pm SS$).

| Formülasyon | Partikül Büyüklüğü (nm) | Zeta Potansiyeli (mV) |
|--|-------------------------|-----------------------|
| 50:50 PLGA/DSPE-PEG (Boş) | 94 ± 2,3 | -28,4 ± 2,0 |
| 85:15 PLGA/DSPE-PEG (Boş) | 102 ± 2,0 | -30,1 ± 1,4 |
| 50:50 PLGA/ DSPE-PEG (%5 FTS yüklü) | 121 ± 3,2 | -30,2 ± 2,0 |
| 85:15 PLGA/PEG-PE (%5 FTS yüklü) | 147 ± 0,7 | -32,4 ± 2,3 |
| DOTAP içeren 50:50 PLGA/ DSPE-PEG (Boş) | 120 ± 3,4 | -11,1 ± 1,1 |
| DOTAP içeren 85:15 PLGA/ DSPE-PEG (Boş) | 145 ± 2,5 | -13 ± 1,2 |
| DOTAP içeren 50:50 PLGA/ DSPE-PEG (%5 FTS yüklü) | 127 ± 2,0 | -11,2 ± 1,2 |
| DOTAP içeren 85:15 PLGA/ DSPE-PEG (%5 FTS yüklü) | 155 ± 2,7 | -13 ± 1,5 |



Şekil 4.8. FTS yüklü Hibrit Nanopartiküller (HNP)in partikül büyüklüğü dağılım grafikleri. a) PLGA 50:50 HNP, b)PLGA 50:50 DOTAP içeren HNP, c) PLGA 85:15 HNP, d) PLGA 85:15 DOTAP içeren HNP.

4.6.2. Nanopartiküllere Yüklenen FTS miktarı

DOTAP içermeyen ve içeren hibrit nanopartikül formülasyonlarına yüklenen etkin madde miktarı ve yüzdeleri Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8' de verilmiştir.

Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı üzere, formülasyon geliştirme sırasında formülasyonlara polimer ağırlınının %5, %10 ve %20' si oranında FTS yüklemesi yapılması planlanmıştır. Ön denemelerde %5'in üzerinde yapılan ilaç yükleme çalışmaları ile elde edilen sonuçların %5 yükleme yapılanlara göre bir fark meydana getirmemesinden dolayı hedef yükleme yüzdesi %5 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. Hibrit nanopartikül formülasyonlarına yüklenen FTS miktarı (n=6, $\bar{X} \pm SS$).

| Formülasyonlar | Yüklenen FTS miktarı (μg) ($\pm\text{S.S}$) | Yükleme yüzdesi (%) ($\pm\text{S.S}$) | Yükleme etkinliği (%) ($\pm\text{S.S}$) |
|-----------------------------------|--|---|---|
| PLGA 50:50 /PEG-PE (%5 FTS yüklü) | 7 \pm 1.9 | 1.52 \pm 0.01 | 21 \pm 2 |
| PLGA 85:15 /PEG-PE (%5 FTS yüklü) | 9 \pm 2 | 1.76 \pm 0.01 | 28 \pm 1.2 |

*Formülasyonlarda FTS yükleme yüzdesi %5 olarak hedeflenmiştir.

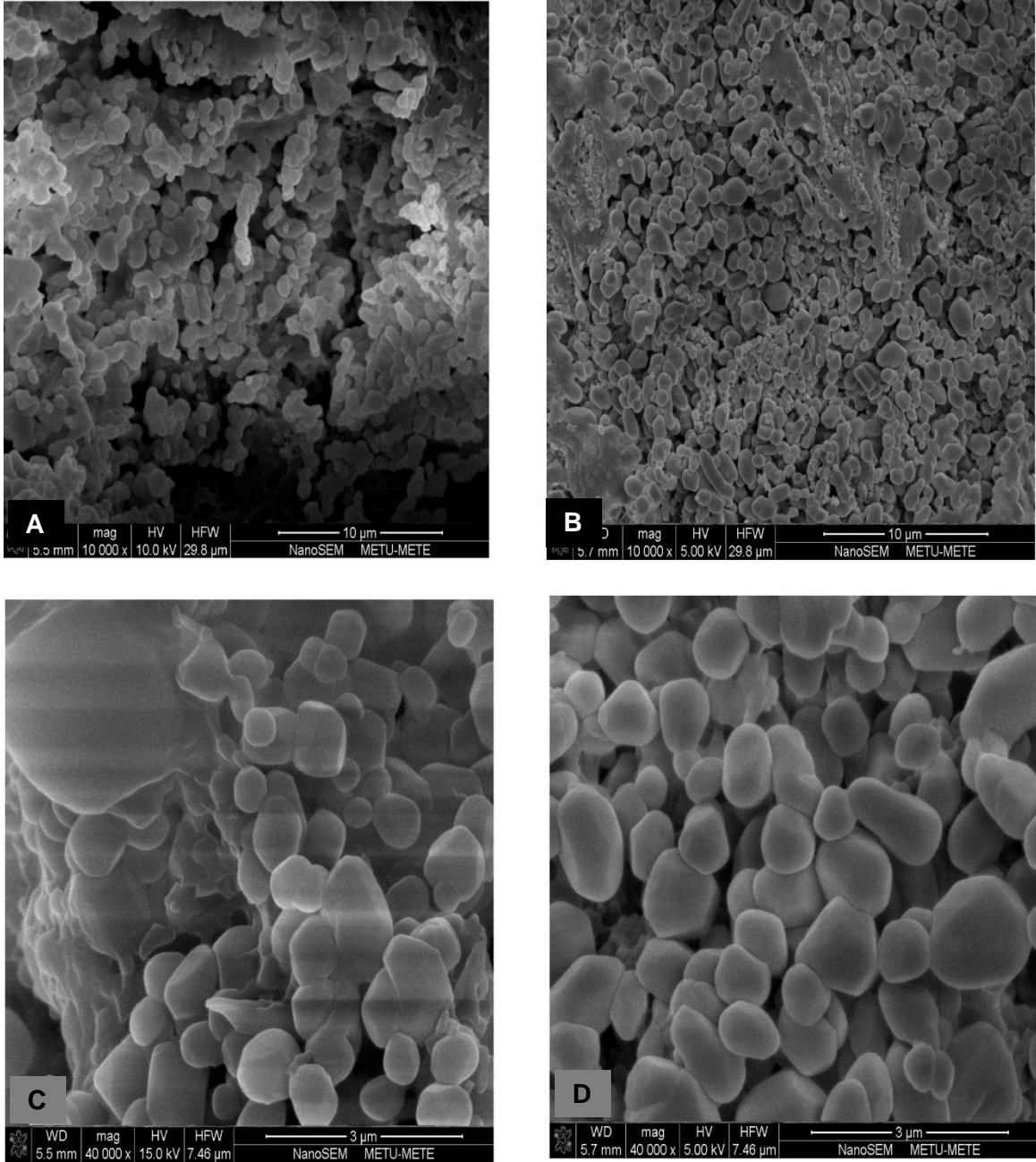
Çizelge 4.8. DOTAP içeren hibrit nanopartikül formülasyonlarına yüklenen FTS miktarları (n=6, $\bar{X} \pm SS$).

| Formülasyonlar | Yüklenen FTS miktarı(μg) ($\pm S.S$) | Yükleme yüzdesi (%) | Yükleme etkinliği (%) ($\pm S.S$) |
|---|---|---------------------|-------------------------------------|
| PLGA 50:50 DSPE-PEG /DOTAP (50:50 μM) | 12 \pm 1.1 | 2.6 \pm 0.01 | 24 \pm 1.3 |
| PLGA 85:15 DSPE-PEG/DOTAP (50:50 μM) | 9.35 \pm 2.0 | 2.1 \pm 0.01 | 19 \pm 1.6 |
| PLGA 50:50 DSPE-PEG/DOTAP (75:25 μM) | 25 \pm 1.6 | 5.1 \pm 0.03 | 60 \pm 1.2 |
| PLGA 85:15 DSPE-PEG/DOTAP (75:25 μM) | 14.65 \pm 1.4 | 2.8 \pm 0.02 | 29 \pm 1.1 |

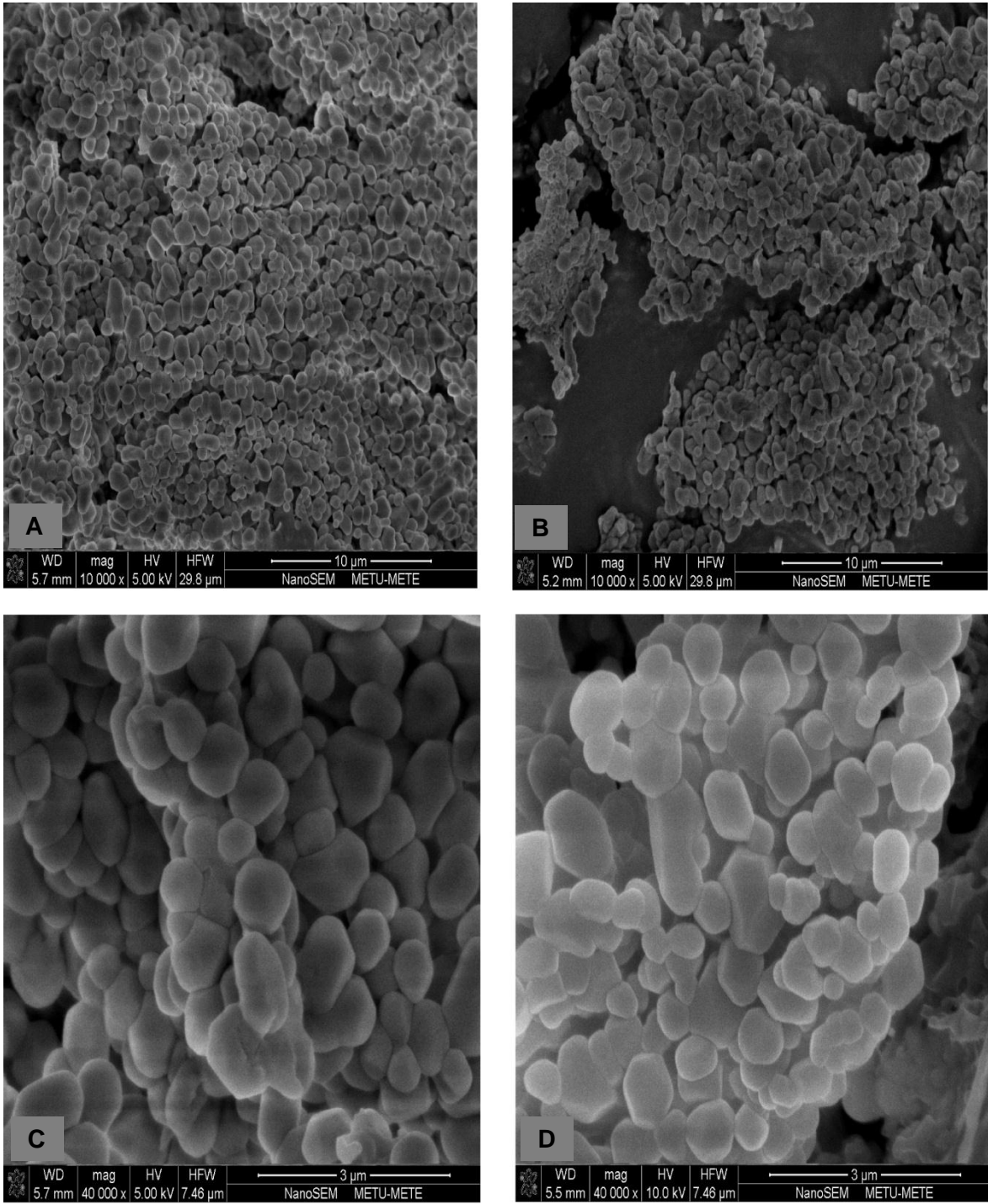
*Formülasyonlarda FTS yükleme yüzdesi %5 olarak hedeflenmiştir.

4.6.3. Formülasyonların Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi

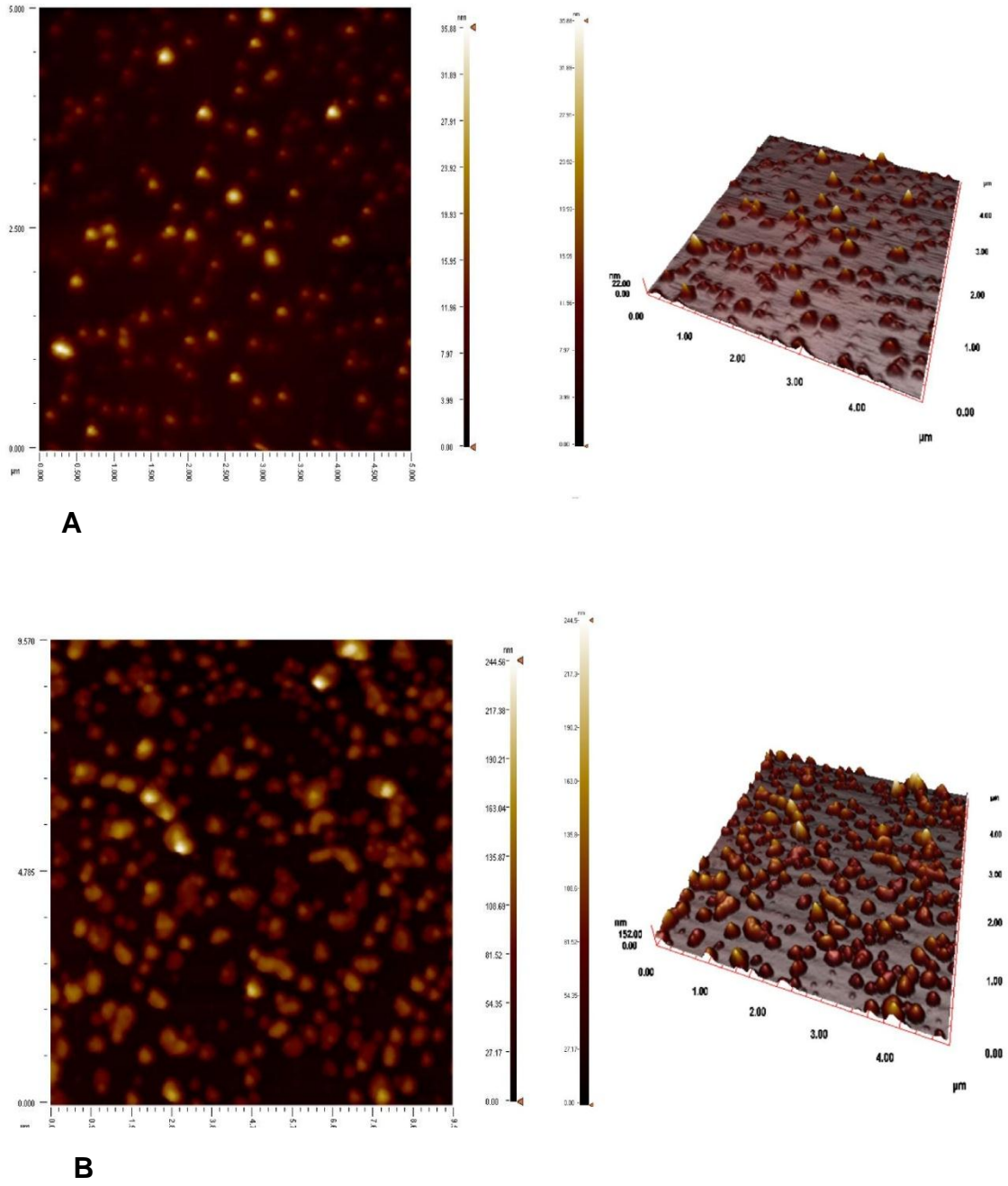
Hazırlanan formülasyonların yüzey özellikleri SEM ve AFM ile incelenmiştir. Formülasyonların SEM ve AFM fotoğrafları Şekil 4.9-4.12' de verilmiştir.



Şekil 4.9. FTS yüklü hibrit nanopartiküllerin SEM görüntüleri. A) PLGA 85:15 HNP (10000x), B) PLGA 50:50 HNP (10000x), C) PLGA 85:15 HNP (40000x), D) PLGA 50:50 HNP (40000x).



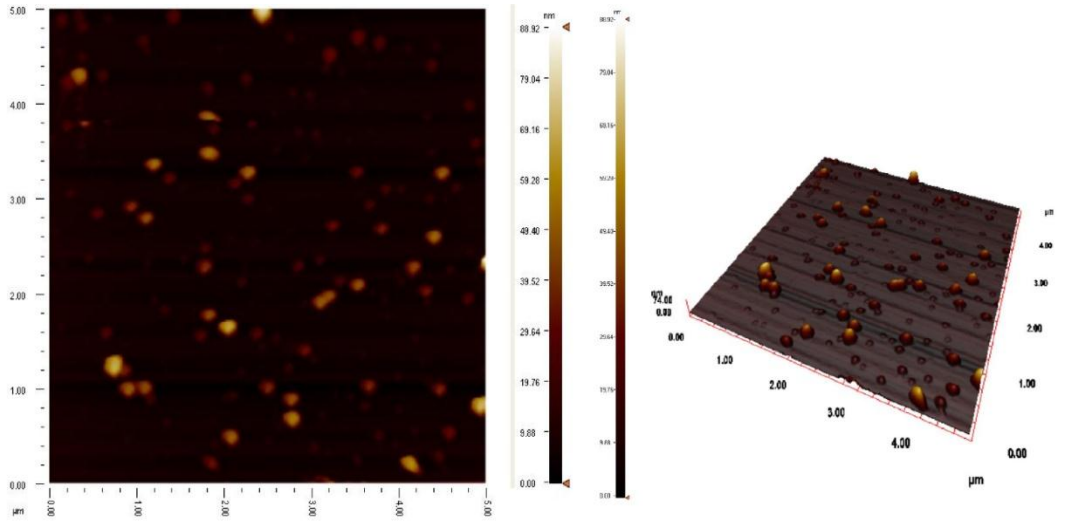
Şekil 4.10. FTS yüklü, DOTAP içeren HNP' lerin SEM görüntüleri. A) PLGA 50:50 HNP (10000x), B) PLGA 85:15 HNP (10000x), C) PLGA 50:50 HNP (40000x), D) PLGA 85:15 HNP (40000x).



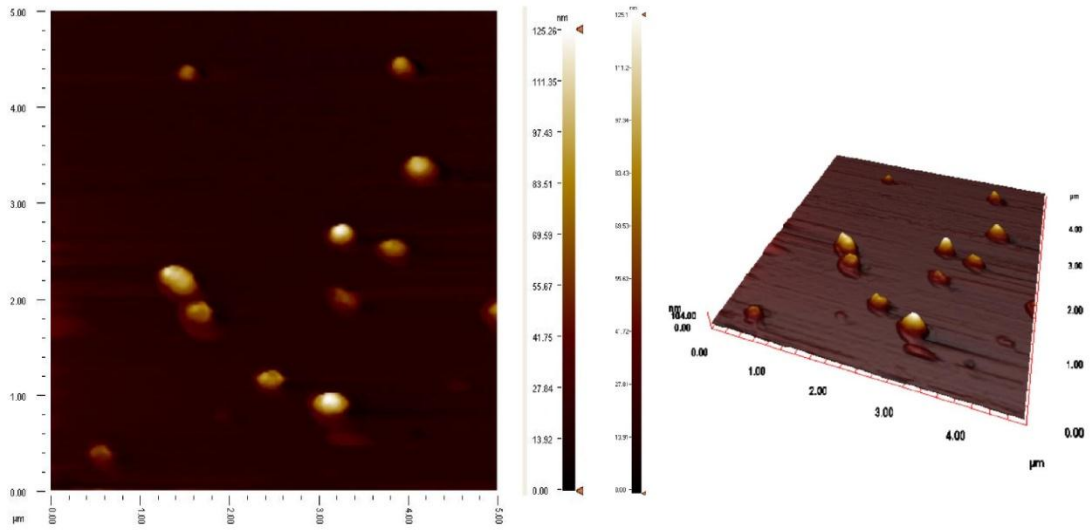
Şekil 4.11. FTS yüklü HNP' lerin AFM görüntüleri.

A) PLGA 50:50 HNP formülasyonları.

B) PLGA 50:50 DOTAP içeren HNP.



A



B

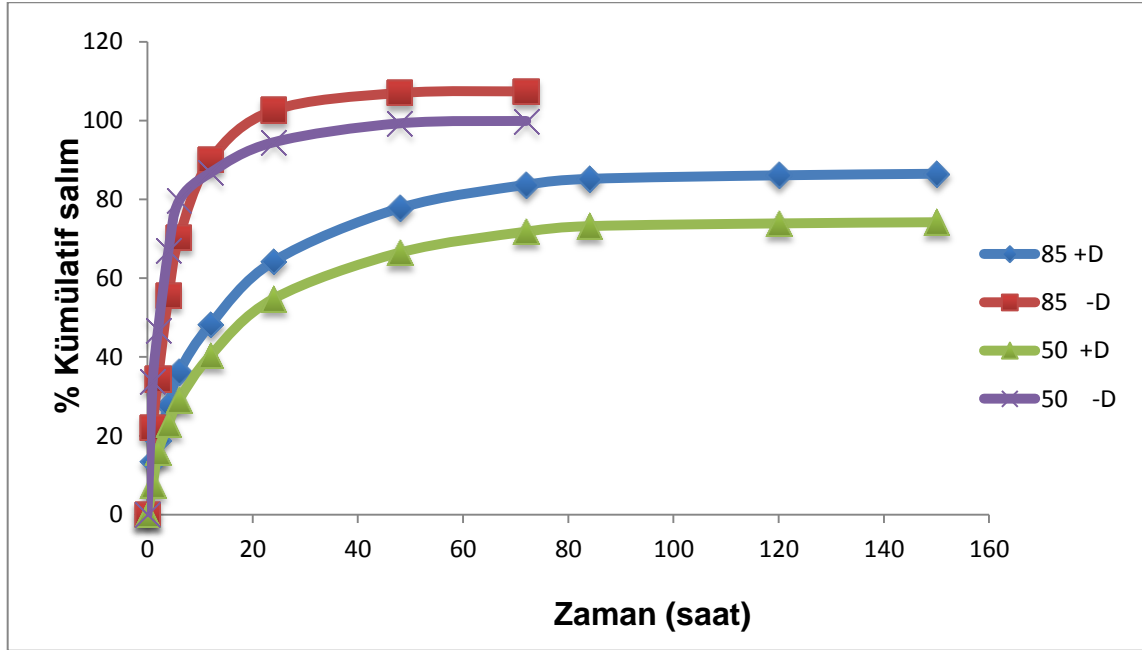
Şekil 4.12. FTS yüklü HNP' lerin AFM görüntüleri.

A) PLGA 85:15 HNP formülasyonları.

B) PLGA 85:15 DOTAP içeren HNP formülasyonları.

4.7. İn Vitro Salım Çalışmaları

Uygun salım ortamının seçilmesinden sonra yapılan in vitro salım çalışmalarında, nanopartikül formülasyonlardan salınan FTS miktarlarına ait grafik Şekil 4.13' de verilmiştir.

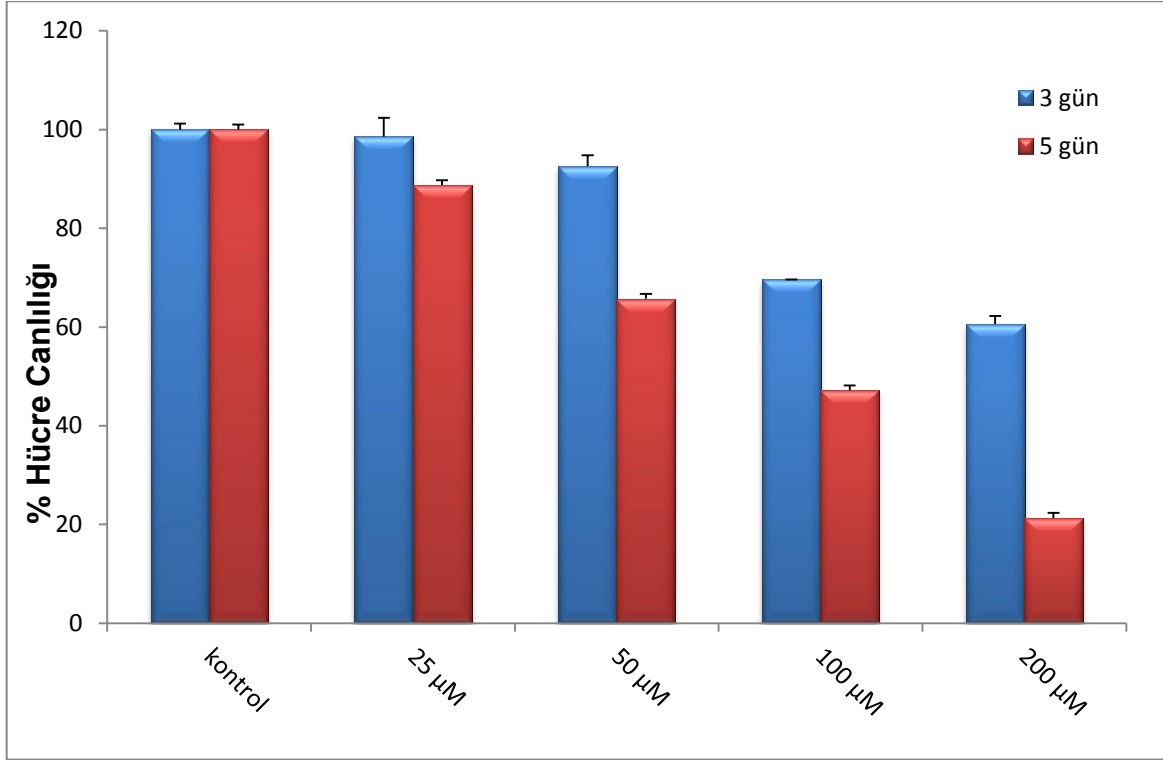


Şekil 4.13. FTS içeren formülasyonların zamana bağlı in vitro salım profilleri (n=6).

4.8. FTS' in İn Vitro Biyoaktivitesinin Hücre Kültüründe Değerlendirilmesi

Tez kapsamında hazırlanan formülasyonların in vitro biyoaktivitesinin değerlendirilmesi için RG2 hücre hattı üzerinde sitotoksikite çalışmaları yapılmıştır. Bölüm 3.2.6.1'de verildiği şekilde gerçekleştirilen deneylere ait sonuçlar Şekil 4.14' de verilmiştir. RG2 hücrelerine uygulamayı takiben FTS' in hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi ve etkin maddenin LD₅₀ değerini belirlemek amacıyla, belirtilen zaman aralıklarında kontrol grubuna göre hücre canlılıkları grafiklenmiştir. Deneylerde 4 farklı FTS konsantrasyonunda çalışılmış ve 2 farklı zaman aralığı sonunda hücre canlılık değerleri elde edilmiştir. Buna göre 3. günün sonunda uygulanan en yüksek FTS konsantrasyonu olan 200 µM' lık çözelti, hücrelerin yaklaşık %30' unu öldürmüştür.

Aynı konsantrasyondaki çözelti 5. günün sonunda ise RG2 hücrelerinde %90 oranında canlılık kaybına yol açmıştır. Uygulanan en düşük konsantrasyon değeri olan 25 μM ' lık FTS çözeltisi 3 günün sonunda hücreler üzerinde %98' lik bir canlılık değerine yol açarken, 5. günün sonunda bu canlılık değeri %80' e düşmüştür.



Şekil 4.14. RG2 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda FTS uygulamasını takiben 3. ve 5. günün sonunda elde edilen hücre canlılığı değerleri ($n=6 \pm SS$).

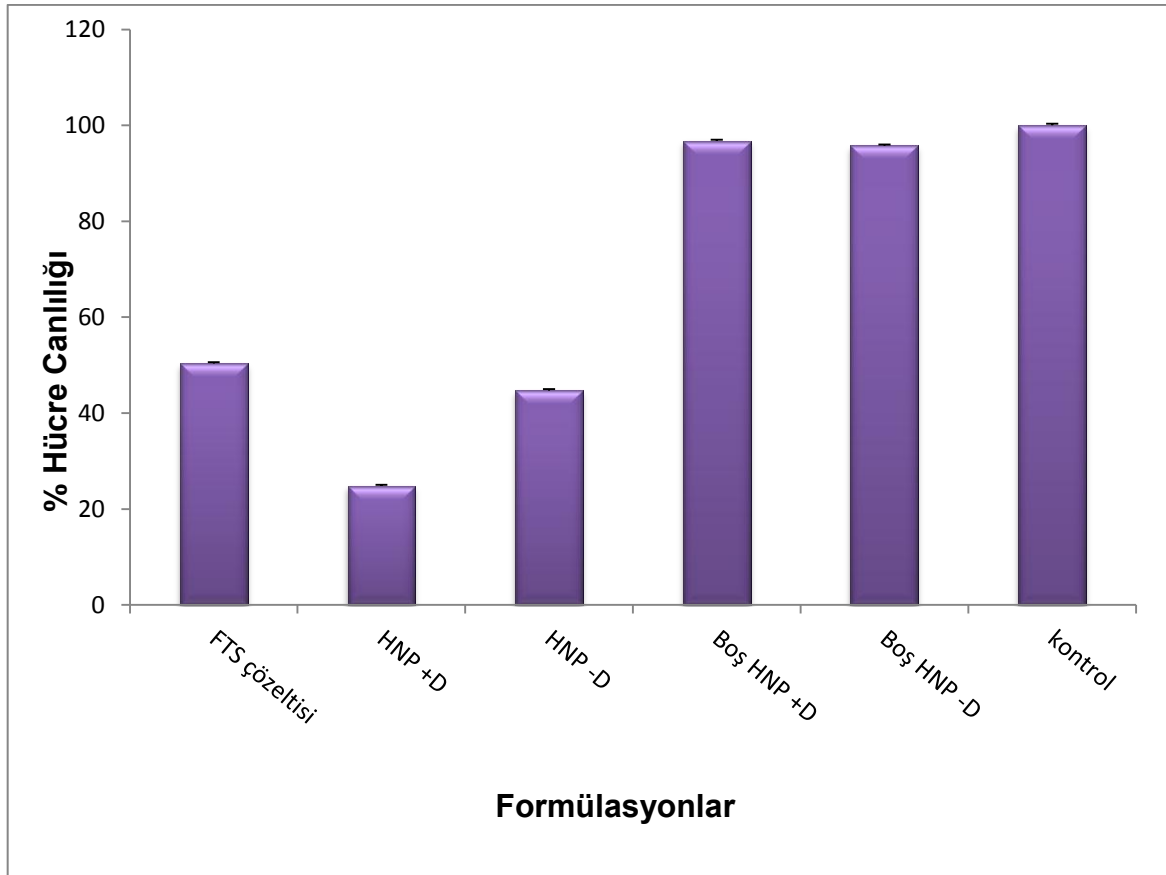
Elde edilen bu sonuçlar değerlendirildiğinde, FTS' in LD_{50} değeri 100 μM olarak belirlenmiştir. Bu konsantrasyonun formülasyonların sitotoksitesinin belirlendiği hücre kültürü çalışmalarında ve in vivo çalışmalarda kullanılmasına karar verilmiştir.

Ayrıca sonuçlardan 5. günde FTS'in daha yüksek etkinlik gösterdiğinin tespit edilmesi nedeniyle formülasyonların sitotoksitesinin belirlendiği hücre kültürü çalışmalarında ve in vivo çalışmalarda bu sürenin göz önünde bulundurulmasına karar verilmiştir.

Çalışmamızda hücre kültürü deneylerine taşınacak formülasyonlar olarak, in vitro karakterizasyon bulguları göz önüne alınarak, PLGA 50:50 kopolimer oranına sahip (DOTAP içeren ve içermeyen) formülasyonlar seçilmiştir.

Bölüm 3.2.6.1.2.' de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen, 100 µM konsantrasyonda FTS içeren nanopartikül formülasyonlarının in vitro biyoaktivitelerinin değerlendirilmesi çalışmalarından elde edilen % hücre canlılığı değerleri Şekil 4.14.'de verilmiştir.

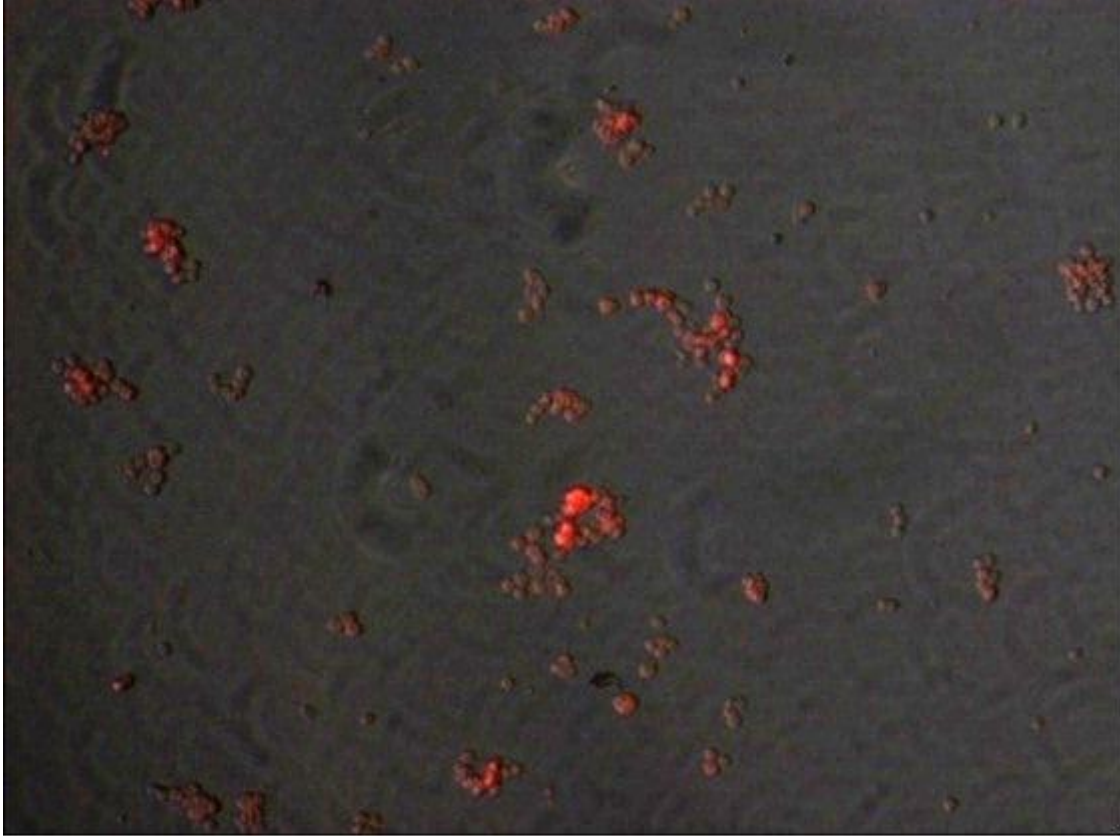
Şekil 4.15' den görüldüğü gibi, etkin madde içeren DOTAP içeren formülasyonlar en yüksek antikanser aktivite göstermiştir. Etkin madde içermeyen nanopartiküllerin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında düşük bir sitotoksiteye sahip oldukları tespit edilmiştir.



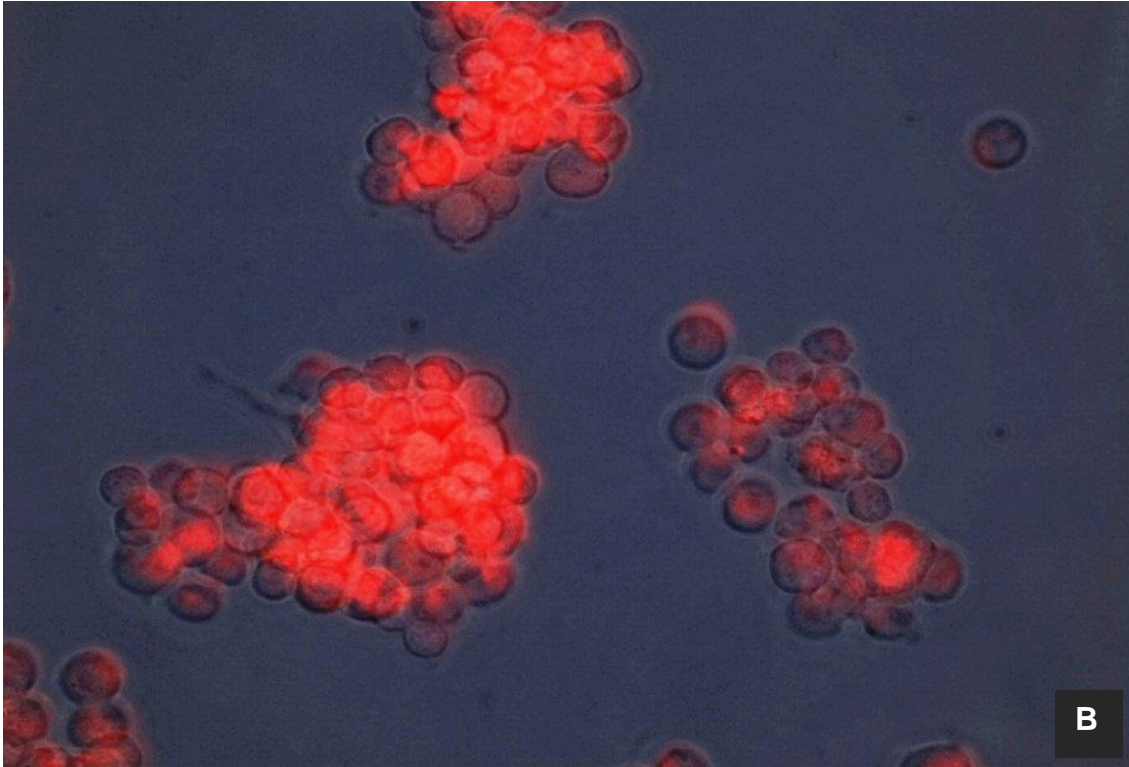
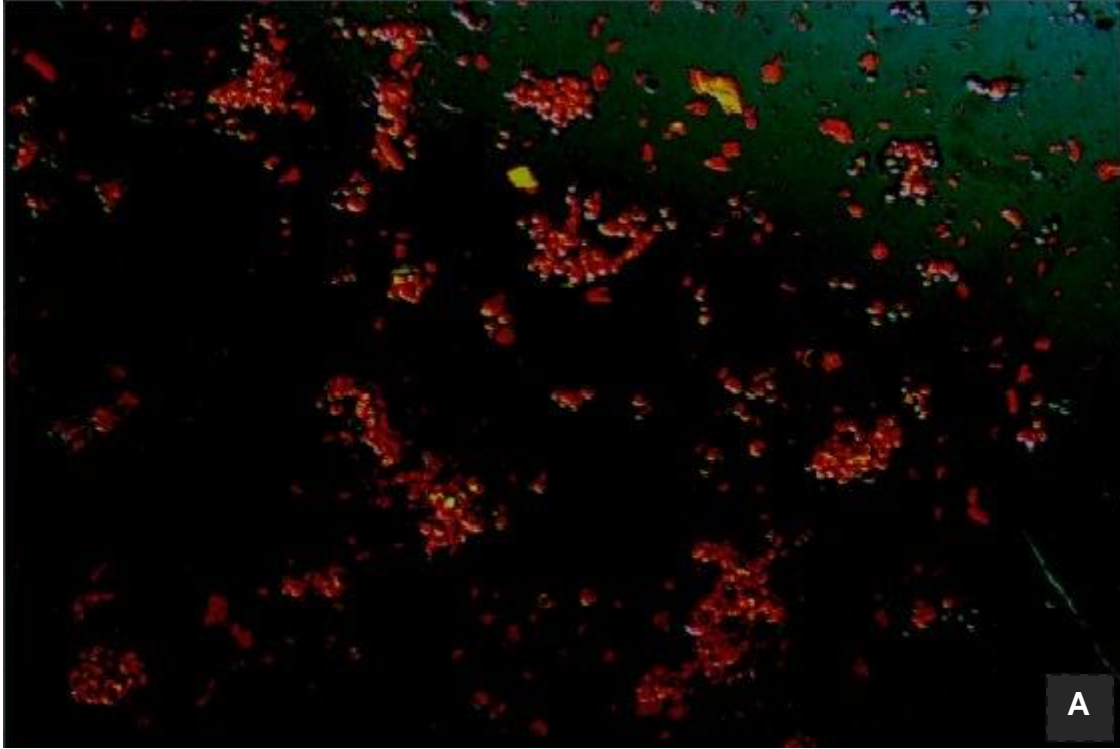
Sekil 4.15. 100 µM konsantrasyonda FTS içeren nanopartikül formülasyonlarının RG2 hücreleri ile muamele edilmesinden 5 gün sonra elde edilen % hücre canlılığı değerleri (n=3 ±SS)

4.9. Hücresel Alımın Değerlendirmesi

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının hücresel alımları, Bölüm 3.2.4.2.' de açıklandığı şekilde değerlendirilmiştir. Nanopartikül formülasyonlarının hücresel alımlarını gösteren floresan mikroskopta elde edilen görüntüleri Şekil 4.16' de gösterilmektedir.



Şekil 4.16. DOTAP içermeyen formülasyonlarının RG2 hücreleri tarafından alımlarının Floresan mikroskop ile değerlendirilmesi.

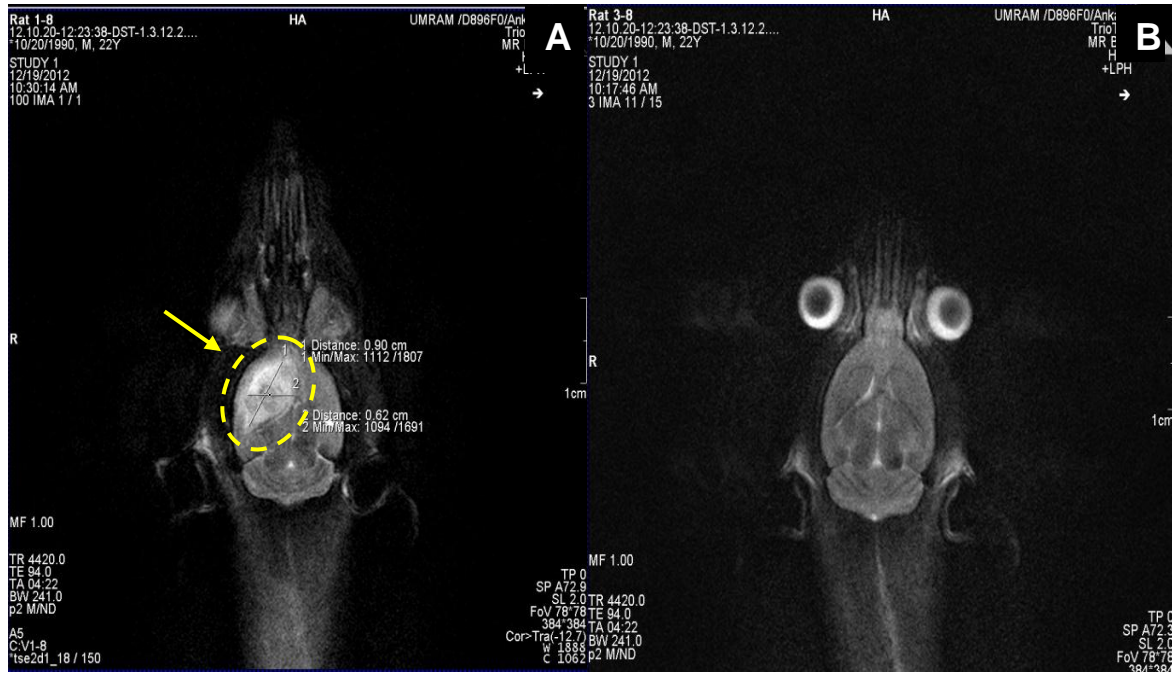


Şekil 4.17. DOTAP içeren HNP formülasyonlarının RG2 hücreleri tarafından alınlarının Floresan mikroskop ile değerlendirmesi. a) 40x, b) 100x.

4.10. İn Vivo Deneylemler

4.10.1. Sıçanlarda Beyin Tümörü Oluşturulması ve Magnetik Rezonans (MR) Görüntüleme

Sıçanlara RG2 gliom hücresi enjeksiyonu Bölüm 3.2.7.2.'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Hücre enjeksiyondan 10 gün sonra tümör oluşumunun tespiti ve alan olarak büyüklüğünün hesaplanması için MR görüntüleme kullanılmıştır (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. RG2 hücresi ekiminden 10 gün sonra sıçanların örnek MR görüntüleri.

A) tümör oluşmuş sıçana ait görüntü. B) tümör oluşmamış sıçana ait görüntü.

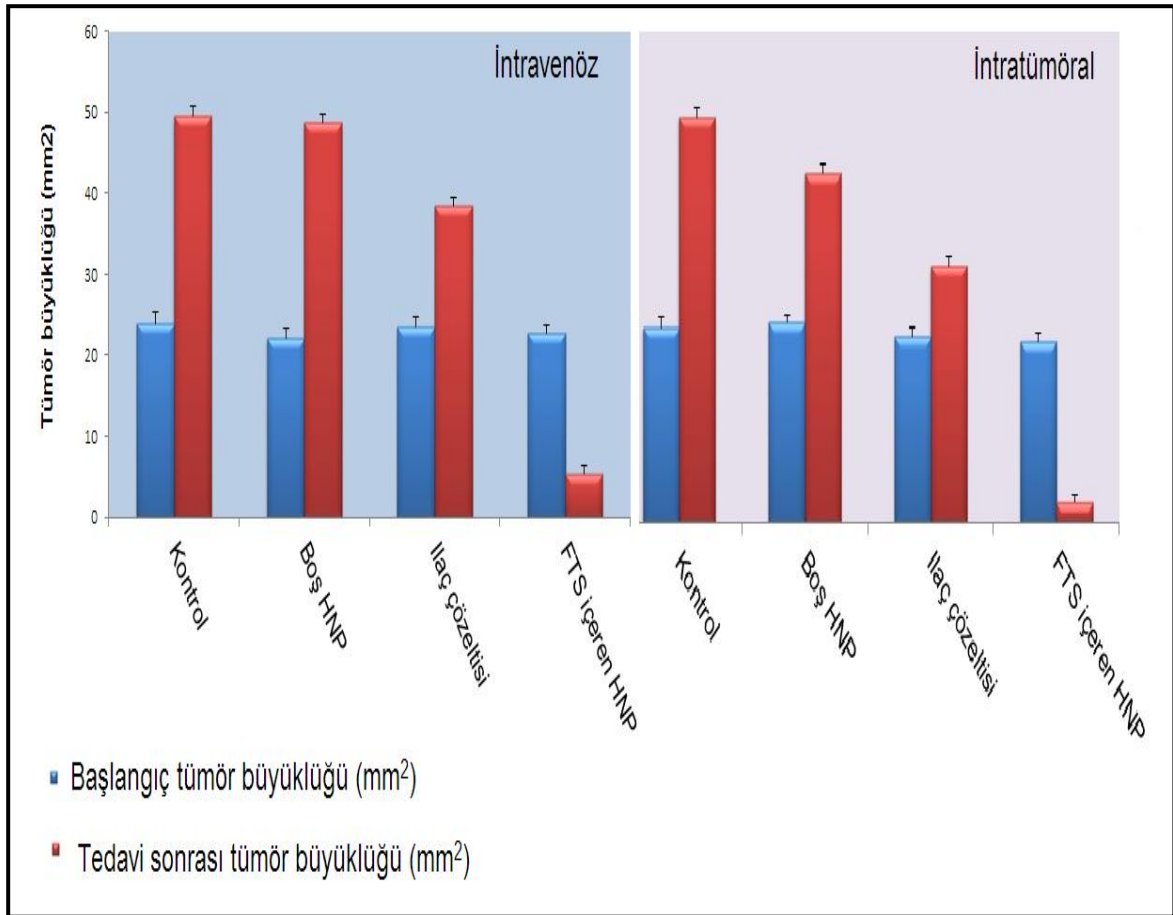
4.10.2. Sıçanlara Tedavi Gruplarının Uygulanması ve Tedavi Sonrası Yapılan Değerlendirilmeler

Bölüm 3.2.7.3 'de belirtildiği üzere, sıçanlara tümör hücresi ekiminden 10 gün sonra MR görüntüleme yapılarak oluşan tümörün başlangıç alanı tespit edilmiştir. Bu işlemi takiben, uygun alan büyüklüğünde tümör taşıyan hayvanlar gruplara ayrılarak tedaviler uygulanmıştır (kontrol grubuna uygulanmayarak).

Siçanlara uygulanan tedaviden 5 gün sonra tekrar MR görüntüleme yapılarak tedavi sonrası tümör alanındaki değişim tespit edilip, alanın başlangıçtaki büyüklüğü ile karşılaştırma yapılmıştır (Çizelge 4.9, Çizelge 4.10).

In vivo deneylerin planlama aşamasında başlangıçta her bir grupta 6 hayvan varken, deney sırasında meydana gelen hayvan kayıpları nedeniyle her bir grupta 3 hayvan kalmıştır.

100 μ M konsantrasyonda FTS içeren nanopartikül formülasyonlarının veya FTS çözeltilerinin veya dolu nanopartiküllerle aynı miktarda nanopartikül içeren boş nanopartikül formülasyonu gruplarının uygulanmasından sonra her bir tedavi grubuna ait örnek MR görüntüleri Şekil 4.20-4.25' de sunulmuştur.



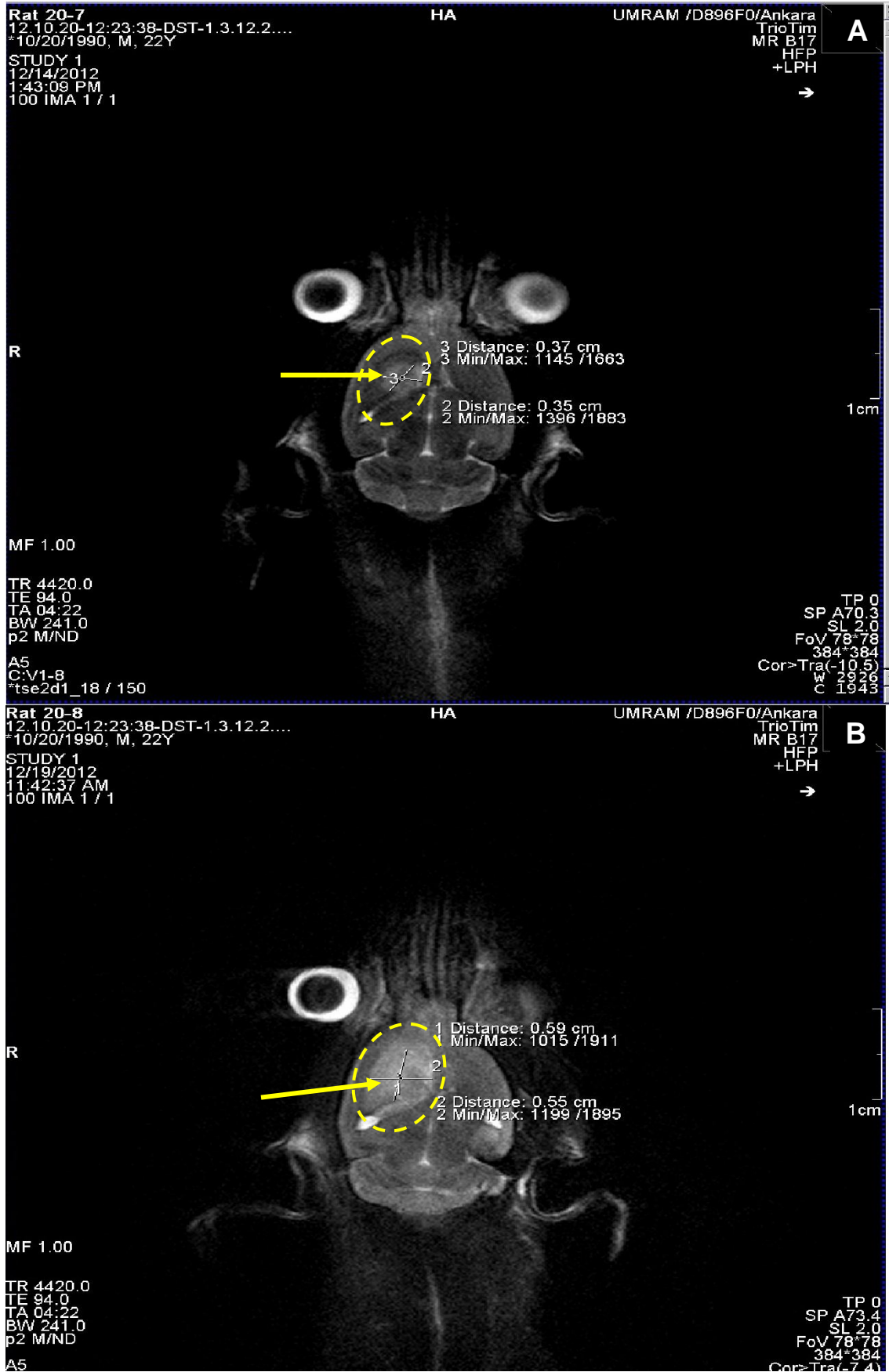
Şekil 4.19. Tümör oluşturulmuş siçanların tedavi öncesi ve sonrasında ölçülen tümör alanları (mm²).

Çizelge 4.9. Tedavi gruplarının *intravenöz* uygulamasından sonra MR görüntüleme ile ölçülen tümör alanı ($n=3, \bar{X} \pm SS$).

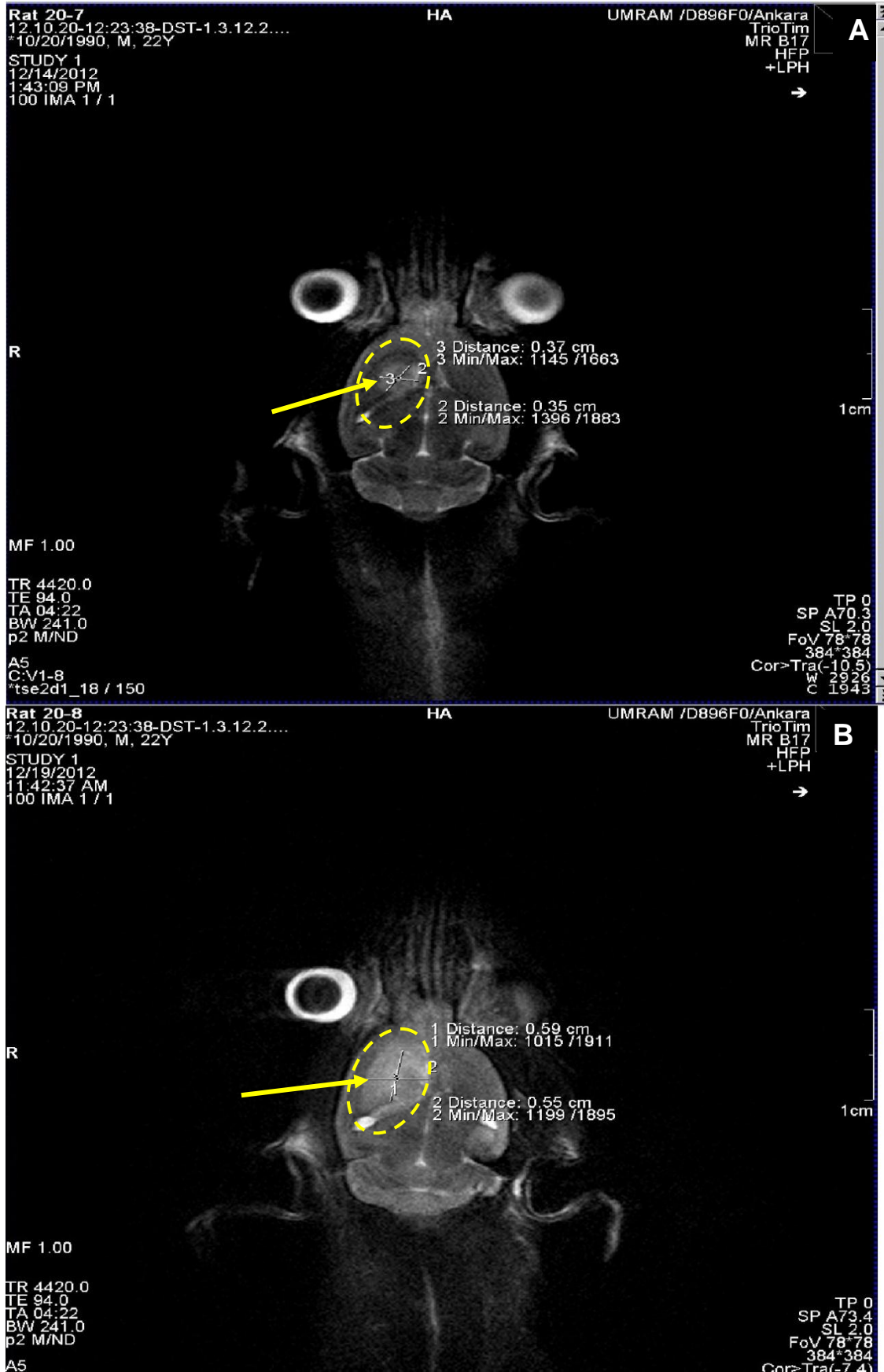
| Uygulanan formülasyon | Başlangıç tümör büyüklüğü (mm ²) | Tedavi sonrası tümör büyüklüğü (mm ²) | Tümör büyüklüğünde değişim (%) |
|-------------------------------------|--|---|--------------------------------|
| İlaç çözeltisi | 23.49 ± 5.7 | 38.4 ± 3.2 | (+) 63,47 ± 1,1 |
| Boş Nanopartikül Süspansiyon | 21.18 ± 7.17 | 48.72 ± 7.3 | (+) 130,02 ± 1,0 |
| FTS içeren Nanopartikül Süspansiyon | 22.65 ± 6.43 | 5.39 ± 5.8 | (-) 76,20 ± 1,2 |
| Kontrol (tedavi yok) | 23.99 ± 5.3 | 49.56 ± 6.33 | (+) 106 ± 1,4 |

Çizelge 4.10. Tedavi gruplarının *intratümöral* uygulamasından sonra MR görüntüleme ile ölçülen tümör alanı ($n=3, \bar{X} \pm SS$).

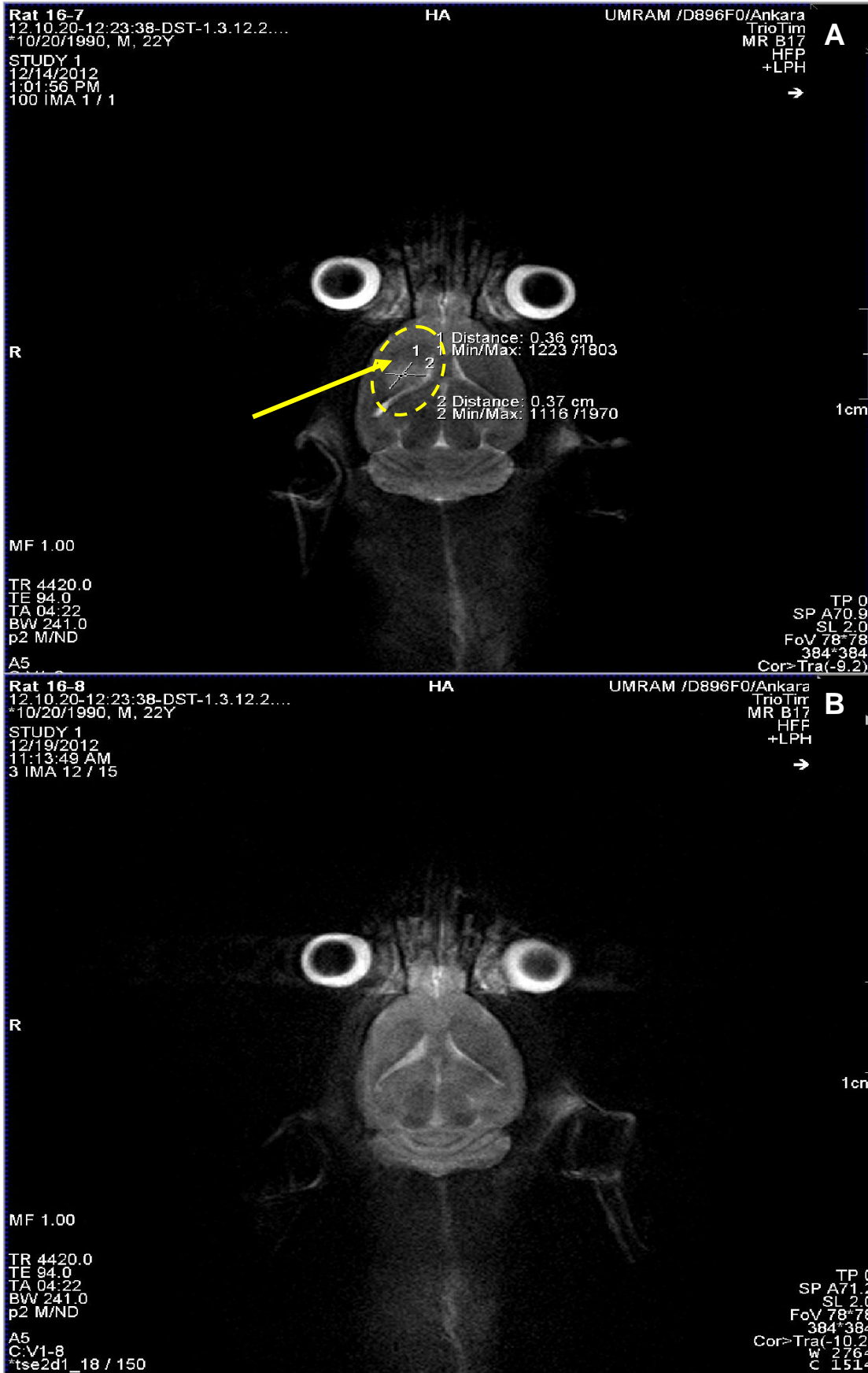
| Uygulanan formülasyon | Başlangıç tümör büyüklüğü (mm ²) | Tedavi sonrası tümör büyüklüğü (mm ²) | Tümör büyüklüğünde değişim (%) |
|-------------------------------------|--|---|--------------------------------|
| İlaç çözeltisi | 19.71 ± 2.4 | 31.4 ± 1.35 | (+) 59 ± 1,3 |
| Boş Nanopartikül Süspansiyon | 24.45 ± 1.76 | 42.72 ± 2.3 | (+) 74,72 ± 1,2 |
| FTS içeren Nanopartikül Süspansiyon | 22.15 ± 2.23 | 2.52 ± 1.33 | (-) 88,62 ± 1,2 |
| Kontrol (tedavi yok) | 23.99 ± 1.3 | 49.56 ± 2.13 | (+) 106,58 ± 1,4 |



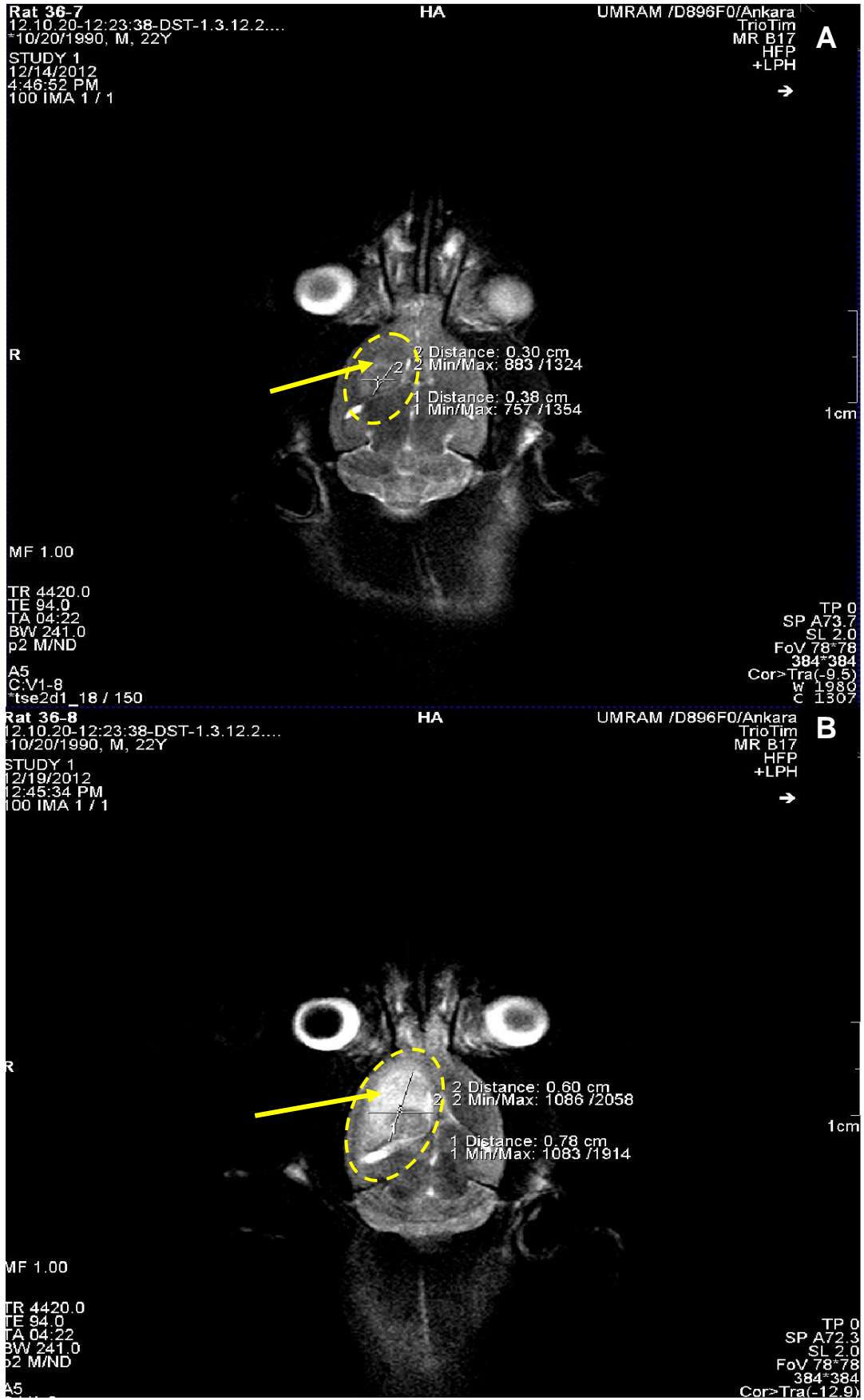
Şekil 4.20. İntravenöz ilaç çözeltisi uygulanan tedavi grubundaki bir sıçana ait MR görüntüsü. A) tedaviden önce, B) tedaviden sonra.



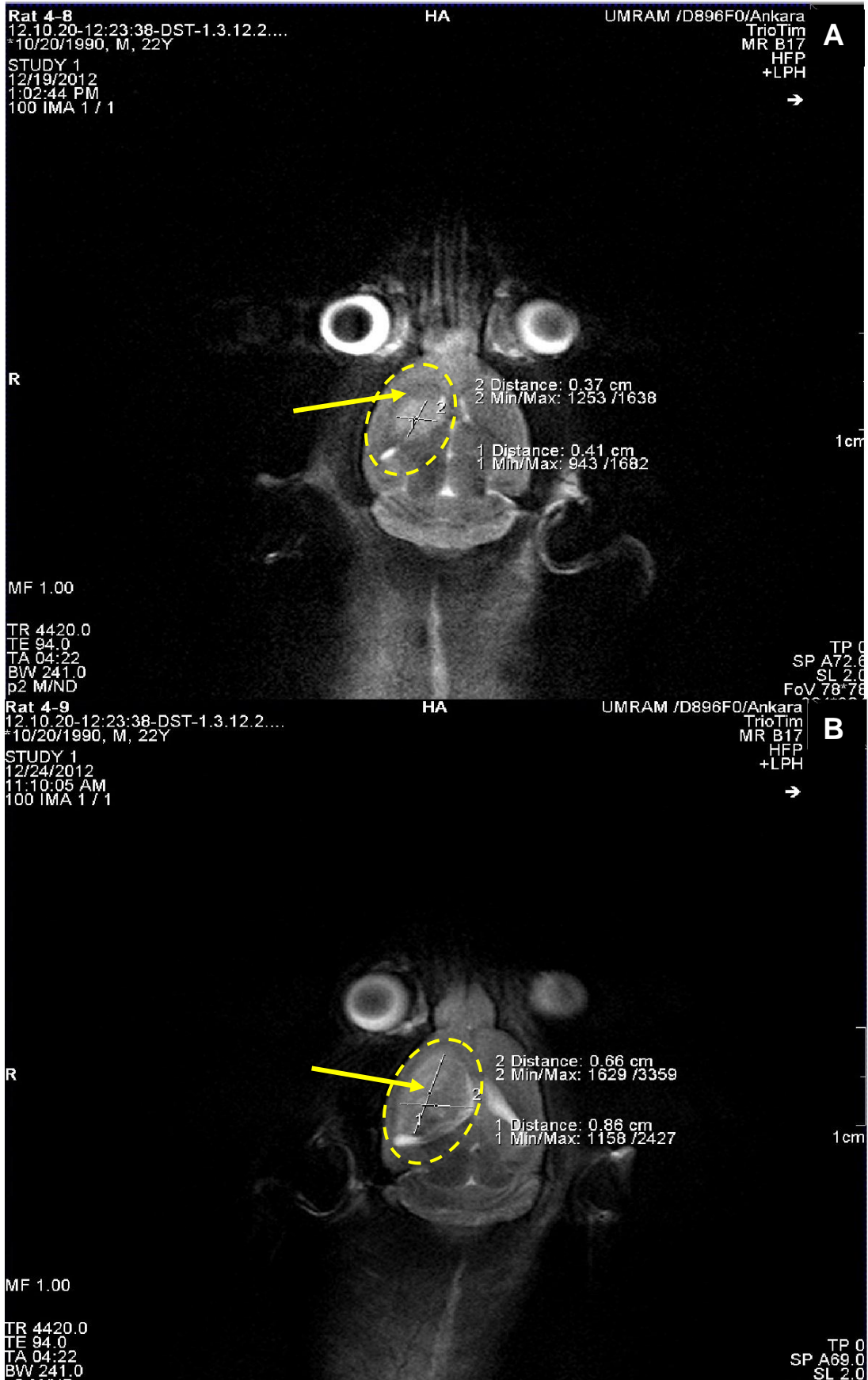
Şekil 4.21. İntravenöz boş nanopartikül formülasyonu uygulanan tedavi gurubundaki bir sıçana ait MR görüntüsü. A) tedaviden önce, B) tedaviden sonra.



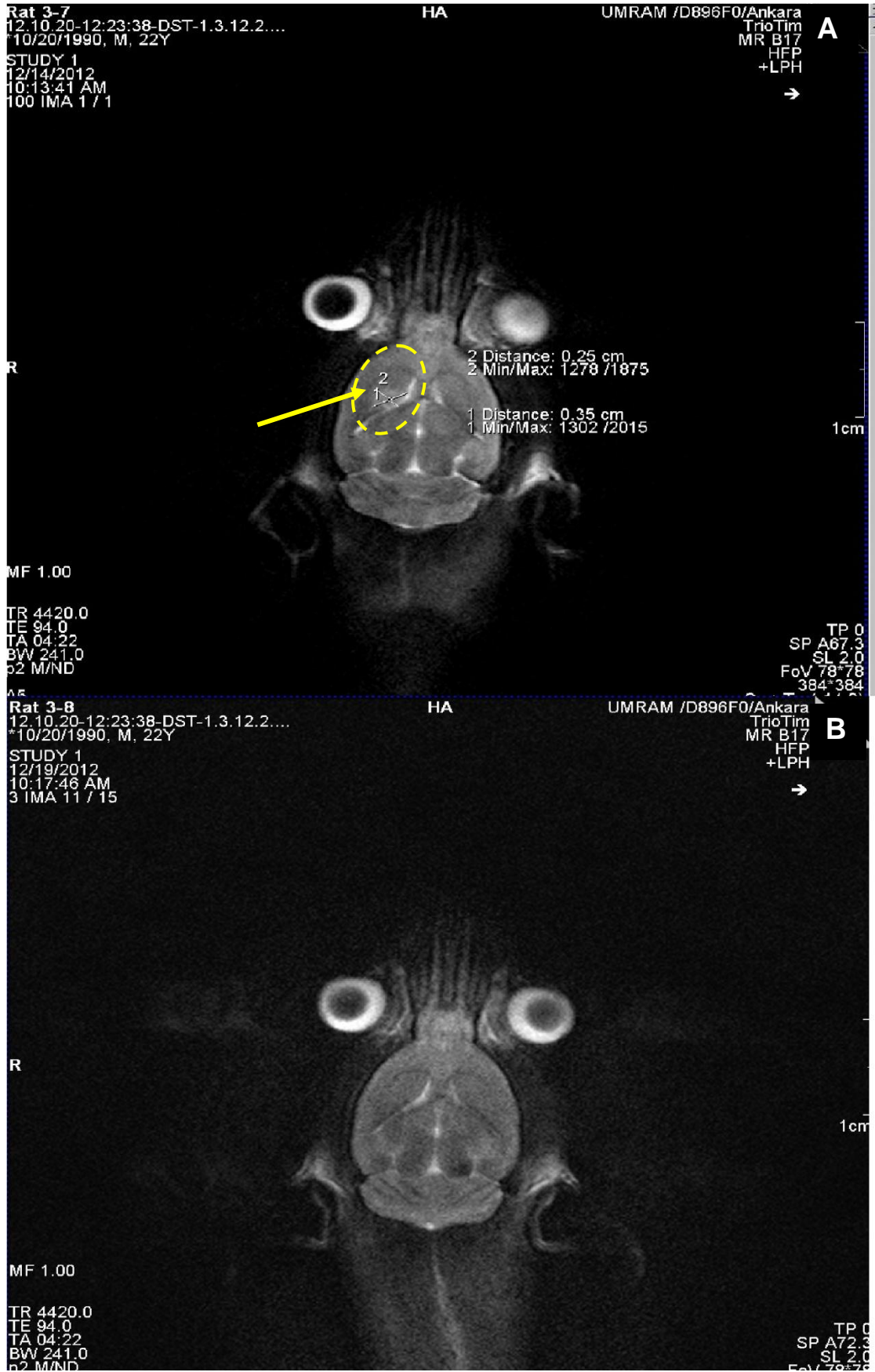
Şekil 4.22. İntravenöz FTS içeren nanopartikül formülasyonu uygulanan tedavi gurubundaki bir sıçana ait MR görüntüsü. A) tedaviden önce, B) tedaviden sonra.



Şekil 4.23. İntratümöral ilaç çözeltisi uygulanan tedavi gurubundaki bir sıçana ait MR görüntüsü. A) tedaviden önce, B) tedaviden sonra.



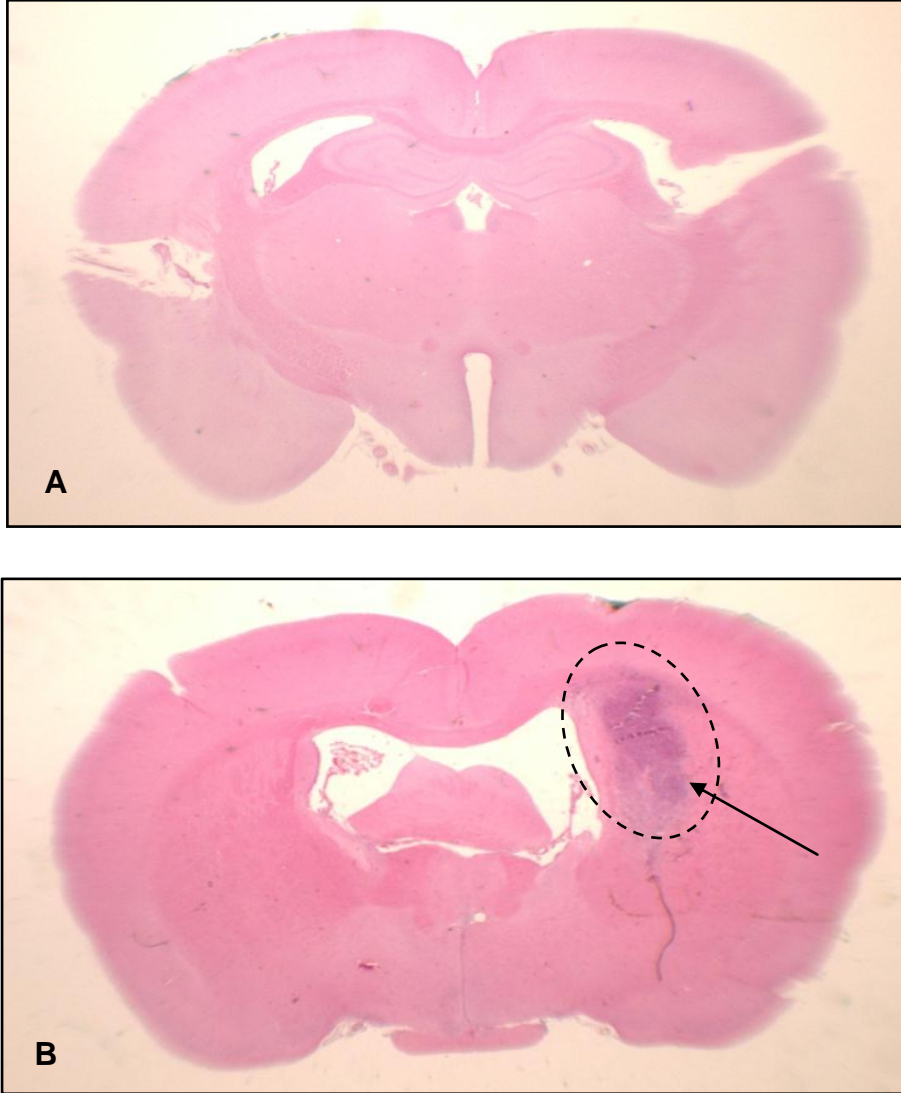
Şekil 4.24. İntratümöral boş nanopartikül formülasyonu uygulanan tedavi gurubundaki bir sıçana ait MR görüntüsü. A) tedaviden önce, B) tedaviden sonra.



Şekil 4.25. İntratümöral FTS içeren nanopartikül formülasyonu uygulanan tedavi gurubundaki bir sıçana ait MR görüntüsü. A) tedaviden önce, B) tedaviden sonra.

4.10.3. Histolojik Değerlendirme

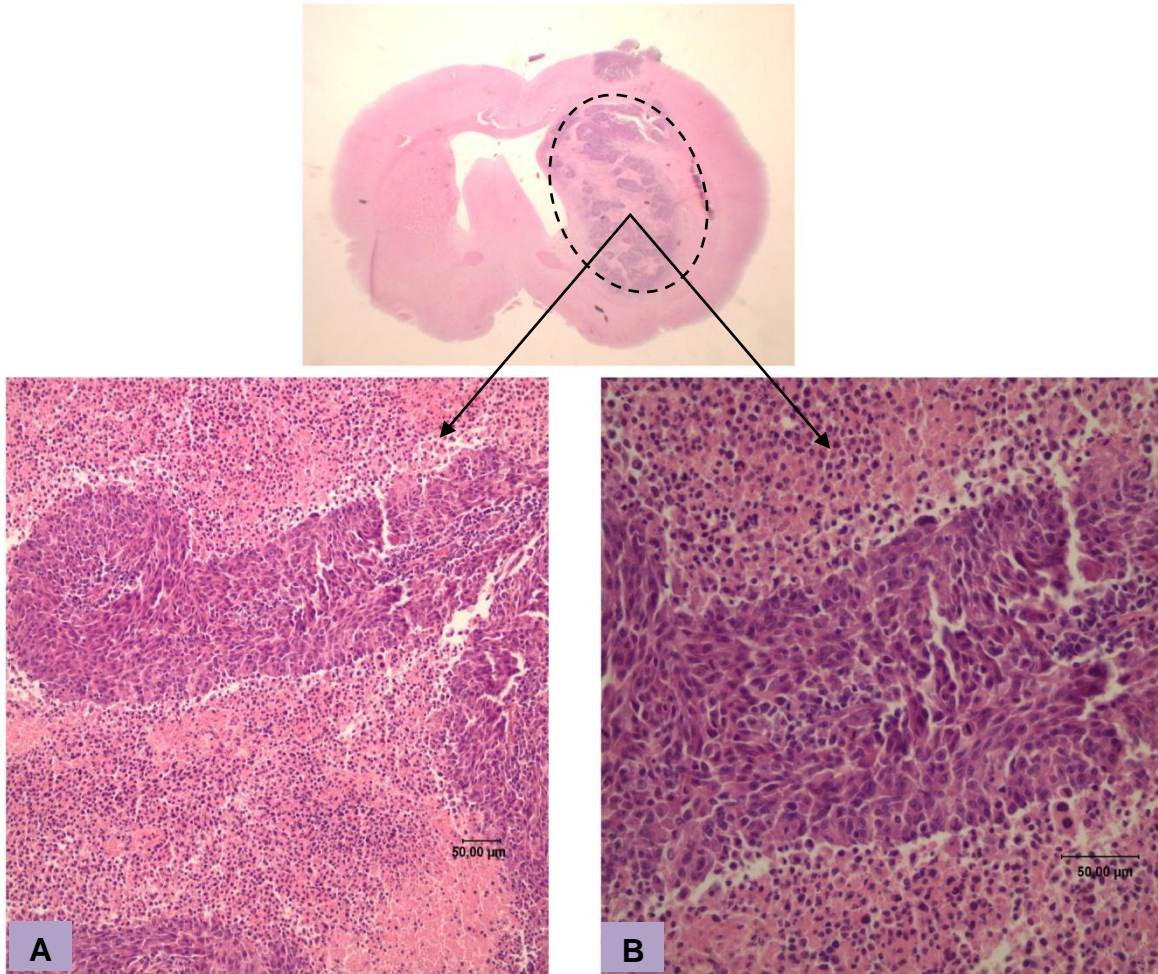
Sıçanlarda MR ile tespit edilen tümör oluşumunun teyidi için histolojik değerlendirme Bölüm 3.2.7.5.2.' de açıklandığı gibi yapılmıştır. Sıçanlara uygulanan son MR görüntüleme sonrası aynı gün hayvanlar sakrifiye edilmiş, çıkarılan beyinlerden 6 µm'lik parafin kesitler hazırlanarak ve her bir kesit Hematoksilin Eosin ile boyanarak ışık mikroskobunda incelenmiştir (şekil 4.26).



Şekil 4.26. Tümör oluşmamış (a) ve tümör oluşmuş (b) sıçan beynine ait kesitlerinin Hematoksilin Eosin boyası ile boyanması sonucu elde edilen ışık mikroskobu görüntüntülerine ait bir örnek (10 x büyütme ile).

Tüm örnekler üzerinde yapılan histolojik değerlendirmelerde, tümörün varlığı ve alansal büyüklüğü teyid edilmiştir. Histolojik değerlendirme sırasında elde edilen ışık mikroskobu görüntüntülerine ait bir örnek Şekil 4.26'de verilmiştir. Şekil 4.26'de görüldüğü üzere, tümör oluşmamış (a) sıçan beyninin tümü pembe renkle karakterize iken, tümör oluşmuş (b) sıçan beyninde tümör bölgesi mor renk ile karakterize olmuştur.

Tümör oluşmuş dokuda meydana gelen değişiklikleri değerlendirmek için, örneklerin ışık mikroskobunda daha büyük görüntüleri elde edilmiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. Tümör oluşmuş sıçanda beyin kesitinin Hematoksilin Eosin boyası ile boyanması sonucu elde edilen ışık mikroskobu görüntülerine ait bir örnek A) 40 x B) 100x büyütme.

Şekil 4.27'den de görüleceği üzere, tümör alanının hiperkromatik olduğu (daha koyu renkte, mor renkli), pleomorfik ve kromatinden zengin hücreler içerdiği belirlenmiştir. Bu alandaki artmış mitoz dikkati çekmektedir. Tümör içindeki damarlarda endovasküler proliferasyon görülmektedir.

5. TARTIŞMA

Hedeflendirilmiş kemoterapinin amacı, tümör hücrelerinin normal hücrelerden daha fazla zarar görmesini sağlayarak antikanser ilaçların dağılımı, alımı ya da etkilerinin değiştirilmesidir. Söz konusu tümörün beyinde olması Kan Beyin Engeli (KBE) nedeniyle hedeflendirmenin yanında bu engelin aşılmasını da gerektirmektedir. Sitotoksik ilaçların hedef bölgelere yönlendirilerek normal dokularda meydana gelebilecek zararın minimuma indirilmesi ve KBE'nin aşılması için lipozomlar, nanopartiküller, dendrimeler ve miseller gibi nanoteknoloji temelli ilaç taşıyıcı sistemlerin başarılı bir şekilde uygulanabileceği bildirilmektedir [254].

Beyin tümörlerinin tedavisinde hem sistemik hem de lokal uygulama için tasarlanabilen nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler dikkat çekmekte ve ümit vaad etmektedir [199]. Beyin tümörlerinin tedavisinde nanopartiküler sistemler:

- Sistemik uygulama için: KBE'nden geçemeyen etkin maddeleri enkapsüle ederek, taşıdıkları yüzey özellikleri ve partikül büyüklükleri nedeniyle bu engelden geçişlerini sağlamak; lokal ilaç konsantrasyonunda artış ve kontrollü ilaç salımı sağlamak; sistemik yan etkilerde azalma avantajlarını sunmak amacıyla,
- Lokal uygulama için: taşıdıkları yüzey özellikleri ve partikül büyüklükleri nedeniyle içerdikleri ilaçların biyolojik membranlardan geçişini artırarak ve/veya enzim inaktivasyonuna karşı koruyarak ilacın hücre veya dokuya seçiciliğini artırmak; intratümöral veya tümörün çıkarılmasını takiben oluşan kaviteye enjeksiyonları sonucunda lokal ilaç konsantrasyonunda artış ve kontrollü ilaç salımı sağlamak; sistemik yan etkilerde azalma avantajlarını sunmak amacıyla hazırlanabilirler [255].

KBE'nin nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler ile aşılmasında kullanılan yaklaşımlardan biri de nanopartiküllerin lipit/lipit-PEG ile konjugasyonu, hibridizasyonu veya kaplanmasıdır. Fenart ve ark. [246] tarafından yapılan bir çalışmada, 60 nm büyüklüğünde hazırlanan maltodekstrin nanopartikülleri anyonik, katyonik veya non-iyonik lipitlerle kaplanmış ve KBE'den geçişleri değerlendirilmiştir. Çalışmada anyonik veya katyonik lipit kaplı nanopartiküllerin kaplı olmayanlara göre KBE'den geçişi 3 veya 4 kat artırdığı bildirilirken, non-

iyonik lipit ile kaplı formülasyonlarda geçişte kontrol grubuna göre herhangi bir değişiklik tespit edilememiştir.

Farnesil tiyosalisilik asit (FTS), malign tümörlerin çoğunda yüksek oranda bulunan Ras proteinlerinin spesifik inhibitörü olan bir ilaçtır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda FTS' in in vitro hücre kültürlerinde gliomlara karşı etkili olduğu bulunmuştur [224]. Bununla birlikte FTS KBE' ni etkin konsantrasyonda geçememektedir [225].

Goldberg ve ark. [226] tarafından yapılan bir çalışmada, FTS beyin tümörü taşıyan sıçanlara "convection enhanced delivery" (CED) tekniği ile intratümöral olarak uygulanmış ve kontrol grubuna göre tümör hacmini azalttığı bildirilmiştir. Yapılan literatür taramalarında FTA içeren nanopartiküler bir sisteme rastlanmamıştır.

Tez çalışmamızın konusu, beyin tümörlerinin etkin şekilde tedavisi için kullanılacak, KBE' ni etkin konsantrasyonda geçemeyen ve yeni nesil ümit verici antineoplastik ilaçlardan olan FTS içeren, lipit/katyonik lipit-PEG ile fonksiyonelleştirilmiş (hibrit) PLGA nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması ve etkinliklerinin RG2 hücreleri ile gliom oluşturulmuş sıçanlarda intratümöral veya intravenöz yoldan uygulanarak değerlendirilmesidir. Bu şekilde, nanopartiküllerin hibrit şeklinde hazırlanmalarının, hazırlanan hibritin katyonik özelliğinin ve uygulama yolunun tümör tedavisinin başarısına etkisi değerlendirilmiş olacaktır.

Tezin tartışma bölümünde konunun daha iyi anlaşılabilmesi için bulgular kısmında verilen sıralama izlenerek, öncelikle etkin madde üzerinde yapılan çalışmalar ve analitik yöntem validasyonu ile ilgili bulgular incelenecektir. Daha sonra nanopartikül formülasyonuna etki eden parametreler ve nanopartikül hazırlanmasında kullanılan işlemler değerlendirilecektir.

Tartışmanın son kısmında elde edilen nanopartiküllerin morfolojik özellikleri, partikül büyüklüğü, ilaç yükleme kapasitesi, in vitro salım özellikleri ve biyolojik aktivitenin saptanması amacıyla gerçekleştirilen hücre kültürü sonuçları ve in vivo deney bulguları irdelenecektir.

5. 1. Etkin Madde Üzerinde Yapılan Çalışmalar

5.1.1. Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özelliklerinin Saptanması

FTS'in UV spektrumu incelendiğinde asetonitril içinde maksimum absorban 322 nm de elde edilmiştir (Şekil 4.1). Literatürde FTS' in kalitatif veya kantitatif analizinin UV spektrofotometre ile yapıldığı bir yöntemle rastlanamamıştır. Ancak, FTS'in miktar tayininin HPLC ile gerçekleştirildiği bir çalışmada [256] UV dedektör dalga boyu 322 nm olarak verilmiş olup çalışmamızda tespit edilen dalga boyu ile uyum içindedir.

FTS'in FT-IR spektrumu (Şekil 4.2.) incelendiğinde, torba şeklinde karakteristik O-H gerilim bantları ($2500-3000\text{ cm}^{-1}$), aromatik yapıya ait C-H gerilim bantları (3000 cm^{-1}), kuvvetli alifatik C-H gerilim bantları (2912 cm^{-1}), C=O gerilim bantları (1676 cm^{-1}), C=C gerilim bantları (1561 cm^{-1}), C-O gerilim bantları (1256 cm^{-1}) ve C-S gerilim bantları (702 cm^{-1}) tespit edilmiş olup kimyasal formülü ile uyumludur. Literatürde FTS' in FT-IR spektrumuna ait herhangi bir bulguya rastlanamadığından bulgularımızla karşılaştırma yapılamamıştır.

FTS'in DSC termogramı Şekil 4.3'de verilmiştir. Literatürde FTS' in DSC termogramına ait herhangi bir bulguya rastlanamadığından bulgularımızla karşılaştırma yapılamamıştır. Ancak, literatürde FTS'in erime derecesi $63-66\text{ }^{\circ}\text{C}$ olarak belirtilmiş olup DSC termogramımızla desteklenmektedir.

Yukarıda belirtildiği şekilde etkin maddeye ait fizikokimyasal özellikler saptandıktan sonra miktar tayini çalışmaları gerçekleştirilmiş ve analitik yöntem validasyonu yapılmıştır.

5.1.2. Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu çalışmaları HPLC kullanılarak gerçekleştirilmiştir. FTS'e ait HPLC kromatogramı Şekil 4.4'de verilmiştir. Kromatogramda da görüleceği üzere FTS' e ait keskin bir pik elde edilmiş olup alıkonma zamanı 11 dakikadır.

Doğrusallık çalışmalarında 0.097 - 25 µg/ml arası konsantrasyonlar seçilmiş olup, bu konsantrasyonlar çalışma aralığını kapsamaktadır. Deney bulguları incelendiğinde belirtilen konsantrasyon aralığında, konsantrasyon ile elde edilen pik alanları arasında doğrusal ilişki saptanmış olup, regresyon analizi bulguları Şekil 4.6'da verilmiştir. Çalışmada kalibrasyon doğru denkleminin R² değerinin 1'e çok yakın olması FTS konsantrasyonu ile pik alanı arasındaki ilişkinin incelenen konsantrasyon aralığında doğrusal olduğunu göstermektedir.

Yöntemin kesinliği için yapılan çalışmalarda tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik sonuçları değerlendirildiğinde (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2), VK değerleri %2' nin altında bulunmuştur. Validasyon çalışmalarında VK'nın % 2'den küçük olması istendiğinden [257, 258] elde edilen bu değerler uygun bulunmuştur.

Yöntemin duyarlılığı çalışmalarında saptama sınırı 0.050 µg/ml ve miktar tayini sınırı 0.097 µg/ml olarak bulunmuştur.

Yöntemin doğruluğu bulguları Çizelge 4.3'de verilmiştir. Çizelgeden de görüleceği üzere, kullanılan analitik yöntem doğruluk parametresini sağlamaktadır. Bütün ortalama bağıl hata değerleri sınır olarak kabul edilen % 15' in altındadır [257, 258].

Yöntemin özgünlüğü için yapılan çalışmalarda nanopartikül formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddelerin FTS ile aynı şartlarda pik verip vermedikleri incelenmiştir. Bunun sonucunda FTS'e ait alıkonma süresinde herhangi bir pik görülmemiştir (Şekil 4.5). Bu sonuç kullanılan analitik yöntemin özgün olduğunu göstermektedir.

FTS'in miktar tayini deneyleri sırasındaki stabilitesinin değerlendirildiği çalışmalarda, FTS çözeltisinde 24. saatin sonunda önemli bir değişiklik meydana gelmemiştir ve bu sonuç etkin maddenin deney süresince stabil olduğunu göstermektedir.

Yöntemin doğrusallık, doğruluk, kesinlik, duyarlılık, özgünlük ve stabilite bulguları tümüyle değerlendirildiğinde, bu yöntemin analitik amaçla validasyonunun yapıldığı ve geçerli bir yöntem olduğu görülmektedir.

5.1.3. FTS'in Çözünürlük Çalışması

Tez çalışmamızda etkin madde olan FTS, suda çözünmez, etanol, DMSO, dimetilformamid gibi organik çözücülerde çözünür (20 mg/mL) [225]. FTS'in çözünürlük sorununun özellikle in vitro salım ve hücre kültürü çalışmalarında zorluklar yaşanmasına neden olacağı düşünüldüğünden, in vitro salım ortamı ve hücre kültürü ortamı olarak kullanılabilir ortamlardaki çözünürlüğünün tespit edilmesine karar verilmiştir.

Buna göre çözünürlük çalışmaları için üç farklı ortam olarak: PBS (pH 7.4), %0.1 (a/h) Tween 20 içeren PBS (TPBS); %10 (h/h) fetal sığır serumuna (FSS) ek olarak %0.1 DMSO (h/h) içeren PBS çözeltileri hazırlanmıştır. Bölüm 3.2.3' de belirtilen yöntemle gerçekleştirilen bu çalışmadan elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4' de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, salım ortamında sink koşulların rahatlıkla sağlanabilmesi ve FTS' in yüksek oranda ortamda çözünebilmesi için TPBS çözeltisinin salım ortamı olarak kullanılmasına, %0.1 DMSO ve %10 FSS içeren hücre kültür ortamının hücre kültürü deneylerinde kullanılmasına karar verilmiştir (Şekil 4.7).

Çözünürlük çalışmalarına ilave olarak FTS'in bu ortamlar içindeki stabilitesi de değerlendirilmiştir (Çizelge 4.5). Çizelgeden de görüleceği üzere, FTS'in TPBS içinde parçalanmadan kalan miktarı 18.saat sonunda % 95 olup, bu miktar %10 (h/h) FSS ve %0.1 DMSO (h/h) içeren PBS çözeltisinde % 60' a düşmüştür. Deneysel çalışmalar gerçekleştirilirken bu bulgular dikkate alınmıştır. Örneğin in vitro salım çalışmalarında ortamın hepsi alınarak ilacın salım ortamında parçalanması engellenmiş, hücre kültürü çalışmalarında etkin maddenin sürekli taze çözeltileri hazırlanarak hemen kullanılmıştır.

5.2. Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

Tez çalışmamızda lipid-polimer hibrit nanopartikülleri hazırlanmıştır. Lipid-polimer hibrit nanopartikülleri ilaç taşıyıcı sistem olarak pek çok hastalığın tedavisinde ümit vaat eden sonuçlar vermektedir. Bu sistemler hidrofobik polimerik çekirdek ve

lipid tabakası ile ayrılan bir hidrofilik polimerik kabuktan meydana gelmektedir. Lipid-polimer hibrit nanopartikülleri lipozomlar ve nanopartiküllerin avantajlarını (lipozomların biyolojik membranlar ile etkileşme, nanopartiküllerin stabilite avantajları) bir araya getiren ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Ayrıca suda az çözünen ilaçların yüksek derecede enkapsülasyonu, uzun süreli ilaç salımı, mükemmel serum stabiliteleri ve değişik hücrelere hedeflendirilmeleri gibi avantajları da bulunmaktadır [259].

Hibrit nanopartiküllerin hazırlanmasında çekirdek (nispeten hidrofobik polimer) olarak, FDA onaylı, toksik olmayan, biyogeçimli ve biyoparçalanır özellikte olan sentetik bir polimer olması nedeniyle PLGA seçilmiştir. Buna ilaveten, PLGA'nın iki farklı kopolimer oranı (50:50 ve 85:15) denenmiş ve uygun karakterizasyona sahip olan ve en uzun salım süresi elde edilen formülasyonun ileri çalışmalara alınması planlanmıştır. Hibrit nanopartiküllerde lipid ve hidrofilik kabuk özelliklerini sağlamak üzere (PEG-DSPE(poli(etilenglikol)-2000-1,2-distearil-3-sn-fosfatidiletanolamin) (DSPE-PEG) kullanılmıştır. Bazı formülasyonlara pozitif yük kazandırmak amacıyla pozitif yüklü bir lipid olan 1,2-dioleoyil-3-trimetilamonyum-propan (DOTAP) ilavesi yapılmıştır. Literatürde KBE'nin aşılmasında nanopartiküllerin lipit/Lipit-PEG ile konjugasyonu veya kaplanması, pozitif yük kazandırılması çalışmaları bulunmaktadır. Fenart ve ark. [246] tarafından yapılan bir çalışmada, 60 nm büyüklüğünde hazırlanan maltodekstrin nanopartikülleri anyonik, katyonik veya non-iyonik lipitlerle kaplanmış ve KBE'den geçişleri değerlendirilmiştir. Çalışmada anyonik veya katyonik lipit kaplı nanopartiküllerin kaplı olmayanlara göre KBE'den geçişi 3 veya 4 kat artırdığı bildirilirken, non-iyonik lipit ile kaplı formülasyonlarda geçişte kontrol grubuna göre herhangi bir değişiklik tespit edilememiştir. Huang ve ark [196] demiroksit nanopartiküllerini hazırlamış ve katyonik lipit (DOTAP (1,2 dioleoil-3-(trimetilamonyum) propan) ve PEG ile modifiye edilmiş katyonik lipit (PEG-DSPE(poli(etilenglikol)-2000-1,2-distearil-3-sn-fosfatidiletanolamin) karışımı (3:1 molar oran) ile kaplayarak formülasyonların insan servikal kanser (HeLa), insan prostatik adenokarsinom (PC-3), fare nöroblastom (Neuro-2a) ve fare kolorektal adenokarsinoma hücrelerine alımlarını incelemişlerdir. Çalışmada kontrol grubuna göre kaplanmış nanopartiküllerin hücre içine alımlarının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda FTS yüklü PLGA-DSPE-PEG hibrit nanopartikülleri emülsiyon sonikasyon yöntemi ile hazırlanmıştır [260]. Bu yöntemin suda çözünmeyen ilaçların hibrit nanopartikül şeklinde hazırlanması için en uygun yöntem olduğu bildirilmiştir [260].

5.3. Hazırlanan Mikrokürelerin Karakterizasyonu

5.3.1. Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel

Yapılan literatür araştırmalarında, beyin tümörlerinin nanopartiküler sistemler ile tedavisi için hazırlanan sistemlerde partikül büyüklüğünün 200 nm'nin altı olarak belirlendiği tespit edilmiştir [121, 261]. Bu nedenle tez çalışmamızda yapılan ön formülasyon çalışmalarında formülasyon parametreleri üzerinde yapılan değişiklikler ile bu partikül büyüklüğü aralığının yakalanmasına çalışılmıştır.

Çalışmada hazırlanan tüm nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklükleri 94 ± 2.3 - 155 ± 2.7 nm arasında bulunmuştur (Çizelge 4.6). Bu durum yukarıda açıklandığı üzere, hazırlanan formülasyonların partikül büyüklüğü açısından beyin tümörlerinin nanopartiküler sistemlerle tedavisine yönelik olan çalışmalarla uyum içinde olduğunu göstermektedir. Çizelge 4.6'dan da görüleceği üzere, PLGA 50:50 ve PLGA 85:15-DSPE-PEG formülasyonlarında etkin madde içermeyen formülasyonların partikül büyüklüğü sırası ile 94 ± 2.3 nm ve 102 ± 2.0 nm iken dolu nanopartiküllerin partikül büyüklükleri sırası ile 121 ± 3.2 nm ve 147 ± 0.7 nm olarak bulunmuştur. Benzer şekilde DOTAP içeren PLGA 50:50 ve PLGA 85:15-DSPE-PEG formülasyonlarında etkin madde içermeyen formülasyonların partikül büyüklüğü sırası ile 120 ± 3.4 nm ve 145 ± 2.5 nm iken dolu nanopartiküllerin partikül büyüklükleri sırası ile 127 ± 2.0 nm ve 155 ± 2.7 nm olarak bulunmuştur. Her iki grup için de boş ve etkin madde içeren formülasyonların partikül büyüklükleri arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.5$). Wang ve ark. [262] tarafından yapılan bir çalışmada vinkristin sülfat ve kurkumin yüklü mPEG-PLGA nanopartikülleri hazırlanmış ve boş nanopartiküllere göre etkin madde yüklü formülasyonların partikül büyüklüğünün daha büyük olduğu bildirilmiştir.

Şekil 4.8'den de görüleceği üzere nanopartiküllerin partikül büyüklüğü dağılımı monomodal bir dağılım göstermekte olup homojene yakındır.

Zeta potansiyel, kolloidal stabilitenin değerlendirilmesi ve in vivo uygulamalarda partikülün sahip olduğu yüzey yükünün önemi nedeni ile incelenmesi gereken bir parametredir. Bunun dışında çalışmamızda zeta potansiyelin kan beyin engelini aşılması açısından da önemi bulunmaktadır. Nanopartiküllerin KBE'nden geçişini artırmak için literatürde yer alan yaklaşımlardan biri de nanopartiküllere katyonik yük kazandırmaktır. Agarwal ve ark. [199] tarafından yapılan bir çalışmada, antikanser bir ilaç olan doksisisiklin yüklü katı lipid nanopartikülleri hazırlanmış ve katyonik sığır serum albumini ile konjuge edilerek i.v. uygulamayı takiben KBE'den geçişi değerlendirilmiştir. Çalışmada koagülasyona tabi tutulmuş formülasyonların, tabi tutulmamış formülasyonlar ve serbest doksisisikline göre daha sitotoksik olduğu ve KBE'den çok daha yüksek oranda geçtiği tespit edilmiştir.

Çalışmada hazırlanan DOTAP içermeyen, boş ve ilaç yüklü nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri $(-28.4 \pm 2.0 \text{ mV}) - (-32.4 \pm 2.3 \text{ mV})$ arasında bulunmuştur (Çizelge 4.6). Etkin madde yüklenmesinin zeta potansiyel üzerinde herhangi bir etkisi olmamıştır ($p > 0.05$). Benzer şekilde, DOTAP içeren, boş ve ilaç yüklü nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri $(-11.1 \pm 1.1 \text{ mV}) - (-13.0 \pm 1.2 \text{ mV})$ arasında bulunmuş olup, ilaç yüklemesinin zeta potansiyel üzerinde herhangi bir etkisi olmamıştır ($p > 0.05$). DOTAP içermeyen ve içeren formülasyonlar karşılaştırıldığında DOTAP'ın katyonik özelliği nedeniyle zeta potansiyel değerlerinde istatistiki olarak anlamlı bir şekilde pozitif yöne doğru kayma olmuştur ($p < 0.5$). Ancak zeta potansiyel değerleri hala negatiftir. Daha fazla DOTAP ilavesi formülasyonun nanopartikül özelliklerinde olumsuz sonuçlara neden olduğundan yapılmamış olup, zeta potansiyel değerindeki bu küçük ölçüdeki değişikliğin çalışmanın ilerleyen aşamalarında herhangi bir farka neden olup olmayacağını araştırılması için bu formülasyonlar da ileri aşamalara alınmıştır.

5.3.2. Nanopartiküllere Yüklenen FTS Miktarı

Literatürde FTS içeren herhangi bir nanopartikül formülasyonuna rastlanamamıştır. Bu nedenle nanopartiküllere hangi oranda FTS yükleneceğine dair bir bilgi elde edilememiştir. Bunun üzerine, yapılan ön denemelerde polimer ağırlığının % 5, 10 ve %20 si oranında FTS yüklemesi yapılmıştır. Ön denemelerde %5'in üzerinde yapılan ilaç yükleme çalışmaları ile elde edilen sonuçların %5 yükleme yapılanlara göre bir fark meydana getirmemesinden dolayı hedef yükleme yüzdesi %5 olarak tespit edilmiştir.

Hazırlanan formülasyonlara ait ilaç yükleme etkinliği bulguları Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8' de görülmektedir. DOTAP içermeyen formülasyonlarda, PLGA 50:50 ve PLGA 85:15 kopolimer oranları kullanılanlarda ilaç yükleme etkinliği sırasıyla % 21 ± 2 ve % 28 ± 1.2 olarak belirlenmiştir. Daha yüksek oranda laktik asit içeren kopolimer ile hazırlanan formülasyonlarda ilaç yükleme etkinliği istatistiki olarak anlamlı bir şekilde artmıştır ($p < 0.05$). DOTAP içeren formülasyonlarda, DSPE-PEG/DOTAP oranının 50:50 olduğu formülasyonlarda yükleme etkinliği değerleri PLGA kopolimeri oranından etkilenmeyerek ($p > 0.05$) % 19 ± 1.6 ve % 24 ± 1.3 arasında bir değişiklik göstermiştir (Çizelge 4.8). Bundan farklı olarak, DSPE-PEG/DOTAP oranının 75:25 olduğu formülasyonlarda yükleme etkinliği değerleri PLGA kopolimeri oranından etkilenmiştir (PLGA 50:50 ve PLGA 85:15 için sırasıyla % 60 ± 1.3 ve % 29 ± 1.1) ($p < 0.05$). İlaç yükleme bulgularında bütün değerler dikkate alındığında en yüksek ilaç yükleme etkinliğinin PLGA 50:50 kopolimer oranının kullanıldığı ve DSPE-PEG/DOTAP oranının 75:25 olduğu formülasyon ile elde edildiği tespit edilmiştir. Literatürde lipid bazlı katyonik nanopartiküllere ilaç yüklemesi ile ilgili yapılan bir çalışmada, yüksek ilaç yükleme değerlerinin elde edilmesinde -formülasyondaki maddelerin yük etkileşimi açısından- optimum formülasyon oranlarının yakalanması gerektiği bildirilmiştir [263]. Bizim çalışmamızda en yüksek ilaç yükleme değeri PLGA 50:50 kopolimer oranının kullanıldığı ve DSPE-PEG/DOTAP oranının 75:25 olduğu formülasyon ile elde edilmiştir. DOTAP içeren formülasyonlar arasında bu formülasyon ileri aşamalara alınmıştır.

5.3.3. Yüzey Özellikleri

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının yüzey özellikleri Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ve Atomik Güç Mikroskobu (AFM) kullanılarak tespit edilmiştir.

Hazırlanan FTS yüklü formülasyonların SEM fotoğrafları Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Hazırlanan formülasyonların lipit içermesi nedeniyle SEM çekimi öncesi taramada tamamen küresel görünen nanopartiküllerde, özellikle yüksek büyütme oranlarında çekim sırasındaki elektron bombardımanı nedeniyle bir miktar erime benzeri deformasyon gözlenmiştir. AFM çekimleri ile bu durum bir nebze aşılmıştır. Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'dan da görüleceği üzere nanopartikül formülasyonları küresele yakın, yüzeyde herhangi bir ilaç kristali içermeyen ve homojen dağılım gösteren bir özellik sergilemiştir. AFM fotoğrafları da (Şekil 4.11, Şekil 4.12) bu bulguları destekler yöndedir.

5.3.4. İn Vitro Salım Bulgularının İrdelenmesi

Uygun salım ortamının seçilmesinden sonra yapılan in vitro salım çalışmalarında, zamanın fonksiyonu olarak nanopartiküllerden yüzde kümülatif salınan FTS 'e ait grafik Şekil 4.13' de verilmiştir.

Şekil 4.13'den de görüleceği üzere, DOTAP içermeyen formülasyonlar arasında PLGA 85:15 kopolimeri kullanılarak hazırlanan formülasyonların 50:50 kopolimeri kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerden daha hızlı bir salım gösterdiği tespit edilmiştir. Bulgularımızın aksine, literatürde bu konuda yapılan araştırmalarda PLGA 85:15 kopolimeri ile hazırlanan formülasyonlardan elde edilen ilaç salım profillerinin PLGA 50:50 ile hazırlananlara göre daha yavaş olduğu bildirilmiştir [264, 265]. Literatürde bu durum, kopolimerdeki laktik asit oranı yükseldikçe polimerin hidrofobikliğinin ve ilaç polimer arasındaki hidrofobik etkileşim olasılığının artması ve salımın polimer erozyonu ile gerçekleştiği durumlarda degradasyonun yavaşlaması ile açıklanmıştır. Çalışmamızda hazırlanan formülasyonlarda PLGA kopolimeri yanında nanopartikül yüzeyini hidrofilik hale getiren PEG zincirleri de bulunmaktadır. Bu nedenle bulgularımız, PEG zincirlerinin nanopartikül yüzeyinde hidrofilik bir alan oluşturarak su moleküllerinin hızla nanopartiküle difüze olmasına ve bu durumun kopolimerler arasındaki hidrofobiklik farkını ortadan kaldırarak ilacın difüzyonla salınmasına neden

olabileceğini düşündürmektedir. Buna ilaveten, PLGA 85:15 kopolimeri ile hazırlanan formülasyonların daha yüksek ilaç içermesi ve konsantrasyon gradyanı nedeniyle ilacın bu formülasyonlardan daha hızlı difüze olabileceği ve bunun da salımı hızlandırabileceği düşünülmektedir.

DOTAP içermeyen formülasyonlar ile elde edilen bulgulara paralel şekilde, DOTAP içeren formülasyonlar için de PLGA 85:15 kopolimeri kullanılarak hazırlanan formülasyonların 50:50 kopolimeri kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerden daha hızlı bir salım gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.13). Bu durum için de yukarıda DOTAP içermeyen formülasyonlar açısından verilen açıklama yapılabilir.

DOTAP içeren ve içermeyen formülasyonlar karşılaştırıldığında, DOTAP içeren formülasyonların FTS'i daha yavaş bir şekilde saldığı, salımın 150 saat kadar sürdüğü (DOTAP içermeyen formülasyonlarda salım 72. saatte tamamlanmıştır) tespit edilmiştir (Şekil 4.13). Literatürde bu konuda yapılan benzer bir çalışmaya rastlanmadığı için herhangi bir yorum yapılamamaktadır.

5.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

Tez çalışmamızda hazırlanan formülasyonların in vitro biyoaktivitesinin değerlendirilmesi amacıyla hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında beyin tümörü hücre dizisi olarak, insan gliom hücrelerine en benzer hücre gruplarından biri olduğu bildirilen RG2 hücre dizisi kullanılmıştır [218].

Çalışmamızda hücre kültürü deneylerine taşınacak formülasyonlar olarak, in vitro karakterizasyon bulguları göz önüne alınarak, PLGA 50:50 kopolimer oranına sahip (DOTAP içeren ve içermeyen) formülasyonlar seçilmiştir.

Literatürde FTS'in RG2 hücreleri üzerindeki sitotoksik özelliklerinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle hücre kültürü çalışmalarında ilk olarak, değişik konsantrasyonda FTS içeren çözeltilerin RG2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin tespiti ve LD₅₀ değerinin hesaplanması çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen bulgular kontrol grubuna göre hücre canlılığı olarak grafiklenmiş ve Şekil 4.14' de verilmiştir. Deneylerde 4 farklı

FTS konsantrasyonunda çalışılmış ve 2 farklı zaman aralığı sonunda hücre canlılık değerleri elde edilmiştir. Buna göre 3. günün sonunda uygulanan en yüksek FTS konsantrasyonu olan 200 μM 'lık çözelti, hücrelerin yaklaşık %30' unu öldürmüştür. Aynı konsantrasyondaki çözelti 5. günün sonunda ise RG2 hücrelerinde %90 oranında canlılık kaybına yol açmıştır. Uygulanan en düşük konsantrasyon değeri olan 25 μM 'lık FTS çözeltisi 3 günün sonunda hücreler üzerinde %98' lik bir canlılık değerine yol açarken, 5. günün sonunda bu canlılık değeri %80' e düşmüştür. Elde edilen bu sonuçlar değerlendirildiğinde, FTS' in LD_{50} değeri 100 μM olarak belirlenmiştir. Bu konsantrasyonun formülasyonların sitotoksitesinin belirlendiği hücre kültürü çalışmalarında ve in vivo çalışmalarda kullanılmasına karar verilmiştir. Ayrıca sonuçlardan 5. günde FTS'in daha yüksek etkinlik gösterdiğinin tespit edilmesi nedeniyle formülasyonların sitotoksitesinin belirlendiği hücre kültürü çalışmalarında ve in vivo çalışmalarda bu sürenin göz önünde bulundurulmasına karar verilmiştir.

Bölüm 3.2.6.1.2.' de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen, 100 μM konsantrasyonda FTS içeren nanopartikül formülasyonlarının in vitro biyoaktivitelerinin değerlendirilmesi çalışmalarından elde edilen % hücre canlılığı değerleri Şekil 4.15.'de verilmiştir. Şekil 4.15' den görüldüğü gibi, etkin madde içeren DOTAP içeren formülasyonlar en yüksek antikanser aktivite göstermiştir. Etkin madde içermeyen nanopartiküllerin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında düşük bir sitotoksiteye sahip oldukları tespit edilmiştir.

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının hücresel alımları, Bölüm 3.2.4.2.' de açıklandığı şekilde değerlendirilmiştir. Nanopartikül formülasyonlarının hücresel alımlarının kalitatif olarak değerlendirildiği floresan mikroskop görüntülerinden de görüleceği üzere, RG2 hücreleri DOTAP içeren formülasyonları, içermeyenlere göre daha fazla miktarda almıştır (Şekil 4.16, Şekil 4.17) Bunun nedeni olarak DOTAP' in taşıdığı pozitif yük sayesinde, formülasyonun hücre içerisine etkin bir şekilde taşınabilmesini sağlaması düşünülebilir [239, 240].

5.5. İn Vivo Çalışmalar

Tez çalışmamızda etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerinin tespiti, in vitro formülasyon geliştirme, karakterizasyon ve hücre kültürü çalışmalarının ardından in vivo çalışmalara geçilmiştir. İn vivo çalışmalarda uygulanacak formülasyonun seçilmesi amacıyla formülasyonlardan elde edilen karakterizasyon ve hücre kültürü bulguları değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda en yüksek oranda ilaç yüklemesine sahip olan, etkin maddeyi en uzun sürede salan ve hücre kültürü çalışmalarında RG2 hücrelerine karşı en sitotoksik özellik gösteren PLGA 50:50-DSPE-PEG/DOTAP (75:25) nanopartikül formülasyonu in vivo deneyler için seçilmiştir.

Tedavi dozu tüm gruplarda aynı tutulmuştur. Tedavi dozunun belirlenmesinde hücre kültürü çalışmalarında elde edilen LD50 değeri temel alınmıştır. Bunun için, hücre kültürü LD50 deneylerinden elde edilen değer olan 100 µM FTS'i içerecek şekilde formülasyonlar ve etkin madde çözeltisi hazırlanmış ve tedavide uygulanmıştır. Uygulanan hacim intratümöral ve intravenöz uygulamalar için aynı (20 µL) tutulmuş olup bu miktar özellikle intratümöral uygulamalar için sıçanların tolere edebileceği maksimum miktar olarak ön denemelerde tespit edilmiştir.

İN vivo çalışmalarda, seçilen formülasyonun etkinliğinin RG2 hücreleri ile gliom oluşturulmuş sıçanlarda intratümöral veya i.v. yoldan uygulanarak değerlendirilmesi planlanmaktadır. Bu şekilde, formülasyonun kontrol grubuna göre etkinliğinin değerlendirilmesinin yanında uygulama yolunun da tümör tedavisinin başarısına etkisi değerlendirilmiş olacaktır. Literatürde beyin tümörlerinin tedavisinde intravenöz yol veya intratümöral yollardan nanopartiküler sistemlerin uygulandığı çalışmalar ayrı ayrı bulunmaktadır. Ancak her iki yolu karşılaştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Chang ve ark [266] tarafından yapılan bir çalışmada PLGA nanopartikülleri hazırlanmış ve albumin veya transferin proteinleri ile kaplanarak sağlıklı veya F98 glioma hücreleri ile beyin tümörü oluşturulmuş fare ve sıçanlardaki i.v. uygulama sonrası dağılımı değerlendirilmiştir. Çalışmada protein kaplamanın hem sağlıklı hem tümör taşıyan hayvanların plazmasında nanopartiküllerin uzun süre kalmasına neden olduğu ve transferin ile kaplı formülasyonların tümör taşıyan

hayvanlarda glioma hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilen transferin reseptörü nedeniyle daha yüksek miktarda tümör dokusunda bulunduğu bildirilmiştir. Guo ve ark [267] tarafından yapılan bir çalışmada paklitaksel yüklü PEG-PLGA nanopartiküllerinin yüzeyine bir DNA aptameri olan ve glioma hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilen AS1411 (Ap) konjuge edilmiş ve C6 glioma hücreleri ile beyin tümörü oluşturulmuş sıçanlarda i.v. uygulamadan sonraki dağılımı ve etkinliği incelenmiştir. Çalışmada, kontrol gruplarına göre, Ap konjuge edilmiş PEG-PLGA nanopartiküllerinin kan dolaşımında daha uzun süre kaldığı ve tümör bölgesinde yüksek miktarda bulunarak tümör hacminde etkin bir azalma ve sıçanların hayatta kalış sürelerinde önemli derecede artmaya neden olduğu bildirilmiştir.

Literatürde nanopartiküler sistemlerin beyin tümörlerinin tedavisinde intratümöral olarak uygulandığı çalışmalar da bulunmaktadır [268] Allard ve ark [268] antikanser bir ilaç olan ferrosipenol yüklü lipit nanopartikül formülasyonlarını hazırlayarak 9L gliom hücresi ile tümör oluşturulmuş sıçanlara intratümöral olarak uygulamış ve etkinliğini değerlendirmişlerdir. Çalışmada kontrol gruplarına göre nanopartikül formülasyonları ile tümör hacminde daha fazla küçülme sağlandığı bildirilmiştir. Roger ve ark [269] tarafından yapılan bir çalışmada ise kumarin-6 yüklü poli(laktik asit)(PLA) nanopartikülleri ve lipit nanopartiküller hazırlanarak mezenkimal kök hücrelere yüklenmiş ve intratümöral olarak U87MG hücreleri ile beyin tümörü oluşturulmuş farelere uygulanmıştır. Çalışmada nanopartikül yüklü hücrelerin tümör içinde etkin bir şekilde dağıldığı ve gliomların tedavisinde kullanılmak üzere ümit verici olduğu bildirilmiştir.

Tez çalışmamızdaki in vivo deneylerde, Bölüm 3.2.7.3 'de belirtildiği üzere, sıçanlara tümör hücresi ekiminden 10 gün sonra MR görüntüleme yapılarak oluşan tümörün başlangıç alanı tespit edilmiştir(Şekil 4.18). Bu işlemi takiben, uygun alan büyüklüğünde tümör taşıyan hayvanlar gruplara ayrılarak tedaviler uygulanmıştır (kontrol grubuna uygulanmayarak). Sıçanlara uygulanan tedaviden 5 gün sonra tekrar MR görüntüleme yapılarak (Şekil 4.20- 4.25) tedavi sonrası tümör alanındaki değişim tespit edilip, alanın başlangıçtaki büyüklüğü ile karşılaştırma yapılmıştır (Çizelge 4.9, Çizelge 4.10). İn vivo deneylerin planlama aşamasında başlangıçta herbir grupta 6 hayvan varken, deney sırasında meydana gelen

hayvan kayıpları nedeniyle her bir grupta 3 hayvan kalmıştır. Şekil 4.19, Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10'da elde edilen bulgular verilmiştir.

Çizelge 4.9'dan da görüleceği üzere, intravenöz tedavi sonrası, tüm gruplarda tedavi öncesi ve sonrası tümör alanlarındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuş ($p<0.05$) olup, kontrol grubunda tümör büyüklüğü başlangıç değerine göre % 106 artarken, ilaç çözeltisi ve boş nanopartikül uygulanan gruplarda bu artış % 63.47 ve % 130.02 oranında bulunmuştur. FTS içeren nanopartikül formülasyonlarının uygulanmasından sonra ise tümörde % 76.20 oranında bir küçülme meydana gelmiştir. Bu durum uygulanan gruplar arasında tümörü büyük oranda küçülten grubun FTS içeren nanopartikül formülasyonları olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.10'dan da görüleceği üzere, intratümöral tedavi sonrası, tüm gruplarda tedavi öncesi ve sonrası tümör alanlarındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuş ($p<0.05$) olup, kontrol grubunda tümör büyüklüğü başlangıç değerine göre % 106 artarken, ilaç çözeltisi ve boş nanopartikül uygulanan gruplarda bu artış % 59 ve % 74.72 oranında bulunmuştur. FTS içeren nanopartikül formülasyonlarının uygulanmasından sonra ise tümörde % 88.62 oranında bir küçülme meydana gelmiştir. Bu durum uygulanan gruplar arasında tümörü büyük oranda küçülten grubun FTS içeren nanopartikül formülasyonları olduğunu göstermektedir.

Intravenöz ve intratümöral uygulama yolu, FTS yüklü nanopartiküller formülasyonlar açısından karşılaştırıldığında, intratümöral (% 88.62 küçülme) yol ile formülasyon uygulamasının intravenöz (% 76.20 küçülme) uygulama yoluna göre daha yüksek oranda tümörü küçülttüğü tespit edilmiş ve aralarındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Bu sonuç şu şekilde açıklanabilir: Beyin tümörlerinin birçoğu "solid/katı" tümörler olduğu için kemoterapötik ilaçlar KBE' den geçerek tümör bölgesine ulaşsa bile, tümör içindeki dağılımları, avasküler yapı nedeniyle istenen etkinlikte olamamaktadır. Pekçok "solid" tümörde hücre popülasyonu damarlardan 100 μm veya daha fazla miktarda uzaklıkta olabilir, bu durum uzakta bulunan hücrelere besin, oksijen, ilaç gibi moleküllerin ulaşmasını sınırlamaktadır. Buna ilaveten, yüksek hücre dansitesi, artmış dokular arası basınç, hipoksi ve asidik pH, tümör bölgesine ulaşan ilaçların tümör içine

penetrasyonunu, dağılımını ve hücre içine birikmesini yetersiz kılmaktadır [204]. Kemoterapötik ilaçların intratümöral olarak tümör merkezine uygulanması ile intravenöz uygulamaya göre tümör içindeki ilaç konsantrasyonu artırılabilir ve dağılımı iyileştirilebilir [204] .

Sıçanlarda MR ile tespit edilen tümör oluşumunun teyidi için histolojik değerlendirme Bölüm 3.2.7.5.2.' de açıklandığı gibi yapılmıştır. Sıçanlara uygulanan son MR görüntüleme sonrası aynı gün hayvanlar sakrifiye edilmiş, çıkarılan beyinlerden 6 µm'lik parafin kesitler hazırlanarak ve her bir kesit Hematoksilin Eosin ile boyanarak ışık mikroskopunda incelenmiştir

Tüm örnekler üzerinde yapılan histolojik değerlendirmelerde, tümörün varlığı ve alansal büyüklüğü teyid edilmiştir. Histolojik değerlendirme sırasında elde edilen ışık mikroskobu görüntüntülerine ait bir örnek Şekil 4.26'de verilmiştir. Şekil 4.26'de görüldüğü üzere, tümör oluşmamış (a) sıçan beyninin tümü pembe renkle karakterize iken, tümör oluşmuş (b) sıçan beyninde tümör bölgesi mor renk ile karakterize olmuştur.

Tümör oluşmuş dokuda meydana gelen değişiklikleri değerlendirmek için, örneklerin ışık mikroskopunda daha büyük görüntüleri elde edilmiştir (Şekil 4.27). Şekil 4.27'den de görüleceği üzere, tümör alanının hiperkromatik olduğu (daha koyu renkte, mor renkli), pleomorfik ve kromatinden zengin hücreler içerdiği belirlenmiştir. Bu alandaki artmış mitoz dikkati çekmektedir. Tümör içindeki damarlarda endovasküler proliferasyon görülmektedir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada,

- FTS'in etkin bir şekilde PLGA-DSPE-PEG ve PLGA-DSPE-PEG-DOTAP hibrit nanopartiküllerine yüklenebildiği ve DOTAP ilavesinin formülasyonların in vitro özelliklerini net bir şekilde değiştirdiği,
- FTS'in RG2 hücreleri üzerinde etkin bir şekilde sitotoksosite gösterdiği ve bu hücreler için LD50 değerinin 100 µM olduğu,
- FTS içeren nanopartikül formülasyonlarının da RG2 hücreleri üzerinde etkin bir şekilde sitotoksosite gösterdiği ve DOTAP ilavesinin sitotoksosite ve hücre alım üzerinde etkili olduğu,
- İn vivo çalışmalarda sıçanlara intravenöz ve intratümöral yol ile formülasyon uygulamasından sonra, her iki yol için de tez kapsamında hazırlanan FTS içeren PLGA-DSPE-PEG-DOTAP hibrit nanopartiküllerinin etkin olduğu,
- İn vivo çalışmalarda intratümöral yoldan formülasyon uygulanmasının intravenöz yola göre daha yüksek oranda tümörü küçülttüğü,

tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Brigger, I., C. Dubernet, and P. Couvreur, *Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis*. Adv Drug Deliv Rev, 2002. **54**(5): p. 631-51.
2. Singh, K.K., *Nanotechnology in cancer detection and treatment*. Technol Cancer Res Treat, 2005. **4**(6): p. 583.
3. Caruthers, S.D., S.A. Wickline, and G.M. Lanza, *Nanotechnological applications in medicine*. Curr Opin Biotechnol, 2007. **18**(1): p. 26-30.
4. Parveen, S. and S.K. Sahoo, *Nanomedicine: clinical applications of polyethylene glycol conjugated proteins and drugs*. Clin Pharmacokinet, 2006. **45**(10): p. 965-88.
5. Bayindir, F., et al., *Coverage error of three conceptually different shade guide systems to vital unrestored dentition*. J Prosthet Dent, 2007. **98**(3): p. 175-85.
6. Beck-Broichsitter, M., et al., *Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: a shift in the "ouzo region" upon drug loading*. Eur J Pharm Sci, 2010. **41**(2): p. 244-53.
7. Cao, Z., et al., *Nanoparticles for drug delivery prepared from amphiphilic PLGA zwitterionic block copolymers with sharp contrast in polarity between two blocks*. Angew Chem Int Ed Engl, 2010. **49**(22): p. 3771-6.
8. Sahoo, S.K. and V. Labhasetwar, *Nanotech approaches to drug delivery and imaging*. Drug Discov Today, 2003. **8**(24): p. 1112-20.
9. Vicent, M.J. and R. Duncan, *Polymer conjugates: nanosized medicines for treating cancer*. Trends Biotechnol, 2006. **24**(1): p. 39-47.

10. Lee, J.H., et al., *A therapeutic aptamer inhibits angiogenesis by specifically targeting the heparin binding domain of VEGF(165)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(52): p. 18902-18907.
11. Mozafari, M.R., et al., *Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology*. J Liposome Res, 2008. **18**(4): p. 309-27.
12. Mozafari, M.R., *Nanoliposomes: preparation and analysis*. Methods Mol Biol, 2010. **605**: p. 29-50.
13. Allen, T.M., *Liposomal drug formulations. Rationale for development and what we can expect for the future*. Drugs, 1998. **56**(5): p. 747-56.
14. Bharali, D.J., et al., *Nanoparticles and cancer therapy: a concise review with emphasis on dendrimers*. Int J Nanomedicine, 2009. **4**: p. 1-7.
15. Mozafari, M.R., C.J. Reed, and C. Rostron, *Cytotoxicity evaluation of anionic nanoliposomes and nanolipoplexes prepared by the heating method without employing volatile solvents and detergents*. Pharmazie, 2007. **62**(3): p. 205-9.
16. Jang, W.D., et al., *Bioinspired application of dendrimers: From bio-mimicry to biomedical applications*. Progress in Polymer Science, 2009. **34**(1): p. 1-23.
17. Alexis, F., et al., *New frontiers in nanotechnology for cancer treatment*. Urol Oncol, 2008. **26**(1): p. 74-85.
18. Aktas, Y., et al., *Preparation and in vitro evaluation of chitosan nanoparticles containing a caspase inhibitor*. Int J Pharm, 2005. **298**(2): p. 378-83.
19. Bakht, M.K., et al., *Scope of nanotechnology-based radiation therapy and thermotherapy methods in cancer treatment*. Curr Cancer Drug Targets, 2012. **12**(8): p. 998-1015.

20. Dolan, T.B., *Thinking small: nanotechnology offers new options for cancer treatment and management*. ONS Connect, 2011. **26**(2): p. 17.
21. Yi, D.K., et al., *Silica-coated nanocomposites of magnetic nanoparticles and quantum dots*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(14): p. 4990-1.
22. Biju, V., et al., *Semiconductor quantum dots and metal nanoparticles: syntheses, optical properties, and biological applications*. Anal Bioanal Chem, 2008. **391**(7): p. 2469-95.
23. Juzenas, P., et al., *Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer*. Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(15): p. 1600-14.
24. Douglas, S.J., S.S. Davis, and L. Illum, *Nanoparticles in drug delivery*. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1987. **3**(3): p. 233-61.
25. Hitzman, C.J., W.F. Elmquist, and T.S. Wiedmann, *Development of a respirable, sustained release microcarrier for 5-fluorouracil II: In vitro and in vivo optimization of lipid coated nanoparticles*. J Pharm Sci, 2006. **95**(5): p. 1127-43.
26. Moghimi, S.M., A.C. Hunter, and J.C. Murray, *Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(2): p. 283-318.
27. Bosch, F. and L. Rosich, *The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize*. Pharmacology, 2008. **82**(3): p. 171-9.
28. Mao, H.Q., et al., *Biodegradable poly(terephthalate-co-phosphate)s: synthesis, characterization and drug-release properties*. J Biomater Sci Polym Ed, 2005. **16**(2): p. 135-61.

29. Panyam, J. and V. Labhasetwar, *Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003. **55**(3): p. 329-47.
30. Seyfoddin, A., J. Shaw, and R. Al-Kassas, *Solid lipid nanoparticles for ocular drug delivery*. *Drug Deliv*, 2010. **17**(7): p. 467-89.
31. El-Sherbiny, I.M. and H.D. Smyth, *Biodegradable nano-micro carrier systems for sustained pulmonary drug delivery: (I) self-assembled nanoparticles encapsulated in respirable/swellable semi-IPN microspheres*. *Int J Pharm*, 2010. **395**(1-2): p. 132-41.
32. Kumari, A., S.K. Yadav, and S.C. Yadav, *Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2010. **75**(1): p. 1-18.
33. Rao, D.A., et al., *Biodegradable PLGA based nanoparticles for sustained regional lymphatic drug delivery*. *J Pharm Sci*, 2010. **99**(4): p. 2018-31.
34. Hans, M.L. and A.M. Lowman, *Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting*. *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, 2002. **6**(4): p. 319-327.
35. Lamprecht, A., et al., *Biodegradable nanoparticles for targeted drug delivery in treatment of inflammatory bowel disease*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2001. **299**(2): p. 775-781.
36. Cheng, J., et al., *Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery*. *Biomaterials*, 2007. **28**(5): p. 869-76.
37. Han, G., P. Ghosh, and V.M. Rotello, *Functionalized gold nanoparticles for drug delivery*. *Nanomedicine (Lond)*, 2007. **2**(1): p. 113-23.

38. Bhirde, A.A., et al., *Targeted killing of cancer cells in vivo and in vitro with EGF-directed carbon nanotube-based drug delivery*. ACS Nano, 2009. **3**(2): p. 307-16.
39. Namdeo, M., et al., *Magnetic nanoparticles for drug delivery applications*. J Nanosci Nanotechnol, 2008. **8**(7): p. 3247-71.
40. Yallapu, M.M., et al., *PEG-functionalized magnetic nanoparticles for drug delivery and magnetic resonance imaging applications*. Pharm Res, 2010. **27**(11): p. 2283-95.
41. Yong, K.T., et al., *Multifunctional Nanoparticles as Biocompatible Targeted Probes for Human Cancer Diagnosis and Therapy*. J Mater Chem, 2009. **19**: p. 4655-4672.
42. Venkatraman, S.S., et al., *Polymer- and liposome-based nanoparticles in targeted drug delivery*. Front Biosci (Schol Ed), 2010. **2**: p. 801-14.
43. Cheng, T.L., et al., *Monoclonal antibody-based quantitation of poly(ethylene glycol)-derivatized proteins, liposomes, and nanoparticles*. Bioconjug Chem, 2005. **16**(5): p. 1225-31.
44. Emerich, D.F. and C.G. Thanos, *Targeted nanoparticle-based drug delivery and diagnosis*. J Drug Target, 2007. **15**(3): p. 163-83.
45. Swain, P., et al., *Non-specific immune parameters of brood Indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations*. Fish Shellfish Immunol, 2007. **22**(1-2): p. 38-43.
46. Zhang, J. and R.D. Misra, *Magnetic drug-targeting carrier encapsulated with thermosensitive smart polymer: core-shell nanoparticle carrier and drug release response*. Acta Biomater, 2007. **3**(6): p. 838-50.

47. Lavon, I. and J. Kost, *Mass transport enhancement by ultrasound in non-degradable polymeric controlled release systems*. Journal of Controlled Release, 1998. **54**(1): p. 1-7.
48. White, P.J., G.T. Clement, and K. Hynynen, *Longitudinal and shear mode ultrasound propagation in human skull bone*. Ultrasound Med Biol, 2006. **32**(7): p. 1085-96.
49. Su, Y.C., et al., *Sensitive quantification of PEGylated compounds by second-generation anti-poly(ethylene glycol) monoclonal antibodies*. Bioconjug Chem, 2010. **21**(7): p. 1264-70.
50. Panyam, J., et al., *Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles*. Int J Pharm, 2003. **262**(1-2): p. 1-11.
51. Chatterjee, D., et al., *[Ru(III)(edta)(H₂O)](-) mediated oxidation of hydroxyurea with H₂O₂. Kinetic and mechanistic investigation*. Dalton Trans, 2010. **39**(7): p. 1695-8.
52. Choi, K.Y., et al., *Theranostic nanoparticles based on PEGylated hyaluronic acid for the diagnosis, therapy and monitoring of colon cancer*. Biomaterials, 2012. **33**(26): p. 6186-93.
53. Goldman, E.R., et al., *A hybrid quantum dot-antibody fragment fluorescence resonance energy transfer-based TNT sensor*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(18): p. 6744-51.
54. Lee, J.H., et al., *A functional magnetic resonance imaging (fMRI) study of cue-induced smoking craving in virtual environments*. Appl Psychophysiol Biofeedback, 2005. **30**(3): p. 195-204.
55. Lopes de Menezes, D.E., L.M. Pilarski, and T.M. Allen, *In vitro and in vivo targeting of immunoliposomal doxorubicin to human B-cell lymphoma*. Cancer Res, 1998. **58**(15): p. 3320-30.

56. Murakami, T., et al., *Intracellular drug delivery by genetically engineered high-density lipoprotein nanoparticles*. *Nanomedicine (Lond)*, 2010. **5**(6): p. 867-79.
57. Brannon-Peppas, L. and J.O. Blanchette, *Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004. **56**(11): p. 1649-59.
58. Sinha, R., et al., *Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery*. *Mol Cancer Ther*, 2006. **5**(8): p. 1909-17.
59. Wang, X., et al., *Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging*. *CA Cancer J Clin*, 2008. **58**(2): p. 97-110.
60. Kim, K., et al., *Tumor-homing multifunctional nanoparticles for cancer theragnosis: Simultaneous diagnosis, drug delivery, and therapeutic monitoring*. *J Control Release*, 2010. **146**(2): p. 219-27.
61. Cho, K., et al., *Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(5): p. 1310-6.
62. Sharma, D., et al., *Novel Taxol formulation: polyvinylpyrrolidone nanoparticle-encapsulated Taxol for drug delivery in cancer therapy*. *Oncol Res*, 1996. **8**(7-8): p. 281-6.
63. Farokhzad, O.C. and R. Langer, *Impact of nanotechnology on drug delivery*. *ACS Nano*, 2009. **3**(1): p. 16-20.
64. Youan, B.B., *Impact of nanoscience and nanotechnology on controlled drug delivery*. *Nanomedicine (Lond)*, 2008. **3**(4): p. 401-6.
65. Mukerjee, A., A.P. Ranjan, and J.K. Vishwanatha, *Combinatorial nanoparticles for cancer diagnosis and therapy*. *Curr Med Chem*, 2012. **19**(22): p. 3714-21.

66. Liu, Y., H. Miyoshi, and M. Nakamura, *Nanomedicine for drug delivery and imaging: a promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles*. Int J Cancer, 2007. **120**(12): p. 2527-37.
67. Llevot, A. and D. Astruc, *Applications of vectorized gold nanoparticles to the diagnosis and therapy of cancer*. Chem Soc Rev, 2012. **41**(1): p. 242-57.
68. Kreuter, J., *Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. **47**(1): p. 65-81.
69. Ulbrich, K., et al., *Transferrin- and transferrin-receptor-antibody-modified nanoparticles enable drug delivery across the blood-brain barrier (BBB)*. Eur J Pharm Biopharm, 2009. **71**(2): p. 251-6.
70. Gindy, M.E. and R.K. Prud'homme, *Multifunctional nanoparticles for imaging, delivery and targeting in cancer therapy*. Expert Opin Drug Deliv, 2009. **6**(8): p. 865-78.
71. Kim, K., et al., *Tumor-homing multifunctional nanoparticles for cancer theragnosis: Simultaneous diagnosis, drug delivery, and therapeutic monitoring*. Journal of Controlled Release, 2010. **146**(2): p. 219-227.
72. Lu, J., et al., *Biocompatibility, biodistribution, and drug-delivery efficiency of mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy in animals*. Small, 2010. **6**(16): p. 1794-805.
73. Park, K., et al., *New Generation of Multifunctional Nanoparticles for Cancer Imaging and Therapy*. Advanced Functional Materials, 2009. **19**(10): p. 1553-1566.
74. Quaglia, F., *Bioinspired tissue engineering: The great promise of protein delivery technologies*. Int J Pharm, 2008. **364**(2): p. 281-297.

75. Green, J.J., R. Langer, and D.G. Anderson, *A combinatorial polymer library approach yields insight into nonviral gene delivery*. *Accounts of Chemical Research*, 2008. **41**(6): p. 749-759.
76. Yang, H., et al., *Hybrid Dendrimer Hydrogel/PLGA Nanoparticle Platform Sustains Drug Delivery for One Week and Antiglaucoma Effects for Four Days Following One-Time Topical Administration*. *ACS Nano*, 2012. **6**(9): p. 7595-7606.
77. Al-Jamal, W.T. and K. Kostarelos, *Liposomes: From a Clinically Established Drug Delivery System to a Nanoparticle Platform for Theranostic Nanomedicine*. *Accounts of Chemical Research*, 2011. **44**(10): p. 1094-1104.
78. Paciotti, G.F., D.G.I. Kingston, and L. Tamarkin, *Colloidal gold nanoparticles: A novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors*. *Drug Development Research*, 2006. **67**(1): p. 47-54.
79. Burgess, B.L., et al., *A phospholipid-apolipoprotein A-I nanoparticle containing amphotericin B as a drug delivery platform with cell membrane protective properties*. *Int J Pharm*, 2010. **399**(1-2): p. 148-155.
80. Napier, M.E. and J.M. Desimone, *Nanoparticle drug delivery platform*. *Polymer Reviews*, 2007. **47**(3): p. 321-327.
81. Burgess, B.L., et al., *A phospholipid-apolipoprotein A-I nanoparticle containing amphotericin B as a drug delivery platform with cell membrane protective properties*. *Int J Pharm*, 2010. **399**(1-2): p. 148-55.
82. Patel, T., et al., *Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012. **64**(7): p. 701-5.
83. Tosi, G., et al., *Polymeric nanoparticles for the drug delivery to the central nervous system*. *Expert Opin Drug Deliv*, 2008. **5**(2): p. 155-74.

84. Kato, E., et al., *Synthesis and antihypertensive activity of 5-(2-hydroxyphenyl)-1-(3-mercaptopropionyl)-2-pyrrolidinecarboxylic acids*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1985. **33**(11): p. 4836-46.
85. Kawashima, Y., et al., *Novel method for the preparation of controlled-release theophylline granules coated with a polyelectrolyte complex of sodium polyphosphate-chitosan*. J Pharm Sci, 1985. **74**(3): p. 264-8.
86. Yokozawa, T., et al., *Studies on the mechanism of the hypoglycemic activity of ginsenoside-Rb2 in streptozotocin-diabetic rats*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1985. **33**(2): p. 869-72.
87. Cha, C., et al., *Designing biomaterials to direct stem cell fate*. ACS Nano, 2012. **6**(11): p. 9353-8.
88. Liechty, W.B., et al., *Advanced molecular design of biopolymers for transmucosal and intracellular delivery of chemotherapeutic agents and biological therapeutics*. J Control Release, 2011. **155**(2): p. 119-27.
89. Liechty, W.B., et al., *Polymers for drug delivery systems*. Annu Rev Chem Biomol Eng, 2010. **1**: p. 149-73.
90. Feng, S.S., et al., *Nanoparticles of biodegradable polymers for clinical administration of paclitaxel*. Curr Med Chem, 2004. **11**(4): p. 413-24.
91. Feng, S.S., *New-concept chemotherapy by nanoparticles of biodegradable polymers: where are we now?* Nanomedicine (Lond), 2006. **1**(3): p. 297-309.
92. Feng, S.S., *Nanoparticles of biodegradable polymers for new-concept chemotherapy*. Expert Rev Med Devices, 2004. **1**(1): p. 115-25.
93. Pan, J. and S.S. Feng, *Targeting and imaging cancer cells by folate-decorated, quantum dots (QDs)- loaded nanoparticles of biodegradable polymers*. Biomaterials, 2009. **30**(6): p. 1176-83.

94. Quintanar-Guerrero, D., et al., *Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers*. Drug Dev Ind Pharm, 1998. **24**(12): p. 1113-28.
95. Nair, L.S. and C.T. Laurencin, *Biodegradable polymers as biomaterials*. Progress in Polymer Science, 2007. **32**(8-9): p. 762-798.
96. Piskin, E., *Biodegradable Polymers as Biomaterials*. Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition, 1995. **6**(9): p. 775-795.
97. Duncan, R., *Drug-polymer conjugates: potential for improved chemotherapy*. Anticancer Drugs, 1992. **3**(3): p. 175-210.
98. Wang, S., et al., *A new nerve guide conduit material composed of a biodegradable poly(phosphoester)*. Biomaterials, 2001. **22**(10): p. 1157-1169.
99. Oliveira, G.F., et al., *Chitosan-pectin multiparticulate systems associated with enteric polymers for colonic drug delivery*. Carbohydrate Polymers, 2010. **82**(3): p. 1004-1009.
100. Liechty, W.B., et al., *Polymers for Drug Delivery Systems*. Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, Vol 1, 2010. **1**: p. 149-173.
101. Langer, R., *Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: One laboratory's experience*. Accounts of Chemical Research, 2000. **33**(2): p. 94-101.
102. Soppimath, K.S., et al., *Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices*. Journal of Controlled Release, 2001. **70**(1-2): p. 1-20.
103. Kuntz, R.M. and W.M. Saltzman, *Polymeric controlled delivery for immunization*. Trends Biotechnol, 1997. **15**(9): p. 364-9.

104. Saltzman, W.M. and L.K. Fung, *Polymeric implants for cancer chemotherapy*. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997. **26**(2-3): p. 209-230.
105. Bansal, S.S., et al., *Advanced Drug Delivery Systems of Curcumin for Cancer Chemoprevention*. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2011. **4**(8): p. 1158-1171.
106. Dhar, S., et al., *Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(45): p. 17356-61.
107. Astete, C.E. and C.M. Sabliov, *Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles*. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2006. **17**(3): p. 247-89.
108. Nafee, N., et al., *Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/RNA delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides*. *Nanomedicine (Lond)*, 2007. **3**(3): p. 173-83.
109. Prabha, S. and V. Labhasetwar, *Critical determinants in PLGA/PLA nanoparticle-mediated gene expression*. *Pharm Res*, 2004. **21**(2): p. 354-64.
110. Jamshidi, K., S.H. Hyon, and Y. Ikada, *Thermal Characterization of Polylactides*. *Polymer*, 1988. **29**(12): p. 2229-2234.
111. Cheow, W.S. and K. Hadinoto, *Enhancing encapsulation efficiency of highly water-soluble antibiotic in poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: Modifications of standard nanoparticle preparation methods*. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 2010. **370**(1-3): p. 79-86.
112. Huang, C., et al., *Polymeric Nanoparticles with Encapsulated Superparamagnetic Iron Oxide and Conjugated Cisplatin for Potential Bladder Cancer Therapy*. *Biomacromolecules*, 2012. **13**(8): p. 2513-2520.

113. Cheng, F.Y., et al., *Multifunctional polymeric nanoparticles for combined chemotherapeutic and near-infrared photothermal cancer therapy in vitro and in vivo*. Chem Commun (Camb), 2010. **46**(18): p. 3167-3169.
114. Duan, H.W., *Self-assembled polymeric nanoparticles and Quantum dot probes for cancer imaging and therapy*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 2010. **239**.
115. Courant, T., et al., *Vectorization of copper complexes via biocompatible and biodegradable PLGA nanoparticles*. Nanotechnology, 2010. **21**(16): p. 165101.
116. Rytting, E., et al., *Biodegradable polymeric nanocarriers for pulmonary drug delivery*. Expert Opin Drug Deliv, 2008. **5**(6): p. 629-39.
117. Scott, C.J. and F. Fay, *Antibody targeting of polymeric nanoparticles for cancer therapy*. Drug Discov Today, 2010. **15**(23-24): p. 1087-1087.
118. Way, T.D., C.J. Chang, and C.W. Lin, *Bioconjugated Fluorescent Polymeric Nanoparticles for Imaging and Targeted Therapy of HER2-Overexpressing Cancer Cells*. Journal of Fluorescence, 2011. **21**(4): p. 1669-1676.
119. Mansour, H.M., et al., *Materials for Pharmaceutical Dosage Forms: Molecular Pharmaceutics and Controlled Release Drug Delivery Aspects*. International Journal of Molecular Sciences, 2010. **11**(9): p. 3298-3322.
120. Stevanovic, M., et al., *Fabrication, in vitro degradation and the release behaviours of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanospheres containing ascorbic acid*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2007. **59**(2): p. 215-223.
121. Ling, Y., et al., *Temozolomide loaded PLGA-based superparamagnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and treatment of malignant glioma*. Int J Pharm, 2012. **430**(1-2): p. 266-75.

122. Danhier, F., et al., *Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation*. J Control Release, 2009. **133**(1): p. 11-7.
123. Garinot, M., et al., *PEGylated PLGA-based nanoparticles targeting M cells for oral vaccination*. J Control Release, 2007. **120**(3): p. 195-204.
124. Ungaro, F., et al., *Dry powders based on PLGA nanoparticles for pulmonary delivery of antibiotics: modulation of encapsulation efficiency, release rate and lung deposition pattern by hydrophilic polymers*. J Control Release, 2012. **157**(1): p. 149-59.
125. Slutter, B., et al., *Nasal vaccination with N-trimethyl chitosan and PLGA based nanoparticles: nanoparticle characteristics determine quality and strength of the antibody response in mice against the encapsulated antigen*. Vaccine, 2010. **28**(38): p. 6282-91.
126. Pinto Reis, C., et al., *Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles*. Nanomedicine (Lond), 2006. **2**(1): p. 8-21.
127. Mora-Huertas, C.E., H. Fessi, and A. Elaissari, *Polymer-based nanocapsules for drug delivery*. Int J Pharm, 2010. **385**(1-2): p. 113-42.
128. Forgiarini, A., et al., *Formation of nano-emulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature*. Langmuir, 2001. **17**(7): p. 2076-2083.
129. Lassalle, V. and M.L. Ferreira, *PLA nano- and microparticles for drug delivery: an overview of the methods of preparation*. Macromol Biosci, 2007. **7**(6): p. 767-83.
130. Sadurni, N., et al., *Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications*. Eur J Pharm Sci, 2005. **26**(5): p. 438-45.

131. Pey, C.M., et al., *Optimization of nano-emulsions prepared by low-energy emulsification methods at constant temperature using a factorial design study*. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2006. **288**(1-3): p. 144-150.
132. Langer, K., et al., *Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles*. Int J Pharm, 2003. **257**(1-2): p. 169-80.
133. Eerikainen, H. and E.I. Kauppinen, *Preparation of polymeric nanoparticles containing corticosteroid by a novel aerosol flow reactor method*. Int J Pharm, 2003. **263**(1-2): p. 69-83.
134. Couvreur, P., et al., *Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties*. J Pharm Pharmacol, 1979. **31**(5): p. 331-2.
135. Laske, D.W., R.J. Youle, and E.H. Oldfield, *Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin TF-CRM107 in patients with malignant brain tumors*. Nat Med, 1997. **3**(12): p. 1362-8.
136. Kaye, A.D., et al., *Differential effects of glibenclamide on responses to thromboxane A2 mimic, U46619, in the pulmonary and hindquarters vascular beds of the cat*. Eur J Pharmacol, 1997. **340**(2-3): p. 187-93.
137. Nagendran, T., et al., *Metastatic bronchogenic carcinoma to the bones of the hand*. Cancer, 1980. **45**(4): p. 824-8.
138. Walker, M.D., *Adjuvant therapy for brain tumor*. Int Adv Surg Oncol, 1980. **3**: p. 351-69.
139. Walker, M.D., et al., *Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery*. N Engl J Med, 1980. **303**(23): p. 1323-9.

140. Moffat, B.A., et al., *Functional diffusion map: a noninvasive MRI biomarker for early stratification of clinical brain tumor response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(15): p. 5524-9.
141. Carson, B.S., Sr., et al., *New approach to tumor therapy for inoperable areas of the brain: chronic intraparenchymal drug delivery*. J Neurooncol, 2002. **60**(2): p. 151-8.
142. Fetell, M.R., et al., *Preirradiation paclitaxel in glioblastoma multiforme: efficacy, pharmacology, and drug interactions*. New Approaches to Brain Tumor Therapy Central Nervous System Consortium. J Clin Oncol, 1997. **15**(9): p. 3121-8.
143. Maeda, M., et al., *New drug delivery system for water-soluble drugs using silicone and its usefulness for local treatment: application of GCV-silicone to GCV/HSV-tk gene therapy for brain tumor*. J Control Release, 2002. **84**(1-2): p. 15-25.
144. Brem, S., *Brain Tumor Therapy: New Lights on the Horizon*. Cancer Control, 1998. **5**(2): p. 95-97.
145. Tsang, R.W., et al., *Glioma arising after radiation therapy for pituitary adenoma. A report of four patients and estimation of risk*. Cancer, 1993. **72**(7): p. 2227-33.
146. Guerin, C., et al., *Recent advances in brain tumor therapy: local intracerebral drug delivery by polymers*. Invest New Drugs, 2004. **22**(1): p. 27-37.
147. Reddy, G.R., et al., *Vascular targeted nanoparticles for imaging and treatment of brain tumors*. Clinical Cancer Research, 2006. **12**(22): p. 6677-6686.
148. Reddy, G.R., et al., *Vascular targeted nanoparticles for imaging and treatment of brain tumors*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(22): p. 6677-86.

149. Wick, W., et al., *Phase III study of enzastaurin compared with lomustine in the treatment of recurrent intracranial glioblastoma*. J Clin Oncol, 2010. **28**(7): p. 1168-74.
150. Kawalec, P., et al., *Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. A systematic review and meta-analysis*. Arch Med Sci, 2012. **8**(5): p. 767-75.
151. Garcia, J.A. and R. Dreicer, *Immunotherapy in castration-resistant prostate cancer: integrating sipuleucel-T into our current treatment paradigm*. Oncology (Williston Park), 2011. **25**(3): p. 242-9.
152. Drake, C.G., *Re: interdisciplinary critique of sipuleucel-T as immunotherapy in castration-resistant prostate cancer*. J Natl Cancer Inst, 2012. **104**(18): p. 1422; author reply 1422-3.
153. Celli, J.P., et al., *Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization*. Chem Rev, 2010. **110**(5): p. 2795-838.
154. Allison, R.R. and C.H. Sibata, *Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2010. **7**(2): p. 61-75.
155. Eljamel, S., *Photodynamic applications in brain tumors: a comprehensive review of the literature*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2010. **7**(2): p. 76-85.
156. Takamiya, Y., et al., *Gene therapy of malignant brain tumors: a rat glioma line bearing the herpes simplex virus type 1-thymidine kinase gene and wild type retrovirus kills other tumor cells*. J Neurosci Res, 1992. **33**(3): p. 493-503.
157. Heller, L.C. and R. Heller, *Electroporation gene therapy preclinical and clinical trials for melanoma*. Curr Gene Ther, 2010. **10**(4): p. 312-7.

158. van den Bent, M.J., et al., *IDH1 and IDH2 mutations are prognostic but not predictive for outcome in anaplastic oligodendroglial tumors: a report of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(5): p. 1597-604.
159. Capper, D., et al., *Characterization of R132H mutation-specific IDH1 antibody binding in brain tumors*. Brain Pathol, 2010. **20**(1): p. 245-54.
160. Gururangan, S., et al., *Lack of efficacy of bevacizumab plus irinotecan in children with recurrent malignant glioma and diffuse brainstem glioma: a Pediatric Brain Tumor Consortium study*. J Clin Oncol, 2010. **28**(18): p. 3069-75.
161. Chertok, B., A.E. David, and V.C. Yang, *Polyethyleneimine-modified iron oxide nanoparticles for brain tumor drug delivery using magnetic targeting and intra-carotid administration*. Biomaterials, 2010. **31**(24): p. 6317-24.
162. Shields, C.L. and J.A. Shields, *Intra-arterial chemotherapy for retinoblastoma: the beginning of a long journey*. Clin Experiment Ophthalmol, 2010. **38**(6): p. 638-43.
163. Daneman, R., *The blood-brain barrier in health and disease*. Ann Neurol, 2012. **72**(5): p. 648-72.
164. Kim, S.Y., et al., *Blood-brain barrier dysfunction-induced inflammatory signaling in brain pathology and epileptogenesis*. Epilepsia, 2012. **53 Suppl 6**: p. 37-44.
165. Wardlaw, J.M., et al., *Blood-Brain Barrier Permeability and Long-Term Clinical and Imaging Outcomes in Cerebral Small Vessel Disease*. Stroke, 2012.
166. Tega, Y., et al., *Blood-to-brain influx transport of nicotine at the rat blood-brain barrier: Involvement of a pyrilamine-sensitive organic cation transport process*. Neurochem Int, 2012.

167. Kaya, M., A.J. Becker, and C. Gurses, *Blood-brain barrier, epileptogenesis, and treatment strategies in cortical dysplasia*. *Epilepsia*, 2012. **53 Suppl 6**: p. 31-6.
168. Schoknecht, K. and H. Shalev, *Blood-brain barrier dysfunction in brain diseases: clinical experience*. *Epilepsia*, 2012. **53 Suppl 6**: p. 7-13.
169. von Budingen, H.C., et al., *B cell exchange across the blood-brain barrier in multiple sclerosis*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(12): p. 4533-43.
170. Takechi, R., et al., *Aging-Related Changes in Blood-Brain Barrier Integrity and the Effect of Dietary Fat*. *Neurodegener Dis*, 2012.
171. van Assema, D.M., et al., *Blood-brain barrier P-glycoprotein function in healthy subjects and Alzheimer's disease patients: effect of polymorphisms in the ABCB1 gene*. *EJNMMI Res*, 2012. **2**(1): p. 57.
172. Khatri, R., et al., *Blood-brain barrier, reperfusion injury, and hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke*. *Neurology*, 2012. **79**(13 Suppl 1): p. S52-7.
173. Agarwal, S., et al., *Function of the blood-brain barrier and restriction of drug delivery to invasive glioma cells: findings in an orthotopic rat xenograft model of glioma*. *Drug Metab Dispos*, 2013. **41**(1): p. 33-9.
174. Errede, M., et al., *Blood-brain barrier alterations in the cerebral cortex in experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2012. **71**(10): p. 840-54.
175. Gabathuler, R., *Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases*. *Neurobiol Dis*, 2010. **37**(1): p. 48-57.

176. Griep, L.M., et al., *BBB ON CHIP: microfluidic platform to mechanically and biochemically modulate blood-brain barrier function*. Biomed Microdevices, 2012.
177. Hartz, A.M., et al., *Amyloid-beta contributes to blood-brain barrier leakage in transgenic human amyloid precursor protein mice and in humans with cerebral amyloid angiopathy*. Stroke, 2012. **43**(2): p. 514-23.
178. Zlokovic, B.V., et al., *Measurement of solute transport across the blood-brain barrier in the perfused guinea pig brain: method and application to N-methyl-alpha-aminoisobutyric acid*. J Neurochem, 1986. **46**(5): p. 1444-51.
179. Gao, K. and X. Jiang, *Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles*. Int J Pharm, 2006. **310**(1-2): p. 213-9.
180. Liu, L., et al., *Biologically active core/shell nanoparticles self-assembled from cholesterol-terminated PEG-TAT for drug delivery across the blood-brain barrier*. Biomaterials, 2008. **29**(10): p. 1509-17.
181. Caruso, G., et al., *Could nanoparticle systems have a role in the treatment of cerebral gliomas?* Nanomedicine (Lond), 2011. **7**(6): p. 744-52.
182. Garcia-Garcia, E., et al., *Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: a way to deliver drugs to the brain?* Int J Pharm, 2005. **298**(2): p. 274-92.
183. Pinto-Alphandary, H., A. Andremont, and P. Couvreur, *Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2000. **13**(3): p. 155-168.
184. Kreuter, J., et al., *Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles)*. Brain Res, 1995. **674**(1): p. 171-4.

185. Kreuter, J., *Nanoparticulate systems in drug delivery and targeting*. J Drug Target, 1995. **3**(3): p. 171-3.
186. Wang, C.X., et al., *Antitumor effects of polysorbate-80 coated gemcitabine polybutylcyanoacrylate nanoparticles in vitro and its pharmacodynamics in vivo on C6 glioma cells of a brain tumor model*. Brain Res, 2009. **1261**: p. 91-99.
187. Gajbhiye, V. and N.K. Jain, *The treatment of Glioblastoma Xenografts by surfactant conjugated dendritic nanoconjugates*. Biomaterials, 2011. **32**(26): p. 6213-25.
188. Tian, X.H., et al., *Enhanced brain targeting of temozolomide in polysorbate-80 coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles*. Int J Nanomedicine, 2011. **6**: p. 445-52.
189. Wohlfart, S., et al., *Efficient Chemotherapy of Rat Glioblastoma Using Doxorubicin-Loaded PLGA Nanoparticles with Different Stabilizers*. PLoS One, 2011. **6**(5).
190. Kulkarni, S.A. and S.S. Feng, *Effects of surface modification on delivery efficiency of biodegradable nanoparticles across the blood-brain barrier*. Nanomedicine (Lond), 2011. **6**(2): p. 377-394.
191. Torchilin, V.P., *Polymer-coated long-circulating microparticulate pharmaceuticals*. J Microencapsul, 1998. **15**(1): p. 1-19.
192. Brigger, I., et al., *Poly(ethylene glycol)-coated hexadecylcyanoacrylate nanospheres display a combined effect for brain tumor targeting*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2002. **303**(3): p. 928-936.
193. Cole, A.J., et al., *Magnetic brain tumor targeting and biodistribution of long-circulating PEG-modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles*. Biomaterials, 2011. **32**(26): p. 6291-6301.

194. Kaul, G. and M. Amiji, *Long-circulating poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles for intracellular delivery*. *Pharm Res*, 2002. **19**(7): p. 1061-1067.
195. Fenart, L., et al., *Evaluation of effect of charge and lipid coating on ability of 60-nm nanoparticles to cross an in vitro model of the blood-brain barrier*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1999. **291**(3): p. 1017-1022.
196. Huang, H.C., et al., *Formulation of novel lipid-coated magnetic nanoparticles as the probe for in vivo imaging*. *Journal of Biomedical Science*, 2009. **16**.
197. Agarwal, A., et al., *Cationic ligand appended nanoconstructs: a prospective strategy for brain targeting*. *Int J Pharm*, 2011. **421**(1): p. 189-201.
198. Chertok, B., et al., *Substantiating in vivo magnetic brain tumor targeting of cationic iron oxide nanocarriers via adsorptive surface masking*. *Biomaterials*, 2009. **30**(35): p. 6780-6787.
199. Haque, S., et al., *Nanostructure-based drug delivery systems for brain targeting*. *Drug Dev Ind Pharm*, 2012. **38**(4): p. 387-411.
200. Pardridge, W.M., *Biopharmaceutical drug targeting to the brain*. *J Drug Target*, 2010. **18**(3): p. 157-67.
201. Chang, J., et al., *Transferrin Adsorption onto PLGA Nanoparticles Governs Their Interaction with Biological Systems from Blood Circulation to Brain Cancer Cells*. *Pharm Res*, 2012. **29**(6): p. 1495-1505.
202. Guo, J.W., et al., *Aptamer-functionalized PEG-PLGA nanoparticles for enhanced anti-glioma drug delivery*. *Biomaterials*, 2011. **32**(31): p. 8010-8020.

203. Allard, E., et al., *Re-188-loaded lipid nanocapsules as a promising radiopharmaceutical carrier for internal radiotherapy of malignant gliomas*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2008. **35**(10): p. 1838-1846.
204. Allard, E., et al., *Lipid nanocapsules loaded with an organometallic tamoxifen derivative as a novel drug-carrier system for experimental malignant gliomas*. Journal of Controlled Release, 2008. **130**(2): p. 146-153.
205. Allard, E., et al., *Local Delivery of Ferrociphenol Lipid Nanocapsules Followed by External Radiotherapy as a Synergistic Treatment Against Intracranial 9L Glioma Xenograft*. Pharm Res, 2010. **27**(1): p. 56-64.
206. Paillard, A., et al., *The importance of endo-lysosomal escape with lipid nanocapsules for drug subcellular bioavailability*. Biomaterials, 2010. **31**(29): p. 7542-7554.
207. Emerich, D.F., et al., *Injectable chemotherapeutic microspheres and glioma II: Enhanced survival following implantation into deep inoperable tumors*. Pharm Res, 2000. **17**(7): p. 776-781.
208. Menei, P., et al., *Local and sustained delivery of 5-fluorouracil from biodegradable microspheres for the radiosensitization of glioblastoma - A pilot study*. Cancer, 1999. **86**(2): p. 325-330.
209. Allard, E., et al., *Dose effect activity of ferrocifen-loaded lipid nanocapsules on a 9L-glioma model*. Int J Pharm, 2009. **379**(2): p. 317-323.
210. Roger, M., et al., *Mesenchymal stem cells as cellular vehicles for delivery of nanoparticles to brain tumors*. Biomaterials, 2010. **31**(32): p. 8393-8401.
211. Lajoie, J., et al., *Blood soluble human leukocyte antigen G levels are associated with human immunodeficiency virus type 1 infection in Beninese commercial sex workers*. Human Immunology, 2010. **71**(2): p. 182-185.

212. Audus, K.L., et al., *The Use of Cultured Epithelial and Endothelial-Cells for Drug Transport and Metabolism Studies*. Pharmaceutical Research, 1990. **7**(5): p. 435-451.
213. Mather, J.P. and P.E. Roberts, *Introduction to cell and tissue culture*. 1998, New York: Plenum Press.
214. Freshney, R.I., *Introduction to basic principles*, in *Basic Cell Culture: A Practical Approach*, J.M. Davis, Editor. 2002, Oxford University Press Inc.: New York. p. 1-18.
215. Wilson, A.P., *Cytotoxicity and viability assays*, in *Animal Cell Culture* J.R.W. Masters, Editor. 2000, Oxford University Press: New York. p. 175-219.
216. Walter, E. and T. Kissel, *Heterogeneity in the Human Intestinal-Cell Line Caco-2 Leads to Differences in Transepithelial Transport*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 1995. **3**(4): p. 215-230.
217. Hansen, M.B., S.E. Nielsen, and K. Berg, *Re-Examination and Further Development of a Precise and Rapid Dye Method for Measuring Cell-Growth Cell Kill*. J Immunol Methods, 1989. **119**(2): p. 203-210.
218. Bozdog, S., et al., *Formulation and in vitro bioactivity of mitoxantrone-loaded biodegradable microspheres on rat glioma (RG2) cells*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2005. **15**(3): p. 201-206.
219. Zhou, J., et al., *Preparation of arsenic trioxide-loaded albuminates immunonanospheres and its specific killing effect on bladder cancer cell in vitro*. Chin Med J (Engl), 2005. **118**(1): p. 50-5.
220. Robe, P.A., et al., *Dexamethasone inhibits the HSV-tk/ganciclovir bystander effect in malignant glioma cells*. BMC Cancer, 2005. **5**.

221. Bozdog, S., et al., *In vitro cytotoxicity of mitoxantrone-incorporated albumin microspheres on acute promyelocytic leukaemia cells*. J Microencapsul, 2004. **21**(7): p. 751-760.
222. Dobrovoiskaia, M.A., et al., *Method for analysis of nanoparticle hemolytic properties in vitro*. Nano Lett, 2008. **8**(8): p. 2180-2187.
223. Yemisci, M., et al., *Treatment of malignant gliomas with mitoxantrone-loaded poly (lactide-co-glycolide) microspheres*. Neurosurgery, 2006. **59**(6): p. 1296-1302.
224. Goldberg, L. and Y. Kloog, *A Ras inhibitor tilts the balance between Rac and Rho and blocks phosphatidylinositol 3-kinase-dependent glioblastoma cell migration*. Cancer Res, 2006. **66**(24): p. 11709-11717.
225. Goldberg, L., et al., *New Derivatives of Farnesylthiosalicylic Acid (Salirasib) for Cancer Treatment: Farnesylthiosalicylamide Inhibits Tumor Growth in Nude Mice Models*. J Med Chem, 2009. **52**(1): p. 197-205.
226. Goldberg, L., et al., *Salirasib (farnesyl thiosalicylic acid) for brain tumor treatment: a convection-enhanced drug delivery study in rats*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(11): p. 3609-16.
227. Yang, W., et al., *Convection enhanced delivery of carboplatin in combination with radiotherapy for the treatment of brain tumors*. J Neurooncol, 2011. **101**(3): p. 379-90.
228. Debinski, W. and S.B. Tatter, *Convection-enhanced delivery for the treatment of brain tumors*. Expert Rev Neurother, 2009. **9**(10): p. 1519-27.
229. Allard, E., C. Passirani, and J.P. Benoit, *Convection-enhanced delivery of nanocarriers for the treatment of brain tumors*. Biomaterials, 2009. **30**(12): p. 2302-18.

230. Kwon, G.S., *Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds*. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 2003. **20**(5): p. 357-403.
231. Richter, A., et al., *Solubilization of Sagopilone, a poorly water-soluble anticancer drug, using polymeric micelles for parenteral delivery*. Int J Pharm, 2010. **389**(1-2): p. 244-253.
232. Veronese, F.M., *Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions*. Biomaterials, 2001. **22**(5): p. 405-17.
233. Roberts, M.J., M.D. Bentley, and J.M. Harris, *Chemistry for peptide and protein PEGylation*. Adv Drug Deliv Rev, 2002. **54**(4): p. 459-76.
234. Veronese, F.M. and J.M. Harris, *Introduction and overview of peptide and protein pegylation*. Adv Drug Deliv Rev, 2002. **54**(4): p. 453-6.
235. Torchilin, V.P., et al., *Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidones: synthesis, properties and liposome surface modification*. Biomaterials, 2001. **22**(22): p. 3035-44.
236. Luppi, B., et al., *Micelles based on polyvinyl alcohol substituted with oleic acid for targeting of lipophilic drugs*. Drug Deliv, 2005. **12**(1): p. 21-6.
237. Nam, Y.S., et al., *New micelle-like polymer aggregates made from PEI-PLGA diblock copolymers: micellar characteristics and cellular uptake*. Biomaterials, 2003. **24**(12): p. 2053-9.
238. Torchilin, V.P., et al., *Poly(ethylene glycol) on the liposome surface: on the mechanism of polymer-coated liposome longevity*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1195**(1): p. 11-20.
239. Farago, O. and N. Gronbeck-Jensen, *Computational and analytical modeling of cationic lipid-DNA complexes*. Biophys J, 2007. **92**(9): p. 3228-40.

240. May, S. and A. Ben-Shaul, *Modeling of cationic lipid-DNA complexes*. *Curr Med Chem*, 2004. **11**(2): p. 151-67.
241. Shimek, J.L., N.G. Rao, and S.K. Khalil, *High-pressure liquid chromatographic determination of ibuprofen in plasma*. *J Pharm Sci*, 1981. **70**(5): p. 514-6.
242. Shah, V.P., *The history of bioanalytical method validation and regulation: Evolution of a guidance document on bioanalytical methods validation*. *Aaps Journal*, 2007. **9**(1): p. E43-E47.
243. Shabir, G.A., *Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis - Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization*. *Journal of Chromatography A*, 2003. **987**(1-2): p. 57-66.
244. Siaghy, E.M., et al., *High-performance liquid chromatographic analysis of muscular interstitial arginine and norepinephrine kinetics. A microdialysis study in rats*. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2000. **745**(2): p. 279-86.
245. Shabir, G.A. and N.J. Forrow, *Validation of a reversed-phase HPLC method for 1,10-phenanthroline-5,6-dione and analysis of its impurities by HPLC-MS*. *J Pharm Biomed Anal*, 2003. **33**(2): p. 219-230.
246. Fenart, L., et al., *Evaluation of effect of charge and lipid coating on ability of 60-nm nanoparticles to cross an in vitro model of the blood-brain barrier*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999. **291**(3): p. 1017-22.
247. Fang, R.H., et al., *Quick synthesis of lipid-polymer hybrid nanoparticles with low polydispersity using a single-step sonication method*. *Langmuir*, 2010. **26**(22): p. 16958-62.

248. Lasa-Saracibar, B., et al., *Lipid nanoparticles for cancer therapy: state of the art and future prospects*. *Expert Opin Drug Deliv*, 2012. **9**(10): p. 1245-61.
249. Gasparini, G., et al., *Preparation and characterization of PLGA particles for subcutaneous controlled drug release by membrane emulsification*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2008. **61**(2): p. 199-207.
250. Amos, S., et al., *Farnesylthiosalicylic acid induces caspase activation and apoptosis in glioblastoma cells*. *Cell Death Differ*, 2006. **13**(4): p. 642-51.
251. Guo, H.C., et al., *Singlet oxygen-induced apoptosis of cancer cells using upconversion fluorescent nanoparticles as a carrier of photosensitizer*. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 2010. **6**(3): p. 486-495.
252. Yemisci, M., et al., *Treatment of malignant gliomas with mitoxantrone-loaded poly (lactide-co-glycolide) microspheres*. *Neurosurgery*, 2006. **59**(6): p. 1296-302; discussion 1302-3.
253. Geletneky, K., et al., *Regression of advanced rat and human gliomas by local or systemic treatment with oncolytic parvovirus H-1 in rat models*. *Neuro Oncol*, 2010. **12**(8): p. 804-814.
254. Nduom, E.K., et al., *Nanotechnology applications for glioblastoma*. *Neurosurg Clin N Am*, 2012. **23**(3): p. 439-49.
255. Invernici, G., et al., *Nanotechnology advances in brain tumors: the state of the art*. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2011. **6**(1): p. 58-69.
256. Kraitzer, A. and M. Zilberman, *Controlled Release of Antiproliferative Drugs From Polymeric Systems for Stent Applications and Local Cancer Treatment*. *Advanced Engineering Materials*, 2012. **14**(6): p. B294-B310.

257. Shabir, G.A., *Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization.* Journal of Chromatography A, 2003. **987**(1-2): p. 57-66.
258. Vega, E., et al., *Validation of a reversed-phase LC method for quantitative analysis of intravenous admixtures of ciprofloxacin and metronidazole.* J Pharm Biomed Anal, 1999. **21**(5): p. 1003-9.
259. Salvador-Morales, C., et al., *Immunocompatibility properties of lipid-polymer hybrid nanoparticles with heterogeneous surface functional groups.* Biomaterials, 2009. **30**(12): p. 2231-40.
260. Lasa-Saracibar, B., et al., *Lipid nanoparticles for cancer therapy: state of the art and future prospects.* Expert Opin Drug Deliv, 2012. **9**(10): p. 1245-1261.
261. Martins, S., et al., *Solid lipid nanoparticles as intracellular drug transporters: An investigation of the uptake mechanism and pathway.* Int J Pharm, 2012. **430**(1-2): p. 216-227.
262. Wang, H., et al., *Effect of preparation conditions on the size and encapsulation properties of mPEG-PLGA nanoparticles simultaneously loaded with vincristine sulfate and curcumin.* Pharm Dev Technol, 2012.
263. Cavalcanti, L.P., et al., *Drug loading to lipid-based cationic nanoparticles.* Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms, 2005. **238**(1-4): p. 290-293.
264. Lee, W.K., et al., *Investigation of the factors influencing the release rates of cyclosporin A-loaded micro- and nanoparticles prepared by high-pressure homogenizer.* Journal of Controlled Release, 2002. **84**(3): p. 115-123.

265. Nair, K.L., et al., *Biological evaluation of 5-fluorouracil nanoparticles for cancer chemotherapy and its dependence on the carrier, PLGA*. Int J Nanomedicine, 2011. **6**: p. 1685-97.
266. Chang, J., et al., *Transferrin adsorption onto PLGA nanoparticles governs their interaction with biological systems from blood circulation to brain cancer cells*. Pharm Res, 2012. **29**(6): p. 1495-505.
267. Guo, J., et al., *Aptamer-functionalized PEG-PLGA nanoparticles for enhanced anti-glioma drug delivery*. Biomaterials, 2011. **32**(31): p. 8010-20.
268. Allard, E., et al., *Dose effect activity of ferrocifen-loaded lipid nanocapsules on a 9L-glioma model*. Int J Pharm, 2009. **379**(2): p. 317-23.
269. Boccaccini, A.R., et al., *Electrophoretic deposition of biomaterials*. J R Soc Interface, 2010. **7 Suppl 5**: p. S581-613.