POLİ (LAKTİK-KO-GLİKOLİK ASİT)-KİTOSAN ÇEKİRDEK/KABUK NANOPARTİKULLERDEN KEMOPREVENTİF VE KEMOTERAPÖTİK ÖZELLİKTEKİ PİPERİN VE EPİGALLOKATEŞİN GALLAT'IN SIRALI SALIMININ İNCELENMESİ

INVESTIGATION OF SEQUENTIAL RELEASE OF PIPERINE AND EPIGALLOCATECHIN GALLATE WITH CHEMOPREVENTIVE AND CHEMOTHERAPEUTIC PROPERTIES FROM POLY (LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID) -CHITOSAN CORE / SHELL NANOPARTICLES

DAMLA GÜREL

PROF. DR YEŞİM SAĞ AÇIKEL

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Egitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Babam'a...

ÖZET

POLİ (LAKTİK-KO-GLİKOLİK ASİT) -KİTOSAN ÇEKİRDEK/KABUK NANOPARTİKÜLLERDEN KEMOPREVENTİF VE KEMOTERAPÖTİK ÖZELLİKTEKİ PİPERİN VE EPİGALLOKATEŞİN GALLAT'IN SIRALI SALIMININ İNCELENMESİ

Damla GÜREL

Yüksek Lisans, Kimya Mühendisliği Bölümü Tez Danışmanı: Prof. Dr. Yeşim SAĞ AÇIKEL Mayıs 2023, 129 sayfa

Kanser sıklıkla ölümle sonuçlanan bir hastalıktır. Konvensiyonel tedavi yöntemlerinde (ameliyat, kemoterapi, radyoterapi gibi) yan etkilerinden kaynaklı hastanın hayat kalitesinde düşüşler yoğun bir şekilde meydana gelmektedir. Son yıllarda artan araştırmalarda kanser tedavisi için yeni yöntemler çalışılmaktadır. Sağlıklı hücreler korunarak sadece tümör bölgesine etki eden kontrollü ilaç salımına olanak sağlayan polimerik nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemleri bu yeni yöntemlerden biridir. İlaç olarak da konvensiyonel ilaçlar yerine çeşitli avantajları olan fitokimyasallar tercih edilerek yan etkilerin azalmasına olanak tanımaktadır. Bu tez çalışması kapsamında poli(laktik-ko-glikolik asit) PLGA nanopartikülleri sentezlenerek, kitosan (KTS) ile kaplanmıştır.

Piperin (PIP) ve epigallokateşin gallat (EGCG) fitokimyasal özellikte olan iki bileşiktir. Bitkisel bazlı bu iki kemopreventif-kemoterapötik özellikteki etken maddenin kanser tedavisinde etkinlikle kullanılabileceklerini gösteren çalışmalar yapılmaktadır. Birlikte kullanılmaları ile sinerjistik etki yaratarak biyoyararlanımlarının arttırılması hedeflenmektedir. Bu doğrultuda PIP PLGA nanopartiküllerine yüklenerek ve EGCG yüklenmis KTS ile kaplanarak çekirdek-kabuk nanokompozit yapısı oluşturulmuştur. Bu doğrultuda PLGA nanopartiküllerinin (PLGA NPs), KTS ile kaplanmış PLGA nanopartiküllerinin (KTS-PLGA NPs), PIP ile yüklenmiş PLGA nanopartiküllerin (PIP-PLGA NPs), KTS ile kaplanmış PIP ile yüklenmiş PLGA nanopartiküllerin (PIP-PLGA-KTS NPs) ve son olarak da EGCG yüklenmiş KTS ile kaplanmış PIP yüklü PLGA (PIP-PLGA-EGCG-KTS) nanokompozit yapısının karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. ZetaSizer, FT-IR, DSC ve SEM cihazları kullanılarak karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. PIP'in tek başına PLGA nanopartiküllerine, PIP' in tek başına KTS ile kaplamış PLGA nanopartiküllerine enkapsülasyon verimlilikleri ve yükleme kapasiteleri kompozit yapıyı oluşturan bileşenlerin ve PIP miktarının fonksiyonu olarak bulunmuştur. Daha sonra EGCG KTS' a yüklenerek, PIP ile yüklenmiş PLGA nanopartiküllerinin bir arada bulundukları nanokompozit yapıda her iki etken maddenin enkapsülasyon verimlilikleri ve yükleme kapasiteleri bulunmuştur. Böylelikle her iki etken maddenin bir arada bulunduğu durumda en uygun PIP-PLGA-EGCG-KTS nanopartikül yapısı belirlenmiştir. PLGA nanopartiküllerden tek başına PIP salımı, KTS ile kaplanmış PLGA nanopartiküllerden PIP salımı vücuttaki sirkülasyonu için kanı simüle eden pH 7.0 ve kanser hücreleri için tümör mikroçevresini simüle eden pH 5.5' da in vitro olarak gerçekleştirilmiştir. PIP ve EGCG' nin bir arada bulunduğu en uygun EGCG-KTS-PIP-PLGA nanokompozit yapısından EGCG ve PIP' in salımı in vitro ortamda incelenmiştir. Yukarıda tanımlanan her sistemin in vitro salım profillerinin sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowell kinetik modellerine uyumu incelenerek, kinetik sabitlerin değerleri hesaplanmış, salım mekanizması önerilmiştir.

Anahtar Kelimeler: İlaç Salımı, Çekirdek-Kabuk Nanopartiküller, Poli (laktik-koglikolik asit), Kitosan, Piperin, Epigallokateşin gallat.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF SEQUENTIAL RELEASE OF PIPERINE AND EPIGALLOCATECHIN GALLATE WITH CHEMOPREVENTIVE AND CHEMOTHERAPEUTIC PROPERTIES FROM POLY (LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID) -CHITOSAN CORE / SHELL NANOPARTICLES

Damla GÜREL

Master of Science, Department of Chemical Engineering Supervisor: Prof. Dr. Yeşim SAĞ AÇIKEL May 2023, 129 pages

Cancer is a disease that often results in death. In conventional treatment methods (such as surgery, chemotherapy, radiotherapy), the quality of life of the patient decreases intensely due to its side effects. In recent years, new methods for cancer treatment have been studied in increasing research. One of these new methods is polymeric nanoparticle drug delivery systems, which protect healthy cells and allow controlled drug release that only affects the tumor area. As a medicine, phytochemicals with various advantages are preferred instead of conventional drugs, allowing the reduction of side effects. In this thesis, poly(lactic-co-glycolic acid) PLGA nanoparticles were synthesized and coated with chitosan (KTS). Piperine (PIP) and epigallocatechin gallate (EGCG) are two compounds with phytochemical properties. There are studies showing that these two herbal-based chemopreventive-chemotherapeutic active substances can be used effectively in cancer treatment. It is aimed to increase their bioavailability by creating a synergistic effect when used together. In this direction, core-shell nanocomposite structure was formed by loading PIP on PLGA nanoparticles and coating with EGCG loaded KTS. Accordingly, PLGA nanoparticles (PLGA NPs), KTS coated PLGA nanoparticles (KTS-PLGA NPs), PIP loaded PLGA nanoparticles (PIP-PLGA NPs), KTS coated PIP loaded PLGA nanoparticles (PIP-PLGA-KTS NPs) and finally EGCG loaded KTS coated PIP loaded PLGA nanoparticles (KTS-PIP NPs) synthesized and characterization studies were carried out. Characterization studies were performed using ZetaSizer, FT-IR, DSC and SEM. The encapsulation efficiencies and loading capacities of PIP to PLGA nanoparticles alone and of PIP to PLGA nanoparticles coated with KTS alone were found as functions of the components that make up the composite structure and the amount of PIP. Then, the encapsulation efficiencies and loading capacities of both active substances were found in the nanocomposite structure, where EGCG was loaded into KTS and PLGA nanoparticles loaded with PIP were together. Thus, the most suitable EGCG-KTS-PIP-PLGA nanoparticle structure was determined in the presence of both active ingredients. PIP release from PLGA nanoparticles alone, PIP release from PLGA nanoparticles coated with chitosan were performed in vitro at pH 7.0 simulating blood for circulation in the body and pH 5.5 simulating tumor microenvironment for cancer cells. The release of EGCG and PIP from the most suitable EGCG-KTS-PIP-PLGA nanocomposite structure with PIP and EGCG together was investigated in vitro. The compatibility of the in vitro release profiles of each system described above with zeroorder, first-order, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowell kinetic models was examined, the values of the kinetic constants were calculated, and the release mechanism was proposed.

Keywords: Drug Release, Core-Shell Nanoparticles, Poly (lactic-co-glycolic acid), Chitosan, Piperine, Epigallocatechin gallate.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans dönemim boyunca bilgi birikimiyle yol gösteren, tez çalışmamın her anında bana her türlü yardımı sağlayan saygı değer hocam Prof. Dr. Yeşim SAĞ AÇIKEL'e

2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu programı kapsamında çalışmalarıma maddi destek sağlayan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na,

Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü merkez laboratuvarında tezim için gerekli analizlerin gerçekleştirilmesinde yardımcı olan Belgin ASLAN ve Duygu GÜLAY'a

Hayatımın her döneminde bana her şekilde sevgisiyle destek olan, cesaret veren, arkamda duran, bugünlere gelmemi sağlayan, daha da iyisi için bana her koşulu sağlayan sevgili canımın içi anneciğim Pınar GÜREL'e

Tez döneminin en stresli olan son dönemlerinde her türlü sıkıntımda her şekilde yanımda olup, kafamı toparlayan, beni güldüren, yeri gelince kızıp kendime gelmemi sağlayan, yeri gelince laboratuvarda benimle saatlerce bekleyip bana elinden gelen desteği veren bi'tanem M. Emin SOYSAL'a

Tez çalışmam boyunca bana laboratuvar konularında yardımcı olmalarının yanı sıra, bana manevi destek veren ve bu süreci eğlenceli kılan, yeni arkadaşlığımızın temellerini Lab-8'de attığım sevgili laboratuvar arkadaşlarım başta Ezgi TÜRKEŞ ve Merve ÖZTEKİN olmak üzere Görkem POLAT'a

Bu tez Tübitak Tarafından "Poli(Laktik-Ko-Glikolik Asit)-Kitosan Çekirdek/Kabuk Nanopartiküllerden Kemopreventif Ve Kemoterapötik Özellikteki Piperin Ve Epigallokateşin Gallat'ın Sıralı Salımının İncelenmesi" konulu öncelikli alanlara yönelik yurt içi yüksek lisans bursu tarafından desteklenmiştir.

Saygıyla sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Damla GÜREL

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	. iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İlaç Salım Sistemleri	3
2.2. İlaç Salım Sistemleri ve Kanser	5
2.2.1. Nanoteknolojik İlaç Taşınım Sistemlerinin Kanser Tedavisindeki Avantajl	arı
5	
2.3. PLGA Nanopartikülleri ile İlgili Genel Bilgiler	6
2.3.1. PLGA Nanopartiküllerinin Kanser Hücrelerine Alımı	9
2.3.2. PLGA Degredasyonu	.10
2.3.3. PLGA İlaç Salım Davranışları	.13
2.3.4. PLGA Nanopartiküllerinin Sentezlenmesinde Kullanılan Yöntemler	.14
2.4. PLGA Nanopartiküllerinin İlaç Salım Sistemlerinde Kullanımı	.23
2.5. Kitosan Nanopartikülleri ile İlgili Genel Bilgiler	.25
2.5.1. Kitosan Nanopartiküllerinin Biyolojik Sıvılarda İlaç Salımı	.26
2.6. Kitosan Nanopartiküllerinin İlaç Salım Sistemlerinde Kullanımı	.28
2.7. PLGA-Kitosan Nanopartikülleri Hakkında Genel Bilgi	.30
2.8. PLGA-Kitosan Nanopartiküllerine Çeşitli Kanser İlaçları Yüklenmesine Yönel	lik
Literatür Özeti	.31
2.9. Piperin Hakkında Genel Bilgi, Çeşitli Kanserleri Tedavi Etmede Kullanıldığı	
Mekanizmalar ve Yolaklar	.33
2.9.1. Piperin'in Kemoprotektif İlaç Olarak Kullanılmasının Nedenleri	.34

2.9.2. Piperin'in Kemoprotektif İlaç Özelliği Gösterdiği Mekanizmalar	35
2.10. EGCG Hakkında Genel Bilgi, Çeşitli Kanserleri Tedavi Etmede Kullanıldığı	
Mekanizmalar ve Yolaklar	37
2.10.1. EGCG 'nin Kanser Önleyici Mekanizmaları	39
2.11. Piperin ve EGCG'nin Çeşitli Kanserleri Tedavi Etmede Birlikte	
Kullanılmasının Olumlu Yönleri ve Beklenen Sinerjistik Etki	40
2.12. Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinin Matematiksel Olarak Tanımlanması	42
2.12.1. Enkapsülasyon Verimliliği ve Yükleme Kapasitesi	42
2.12.2. İlaç salım Kinetik Modelleri	42
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	47
3.1. Kimyasal Malzemeler	47
3.2. Partikül Sentez Yöntemleri	48
3.2.1. PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması	48
3.2.2. PIP Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması	49
3.2.3. KTS Kaplı PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması	50
3.2.4. PIP Yüklü KTS Kaplı PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması	51
3.2.5. EGCG Yüklü KTS ile Kaplanmış PIP yüklü PLGA Nanopartiküllerinin	
Hazırlanması	52
3.3. Karakterizasyon Çalışmaları	53
3.3.1. Nanopartiküllerin Boyut ve PDI Analizleri	53
3.3.2. İlaç Enkapsülasyon Verimi ve Yükleme Kapasitesi Analizleri	53
3.3.2.1. PIP Yüklü NP İlaç Enkapsülasyon Verimi ve Yükleme Kapasitesi	
Analizleri	53
3.3.2.2. EGCG Yüklü NP İlaç Enkapsülasyon Verimi ve Yükleme Kapasites	i
Analizleri	55
3.3.3. FT-IR Analizleri	56
3.3.4. DSC Analizleri	56
3.4. Salım Çalışmaları	57
3.4.1. PIP Yüklü PLGA Nanopartikül Salım Analizleri	57
3.4.2. EGCG Yüklü KTS Kaplı PLGA Nanopartikül Salım Analizleri	59
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	61

4.1.1. Nanopartiküllerin Boyut ve PDI Analizleri	61
4.1.2. FT-IR Analizleri	66
4.1.3. DSC Analizleri	
4.1.4. SEM Analizleri	77
4.2. İlaç Salım Analizleri	
4.2.1. Enkapsülasyon Verimi ve İlaç Yükleme Analizleri	
4.2.2. Salım Çalışmaları ve Kinetik Modelleri	
5. YORUM	119
6. KAYNAKLAR	121

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. PLGA'nın Kimyasal Yapısı, x: Laktik Asit Monomeri, Y: Glikolik Asit
Monomeri. [9]7
Şekil 2.2. PLGA 50:50, 65:35, 75:25 ve 85:15 (laktik asit: glikolik asit) için in vivo salım
profilleri modellenmiştir. Sıfırıncı derece kinetiğinden hızlı ilaç salımına geçen çift
fazlı salım profili gösterilmiştir. Profiller ayrıca laktidin glikolide oranının
azalmasıyla salım hızında artış gösterir. [16]14
Şekil 2.3. Kitosan'ın kimyasal yapısı, D:N-acetilglukozamin birimi A:Glukozamin birimi
[27]25
Şekil 2.4. Piperin'in kimyasal yapısı
Şekil 2.5. Piperin'in faydaları
Şekil 2.6. (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin-3-gallate
(ECG), and (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) kimyasal yapısı [6]37
Şekil 2.7. EGCG'nin yararları
Şekil 3.1. PLGA NP
Şekil 3.2. PIP yüklü PLGA NP 49
Şekil 3.3. KTS kaplı PLGA NP 50
Şekil 3.4. PIP Yüklü KTS Kaplı PLGA51
Şekil 3.5. EGCG Yüklü KTS ile Kaplanmış PIP yüklü PLGA 52
Şekil 3.7. PIP'in %10 aseton-etanol içerisindeki kalibrasyon doğrusu
Şekil 3.8. PIP'in %10 aseton-etanol-%2 asetik asit içerisindeki kalibrasyon doğrusu 54
Şekil 3.9. EGCG'nin %10 aseton-etanol-%2 asetik asit içerisindeki kalibrasyon doğrusu.
Şekil 3.10. PIP-PBS kalibrasyon doğrusu (pH=7.0)57
Şekil 3.11. PIP-pH:5.5 kalibrasyon doğrusu
Şekil 3.12. EGCG-PBS kalibrasyon doğrusu (pH:7.0) 59
Şekil 3.13. EGCG-pH:5.5 kalibrasyon doğrusu60
Şekil 4.1. 0.02 mL Tween 80 içeren PLGA NP Zeta Sizer analizleri
Şekil 4.2. 0.1 mL Tween 80 içeren PLGA NP Zeta Sizer analizleri
Şekil 4.3. 5 mg KTS içeren NP Zeta-Sizer analiz sonuçları

Şekil 4.4. 10 mg KTS içeren NP Zeta-Sizer analiz sonuçları
Şekil 4.5. 15 mg KTS içeren NP Zeta-Sizer analiz sonuçları
Şekil 4.6. Saf PLGA FT-IR spektrumu67
Şekil 4.7. PLGA NP FT-IR spekturumu67
Şekil 4.8. Saf PIP FT-IR Spektrumu
Şekil 4.9. PIP yüklü PLGA NP FT-IR spektrumu68
Şekil 4.10. PIP, PLGA ve PIP yüklü PLGA NP'lerinin FT-IR spektrumlarının
karşılaştırılması
Şekil 4.11. Saf KTS FT-IR spektrumu70
Şekil 4.12. KTS kaplı PLGA NP FT-IR spektrumu70
Şekil 4.13. PIP yüklü KTS kaplı PLGA NP FT-IR spektrumu71
Şekil 4.14. Saf EGCG FT-IR spektrumu72
Şekil 4.15. EGCG yüklü KTS kaplı PIP yüklü PLGA NP FT-IR spektrumu72
Şekil 4.16. Saf PLGA DSC spektrumu73
Şekil 4.17. Saf PIP DSC spektrumu74
Şekil 4.18. PIP yüklü PLGA NP DSC spektrumu74
Şekil 4.19. PIP, PLGA ve PIP-PLGA DSC spektrumlarının karşılaştırılması75
Şekil 4.20. Saf KTS DSC spektrumu76
Şekil 4.21. PIP yüklü KTS ile kaplanmış PLGA NP DSC spektrumu76
Şekil 4.22. PIP, PLGA, KTS ve KTS kaplı PIP-PLGA DSC spektrumlarının
karşılaştırılması
Şekil 4.23. PLGA NP SEM görüntüsü78
Şekil 4.24. PLGA NP SEM görüntüsü78
Şekil 4.25. PLGA NP SEM görüntüsü79
Şekil 4.26. KTS kaplı PLGA NP SEM görüntüsü80
Şekil 4.27. KTS kaplı PLGA NP SEM görüntüsü80
Şekil 4.28. PIP yüklü PLGA NP' lerden PIP salımının pH:7.0'daki salım grafiği88
Şekil 4.29. 18 mg PIP yüklü PLGA NP' lerden PIP salımının pH:5.5'deki salım grafiği.
Şekil 4.30. 18 mg PIP yüklü PLGA NP'lerden pH:5.5 ve pH:7.0 ortamlarındaki PIP salım
grafiği
Şekil 4.32. PIP (24 mg) yüklü PLGA NP' lerden pH 7.0'de elde edilen birinci derece
kinetik model grafiği90

Şekil 4.33. PIP (24 mg) yüklü PLGA NP' lerden pH 7.0' de elde edilen Higuchi kinetik
model grafiği91
Şekil 4.34. PIP (24 mg) yüklü PLGA NP' lerden pH 7.0' de elde edilen Korsmeyer-
Peppas kinetik model grafiği91
Şekil 4.35. PIP (24 mg) yüklü PLGA NP' lerden pH 7.0' de elde edilen Hixson-Crowell
kinetik model grafiği92
Şekil 4.36. PIP (18 mg) yüklü PLGA NP' lerden pH 5.5' de elde edilen sıfırıncı derece
kinetik model grafiği92
Şekil 4.37. PIP (18 mg) yüklü PLGA NP' lerden pH 5.5' de elde edilen birinci derece
kinetik model grafiği93
Şekil 4.38. PIP (18 mg) yüklü PLGA NP' lerden pH 5.5' de elde edilen Hixson-Crowell
kinetik model grafiği93
Şekil 4.39. PIP (18 mg) yüklü PLGA NP' lerden pH 5.5' de elde edilen Higuchi kinetik
model grafiği94
Şekil 4.40. PIP (18 mg) yüklü PLGA NP' lerden pH 5.5' de elde edilen Korsmeyer-
Peppas derece kinetik model grafiği94
Şekil 4.41. KTS ile kaplanmış PIP yüklü PLGA NP' lerden pH:7.0' de salım profilleri.
Şekil 4.42. KTS ile kaplanmış PIP yüklü PLGA NP' lerden pH:5.5' da salım profilleri.
Şekil 4.43. 24 mg PIP yüklü KTS ile kaplı PLGA NP'lerden farklı pH ortamlarında PIP
salım profilleri
Şekil 4.44. 30 mg PIP yüklü KTS ile kaplı PLGA NP'lerden farklı pH ortamlarında PIP
salım profilleri
Şekil 4.45. 36 mg PIP yüklü KTS ile kaplı PLGA NP'lerden farklı pH ortamlarında PIP
salım profilleri
Şekil 4.46. 24 mg PIP yüklü PLGA ve KTS kaplı PLGA NP' den PIP salım profilleri.
Şekil 4.47. PIP (24 mg) yüklü KTS kaplı PLGA NP' lerden pH 7.0' de elde edilen sıfırıncı
derece kinetik model grafiği 103
Şekil 4.48. PIP (24 mg) yüklü KTS kaplı PLGA NP' lerden pH 7.0' de elde edilen birinci
derece kinetik model grafiği

Şekil 4.49. PIP (24 mg) yüklü KTS kaplı PLGA NP' lerden pH 7.0' de elde edilen Higuchi
kinetik model grafiği104
Şekil 4.50. PIP (24 mg) yüklü KTS kaplı PLGA NP' lerden pH 7.0' de elde edilen Hixson-
Crowell kinetik model grafiği104
Şekil 4.51. PIP (24 mg) yüklü KTS kaplı PLGA NP' lerden pH 7.0' de elde edilen
Korsmeyer -Peppas kinetik model grafiği105
Şekil 4.52. PIP (24 mg) yüklü KTS kaplı PLGA NP' lerden pH 5.5' da elde edilen sıfırıncı
derece kinetik model grafiği105
Şekil 4.53. PIP (24 mg) yüklü KTS kaplı PLGA NP' lerden pH 5.5' da elde edilen birinci
derece kinetik model grafiği106
Şekil 4.54. PIP (24 mg) yüklü KTS kaplı PLGA NP' lerden pH 5.5' da elde edilen Higuchi
kinetik model grafiği106
Şekil 4.55. PIP (24 mg) yüklü KTS kaplı PLGA NP' lerden pH 5.5' da elde edilen Hixson-
Crowell kinetik model grafiği107
Şekil 4.56. PIP (24 mg) yüklü KTS kaplı PLGA NP' lerden pH 5.5' da elde edilen
Korsmeyer-Peppas kinetik model grafiği107
Şekil 4.57. PIP ve EGCG' nin EGCG-KTS kaplı PIP-PLGA NP' lerden pH:5.5'te salım
profilleri111
Şekil 4.58. EGCG (10 mg) yüklü KTS kaplı- PIP yüklü (18 mg) PLGA NP' lerden EGCG
için pH 5.5' da elde edilen sıfırıncı derece kinetik model grafiği111
Şekil 4.59. EGCG (10 mg) yüklü KTS kaplı- PIP yüklü (18 mg) PLGA NP' lerden EGCG
için pH 5.5' da elde edilen birinci derece kinetik model grafiği112
Şekil 4.60. EGCG (10 mg) yüklü KTS kaplı- PIP yüklü (18 mg) PLGA NP' lerden EGCG
için pH 5.5' da elde edilen Hixson-Crowell kinetik model grafiği112
Şekil 4.61. EGCG (10 mg) yüklü KTS kaplı- PIP yüklü (18 mg) PLGA NP' lerden EGCG
için pH 5.5' da elde edilen sıfırıncı Korsmeyer-Peppas kinetik model grafiği113
Şekil 4.62. EGCG (10 mg) yüklü KTS kaplı- PIP yüklü (18 mg) PLGA NP' lerden EGCG
için pH 5.5' da elde edilen sıfırıncı Higuchi kinetik model grafiği113
Şekil 4.63. EGCG (10 mg) yüklü KTS kaplı- PIP yüklü (18 mg) PLGA NP' lerden PIP
için pH 5.5' da elde edilen sıfırıncı derece kinetik model grafiği114
Şekil 4.64. EGCG (10 mg) yüklü KTS kaplı- PIP yüklü (18 mg) PLGA NP' lerden PIP
için pH 5.5' da elde edilen birinci derece kinetik model grafiği114

Şekil 4.65. EGCG (10 mg) yüklü KTS kaplı- PIP yüklü (18 mg) PLGA NP	' lerden PIP
için pH 5.5' da elde edilen Hixson-Crowell kinetik model grafiği	
Şekil 4.66. EGCG (10 mg) yüklü KTS kaplı- PIP yüklü (18 mg) PLGA NP	' lerden PIP
için pH 5.5' da elde edilen Higuchi kinetik model grafiği	
Şekil 4.67. EGCG (10 mg) yüklü KTS kaplı- PIP yüklü (18 mg) PLGA NP	' lerden PIP
için pH 5.5' da elde edilen Korsmeyer-Peppas kinetik model grafiği	

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Emülsiyon buharlaştırma yöntemi avantaj ve dezavantajları. [17]16
Çizelge 2.2. Nanoçöktürme yöntemi avantaj ve dezavantajları. [17]19
Çizelge 2.3. Tuzla çökelme yöntemi avantaj ve dezavantajları. [17]21
Çizelge 2.4. Emülsiyon difüzyon yöntemi avantaj ve dezavantajları. [17]22
Çizelge 2.5. PLGA NP'leri için literatür özeti
Çizelge 2.7. Kitosan NP için literatür özeti
Çizelge 2.8. Kitosan kaplı PLGA NP için literatür özeti
Çizelge 3.1. EGCG tayini için HPLC metodu
Çizelge 4.1. Emülsifiyer miktarının PLGA NP boyutuna etkisi61
Çizelge 4.2. KTS kaplı PLGA NP'lerinde KTS miktarının NP boyutuna etkisi63
Çizelge 4.3. PIP miktarının enkapsülasyon verimi üzerindeki etkisi
Çizelge 4.4. PIP yüklü PLGA NP'lerinde PIP miktarının enkapsülasyon verimi
üzerindeki etkisi
Çizelge 4.5. PIP yüklü KTS kaplı PLGA NP'lerinde PIP miktarının enkapsülasyon
verimine etkisi
Çizelge 4.6. EGCG yüklenmiş KTS ile kaplanmış PIP yüklü NP'lerinde EGCG
miktarının enkapsülasyon verimine etkisi84
Çizelge 4.7. EGCG yüklenmiş KTS ile kaplanmış PIP yüklü NP'lerinde PIP miktarının
enkapsülasyon verimine etkisi85
Çizelge 4.8. EGCG yüklenmiş KTS ile kaplanmış PIP yüklü NP'lerinde PIP miktarının
enkapsülasyon verimine etkisi86
Çizelge 4.9. PIP salımının pH 7.0' de gerçekleştirileceği PIP yüklü PLGA NP salım
partiküllerinin özellikleri
Çizelge 4.10. PIP salımının pH 5.5' da gerçekleştirileceği PIP yüklü PLGA NP salım
partiküllerinin özellikleri
Çizelge 4.11. PIP yüklü PLGA NP'lerden PIP salımı için elde edilen kinetik modellerin
R ² değerleri
Çizelge 4.12. PIP Yüklü PLGA NP'lerden PIP salımı için kinetik modellerden elde edilen
kinetik sabitlerin değerleri98
Çizelge 4.13. PIP salımının gerçekleştirileceği PIP yüklü PLGA NP' lerinin özellikleri.

Çizelge 4.14. PIP yüklü KTS-PLGA NP' lerden PIP salımının kinetik modellere uyumu
için elde edilen R ² değerleri
Çizelge 4.15. PIP yüklü KTS-PLGA NP' lerden PIP salımı için kinetik modellerden elde
edilen sabitlerin değerleri109
Çizelge 4.16. PIP ve EGCG salımının gerçekleştirileceği EGCG-KTS kaplı PIP-PLGA
NP' lerinin özellikleri
Çizelge 4.17. EGCG yüklü KTS-PIP yüklü PLGA NP' lerden PIP ve EGCG salımının
kinetik modellere uyumu için elde edilen R ² değerleri117
Çizelge 4.18. EGCG yüklü KTS-PIP yüklü PLGA NP' lerden PIP ve EGCG salımının
kinetik modellerden elde edilen sabitlerin değerleri118

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

ppm	Milyonda bir birim (mg L ⁻¹)
mg	Miligram
mL	Mililitre
nm	Nanometre

Kısaltmalar

HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
EGCG	Epigallokateşin-3-gallat
NP	Nanopartikül
KTS	Kitosan
PIP	Piperin

1. GİRİŞ

Kanser dünya çapında ölüm oranı yüksek bir hastalıktır. Hastalık başlangıcından sonra kontrolsüz ve hızla gelişmektedir. Kanser tedavisi çalışmaları oldukça yoğun bir şekilde devam etmektedir. Genellikle kanser tedavisinde ameliyat, radyasyon tedavisi, kemoterapi gibi tedaviler tümör hücrelerinin yanı sıra sağlıklı hücrelerde de zarara neden olmaktadır. Konvensiyonel kemoterapik ilaçların toksisitesi sağlıklı hücreleri harap etmesi ve çoklu ilaç direncine neden olması çalışma gruplarını farklı tedavilerin araştırmalarına yönlendirmiştir. Bu noktada nanotaşıyıcı sistemler oldukça avantajlı hale gelmiştir [1].

Uygun polimerik nanotaşıyıcı sistemlerin seçilmesi ile terapötik etkinin arttırılması için birden fazla ajanın taşınmasına olanak sağlamasının yanı sıra, tek bir kemoterapötik ilaca karşı oluşan direncin üstesinden gelinmesini sağlayabilmektedir.

PLGA'nın büyük boyutu sayesinde görüntüleme, kanser ilacı yükleyebilme, ilaç salımı ve hedefli salım gerçekleştirebilecek ajanlar tek bir platformda bir araya gelebilmektedir. PLGA'nın asidik yapısı ilaç ya da biaktif moleküller için uygun değildir ancak bu sorunun üstesinden gelmek için kitosan gibi pozitf yüklü moleküllerle kaplaması bu sorunu ortadan kaldırmaktadır [2]. Ayrıca PLGA'nın kitosan ile kaplanması PLGA'nın geçirgenliğini ve muko-yapışkan özelliklerini geliştirmektedir. Kitosan müsin ile iyonik etkileşim sayesinde mukozal yüzeylere yapışarak nanopartikül sistemlerin uygulama yerinde kalma süresini uzatıp ilaç salımını sürdürür [3].

Fitokimyasallar doğal bileşiklerdir ve kanser tedavisinde kullanımları sıklıkla araştırılmakta ve kullanılmaktadır. Kemoterapinin yaşam kalitesini azaltan yan etkilerinin azaltılması, önlenmesi amacıyla fitokimyasal seçilebilmektedir. Karabiber (*piper nigrum L*.) içerisinde bulunan Piperin fitokimyasalı güçlü bir biyo-arttırıcıdır ve bir çok ilacın biyoyararlanımını arttırmakta yardımcı olur [4].

Epigallokateşin gallat (EGCG), yeşil çay (Camellia sinensis) yapraklarından elde edilen antikanser etkileri olan bir başka fitokimyasaldır. EGCG'nin kanser mekanizmalarını engelleyici birçok rolü vardır. Ayrıca Piperin gibi birçok ilaç ile sinerjistik etki göstermektedir [5, 6].

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İlaç Salım Sistemleri

İlaç salım sistemi bir ilacın formülasyonu anlamına gelir. Kontrollü ilaç salım sistemi ise zamana bağlı ilaç kinetiğinin kontrol edilmesine olanak sağlayan bir formülasyondur. Konvensiyonel ilaçlarda herhangi bir kontrol olmadan anında salım gerçekleşmektedir.

İlaç salım sistemlerinin gelişimine bakacak olursak, Smith, Kline&French Labotuvar tarafından geliştirilen Spansule 12 saatlik salım teknolojisi ile kontrollü salım sistem teknolojisi gelişimi başlamıştır. Spansule teknolojisi gastrointestinal sıvılara erişimi sınırlayan bir kaplamanın bariyer görevi görmesiyle ilaç çekirdeğinin çözünmesini sağlamıştır. Bu formülasyonla çözünme kontrollü mekanizma geliştirilmiştir. Bu teknolojinin geliştirilmesi difüzyon kontrollü, ozmotik basınç kontrollü, iyon-değişimli ilaç salım formülasyonlarının gelişmesi konusunda öncü bir teknoloji olmuştur.

Oral formülasyonlarda *in vitro* ilaç salım profilleri genellikle *in vivo* farmakokinetik profilleriyle ilişkilidir. Böylece farmakokinetik profilleri, formülasyon parametreleri kontrol edilerek ayarlanabilir. Ancak 24 saat süren bir salım ile 24 hafta süren bir salım için gerekli formülasyonu oldukça farklıdır.

İlk uzun-etkili enjekte edilebilir formülasyon FDA tarafından onaylı Lupron Depot'tur. Bu formülasyonda löproid asetatın 1 ay boyunca salımı gerçekleştirilmiştir. 1989'daki ilk onaydan sonra, PLGA mikropartikül formülasyonu laktit: glikolit oranlarını ayarlayarak ilacın 6 aya kadar salımı sağlanmıştır. Bu uzun-etkili enjekte edilebilir formülasyonu, çeşitli küçük moleküller, peptitler ve protein formülasyonlar takip etmiştir. FDA tarafından onaylanan tüm polimeler bazlı, biyolojik olarak parçalanabilen uzun etkili enjekte edilebilir formülasyonların geliştirilmesi PLGA'nın güvenli uzun tarihi sayesinde başlamıştır. 2000 yılında, Amerika Birleşik Devletleri hükümeti Ulusal Nanoteknoloji Girişimi başlattı. Bu uygulama nanotıp alanındaki ilaç keşfinin ve dağıtımının sağlanması hedeflenmiştir. Nanotıp alanının neredeyse tamamı tümör hedefli ilaç salımına odaklanmıştır. Mylotarg, Doxil ve Abraxane nanotıbbın yüzü halindedir. Doxil ve Abraxane ilaçlarının etkinliklerinden daha çok azaltılmış yan etkileri daha önemli olmasıyla yan etkilerinin azaltılması işe daha gelişmiş ilaçlar yapılması konusunda oldukça gelişim sağlanmıştır.

Nanotıpta tümör hedeflenmesi konusunda çeşitli nanoformülasyon formları üzerinde yapılan araştırmalar bazı kritik başarılar elde etmiştir. Nanoboyuttaki ilaç formülasyonları sayesinde düşük çözünürlükteki ilaçların suda çözünebilirliği arttırılmıştır. Böylece çözünme kinetiklerini, çözünmüş ilacın vücutta emilimi gerçekleşirken ilaç molekülü sürekli halde salıma devam edecek şekilde ayarlanabilmektedir. Genel sonuç olarak suda çözünürlük artmış hale gelmektedir. 2000 yılında FDA tarafından onaylanan ilk nanokristal formülasyon Rapamune olmuştur.

Bir diğer önemli gelişme ise lipit molekül yapılarının manipüle edilerek endozomlardan daha etkili şekilde kaçmanın sağlanmasıdır. Nanoyapıların endozomlar tarafından bir kez yakalanıp hücrelerin diğer hücre altı bileşenlerine erişimini sınırlandığının keşfedilmesiyle bu formülasyonun önemi ortaya çıkmıştır. 2018 yılında FDA tarafından onaylanan siRNA iletiminde kullanılan Onpattro lipit formülasyondur. Bu formülasyonda RNA kapsülleme ve hücre içi dağıtım için optimize edilmiş iyonize edilebilir katyonik bir lipit kullanılmıştır ve partikül boyutunu ayarlayabilmek için PEG tercih edilmiştir. Lipit molekül ve birleştirilmiş yapılar COVID-19 mRNa bazlı aşının geliştirilmesinde anahtar rolü oynamıştır.

Kompleks yapı, elektrostatik ve/veya hidrofobik etkileşimler gibi kovalent olmayan bağlarla bir arada tutulan bireysel moleküllerin moleküler birleşimidir. İlaç kompleksleri genellikle suda çözünebilir polimerlerle yapılmaktadır. Buna örnek olarak düşük molekül ağırlığına sahip dekstran kullanılan 1974 yılında onaylanan InFed, 1992 yılında onaylanan Dexferrum ve albümin içeren 2005 yılında onaylanan Abraxane ilaçlarıdır. Abraxane ilacında paksitaksel albümin ile kaplanarak kanser tedavisinde kullanılmıştır.

İlaç polimer konjugatı, kovalent olarak bağlı ilaç moleküllerine sahip polimerik taşıyıcıdır. Taşıyıcı polimer, çoklu fonksiyonel gruplara sahiptir. Makro moleküler yapısı sayesinde çok sayıda kovalent bağlı ilaç molekülü taşıyabilir. Böylece polimer omurgasına ya da fonksiyonel yan gruplarına ilaç molekülleri haricinde hedefleme, görüntüleme ya da başka faydalı ajanların bağlanmasını sağlar. Bu yüzden bu yapı oldukça kullanışlı ve ilgi çekici hale gelmiştir. Çok sayıda ilaç-polimer konjugatları klinik çalışmalara dahil edilmektedir. Sonuçlar her zaman verimli olmasa bile çalışmalardan öğrenilen sonuçlar ile başka çalışmaların devamı ilaç salım sistemlerinin geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır[7].

2.2. İlaç Salım Sistemleri ve Kanser

Kanser, tedavisi için çok fazla araştırma yapılıyor olsa da hala dünyada ölüm nedeni olarak bir ya da ikinci sırada olan bir hastalıktır. Ameliyat, radyasyon tedavisi, kemoterapi gibi tedavilerin kanser hücrelerinin yok edilmesinde faydalı ve yaygın kullanılan yöntemlerdir. Nükseden kanserler için tüm vücuda etki eden sitotoksik ilaçların kullanılmasının bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bunlar zayıf suda çözünürlük, spesifik olmayan biyolojik dağılım, sağlıklı hücrelerin toksisiteye maruz kalması, tümör ya da kanserli hücrelere etki eden yetersiz ilaç konsantrasyonu ve çoklu ilaç direncidir. Bu yüzden araştırmaların yönü kanser tedavisinde etkili olan ve sağlıklı hücreleri de koruyabilen başka tedavi yöntemlerine doğru ilerlemektedir. Nanoteknolojik ilaç taşıma sistemleri de bu aşamada devreye girmektedir [1].

2.2.1. Nanoteknolojik İlaç Taşınım Sistemlerinin Kanser Tedavisindeki Avantajları

Nanopartiküller kanser tedavisinde genellikle 1-1000 nm boyutlarına sahip olmakla birlikte tercih edilen ilaç taşınımı sistemlerinin boyutları 5-200 nm arasında değişmektedir. Bu boyutların büyük yüzey-hacim oranına sahip olması ve yüzey fonksiyonellik kabiliyeti *in vivo* biyolojik dağılımda önemli rol oynamaktadır. Yaygın örnekleri lipozomlar, polimerik nanopartiküller, dendrimerler, nano-kabuklar, inorganik, nükleik asit bazlı ve manyetik nanopartiküllerdir.

Nanopartiküller kullanılarak ilaçların uzatılmış periyotlarla kararlı durumdaki terapötik seviyelere ulaşması sağlanarak ilacın etkinliğinin artması hedeflenmektedir. İlaç çözünürlüğünün ve stabilitesinin arttırılması ilacın toksisitesinin azaltılması ilaç farmakokinetiğinin geliştirilmesine olanak sağlarlar.

Tasarlanmış nanotaşıyıcılar korunmuş izolasyon ile ilaç moleküllerinin stabilitesini arttırır. Yüzey fonksiyonelliği sağlayarak sinerjistik terapötik tedavi için çoklu ilaç taşınımını gerçekleştirebilecek tasarımlara olanak sağlarlar. Antikanser ajanları içeren nanopartiküller kemorezistansı azaltarak, kanserli hücrelerin seçilimini arttırır ve normal hücrelere olan toksisiteyi azaltmış olur.

Nanoilaçlar konvensiyonel kemoterapiye göre daha uzun plazma yarı ömrüne ve farklı ilaç profillerine sahiptir. Nanoilaçlar sıkı bağlantıları ve fonksiyonel lenfatik drenajı olan endotelyal hücrelerle çevrili olan normal hücrelere kıyasla tümör interstisyel sıvısında (doku ve hücreleri çevreleyen, hücreler arasındaki boşluklarda bulunan sıvı) daha çok birikmektedir. Bu birikme durumuna artırılmış geçirgenlik ve alıkonma (EPR) etkisi denmektedir. Normal endotelyal hücrelerdeki sıkı bağlantılardan dolayı nanoilaçların birikmemesi EPR etkisi antikanser ilaç gelişimleri için önemli bir konudur [1].

2.3. PLGA Nanopartikülleri ile İlgili Genel Bilgiler

Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) glikolik asit ve laktik asit monomerlerinin polimerizasyonu ile sentezlenmiş bir polimerdir. Bu sentezi gerçekleştirmek için sık kullanılan katalistler kalay(II)2-etilheksanoat, kalay(II)alkoksitler ya da alüminyum izopropoksit'tir. PLGA'nın boyut, boyut dağılımı, morfoloji, zeta potansiyeli gibi özellikleri PLGA nanopartikülü sentezlenirken sentezleme yöntemindeki parametrelerin değişimi ile sağlanır[8].



Şekil 2.1. PLGA'nın Kimyasal Yapısı, x: Laktik Asit Monomeri, Y: Glikolik Asit Monomeri. [9]

PLGA vücutta çözünür bir yapıdır. İçerisindeki ester bağlar su ile hidrolize uğrar ve monomerlerine ayrılır. Monomerler, glikolik ve laktik asit vücuttaki başka metabolik proseslerinin yan ürünleridir, yani PLGA'nın monomerlerine ayrışması vücutta çözünebilirliğini sağlamaktadır [8]. Degredasyon ürünleri krebs döngüsü ile metabolize edilip karbondioksit ve su olarak vücuttan atılırlar. Bu yüzden toksisiteleri düşüktür. Biyomadde olarak kullanılması bu yüzden oldukça uygundur [10].

PGA ve PLA polimerlerine göre PLGA kopolimer partikülü, hidrolitik bölünmeye karşı polimerlerin her birinin tek başına olduğundan daha kararlıdır [11].

PLGA Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (US FDA) ve EMA Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından insan üzerinde çeşitli ilaç taşıma sistemleri tarafından kullanılabilirliği onaylı bir polimerdir[12]. Biyolojik olarak parçalanabilen, ilaç biyouyumlu, biyodegredasyon kinetiğine uygun, kolay proses edilebilir bir polimerdir[8].

PLGA içerisine çok sayıda kemoterapik ilaç yüklenmiş ve protokollerle sentezleme işlemleri optimize edilmiştir. Bu partiküller kılcal penetrasyon, hücresel içselleştirme(internalization) ve endozomal kaçış (escape) için yeterince küçük boyutlara sahiptirler. Ayrıca tümör ya da başka dokulara hedefli salım için yüzeyleri modifiye edilebilir. Büyük boyutlardaki PLGA nanopartikülleri multifonksiyonel görüntüleme ve

probelar için oldukça avantajlıdır. Bu tarz nanopartiküllere kanser ilaçları, görüntüleme ve hedef ajanları tek bir nanopartikül platformuna yüklenebilir[13].

Tedavi edici ajanlar, düşük molekül ağırlıklı lipofil ya da hidrofilik ilaçlar, yüksek molekül ağırlığına sahip DNA ya da antisense DNA PLGA nanopartiküllerin içine yüklenebilir [14].

Partikül boyutu vücutta uzun süreli sirkülasyonda biyo-dağılımdaki tedavi edici etki için önemlidir. Moleküler ağırlık, polimer kompozisyonu (Laktit/glikolid oranı), kristalinite ve zincirin geometrik düzeni polimerin mekanik gücünü etkilemektedir[14].

Retiküloendotelyal sistem (RES), opsonizasyon ve sonrasında makrofajlar tarafından fagositoz ile yabancı maddeleri yok ederler. Nanotaşıyıcılar RES'ten gizlenmeli ki görevlerini yerine getirebilsinler. İntravenöz olarak vücuda verilen nanopartiküller çoğunlukla karaciğerde ve dalakta bulunan makrofajlar tarafından alınmaktadır. Bu alım nanopartiküllerin boyutuna, yüzey yüküne ve yüzey hidrofobikliğine bağlı olarak değişmektedir. Hidrofilik yüzeyde ve 100 nm boyutundaki partiküller nispeten daha az opsonizasyona ve temizlemeye maruz kalırlar. Bu da nanopartiküllerin kandaki dolaşım süresini uzatır ve RES dışındaki dokulara ulaşmasına olanak tanır [14].

Nanopartikül taşıma sistemlerinde kanser ilaçları tümör bölgelerine pasif ya da aktif hedefleme ile ulaşır. Pasif hedefleme, nanopartikül boyutundan yararlanır ve gelişmiş geçirgenlik ve tutma (EPR) etkisi gibi tümör vaskülatürünün anatomik ve patofizyolojik anormalliklerinden yararlanır. EPR efekti nanoteknolojik taşıma sistemlerinde ilaç biyoyararlanımını ve verimliliğini artıran bir yaklaşımdır. Maeda ve arkadaşları EPR efekti ile tümör dokularına hedefleyen nanoboyutlu anti-kanser ilacı tasarlayan ilk gruptur. EPR etkisinin özellikleri arasında geniş anjiyogenez, kusurlu vasküler yapı ve tümörlerin bozulmuş lenfatik drenaj/kurtarma sistemi yer alır. Solid ve hızla büyüyen tümörler besin ve oksijen kaynağı açısından yetersizlerdir. Bu yüzden yüksek vasküler yoğunluktan kaynaklı geniş bir anjiyogeneze sahiptirler. Tümör kan damarlarının oluşumu kaotik ilerleme gösterir ve endotel hücre-hücre bağlantılarında büyük boşluklara sahip vasküler endotelin düzgün olmayan yapısından dolayı aşırı geçirgenliğe neden olur. EPR etkisi nanopartiküllerin tümöre daha seçici bir hedefleme için olanak sağlar[14]. EPR etkisinin farklı faktörlerle nasıl değiştiği tam olarak anlaşılamamış olsa da bazı faktörler oldukça önemlidir. Hidrofilik yüzeye sahip 200 nm'den küçük partiküller taşıyıcının kandaki kalış süresinin uzattığı görülmektedir. Ayrıca ilaç taşıyıcısının artan plazma yarı ömrü ve tümördeki birikimi nanopartikülde kullanılan polimerlerin molekül ağırlığı ile ilişkilidir. Renal eşiği üzerinde molekül ağırlığına sahip polimerik ilaçların yani 40 kDa'dan büyük olanların intravenöz enjeksiyonu takiben uzun süre tümörlerde biriktiği neredeyse kesindir[14]. EPR etkisi ile PLGA nanopartiküller itümörler pasif olarak hedeflenmektedir. Aktif olarak hedefleme için partiküller ligand-reseptör interaksiyonu kullanılır ve böylece efflux pumps'ın neden olduğu yavaşlatıcı etkisiyle ilaç direncini engellemesi sağlanır[15].

2.3.1. PLGA Nanopartiküllerinin Kanser Hücrelerine Alımı

PLGA nanopartiküllerinin tümör hücrelerine alımı 3 endositoz mekanizması ile tanımlanmaktadır. Bunlar;

- Reseptör aracılı endositoz
- Taşıyıcı aracılı endosiztoz
- Adsorpsiyon aracılı endositoz 'dur.

Partikül boyutu, şekli, yüzey yükü, hidrofilik/hidrofobik olması,polidispersite endeksi, elastikiyeti ve hücre türüne göre gerçekleşen endositoz yolu ve alımın verimliliği değişmektedir[15].

- Reseptör Aracılı Endositoz: PLGA nanopartiküllerinde bulunan hedefleme ajanlarının, tümör hücresinde eksprese edilen reseptöre karşılık gelen bölgeye spesifik bağlanması ile hücre alımı gerçekleşir. Bu reseptör aracılı endositoza örnek olarak biotin-biotin reseptör, HA-CD44 reseptör, Tf-Tf reseptörü verilebilir [15].
- 2. Taşıyıcı Aracılı Endositoz: Amino asitler, peptitler, monoaminler ve glukoz gibi hidrofilik moleküller hücreler için yapı taşları olarak, nörotransmitter ve enerji kaynağı olarak kullanılabilmektedirler. Genellikle seçici olarak tanınırlar ve hücre

zarında eksprese edilen taşıyıcı proteinlerle etkileşim yoluyla aktif olarak taşınırlar. Tümör hücreleri normal olmayan hızlı büyüme modellerinden kaynaklı yüksek enerjiye ve yapı taşlarına ihtiyaç duymaktadır ve böylece heksoz taşıyıcıları ve amino asit taşıyıcıları dahil olmak üzere bu taşıyıcı proteinleri aşırı eksprese eder. Bu yüzden glikoz tümör hedefli PLGA taşıyıcıları için hedefleme ajanı olarak kullanılabilmektedir[15].

3. Adsorpsiyon Aracılı Endositoz: Hücre membranı yüzeyi fizyolojik pH düzeyinde negatif yüke sahiptir. Katyonik yüke sahip nanopartiküller ile tümör hücre membranı yüzeyinde elektrostatik etkileşim gerçekleşir. Bu durum hücre membranının partikülü adsorplamasını arttırır. PLGA nanopartikül yüzeyi negatif yüzeye sahiptir, bu durum tümör hücrelerinin elektrostatik çekim ile nanopartikülü adsorplaması düşük penetrasyona sebebiyet verir. Kitosan gibi katyonik polimerlerle PLGA nanopartikülünün kaplanması adsorpsiyon aracılı endositoza bağlı olarak nanopartiküllerin tümör hücresine girişi kolaylaşır. Pozitif yüklü nanopartiküllerin gelişmiş opsonizasyon ve RES tarafından tanınması dolaşım süresini azaltabilmektedir. [15].

2.3.2. PLGA Degredasyonu

PLGA, içerisindeki laktik asit ve glikolik asit oranları belirtilerek tanımlanmaktadır. Örneğin; %50 laktik asit ve %50 glikolik asit içeren PLGA (50:50) olarak belirtilir [8]. PLGA'nın degredasyonu değişen laktik ve glikolik asit oranlarından etkilenmektedir. Degredasyon birkaç aydan birkaç yıla kadar uzatılabilmektedir. Laktik asit içerisindeki metil grupları glikolik aside oranla daha hidrofobik özellik göstermektedir. Bu yüzden suyu daha az absorbe eder ve laktik asidin oranının yüksek olduğu PLGA'lar daha yavaş degrede olmaktadırlar. PLGA'nın hidrolizine bağlı olarak katı formülasyonunun değişmez olarak kabul edilen tanımları zamana bana değişebilir. Bunlar; camsı geçiş sıcaklığı, nem miktarı ve molekül ağırlığıdır. Bu özelliklerin değişmesi degredasyon hızını değiştirmektedir. Bu da içerisine yüklenen ajanın degrede süresini etkilemektedir. Molekül ağırlığı, laktik-glikolik asit oranı, boyut, suya maruz kalma, depolama sıcaklığı, polidispersite indeksi (PDI) PLGA'nın fiziksel özelliklerini etkilemektedir. Bu özelliklere bağlı olarak PLGA'nın mekanik özelliklerini değişmektedir. Aynı zamanda bu özellikleri ilaç taşıma sisteminin formülasyonunu da etkiledikleri için formülasyonun değişmesi PLGA degredasyon hızını ve hidrolizini etkilemektedir. Kristal özellikteki poli-glikolik asit poli-laktik asit ile polimerizasyon gerçekleştirilmesi PLGA'nın kristalinite derecesi düşürür. Bu durum PLGA'nın hidrasyonunu ve hidroliz hızını arttırmaktadır. Kristalinite ve erime noktası polimerlerin molekül ağırlığını direkt etkilemektedir. PLGA'nın camsı geçiş sıcaklığı (Tg) 37°C'lik fizyolojik sıcaklığın üzerindedir. Bu yüzden PLGA camsı bir yapıya sahip ve dolayısıyla oldukça sert bir zincir yapısı göstermektedir. Laktik asit içeriğinin azalması Tg'nin azalmasına neden olur ve dolayısıyla moleküler ağırlığın azalmasına neden olmaktadır [16] [10].

2.3.2.1. Degredasyonu Etkileyen Faktörler

Kompozisyon: Polimerin monomer oranları yani kompozisyonu hidrofiliteyi belirleyen önemli bir faktördür. Bu durum taşıma matrisinin degredasyon hızına etki eder.

Kristalinite (Tg): Polimer kompozisyonu ayrıca camsı geçiş sıcaklığını ve kristaliniteyi etkiler ve indirekt olarak degredasyon hızını etkiler. Laktik asit kristalinitesi degredasyon hızını artırmaktadır çünkü hidrofilitenin artmasından dolayı yarı-kristalin polimer degredasyonu hızı artmaktadır. Buna karşın bazı araştırmacılar numunenin kristalinitesinin artması ile degredasyon hızının azaldığını öne sürmüştür.

Ortalama Moleküler Ağırlık: Molekül ağırlığı polimer zincir boyutu ile doğru orantılıdır. Yani polimer yüksek molekül ağırlığına sahip ise uzun polimer zincirine sahiptir. Yüksek molekül ağırlığına sahip polimerler genellikle daha düşük degredasyon hızına sahiptir. Bu da kısa zincir uzunluğundaki polimerlere oranla degredasyon için daha çok zamana ihtiyaç olmasına sebep olur.

İlaç Türü: İlacın varlığı degredasyon mekanizmasını kütle erozyondan yüzey degredasyonuna değiştirebilir Aynı zamanda matris degredasyonunun hızını etkiler. İlaç salım profili ve salım süresi ve tamamının salınma zamanı ilaca bağlı değişir. Ancak ilaç

kimyası (yoğunluğu tanımlayan OH grupları) ya da ilacın hidrofilitesi salım parametresi açısından güçlü bir bağlantıya sahip değildir. Ancak ilacın kimyasal özellikleri ilaç salım mekanizması açısından göz önüne alınmalıdır.

Matrisin Boyu ve Yüzeyi: Büyük ajanlarda degredasyonda yüzey alanı-hacim oranı önemli bir rol oynamaktadır. Yüksek yüzey alanı matrisi yüksek degredasyona neden olur. PLGA için kütle degredasyonu saf yüzey degredasyonundan daha hızlıdır bu da yüksek yüzey alanı-hacim oranının yüksek olması ilacın daha hızlı salınmasına neden olur.

pH etkisi: *in vitro* PLGA biyodegredasyonu/hidrolizi alkalin ve güçlü asit ortamlarının ikisinde de yüksek polimer degredasyonuna neden olmaktadır. Ancak düşük asidik ve nötr ortam arasındaki fark karboksilik uç gruplarının otokatalizinden dolayı daha düşüktür.

İlaç Yüklenmesi: İlaç taşınım matrisine yüklenen ilacın nanopartikülün salım hızında önemli rol oynamaktadır. Yüksek ilaç içeriği yüksek initial burst release'ına neden olur. Ancak ilaç tipine bağlı olarak belirli bir düzeye ulaştığında azalma gösterebilmektedir.

Toksikoloji: Birçok çalışma nanopartikül sistemlerindeki spesifik biyodağılımını ve toksikolojisini oldukça güvenli olduğunu göstermektedir [16].

2.3.3. PLGA İlaç Salım Davranışları

Çift Fazlı Salım (Biphasic Release)

PLGA hidrolizi ya da biyo-degredasyonu ana atom zincirindeki ester bağlarının oligomere dönmesi ve son olarak monomer haline gelmesi gerçekleşmektedir. Polimerin degredasyon prosesi matrisin kütle degredasyonu ile gerçekleşir. Matris içine suyun penetrasyonu ile olur ve bu penetrasyon hızı polimer degradasyon hızından daha hızlıdır. Ayrıca biyodegredasyon ile karboksilik uç gruplarının artması otokataliz süreci ile prosese katkı sağlar. Kütle ve yüzey difüsyonları, kütle ve yüzey erozyonlarının proseslerinin tamamı PLGA kopolimer degredasyonunu oluşturur. Çeşitli durumlar degredasyon prosesini etkiler, salım modeli tahmin edilemezdir. PLGA biyodegredasyon hızı laktik-glikolik asit oranı, polimer molekül ağırlığı, kristalinite derecesi ve camsı geçiş sıcaklığına bağlıdır. PLGA biyodegredasyonu çift fazlı eğri şeklinde gerçekleşmektedir;

- İlacın başlangıç ani salımı (burst release) ilaç tipine, konsantrasyonuna ve polimerin hidrofobikliğine bağlıdır. Yüzeydeki ilaç ortam ile karşılaştığında polimer matrisinin su ile penetrasyonu ve çözünürlüğe bağlı fonksiyonu olarak salım gerçekleşir. PLGA'nın rastgele bölünmesi molekül ağırlığını azaltır ancak kayda değer bir ağırlık kaybına ve çözünür monomerin kaybına yol açmaz.
- 2. İkinci fazda ilaç daha kalın tükenmiş bir tabakadan kademeli olarak salınır. Matris içerisindeki su polimeri hidrolize eder bu da çözünür oligomerik ve monomerik ürünler oluşturur. Bu durum polimer tamamen çözünene kadar ilacın difüzyon ve erozyon ile salınmasını sağlar. İlacın türü sulu fazın matrise girişinde önemli bir rol oynar.



Şekil 2.2. PLGA 50:50, 65:35, 75:25 ve 85:15 (laktik asit: glikolik asit) için in vivo salım profilleri modellenmiştir. Sıfırıncı derece kinetiğinden hızlı ilaç salımına geçen çift fazlı salım profili gösterilmiştir. Profiller ayrıca laktidin glikolide oranının azalmasıyla salım hızında artış gösterir. [16]

PLGA biyodegredasyonunda enzimlerin rolü belirsizdir. Birçok literatür PLGA biyodegredasyonun herhangi bir enzimatik aktivite içermediğini ve hidroliz ile gerçekleştiğini söyler. Ancak bazı araştırmacılar *in vitro* ve *in vivo* degredasyon hızı farkının PLGA bozunmasının enzimatik rolden kaynaklı olduğunu öne sürmüştür. PLGA polimeri laktik ve glikolik asite biyodegrede olur. Laktik asit trikarbolik asit döngüsüne girer ve metabolize edilir ve sonradan vücuttan karbon dioksit ve su olarak atılır. Glikolik asit böbrekten değişmeden atılır ya da trikarboksilik asit döngüsüne girer ve neticede karbondioksit ve su olarak atılır[16].

2.3.4. PLGA Nanopartiküllerinin Sentezlenmesinde Kullanılan Yöntemler

PLGA nanopartikülünü oluşturmak için çeşitli yöntemler bulunmaktadır ve hazırlanma prosesinin değişmesiyle nanopartikül yapısı da değişmektedir. İlaç çekirdek içerisine ya da matris yüzeyine adsorbe edilebilir. Çekirdek içerisine yüklenmesi nanokapsül ve ilacın matris yüzeyinde olması ise nanoküre olarak adlandırılır [10].

PLGA nanopartiküllerinin sentezlenmesi iki sınıfta toplanır. Bunlar; kütledennanoboyuta-kütleye (top-down) ve nanoboyuttan-malzemeye (bottom-up) teknikleridir.

Nanoboyuttan-malzemeye (bottom-up) tekniklerinde başlangıç noktasında monomer bulunmaktadır. Bunlar;

- Emülsiyon ya da mikroemülsiyon polimerizasyonları,
- İnterfasiyal polimerizasyonları
- Çöktürme polimerizasyon'dur.

Kütleden-nanoboyuta-kütleye (top-down) tekniklerinde ise önceden oluşturulmuş polimelerlerden nanopartiküller sentezlenirler. Bunlar;

- Emülsiyon buharlaştırılması
- Emülsiyon difüzyonu,
- Çözücü yer değiştirmesi,
- Tuzla çökelme, [17].

2.3.4.1. Emülsiyon Buharlaştırılması Yöntemi

Bu yöntem iki farklı başlık altında incelenmektedir. Tek emülsiyon su (s ile kısaltılmıştır) içerisinde yağ (y ile kısaltılmıştır) (y/s) ya da yağ içerisinde su (s/y) ve çift emülsiyon su içerisinde yağ içerisinde su şeklinde (s/y/s) ile aktif komponent farklı özelliklerde nanopartikül oluşturulmaktadır. Tek emülsiyon hidrofobik bileşikler, çift emülsiyon hidrofilik bileşenler için daha uygundur.

Bu yöntemin en önemli noktası emülsiyon damlacıklarının boyutunun sonuçta oluşan nanopartikül boyutunu etkilemesidir [17].

Avantajlar	Dezavantajlar	Avantaj/Dezavantaj
Toksisitesi yüksek	Yüksek kesme gerilimi	Aktif komponentin
olmayan çözücü	gereksiniminden dolayı	eklenmesi nanopartikülün
kullanılması (etil	yüksek enerji	son boyutunu etkilemektedir
asetat gibi)	kullanılmaktadır (sonikasyon	
	ya da mikroakışkanlaştırma)	
Katkı maddeleri		Çözücünün
nanopartiküllerin		buharlaştırılmasında enerji
boyut küçültülmesi		kullanımı çok olsa da çözücü
için kullanılmaktadır.		uzaklaştırılmasının süresi bu
		sayede azalmaktadır.
Hidrofilik ve		
hidrofobik aktif		
komponentler için		
uygundur.		

Çizelge 2.1. Emülsiyon buharlaştırma yöntemi avantaj ve dezavantajları. [17]

2.3.4.2. Tek Emülsiyon

Polimer içeren organik faz ve aktif komponenti içeren sulu faz emülsifiye edilir. Daha sonra organik çözücünün uzaklaştırılması için buharlaştırma yapılır. Yüzey aktif madde olarak PVA, SDS, Pluronic F68 sulu fazda kullanılabilir. Emülsion damlalarının boyutunun düşürülmesi için sonikasyon ya da mikroakışkanlaştırma yapılır. Buharlaştırma aşamasında organik çözücünün çözeltide bulunması boyut aralığını belirler.
Önemli parametreler;

- Polimer molekül ağırlığı ve konsantrasyonu,
- Ko-polymer oranı ve uç gruplar,
- Yüzey aktif maddenin yapısı,
- Faz oranları,
- Çözücü yapısı,
- Buharlaştırma hızı,
- İlaç yüklenmesi,
- Katkı maddeleri,
- Kesme gerilimi,
- Sterilleştirme [17].

2.3.4.3. Çift Emülsiyon

Yağ içerisinde su emülsiyon oluşturulması ilk adımdır. Sulu çözelti hidrofilik aktif komponenti içerir ve organik faz PLGA ve uygun yüzey aktif maddeyi (span 80, pluronic F68..) içerir. Miniemülsiyon güçlü kesme gerilimi (sonikasyon, mikroakışkanlaştırma, yüksek hızlı homojenizasyon) ile oluşturulur. Daha sonra su/yağ/su emülsiyonu sonikasyon ya da homojenizasyon ile damlacıkların boyut küçültülmesi ile oluşturulur. Bu ikinci boyut küçültme, harici sulu faza hidrofilik aktif bileşen difüzyonunu en aza indirmek için kontrol edilmelidir. Son adım olarak organik çözücünün uzaklaştırılması için buharlaştırma yapılır. Buharlaştırma polimer ve aktif komponentin zarar görmemesi için vakum altında yapılır ve bu nanopartikül boyutunu azaltmayı destekler[17].

Bu yöntemin ana dezavantajı büyük boyutlu partikül oluşması ve hidrofilik aktif komponentin sızmasından kaynaklı düşük ilaç yükleme verimliliğidir. Boyutu küçütebilmek adına ikinci güçlü shear rate uygulanır [17].

Önemli parametreler;

- Polimer/yüzey aktif madde oranı,
- Polimer konsantrasyonu,
- Yüzey aktif madde yapısı,
- Viskozite,
- Çözücü yapısı,
- Buharlaştırma,
- Katkı maddeleri ve
- Birinci/ikinci faz oranı.

Tek-emülsiyon prosesinde yağ/su (y/s) emülsifiye yöntemi ve çift-emülsiyon prosesinde su-yağ-su (s/y/s) tekniği ile nanopartiküller oluşturmaktadır. S/Y/S tekniğinde suda çözünür ilaçların yüklenmesi daha uygundur. Örneğin, peptitler, proteinler, aşılar. Y/S yönteminde suda çözünmeyen ilaçların yüklenmesinde kullanılır. Suda çözünmeyen durumuna örnekler ise, steroidlerdir. Y/S yönteminde polimer organik çözücülerde (DCM, Kloroform, etil asetat) çözdürülmektedir. İlaç hazırlanan bu çözeltisinde ilaç çözdürülmekte ya da disperse edilmektedir. Bu çözelti sulu çözelti içinde emülsifiye edilir ve yağ içerinse su oluşturulur. Y/S emülsiyonu yüzey etkin madde/emülsifiye edici kullanılarak oluşturulmaktadır. Stabil bir emülsiyon oluşturulması için organik çözücü sıcaklık, basınç ya da sürekli karıştırma altında buharlaştırılır. Bu aşamaların hepsinde yüksek hızlı homojenizasyon ya da sonikasyon kullanılır. Ancak bunlar laboratuvar ölçeği için uygun olsalar da büyük ölçekte pilot üretimlerinde düşük enerjili emulsifikasyon yöntemleri kullanılmaya ihtiyaç duyulmaktadır[10].

Nanopartiküllerin boyutları karıştırma hızı, tipi, disperse edici ajana, organik ve sulu fazın viskozitesine ve sıcaklığa bağlıdır[10].

2.3.4.4. Nanoçöktürme (Çözücü Difüzyonu ya da Çözücü Yer Değiştirmesi) Metodu

Bu yöntem tek basamaklı bir prosestir. Bu proseste üç temel komponent vardır. Bunlar polimer, polimer çözücüsü ve polimeri çözmeyen çözücüdür. Bu yöntem genellikle hidrofobik ilaç yüklenmesi için kullanılır ancak hidrofilik ilaçlar için de uygun olabilir. Polimer ve ilaç polar, su ile karışabilir solvent içerisinde çözdürülür. Çözelti için aseton, asetonitril, etanol, metanol kullanılabilir. Çözelti damla damla kontrollü bir şekilde yüzey aktif madde ile birlikle sulu çözeltiye eklenir. Nanopartiküller anında hızlı çözücü difüzyonu ile oluşmaktadırlar. Son olarak solvent uzaklaştırılmaktadır [10].

Önemli parametreler;

- Polimer/yüzey aktif madde oranı,
- Polimer konsantrasyonu,
- Yüzey aktif maddenin doğası ve konsantrasyonu,
- Çözücü doğası,
- Viskozite,
- Katkı maddeleri,
- Aktif bileşikler,
- Faz enjeksiyonu [17].

Çizelge 2.2.	Nanoçöktürme	yöntemi avanta	j ve dezavantajları	. [17]
, ,	,	-	5	

Avantajlar	Dezavantajlar
Düşük toksisiteye sahip çözücünün	Çözücülerin uzaklaştırılması
kullanılması	buharlaştırma yolu ile yapıldığından bu
	durum zaman kaybına neden olur
Yüksek enerji gerektiren karıştırma	Difüzyon sırasındaki kayıpları en aza
işlemlerine (sonikasyon ve	indirgemek için ilaçların aseton, etil
mikroakışkanlaştırma) ihtiyaç	asetat gibi polar çözücülerde çözünme
duyulmaması	gerekliliği
Nanopartiküllerin boyutlarının	Nanopartikül boyutu polimer
azaltılması için katkı maddelerinin	konsantrasyonun artması ile doğru
kullanılması	orantı olması

2.3.4.5. Tuzla Çökelme Yöntemi

Polimer organik fazda çözdürülür. Bu faz aseton, tetrahidroturan gibi su ile karışabilmektedirler. Organik faz sulu faza güçlü mekanik kesme gerilimi altında emülsifiye edilmektedirler. Sulu faz emülsiyonlaştırıcı ve yüksek konsantrasyonda tuza sahiptir ve organik fazda çözünmemektedir. Tuzlar genellikle polimer ile belirli bir oranda magnezyum klorür hekzahidrat veya magnezyum asetat tetrahidrat kullanılmaktadır [17]. Bu tuzlar organik ve sulu fazın karışmasını yavaşlatır [11]. Emülsiyon difüzyonu yöntemi ile karşılaştırıldığında tuzların varlığından dolayı çözücünün difüzyonu yoktur. Hafif karıştırma altında y/s emülsiyonuna suyun hızlı eklenmesi iyonik gücü azaltarak organik fazın sulu faza geçişini sağlar ve nanoküre oluşumunu arttırmaktadır. Son olarak tuzla çökelme ajanını uzaklaştırmak için çapraz akışlı filtrasyon ve ya da santrifüj yapılması ile saflaştırma gerçekleştirilir. Sıklıkla kullanılan saltıng out ajanları olarak seçilen maddeler sodyum klorür, magnezyum asetat veya magnezyum klorür gibi elektrolitler ya da sakaroz gibi elektrolit olmayan maddelerdir [17].

Bu yöntemde önemli olan parametreler;

- Polimer konsantrasyonu,
- Moleküler kütle,
- Karıştırma hızı ve zamanı,
- Yüzey aktif maddenin doğası ve konsantrasyonu,
- Çözücünün doğası ve konsantrasyonu
- Kriyoprotektanlardır [17].

Avantajlar	Dezavantajlar	Avantaj/Dezavantaj
Normal karıştırma	Saflaştırma aşamasında	Hidrofobik bileşikler için
kullanıldığı için enerji	tuzla çökelme ajanının	oldukça uygundur çünkü
kullanımı azalmaktadır.	giderilmesi en ana	tuzla çökelme ajanı suda
Yüksek kesme gerilimine	dezavantajdır. Çünkü	çözünebilmektedir.
ihtiyaç yoktur. (sonikasyon	Polimerin en az üç katı	
ya da	kadar tuzla çökelme	
mikroakışkanlaştırma)	ajanı kullanılmaktadır.	
Uzun sürmeyen bir		Toksisitesi yüksek
süreçtir.		olmayan ancak patlayıcı
		özellikteki çözücülerin
		kullanılması

Çizelge 2.3. Tuzla çökelme yöntemi avantaj ve dezavantajları. [17]

2.3.4.6. Emülsiyon Difüzyon Yöntemi

Polimer organik fazda (benzil alkol, propilen karbonat, etil asetat) çözdürülür. Bu faz suda karışabilmektedir. Organik faz karıştırma altında sulu faz (anyonik sodyum dodesil sülfat (SDS), iyonik olmayan polivinil alkol (PVA) veya katyonik didodesil dimetil amonyum bromür (DMAB)) ile emülsifiye edilir. organik çözücünün difüzyonu ve emülsiyon damlalarına karşı suyun difüzyonu nanopartiküllerin oluşmasında etkilidir[17].

Bu yöntemdeki önemli parametreler;

- PLGA kopolimer oranı,
- Polimer konsantrasyonu,
- Çözücü yapısı,
- Yüzey aktif madde polimer moleküler kütlesi,
- Viskozitesi,

- Faz oranları,
- Karıştırma hızı,
- Çözücü yapısı,
- Eklenen suyun sıcaklığı ve akışı[17].

Avantajlar	Dezavantajlar	Avantaj/Dezavantaj
Normal karıştırma kullanıldığı için enerji kullanımı düşüktür. Sonikasyon ya da mikroakışkanlaştırma kullanılmadığı için yüksek kesme gerilimine ihtiyaç yoktur.	Boyut küçültmede kesme gerilimi kullanılmadığından polimer konsantrasyonuna karşı proses oldukça hassastır.	Hidrofobik bileşenler için uygundur.
Toksisitesi yüksek olmayan çözücülerin kullanılması	Emülsiyonun karışması için uzun süre gerekmektedir.	Hidrofilik bileşenler, polar çözücünün sulu faza difüzyonundan dolayı yüksek bir migrasyon eğilimine sahiptir ve bu nedenle, ilaç yükleme etkinliği düşüktür
	Nanopartikül oluşumu için yüksek miktarlarda su kullanılmaktadır.	

Çizelge 2.4. Emülsiyon difüzyon yöntemi avantaj ve dezavantajları. [17]

2.4. PLGA Nanopartiküllerinin İlaç Salım Sistemlerinde Kullanımı

$C_{-1} - 1 - 2 $		NTDI1		1.4	
\mathbf{I} 17 \mathbf{I} \mathbf{I}	ΡΙΙΤΑ	NPIeri	1C1n	Interation	OZett
VILUIGO L.J.	LON	INI IOII	IVIII	moratur	ozen.
, .			,		

Referans	ere [18]	[19]	ur. [20]	e [21]	iser [22] .UR 3u tir.
Sonuç	Tümörün ortadan kaldırılması ardından metastaz yapan tümörl karşı güçlü bir immünolojik hafiza etkisi oluşturulmuştur.	Güçlü CD8+ T hücre bağışıklık tepkilerine neden olmuştur.	NP indüklenen güçlü anti-tümör bağışıklık tepkisi oluşturmuşt	Bu formülasyon, andrographolide'in 48 saat boyunca sürekli salındığını göstermiştir ve bir metastatik meme kanseri hücre hattında serbest ilaca kıyasla önemli ölçüde daha yüksek in vit antikanser etkinliği göstermiştir.	 Kapsüllenmiş KUR, nanopartikülleri serbest KUR' a göre kan hücreleri tarafından daha iyi alım sergilemiştir. Ayrca serbest K ile karşılaştırıldığında hücre proliferasyonu ve klonojenik analizlerde gelişmiş bir anti-kanser potansiyeli göstermiştir. B formülasyonu indüklenen gelişmiş apoptoz ile ilişkilendirilmiş
Kanser/Tümör Türü	Meme Kanseri	CD8+ T-hücresi	TC-1 tumor	Meme Kanseri	A2780CP yumurtalık ve metastatik MDA-MB-231 mem kanseri hücrelerinde
NP içerisine Yüklenen İlaç	Fototermal ajan olan İndosiyanin yeşili (ICG) ve Toll benzeri reseptör- 7 agonisti olan imikuimod (R837)	Sıtma ve antiromatizmal bir ilaç olan Hidroksiklorokin ve antijen grubu Ovalbümin	Antijenik peptit HPV16 E744-62' önemli hücre içi bileşenlerden biri olan adenozin trifosfat	Andrographolide	Kurkumin (KUR)

NP içerisine Yüklenen İlaç	Kanser/Tümör Türü	Sonuç	Referans
Trapoksin A ve metotreksat ilaçları ve ayrıca PEGlasyon yapılmıştır.	MCF-7 meme kanseri hücrelerine	PLGA içerisine ikili ilaç yüklenmesi tekli ilaç yüklü NP'lere oranla siklin Di ve Bcl-2 ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde değişmiştir. Sinerjistik antikanser etkileri ve mitokondriyal apoptoz gözlenmiştir. Böylece meme kanseri hücrelerinde formülasyon antikanser etkisi gözlenmiştir.	[23]
Çift sarmallı (ds)RNA adjuvanı olan Riboxxim	CD8+T cell	in vivo olarak güçlü antitümör immün tepkilerini indükler.	[24]
Kurkumin (KUR)	A2780CP yumurtalık ve metastatik MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde	Kapsüllenmiş KUR, nanopartikülleri serbest KUR'a göre kanser hücreleri tarafından daha iyi alım sergilemiştir. Ayrca serbest KUR ile karşılaştırıldığında hücre proliferasyonu ve klonojenik analizlerde gelişmiş bir anti-kanser potansiyeli göstermiştir. Bu formülasyonu indüklenen gelişmiş apoptoz ile ilişkilendirilmiştir.	[22]
Soksorubisin ve nifuratel	Mide kanseri	Formülasyonda Mitokondriyal bağımlı apoptozu önemli ölçüde indüklenerek ve STAT3 fosforilasyonunu inhibe edilmesiyle antikanser etkisi artmıştır.	[25]
Narinfenin	Pankreas kanseri	Serbest narinfenin ilacına göre NP formülasyonu iyileştirilmiş antikanser sağlamıştır.	[26]

2.5.Kitosan Nanopartikülleri ile İlgili Genel Bilgiler

Kitosan kitinin deasetilasyonundan üretilen doğada ikinci en çok bulunan polisakkarittir Glukozamin ve N-asetil-glukozaminden meydana gelmektedir. Tekrar eden glukozidik kalıntı içerisindeki birincil amino grubuna sahip olmasından dolayı kitosan pozitif yüke sahip doğal bir polisakkarittir. Nötr pH'daki suda çözünmemektedir. Ancak düşük pH'da suda çözünür bir katyonik polielektrolit haline gelir. Kitosanın çözünebilirliği deasetilasyon derecesine bağlıdır. Ve düşük deasetilasyon derecesi çözünmeyi ve viskoziteyi arttırmaktadır. Moleküler ağırlık çözünmeyi ve diğer özellikleri de etkilemektedir. Viskozite kitosan konsantrasyonunun artmasıyla artmaktadır.



Şekil 2.3. Kitosan'ın kimyasal yapısı, D:N-acetilglukozamin birimi A:Glukozamin birimi [27].

Kitosan toksik olmayan ve biyouyumlu bir polimerdir. Kitosanın toksisitesini etkileyen ana parametre deasetilasyon derecesidir (DD). Düşük DD *in vitro*'da düşük toksisiteye neden olmaktadır. Ayrıca DD ile degredasyon doğru orantılıdır. Fareler üzerinde yapılan *in vivo* degredasyon testinin sonuçları 14 saatte kitosanın idrarla atıldığını ve birikmeye neden olmadığını göstermiştir [28].

Kitosan düşük üretim maliyetine sahip olması, biyolojik olarak parçalanabilir ve biyouyumluluğundan dolayı 1990'lardan beri ilaç sistemlerinde sıklıkla tercih edilmektedir. Birincil amino gruplarına sahip olmasından kaynaklı katyonik özellikte olmasından ilaç taşıma sistemlerinde özellikle tercih edilmektedir ve hidrofobik polimerlere kolaylıkla konjuge olurlar. Kitosanın iyonik çapraz bağlanma formu sayesinde stabil kompleksler oluşturarak ilaç salımının daha uzun periyotlarda gerçekleşmesini sağlar [28, 29].

Kitosanın C-2 pozisyonunda bulunan amino grubu fonksiyonel ve yapısal özelliklerini güçlendirmektedir. Bu özellik mukoadezitideyi kazandırarak kitosanın katyonik yapıda olmasını sağlamaktadır. Mukoza membranı musin glikoproteininden oluşur ve anyonik özellliğini sialik asit ve sülfonik asit formlarından alır. Kitosandaki katyonik grubun ve bu anyonik asitlerin iyonik etkileşimleri sayesinde mukoadezyon özelliği sağlanmaktadır. Mukoadezyon, deasetilasyon derecesinin ve moleküler ağırlığın artmasıyla artar ve çapraz bağlanmanın artması ile azalır. Kitosanın pozitif yükü mukozal hücrelerdeki geçişi destekleyerek ilaç geçirgenliğine destek olur [29].

Bir maddenin biyouyumlu olması maddenin biyolojik dokular için toksik ve immünojenik olmadığını bir göstergesidir. Kitosan insan vücudunun dış matrisindeki glikozaminoglikanlara fonksiyonel ve yapısal benzerliği nedeniyle oldukça iyi bir biyouyumlu malzemedir. Yapısındaki glikosidik bağın parçalanması sayesinde *in vivo* lizozim, kitinazlar ve kolonda yaşayan bakteriler tarafından kolayca parçalanır [29].

2.5.1. Kitosan Nanopartiküllerinin Biyolojik Sıvılarda İlaç Salımı

Kitosan üç mekanizma ile ilaç salımı gerçekleştirir;

1. Polimer Erozyonu/Degredasyonu

Polimerin tamamının degredasyonu ile homojen erozyon ve çekirdekten yüzeye doğru olan heterojen erozyon olarak iki yol ile meydana gelir. Polimer degredasyonu yüzeyde ya da enzimlerin varlığı ile kimyasal olarak olur. Biodegredable polimerler kovalent bağların arasındaki boşluklara bağlı açılır ve biyolojik olarak aşınabilir polimerleri molekülün kimyasal yapısında herhangi bir değişiklik olmadan kovalent bağların açılması ile degrede olur.

2. Difüzyon

İlaç polimerik yapının çekirdeğinden ortama nüfuz eder. İlaç matristen hücresel membrana doğru ve membran boyunca olan konsantrasyon farkına bağlı olarak difüze olur. Bu mekanizma Fick's yasası ile açıklanır.

3. Polimer şişmesi

Polimerin çözünene kadar ve polimer zinciri açılana kadar polimerin içine suyun girmesi ve hidrasyona bağlıdır. Bu zincirin açılması ilacın polimer matrisinden salınmasına izin veren bir kuvvet yaratmaktadır. Bu mekanizmayı polimer çözünmesi, polimer şişme derecesi, polimer zincirinin yoğunluğu, ilaç ve polimerin interaksiyonu, partikül boyutu ve ilaç polimer oranı etkilemektedir. Polimer nanotaşıyıcısına ilaç yüklenmesinin en önemli kriteri, ne kadar çok ilaç yüklenirse daha yüksek patlama etkisi meydana gelir ve daha hızlı salım gerçekleşir. Kitosan nanopartiküllerinin mide-bağırsak sisteminin ya da kanserli dokuların pH'ı gibi biyolojik durumlara karşı yanıt vererek ilacın daha etkili bir şekilde salınmasına yardımcı olur. Çünkü kitosan nanopartiküllerini biyolojik durumlara karşı protonlanabilmektedirler [29].

Kitosan nanopartiküllerinin biyolojik aktiviteleri, teapötik etkilerini ve biyouyumluluğunu etkileyen faktörler partiküllerin boyutu, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli, yüzey yükü ve şekilleridir. Yükleme kapasiteleri ve enkapsülasyon verimi ilaç taşıma kapasitesini ve ilaca bağlı toksisiteyi düzenler. Bunlar ise nanopartikülün oluşturulma yöntemine bağlıdır. Seçilecek yöntem son ürünün ihtiyaçlarına (boyut, şekil PDI, stabilite, salım kinetiği ve toksisite) göre belirlenmelidir [29].

Kitosanın fizikokimyasal karakteristiği (kristalinite, çözünme ve degredasyon) kitinin proses parametrelerine ve seçilen üretim yönteminden doğan molekül ağırlığı, deasetilasyon derecesi ile değişmektedir. Deastilasyonun artması kristaliniteyi arttırır ve pozitif yük yoğunluğunu arttırır bu da çözünmeyi arttırır. Ayrıca pozitif yükün artması negatif yüklü mukus membran içindeki müsinin interaksiyonunu arttırır bu da mukoadhesif özelliği arttırır [29].

NP içerisine Yüklenen İlaç	Kanser/Tümör Türü	Sonuç	Referans
Kurkumin	Meme kanseri (L929 ve MCF7 hücre hatları)	Kanserli hücreleri hedeflemeye yarayan nanotaşıyıcı yapılması	[30]
Piperin, L.plantarum, L.rhamnosus	Serviks Kanseri (HeLa hücre hattı)	L.rhamnosus umut verici anti-kanser ajanı olarak kabul edilmiştir.	[31]
Kamptotesin	Akciğer Kanseri (A549 WT ve A549-DDP hücreleri)	Belirgin anti-tümör etkileri ve yüksek tümör hedefleme yeteneği gösterilmiştir.	[32]
Dosetaksel-folik asit ve Setuksimab hedefleme ajanları	Akciğer Kanseri (A-549 kanser hücreleri)	Kitosan nanopartiküllerin iyileştirilmiş hali dosetakselin daha uzun sirkülasyon ve sürekli salımına neden olmuştur.	[33]
İzolongifolen	Kanser	Plazma ile uyumlu olduğu ve sabit bir salım paterni sergilediklenmiştir. Kitosan yüklü nanoparçacıklar, katı tümörlerde çoklu ilaç direnciyle mücadele etmek için kanser tedavisinde mükemmel bir adjuvan olarak kullamlabileceği kanıtlanmıştır.	[34]

2.6. Kitosan Nanopartiküllerinin İlaç Salım Sistemlerinde Kullanımı

Çizelge 2.6. Kitosan NP için literatür özeti.

Referans	[35]	[36]	[37]	[38]	[39]
Sonuç	AA, OX veya AA ve OX'u yüklenmiş PEG'lenmiş kitosan nanoparçacıkları, MCF-7 hücrelerinde apoptozun indüklenmesi için etkili bir formül oluşturulmuştur.	Folatla modifiye edilmiş kitosan nanoparçacıkları, tümör hücrelerinin hedeflenmesini geliştirmek için potansiyel bir yol sağlamıştır.	Mitokondriyal metabolizmayı hedefleyerek ve intrinsik apoptotik yolu indükleyerek invaziv meme kanseri hücre proliferasyonunu baskılamakta verimli bir formülasyon sentezlenmiştir.	NP pH'a duyarlı kontrollü salım özellikleri ve doza bağlı sitotoksisitesi ve NP'nin antitümör etkisi gösterilmiştir.	Serum VEGFR2 ve akciğer HIF 1 gen ekspresyonu seviyelerini düşürerek tümör anjiyogenezini inhibe etmiştir.
Kanser/tümör türü	Meme kanseri (MCF-7 hücreleri)	Kolon kanseri	Meme kanseri	Prostat Kanseri (PC-3 hücreleri)	Akciğer kanseri
Np içerisine yüklenen ilaç/lar	PEG'lenmiş Askorbik asit (AA) ve Oksaliplatin (OX)	Folik Asit ile kaplanmış 5- Fluorourasil	Resveratrol	Telmisartan yüklü Fe304 Manyetik NP'lere	Berberin

2.7. PLGA-Kitosan Nanopartikülleri Hakkında Genel Bilgi

Nanopartiküllerin yüzey yükleri hücrelerle etkileşimi ve hücre içine alımları üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Pozitif yüke sahip yüzeyler hücrelerle etkileşimi arttırır bu da hızı ve alımı arttırır. PLGA negatif yüke sahip bir nanopartiküldür ve nötr ya da pozitif yüke çevirmek için PLGA polimerleri PEG ya da kitosan ile kaplanabilir [10, 12].

PLGA monomerlerinin asidik doğası ilaçlar ya da biyoaktif moleküller için uygun değildir. Ancak PLGA'nın aljinat, kitosan, pektin, poli(propilenfumarat), polivinilalkol gibi maddelerle karıştırılması bu sorunu ortadan kaldırır [13].

2.8. PLGA-Kitosan Nanopartiküllerine Çeşitli Kanser İlaçları Yüklenmesine Yönelik Literatür Özeti

Referans	[40]	[41]	[42]	[43]	[44]
Sonuç	NP formülasyonu ilaç çözeltisine göre daha yüksek apoptoza neden olmuştur. Ayrıca güvenlidir ve yan etki görülmemiştir.	NP [*] nin ilacı kanser hücrelerine etkili bir biçimde ilettiği gösterilmiştir.	pH:5.5' de daha hızlı ilaç salım gerçekleşmiştir, Yüksek sitotoksik etkiye neden olmuştur bu yüzden NP' nin uygun bir antitümör ilaç taşıyıcısı olduğu kanıtlanmıştır.	Serbest ilaca kıyasla antiproliferatif etki NP'de artmıştır ve üstün farmakokinetik özellik göstermiştir.	NP ilacın çözünebilirliği, enkapsülasyonu, serbest bırakma, stabilitesini ve terapötik etkisini arttırmıştır.
Kanser/tümör türü	Akciğer Kanseri (H1299 hücreleri)	Akciğer Kanseri (A549 hücre hattı)	MDA-MB-231 Hücre hattı	Kolanjiokarsinoma (HuCCT1ve CL6)	H1299 Akciğer Kanseri
Np içerisine yüklenen ilaç/lar	Kateşin Hidrat	Brigatinib	Paksitaksel	Atraktilodin	Resveratrol

Çizelge 2.7. Kitosan kaplı PLGA NP için literatür özeti.

Np içerisine yüklenen ilac/lar	Kanser/tümör türü	Sonuç	Referans
Albendazol	Kanser	NP ile antikanser etkisi artmıştır.	[45]
Paklitaksel ve Lapatinib	HER2pozitif Meme Kanseri	Serbest ilaçlar ve ilaçların kombinasyonuna göre NP sitotoksik etkiyi arttırmıştır.	[46]
Itrakonazol	H1299 Akciğer Kanseri	Itrakonazol çözeltisine göre NP'nin sitotoksitesi, kanser hücrelerindeki apoptoz daha fazla olduğu gösterilmiştir.	[47]
Artesunat	MCF-7 ve A459 kanser hücreleri	Kitosan kaplı NP, kaplanmamış NP' lere kıyasla hücre içi alım, <i>in vitro</i> sitotoksisite ve apoptoz davranışlarını arttırmıştır.	[48]
Gefitinib	Akciğer Kanseri	Kitosan kaplı NP, PLGA NP'ye göre daha uzun salım gerçekleştirmiştir. Sitotoksisiteleri de gösterilmiştir ve bu NP etkili taşıyıcı olabildiği kanıtlanmıştır.	[49]

2.9. Piperin Hakkında Genel Bilgi, Çeşitli Kanserleri Tedavi Etmede Kullanıldığı Mekanizmalar ve Yolaklar

Piperin karabiberden (*Piper nigrum*)'dan ilk olarak 1819 yılında Hans Christian Orsted tarafından ekstrate edilmiştir [50]. Karabiber *Piperaceace* ailesine aittir. Piperin kimyasal olarak *Piperaceace* ailesinin birçok üyesinden elde edilebilen bir azotlu alkaloiddir. *Piperaceace* ailesinin üyeleri, *Piper Nigrum, Piper longum, Piper chaba, Piper guineense* ve *Piper sarmentosum* 'dur [51].

Piperin'in kimyasal formülü C₁₇H₁₉NO₃ ve IUPAC adı 1-(5- [1,3-benzodioxol-5-yl]-1oxo-2,4-pentadienly) piperidine'dir. Moleküler ağırlığı 285.34 g/mol ve erime noktası 130°C'dir. Piperin'in 4 adet geometerik izomeri bulunmaktadır. Bunlar, izokavisin (trans-cis izomer), izopiperin (cis-trans izomer) ve izopiperin (cis-trans izomer) ve piperin (trans-trans izomer) yapılarıdır. Bu dört izomerin trans-trans izomer olan harici diğerlerinin farmakolojik etkisi bulunmamaktadır[52].



Şekil 2.4. Piperin'in kimyasal yapısı. [52]

Piperin suda oldukça az çözünebilmektedir. Çözünme koşulları 40 mg/L, 18°C 'dir. Yani hidrofobik yapıya sahiptir. Bu da absorpsiyon proseslerinde ve yüksek konsantrasyonlarda farmakolojik ve klinik çalışmalarda engel oluşturabilir. Bu engel sinir sisteminde toksisite durumu olarak geri dönüş sağlayabilir. Bu limitasyonları engellemek

adına çeşitli ilaç sistemleri geliştirilmektedir. Bu sistemlere örnekler ise nanopartiküller, nanolipozomlar ve misellerdir [52].

Piperin, kolorimetrik yöntemler, gaz kromatografisi (GC), ultraviyole spektrofotometri (UV), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve Kjeldahl metodu ile tayin edilebilir [52].

Piperin'in genel özellikleri aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Piperin'in faydaları. [50-52]

2.9.1. Piperin'in Kemoprotektif İlaç Olarak Kullanılmasının Nedenleri

Çeşitli metabolize edici enzimleri inhibe etmektedir. Bu durum ilaçların, besinlerin ve ilaçların oral biyoyararlanımını arttırır [51].

Piperin biyotransformatif etkilere sahip olup rifampisin, sulfadiazine tetracyline ve phenytoin gibi farklı ilaçların metabolizmasını yavaşlatarak emilimlerini arttırır. Kanser hastalarının radyoterapi tedavilerinden önce uygulanarak radyasyona karşı koruyucu olarak kullanabileceği gösterilmiştir[53].

Piperinin antioksidan etkisi karaciğer koruyucu etkiye neden olur. Karabiber ve ana biyoaktif bileşiği olan piperin, karaciğerdeki biyotransformasyon enzimlerinin aktivitesini doza bağlı bir şekilde arttırır ve böylece kemoprotektif bir rol oynar [53].

Bitkisel bileşenlerin %40'ından fazlası suda çözünmemektedir. Piperin lipid ailesindendir. Lipid/su partition katsayısı 17.33 (logP = 2.25)'dır ve suda çok az çözünür. Piperinin terapötik etkilerine karşın sudaki düşük çözünürlüğü ve zayıf çözünürlüğü klinik verimliliği düşürmektedir. Sudaki düşük çözünürlüğü, absorpsiyon prosesindeki hız belirleyici adım olması laboratuvardan klinik çalışmalara geçmesi karşısında engel oluşturmaktadır. Bu engelleri aşabilmek adına piperinin farklı formülasyonları denenmektedir[53].

2.9.2. Piperin'in Kemoprotektif İlaç Özelliği Gösterdiği Mekanizmalar

Hücre çoğalması, doku bütünlüğünün sağlanması hücre döngüleri ile sağlanmaktadır. Piperin kanser hücrelerinin döngülerindeki siklinleri sikline bağımlı kinazlar(CDK'ler) ve CDK inhibitörleri (CKI'ler) dahil olmak üzere spesifik proteinler ve kinazlar tarafından iyi tanımlanmış kontrol noktalarının ilgili kısımlarını kontrol etme yeteneği göstererek kemopreventif özelliği göstermektedirler.

Otofaji hücresel strese neden olan sebeplere karşılık olarak enerji kaynağı dengesini sağlamak üzere kendi kendini parçalayan bir süreçtir ve bu stresleri aşarak hücrenin hayatta kalmasını sağlayan bir prosestir. Sağlıklı hücrelerde olduğu gibi kanserli hücrelerde de mikroçevre koşulları da dahil olmak üzere stres önkoşulları önemlidir. Fitokimyasal ve doğal bileşikler de kimyasal ilaçlar gibi otofajinin tümör hücrelerini yok etmesindeki rolü çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır.

Anjiyogenez, önceden var olan damar sisteminden yeni kan damarlarının büyümesidir. Tümöre oksijen ve besin sağlayarak, metastatik yayılıma da neden olur. Piperin de *in vitro* ve *in vivo* olarak anjiyogenezin birçok yönüne müdahale eder. Böylece tümöre giden oksijen ve besin kaynağını engellenmektedir.

Kanser kök hücreleri kanser hücrelerinin alt kümeleri olarak pro-metastatik fenotipe sahiplerdir. Normal kök hücreler gibi kendini yenileme ve farklılaşma yetenekleri vardır. Ayrıca kemoterapi ve radyoterapiye karşı direnç gösterme özelliklerine sahiptir. Piperin kurkumin ile ortak formülasyonda meme kanser kök hücrelerinde WNt/betakatenin sinyal yolunu inhibe ederek mammospheres oluşumunu engelleyerek kendi kendini yenileme yeteneklerini engeller.

Kanser tedavisinde çoklu ilaç direnci gelişmesi tedavinin başarılı olmasını engellemektedir. Piperin, ATP bağlanma bölgesiyle rekabet ederek P-gp'ye bağımlı ilaç direncini baskılayabilmekte ya da down-regüle olarak etkileyebilmektedir[54]. Katiyar ve ark. yaptıkları çalışmada rapamisin ve piperin ilaçlarını PLGA içerisine yükleyerek meme kanseri tedavisinde kullanılması için bir tasarım yapmışlardır ve *in vitro* olarak salım çalışmaları gerçekleştirerek bu tasarımı denemişlerdir. MDR1 geni tarafından kodlanan P-glikoprotein (P-gp)'nin aşırı ekspresyonu, kanser tedavisinde önemli bir engeldir. İlaç geri pompalandığından, P-gp akışı, düşük oral biyoyararlanıma ilişkilendirilmektedir. P-gp akışının engellenmesi kanser hücrelerindeki ilaç birikiminin artmasına neden olmaktadır. Böylece rapamisin ilacının kanser üzerindeki tedavi etkinliği artmaktadır. Bu tasarımdaki piperinin varlığı ile bağırsak geçirgenliğini arttırması ve antikanser özelliğinde olması bu tasarımı avantajını ortaya koymuştur [55].

Hayvan modellerinde piperin metabolizmasının çalışılmasında oral yollardan piperinin hızla ve neredeyse tamamının absorbe edildiği saptanmıştır. Emilmeyen piperinin sadece %3'ü dışkı ile atılmıştır. Piperinin emilim sırasında herhangi bir metabolik değişikliğe uğramayarak metabolitleri idrar ile atarken karaciğer tarafından hızla metabolize edilmektedir. Piperinin ilaç metabolizmasında yer alan çeşitli enzimlerle etkileşime girebildiği ve oksidatif fosforilasyon gibi metabolik yolları ve süreçleri etkileyebildiği gösterilmiştir. Böylece ilaç metabolizmasını ve biyobozunmanın yavaşlaması ile farmakolojik durumlarda piperin rahatlıkla kullanılabilmektedir [54].

2.10. EGCG Hakkında Genel Bilgi, Çeşitli Kanserleri Tedavi Etmede Kullanıldığı Mekanizmalar ve Yolaklar

Camellia sinensis bitkisi yani çay dünyada en çok tüketilen içeceklerindendir [56]. Yeşil çay farklı kimyasal bileşiklerden oluşmaktadır. Bunlar amino asitler, vitaminler, inorganik elementler, karbohidratlar, lipitler, kafein ve çay polifenollerdir. Polifenoller yeşil çayın kuru ağırlığının yaklaşık %30'udur ve sağlık için yararlı kısmın ana bileşenidir. Polifenollerin ana grubu kateşinlerdir. Kateşinler yeşil çay polifenollerindeki biyoaktif içeriğinin büyük bir kısmını oluşturur ve pahalı olmayan, kolay uygulanabilir güvenli fitokimyasallardır. Kateşinler farklı moleküllerden oluşur. Bunlar ve kimyasal yapıları aşağıda gösterilmektedir. [6, 57]



Şekil 2.6. (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin-3-gallate (ECG), and (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) kimyasal yapısı [6]

4 ana yeşil çay kateşini (–)-epicatechin (EC), (–)-epigallocatechin (EGC), (–)epicatechin-3-gallate (ECG), and (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG)'dir. [57] Ve EGCG en bol bulunan ve biyolojik olan aktif olan bileşendir. EGCG yeşil çay içerisindeki kateşin miktarının yaklaşık %50-%80'i olarak kateşinin büyük bölümünü oluşturmaktadır. [6]

EGCG'nin yeşil çaydan pahalı olmayan bir şekilde elde edilmesi, oral yollarla kullanılabilmesi ve kabul edilebilir güvenli bir profile sahip olması oldukça avantaj sağlamaktadır. Hayvan çalışmalarında *in vitro* ve *in vivo* olarak kemopreventif ve kemoterapötik özellikleri çeşitli çalışmalarda kanıtlanmıştır. [6]

EGCG Anti-kanser potansiyeli olmasına rağmen, düşük yarı-ömür, düşük stabilite ve düşük biyoyararlanım durumlarından dolayı klinik çalışmalarda kullanımını limitli olmaktadır. [6]



Şekil 2.7. EGCG'nin yararları. [6]

2.10.1. EGCG 'nin Kanser Önleyici Mekanizmaları

Kateşinler metal iyonlarını, özellikle bakır iyonlarını şelatlayabilmektedirler. Kanser hücrelerinde bakır düzeyi büyük ölçüde yükselmektedir. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada lenfositlerdeki bakır seviyesinin EGCG tedavisinde azaldığı gösterilmiştir. [56]

Enflamasyon kanserin gelişmesi ve ilerlemesinin hayati bir işaretidir ve artan inflamatuar mediatörler, kanserli hastalarda kötü prognoz ile ilişkilidir. Çeşitli çalışmalarda EGCG'nin anti-inflamatuar potensiyele sahip olması ve pro-inflamatuar sitokin aktivitsini inhibe ettiği gösterilmiştir.

Reaktif oksijen türleri asıl olarak yan ürün olarak üretilmektedir. Zararlı etkiye sahiptiler ve çeşitli hastalıkların patogenezine yol açarlar. ROS üretimi ve antioksidan dengesi oldukça önemli ve homeostaz için gereklidir. Reaktif oksijen türlerinin nötralize edilmesi ya da uzaklaştırılması patogenez inhibisyonunda önemli bir basamaktır. Antioksidan enzimler bu durumda önemli bir rol oynamaktadırlar. Doğal ürünlerin bu konudaki yeteneği oldukça önemlidir. EGCG bilinen bir antioksidandır ve ROS gibi çoğu serbest radikali temizlemektedir.

Kanser büyümek için her zaman bir kan kaynağına ihtiyaç duyar ve anjiyogenezden yoksun bırakıldığında kanser uykuda kalabilmektedir. Anjiyogenez sürecinin inhibisyonu, kanser tedavi stratejilerinde güç olarak kabul edilmektedir. Anjiyogenez, birçok hastalığın patogenezinde ciddi bir rol oynamaktadır. Anjiyogenez damarların tomurcuklanma ile yeni damarların oluşması anlamına gelmektedir. Kanser yayılmak için kan kaynağına ihtiyaç duymaktadır. Anjiyonegenezden yoksun bırakıldığında kanser uykuda kalabilmektedir. Tedavi aşamasında anjiyogenezin engellenmesi engel teşkil etmektedir. Bu engeli aşmak için fitokimyasal olan EGCG inhibisyon veya kontrolsüz anjiyogenez sürecinde dinamik rol oynamaktadır.

Apoptoz, kontrollü hücre ölümüdür ve hasarlı hücrelerin uzaklaştırılmasını içermektedir. EGCG proliferasyon inhibisyonunda önemli rol oynamaktadır. Kanser hücrelerindeki apoptozu desteklemektedir.

Kanserin gelişmesinde kontrolsüz hücre döngüsü önemli rol oynamaktadır. Hücre döngüsü ve apoptozu kontrol eden birkaç hücresel sinyal yolunun eşzamanlı etkisi, kanser hücresi proliferasyonunu ve bir tümörün büyümesini ve ilerlemesini kontrol etmek için önemli bir durumdur. EGCG hücre döngüsünün durmasının indüklenmesiyle anti-tümör etkisi göstermektedir.

Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon 3 Aktivatörün (STAT3), kanser hücrelerinde hücrenin hayatta kalmasını, çoğalmasını, hareketliliğini ve ilerlemesini sağlayan bir onkogen türüdür. EGCG, ün (STAT3) aktivitesini inhibe ederek kanserin önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. [58]

2.11. Piperin ve EGCG'nin Çeşitli Kanserleri Tedavi Etmede Birlikte Kullanılmasının Olumlu Yönleri ve Beklenen Sinerjistik Etki

Biyo-arttırıcılar ilaçların etkili olmalarına yardımcı olurlar ilaçlarla ve kombinasyonlarında ilaç moleküllerinin aktivitelerini farklı yollarla (membran boyunca ilacın biyoyararlanımını arttırabilirler ya da ilaç reseptörü olarak işlev görerek) destekleyerek ilaçların daha etkili olmalarına yardımcı olurlar. Piperin de birçok ilaç için biyo-arttırıcı olarak görev alabilir. Piperinin bağırsak bariyerinden emilimi oldukça hızlıdır. Çalışmalar piperinin pasif bir difüzyon mekanizmasına sahip olduğu, yüksek görünür geçirgenlik katsayısına ve kısa temizleme süresine sahip olduğunu göstermiştir. Piperinin nonpolar doğasından kaynaklı olarak lipitler ve proteinlerin hidrofobik bölümleri sayesinde membran dinamiklerini düzenlerler. Piperin, ince bağırsağın emici yüzeyini artıran hücre iskeleti işleviyle ilgili proteinlerin kombinasyonunda indüksiyon ile membran dinamikleri ve geçirgenlik özelliklerinde değişikliklere neden olabileceğinden, epitelyal bariyerden geçişi artırabilir [53].

Piperin ayrıca bitkisel ve konvensiyonel ilaçların da biyoyararlanımını arttırır. Bunlara örnek olarak çalışmalar piperinin resveratrolün metabolizmasını inhibe ederek ve klinik çalışmalarda dozunu azaltarak *in vivo* biyoyararlanımını arttırdığını göstermiştir. Bir diğer örnek ise kurkuminin Piperin ile biyoyararlanımını artırmasıdır. Bu da piperinin kurkuminin hepatik metabolizması ve bağırsaklar üzerindeki önleyici etkisi ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca çalışmalarda da kurkumin-piperin yükle nanopartiküllerin kanser tedavisinde kanser hücresini hedefleme konusunda sınırlamalarını azalttığını göstermiştir[53].

Konvensiyonel kemoterapötik ilaçlar bitkinlik, saç kaybı, mide bulantısı, kusma, iştah kapanması ve fizikolojik ve biyolojik proseslerde değişime neden olmaktadır. Doğal kaynaklı kematerapötik ilaçlarla sinerjistik etki yaratıldığı çeşitli çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Bu gibi kombinasyonlar sağlıklı hücrelere olan toksik etkilerin azalma göstermesi sonucu da çalışmaların sonuçlarında yer almaktadır. EGCG fitokimyasalının çeşitli ilaçlar ile kombine edilerek toksisite azalmasında, kanser hücrelerini yok etmede yardımcı olduğu görülmüştür. EGCG'nin ikili ilaç kombinasyonlarında yarattığı faydalara örnek olarak Sisplatin ve oksaliplatin ile kanser hücrelerinde otofajiyi arttığı gözlenmiştir. EGCG ve Selokoksib ilaçlarının ayrı ayrı iken yapamadığı ancak sinerjistik etki ile protein kanser hücrelerinin ekspresyonunu indüklemişlerdir [58].

Piperin ve EGCG birbirlerine sinerjistik etki yaratıp biyoyararlanımlarını arttırarak daha etkili bir kombinasyon tedavisi olması beklenmektedir.

2.12. Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinin Matematiksel Olarak Tanımlanması

2.12.1. Enkapsülasyon Verimliliği ve Yükleme Kapasitesi

Nanopartiküller içerisine yüklenmiş ilacın enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasiteleri aşağıdaki denklemler aracılığıyla bulunmaktadır [59];

Enkapsülasyon Verimi (EE)% = $\frac{Başlangıçtaki ilaç miktarı-Serbest ilaç miktarı}{Başlangıçtaki ilaç Miktarı} x100$

Yükleme Kapasitesi (LD)% = $\frac{Başlangıçtaki ilaç miktarı-Serbest ilaç miktarı}{Nanopartiküldeki Başlangıç İlaç Miktarı} x100$

2.12.2. İlaç salım Kinetik Modelleri

2.12.2.1. Sıfırıncı Derece Kinetik Modeli

Ayrışmayan ve yavaş salmayan dozaj ilaç çözünmesi bu model ile tanımlanır. Matematiksel olarak aşağıdaki gibi ifade edilmektedir;

 $Q_t = Q_0 + Kot$

t: Zaman

Qt: t zamanında çözünen ilaç miktarı

Q₀: Çözeltideki ilacın başlangıç miktarı (genellikle Q0= 0)

K₀ : Sıfırıncı derece salım sabiti, birimi konsantrasyon/zaman

In vitro ilaç salım kinetiğine bakılırken kümülatif salınan ilaç miktarının zamana bağlı grafiği çizilir.

2.12.2.2. Birinci Derece Kinetik Model

Bu model aynı zamanda ilaçların absorpsiyonu ve/ya eliminasyonu için tanımlanmaktadır. Matematiksel olarak aşağıdaki gibi ifade edilmektedir;

$$\log C = \log C_0 - \frac{Kt}{2.303}$$

C0 : Başlangıç ilaç konsantrasyonu

K: Birinci derece hız sabiti

t: Zaman

Zamana karşı log kümülatif yüzde olarak grafik çizilir ve elde edilen veriler -K/2.303 eğimli düz bir çizgi verir.

2.12.2.3. Higuchi Kinetik Model

1961'de Huguchi ilaç salınımı için ilk matematiksel model örneği olarak matris sistemi kullanmıştır. Başlangıçta düzlemsel sistem için düşünülmüştür ancak daha sonrasında farklı geometrilere ve porosel sistemlere genişletilmiştir. Bu model başlangıçta matristeki ilaç konsantrasyonunun ilaç çözünürlüğünden daha yüksek olduğunu, ilaç difüzyonunun sadece tek boyutta gerçekleştiğini (kenar etkisi ihmal edilir), ilaç partiküllerinin sistem kalınlığından çok daha küçük olduğunu, maktris şişmesinin ve çözünmesinin ihmal edildiğini, ilaç difüzivitesinin sabit olduğunu ve mükemmel karıştırma durumlarının her zaman salım çevresine ulaştığı hipotezlerine dayanmaktadır. Matematiksel olarak aşağıdaki gibi ifade edilmektedir;

$$f_t = Q = A \sqrt{D(2C - C_s)C_s t}$$

Q: A birim alan başına t zamanında salınan ilaç miktarı

A: Birim alan

C: Başlangıç ilaç konsantrasyonu

Cs : Matris ortamdaki ilaç çözünürlüğü

D: Matris maddenin ilaç moleküllerinin difüzivitesi (difüzyon katsayısı)

t: Zaman

Bu denklem her zaman geçerlidir ancak terapötik sistemdeki toplam tükenme sağlandığı durumlar hariçtir. Düzlemsel heterojen matris sistemde disolüsyon çalışırken, matristeki ilaç konsantrasyonu çözünürlüğünden daha düşükse ve salım matristeki porlar aracılığıyla gerçekleşiyorsa aşağıdaki matematiksel ifade kullanılmaktadır;

$$f_t = Q = \sqrt{\frac{D\delta(2C - \delta C_s)C_s t}{\tau}}$$

D: Çözücüdeki ilaç moleküllerinin difüzyon sabiti

δ: Matris gözenekliği

τ:Matris tortozitesi

Q: A birim alan başına t zamanında salınan ilaç miktarı

A: Birim alan

Cs : Matris ortamdaki ilaç çözünürlüğü

t: Zaman

Tortozite matristeki gözeneklerin ve kanalların yarıçap ve dallanma boyutları olarak tanımlanır.

Higuchi kinetik modeli matematiksel olarak aşağıdaki gibi ifade edilmektedir;

$$f_t = Q = K_H x \sqrt{t}$$

K_H : Higuchi çözünürlük sabiti

Veriler ilaç salınımın yüzdesine karşı zamanın karesi olarak çizilen grafikle çizilir.

2.11.2.4. Hixson-Crowell Kinetik Modeli

Hixson ve Crowell partiküllerin düzenli alanının hacminin küp köküyle orantılı olduğunu fark ettiler. Denklem olarak ifade etmek gerekirse;

$$\sqrt[3]{W_0} - \sqrt[3]{W_t} = \kappa t$$

W0: Farmötik dozaj formundaki başlangıçtaki ilaç miktarı

Wt: Farmötik dozaj formunun t zamanındaki kalan ilaç miktarı

к: Yüzey-hacim ilişkisine bağlı sabit

Bu denklem partikül ya da tabletlerdeki yüzey alanı ve yarıçaptaki ilaç salımının değişimi olduğu sistemleri ifade eder. *In vitro* ilaç salım çalışmalarında matristeki ilaç yüzdesinin küp köküne karşılık zamanı olarak çizilmektedir.

2.12.2.5. Korsmeyer-Peppas Kinetik Modeli

Korsmeyer ve arkadaşları polimerik sistemlerdeki ilaç salımı için basit bir ilişki ortaya koymuşlardır.

İlaç salımını çözmek için ilk %60 ilaç salımı verilerini Korsmeyer-Peppas modeline yerleştirmişlerdir. Bu denklik;

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = Kt^n$$

 $Mt / M\infty$: t zamanında salınan ilaç kesri

k: Salım hızı sabiti

n: Salım eksponent (silindirik şekilli matrisler için farklı salımı karakterize etmek için kullanılır.)

 $0.45 \le n$: Fickian difüzyon mekanizması

0.45 < n < 0.89: Non-Fickian transport

n = 0.89: Case II transport

n > 0.89: Super Case II transport

Salım eğiminden n değerini bulmak için sadece Mt / $M\infty < 0.6$ bu durum kullanılmalıdır.

in vitro ilaç salım çalışması için kümülatif ilaç yüzdesinin logaritmik değerine karşılık zamanın logaritmik değeri grafiği çizilmektedir [59].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kimyasal Malzemeler

Piperin ≥95% FG MW: 285.34 g/mol (Sigma-Aldrich), Fosfat Tamponlu Tuz (PBS) (Sigma-Aldrich), Polisorbat 80 (Tween-80) (ISOLAB), Polivinil Alkol (PVA) %85 hidrolize MW: 13,000-23,000 (Aldrich Chemistry), Kitosan Düşük Moleküler Ağırlık (Sigma-Aldrich), Poli(D,L-laktid-ko-glikolid) (PLGA) asit sonlandırmalı MW:7,000-17,000 (Sigma-Aldrich),Epigallokateşin gallat (EGCG), Farmotik ikincil standart MW:458.37 g/mol, (Sigma-Aldrich), Asetik Asit 100 % puriss (glasiyal) MW: 60.05 g/mol (Riedel-De Haen), Etanol absolut puriss MW: 46.07 g/mol (Sigma Aldrich), Aseton ≥99.5% MW:58,08 g/mol (Sigma-Aldrich).

3.2. Partikül Sentez Yöntemleri

3.2.1. PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması

PLGA aseton içerisinde manyetik karıştırıcı altında ve oda sıcaklığında tamamen çözünene kadar karıştırılır. Bu çözelti organik faz olarak adlandırılmaktadır. Saf su içerisine Tween 80 eklenir ve çözelti berrak haline gelene kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırılır. Bu çözelti sulu faz olarak adlandırılır. Organik faz sulu faz içerisine peristaltik pompa aracılığıyla damla damla ultraturrax altında eklenir. Organik fazın eklenmesi ardından çözelti %40 amplitude ile 10 saniye boyunca probe sonikatörde tutulur, 10 saniye beklenir ve aynı işlem bir kez daha yapılır. Gece boyu manyetik karıştırıcıda karıştırılır. 13,750 g 30 dakika boyunca santrifüjlenir. 3 kere saf su ile yıkandıktan sonra 24 saat boyunca liyofilizerde kurutulur. 4-8°C'de buzdolabında ışıktan muhafaza edilerek saklanır.



Şekil 3.1. PLGA NP

3.2.2. PIP Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması

PLGA aseton içerisinde manyetik karıştırıcı altında ve oda sıcaklığında tamamen çözünene kadar karıştırılır. PLGA tamamen çözünüp çözelti berrak haline geldiğinde içerisine PIP eklenerek manyetik karıştırıcıda ve oda sıcaklığında tamamen çözünene kadar beklenir. Bu çözelti organik faz olarak adlandırılmaktadır. Saf su içerisine Tween 80 eklenir ve çözelti berrak haline gelene kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırılır. Bu çözelti sulu faz olarak adlandırılmaktadır. Organik faz sulu faz içerisine peristaltik pompa aracılığıyla damla damla ultraturrax ile karışırken eklenir. Organik fazın eklenmesi ardından çözelti %40 amplitude ile 10 saniye boyunca probe sonikatörde tutulur, 10 saniye beklenir ve aynı işlem bir kez daha yapılır. Gece boyu manyetik karıştırıcıda karıştırılır. 13,750 g 30 dakika boyunca santrifüjlenir. 3 kere saf su ile yıkandıktan sonra 24 saat boyunca liyofilizerde kurutulur. 4-8°C'de buzdolabında ışıktan muhafaza edilerek saklanır.



Şekil 3.2. PIP yüklü PLGA NP

3.2.3. KTS Kaplı PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması

PLGA aseton içerisinde manyetik karıştırıcı altında ve oda sıcaklığında tamamen çözünene kadar karıştırılır. Bu çözelti organik faz olarak adlandırılmaktadır. KTS %1 asetik asit içerisinde tamamen çözünene kadar manyetik karıştırıcıda ve oda sıcaklığında karıştırılır. Saf su içerisine Tween 80 eklenir ve çözelti berrak haline gelene kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırılır. KTS içeren çözelti Tween 80 içeren çözelti içerisine eklenir ve iki çözeltinin tamamen karışması için manyetik karıştırıcıda bekletilir. Bu çözelti ise sulu faz olarak adlandırılır. Organik faz sulu faz içerisine peristaltik pompa aracılığıyla damla damla ultraturrax ile karıştırken eklenir. Organik fazın eklenmesi ardından çözelti %40 amplitude ile 10 saniye boyunca probe sonikatörde tutulur, 10 saniye beklenir ve aynı işlem bir kez daha yapılır. Gece boyu manyetik karıştırıcıda karıştırılır. 13,750 g 15 dakika boyunca santrifüjlenir. 3 kere saf su ile yıkandıktan sonra 24 saat boyunca liyofilizerde kurutulur. 4-8°C'de buzdolabında ışıktan muhafaza edilerek saklanır.



Şekil 3.3. KTS kaplı PLGA NP

3.2.4. PIP Yüklü KTS Kaplı PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması

PLGA aseton içerisinde manyetik karıştırıcı altında ve oda sıcaklığında tamamen çözünene kadar karıştırılır. PLGA tamamen çözünüp çözelti berrak haline geldiğinde içerisine PIP eklenerek manyetik karıştırıcıda ve oda sıcaklığında tamamen çözünene kadar beklenir. Bu çözelti organik faz olarak adlandırılmaktadır. KTS %1 Asetik Asit içerisinde tamamen çözünene kadar manyetik karıştırıcıda ve oda sıcaklığında karıştırılır. Saf su içerisine Tween 80 eklenir ve çözelti berrak haline gelene kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırılır. KTS içeren çözelti Tween 80 içeren çözelti içerisine eklenir ve iki çözeltinin tamamen karışması için manyetik karıştırıcıda bekletilir. Bu çözelti ise sulu faz olarak adlandırılır. Organik faz sulu faz içerisine peristaltik pompa aracılığıyla damla damla ultraturrax ile karışırken eklenir. Organik fazın eklenmesi ardından çözelti %40 amplitude ile 10 saniye boyunca probe sonikatörde tutulur, 10 saniye beklenir ve aynı işlem bir kez daha yapılır. Gece boyu manyetik karıştırıcıda karıştırılır. 13,750 g 15 dakika boyunca santrifüjlenir. 3 kere saf su ile yıkandıktan sonra 24 saat boyunca liyofilizerde kurutulur. 4-8°C'de buzdolabında ışıktan muhafaza edilerek saklanır.



Şekil 3.4. PIP Yüklü KTS Kaplı PLGA

3.2.5. EGCG Yüklü KTS ile Kaplanmış PIP yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması

PLGA aseton içerisinde manyetik karıştırıcı altında ve oda sıcaklığında tamamen çözünene kadar karıştırılır. PLGA tamamen çözünüp çözelti berrak haline geldiğinde içerisine PIP eklenerek manyetik karıştırıcıda ve oda sıcaklığında tamamen çözünene kadar beklenir. Bu çözelti organik faz olarak adlandırılmaktadır. KTS %1 Asetik Asit içerisinde tamamen çözünene kadar manyetik karıştırıcıda ve oda sıcaklığında karıştırılır. Saf su içerisine Tween 80 eklenir ve çözelti berrak haline gelene kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırılır. KTS içeren çözelti Tween 80 içeren çözelti içerisine eklenir ve iki çözeltinin tamamen karışması için manyetik karıştırıcıda bekletilir. EGCG saf su içerisinde tamamen çözünene kadar manyetik karıştırıcıda bekletilir. KTS ve Tween 80 içeren çözelti içerisine çözünmüş EGCG içeren çözelti eklenir ve karışana kadar manyetik karıştıcıda tutulur. Bu çözelti ise sulu faz olarak adlandırılır. Organik faz sulu faz içerisine peristaltik pompa aracılığıyla damla damla ultraturrax ile karışırken eklenir. Organik fazın eklenmesi ardından çözelti %40 amplitude ile 10 saniye boyunca probe sonikatörde tutulur, 10 saniye beklenir ve aynı işlem bir kez daha yapılır. Gece boyu manyetik karıştırıcıda karıştırılır. 13,750 g 15 dakika boyunca santrifüjlenir. 3 kere saf su ile yıkandıktan sonra 24 saat boyunca liyofilizerde kurutulur. 4-8°C'de buzdolabında ışıktan muhafaza edilerek saklanır.



Şekil 3.5. EGCG Yüklü KTS ile Kaplanmış PIP yüklü PLGA
3.3. Karakterizasyon Çalışmaları

3.3.1. Nanopartiküllerin Boyut ve PDI Analizleri

Sentezlenen nanopartiküller süspanse haldeyken seyretilerek Zetasizer'de ölçüm için hazırlanmıştır. Zeta-sizer ve PDI analizleri HUNİTEK'te Malvern marka Zetasizer Nano ZSP cihazı ile yapılmıştır. Emülsifiyer miktarı, PLGA miktarı değiştirilerek PLGA NP boyut analizleri yapılmıştır. Daha sonra KTS kaplı PLGA NP için emülsifiyer miktarı, PLGA ve KTS miktarları değiştirilerek boyut analizleri yapılmıştır.

3.3.2. İlaç Enkapsülasyon Verimi ve Yükleme Kapasitesi Analizleri

Sentezlenen partiküller liyofilizerde (Christ marka Alpha 1-2 LD plus cihazı) 24 saat boyunca kurutulduktan sonra çözücülerinde çözülüp PIP ve EGCG analizleri Thermo Scientific Genesis 10S UV-Vis spektrofotometresi ve Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 HPLC kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.2.1. PIP Yüklü NP İlaç Enkapsülasyon Verimi ve Yükleme Kapasitesi Analizleri

UV-Vis kullanarak kalibrasyon eğrisi çizmek için önce PIP metanol içerisinde çözülerek tüm dalga boylarında absorbans taraması yapılmıştır. Şekil 3.6.'de görüldüğü üzere 340 nm'de en yüksek absorbans değerini vermiştir ve bu değer literatürle de uyumludur [60].



Şekil 3.6. PIP'in UV-Vis spektrofotometresindeki dalga boyu taraması.

Daha sonra 340 nm dalga boyunda PIP'in uygun çözücüler kullanılarak konsantrasyonu değiştirilerek ölçümler yapılmış ve kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. Şekil 3.7.'deki R² değeri 1'e oldukça yakındır ve PLGA NP içerisindeki PIP miktarının bulunması için bu doğru için elde edilen denklem kullanılmaktadır. %10 Aseton-Etanol çözücü PLGA NP'yi çözmek için seçilmiştir bu nedenle bu çözücü ile PIP'in kalibrasyon doğrusu elde edilmiştir.



Şekil 3.7. PIP'in %10 aseton-etanol içerisindeki kalibrasyon doğrusu.

Şekil 3.8'teki R² değeri 1'e oldukça yakındır. Seçilen çözücü KTS kaplı PLGA NP'nin çözülmesi için kullanıldığından bu çözücü kullanılarak kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. KTS kaplı PLGA NP içerisindeki PIP miktarının bulunması için bu doğru için elde edilen denklem kullanılmaktadır.



Şekil 3.8. PIP'in %10 aseton-etanol-%2 asetik asit içerisindeki kalibrasyon doğrusu.

3.3.2.2. EGCG Yüklü NP İlaç Enkapsülasyon Verimi ve Yükleme Kapasitesi Analizleri

EGCG yüklü NP'leri sentezlendikten sonra %10 Aseton-Etanol-%2 Asetik Asit içerisinde çözüldükten sonra HPLC ile ölçüm yapılmıştır. HPLC için hazırlanan EGCG tayin yöntemi çizelge 3.1'de gösterilmektedir. Bu metoda Hong ve arkadaşlarının metodu baz alınarak bazı modifikasyonlar yapılmıştır. [61].

	Thermo Scientific Hypersil GOLD			
Kolon	C18 5µm x 4.6 mm x	150 mm		
	Zaman	Akış Hızı		
	0:01	1.5 mL/dk		
Akış Hızı	1:81	0.7 mL/dk		
	6:00	0.7 mL/dk		
Dalga Boyu	280 nm			
Kolon Sıcaklığı	25°C			
Mobil Faz A	Su:Asetik Asit 98:2 (v	//v)		
Mobil Faz B	Asetonitril			
Mobil Faz	Mobil Faz A: Mobil F	Mobil Faz A: Mobil Faz B		
	80:20 (v/v)			
Enjeksiyon Hacmi	10 µL			
Analiz Süresi	6 dakika			

Çizelge 3.1. EGCG tayini için HPLC metodu.

KTS kaplı PLGA NP içerisindeki EGCG ilacının enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesini hesaplamak için Şekil 3.9.'deki R² değeri 1'e oldukça yakın olan doğru denklemi kullanılmaktadır.



Şekil 3.9. EGCG'nin %10 aseton-etanol-%2 asetik asit içerisindeki kalibrasyon doğrusu.

3.3.3. FT-IR Analizleri

FT-IR analizleri Hacettepe Üniversitesi Merkez Laboratuvarında ve İLKO ARGEM'de yapılmıştır. Hazırlanan partiküller liyofilizerde 24 saat kurutulduktan sonra ve kullanılan hammaddeler yaklaşık 5 gram olarak merkez laboratuvara verilmiştir. Bu analizler numunelerin içerisindeki kimyasal bağları ve kompozit yapılar içindeki değişimlerini tespit edebilmek için gerçekleştirilmiştir.

3.3.4. DSC Analizleri

DSC analizleri Hacettepe Üniversitesi Merkez Laboratuvarında yapılmıştır. Hazırlanan partiküller liyofilizerde 24 saat kurutulduktan sonra ve kullanılan hammaddeler yaklaşık 5 gram olarak merkez laboratuvara verilmiştir. Sıcaklık değişimi içeren programa maruz bırakılan numunelerin entalpi ve erime, camsı geçiş sıcaklığı gibi bilgilerin elde edilmesi için DSC analizi gerçekleştirilmiştir.

3.4. Salım Çalışmaları

Salım çalışmaları 100 rpm ve 37°C' da çalıştırılan Edmund Bühler GmbH TH 30 orbital çalkamalı inkübatör içerisinde gerçekleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında salım ortamlarından numune alınarak PIP ve EGCG ilaçları için belirlenmiş kalibrasyon doğrularından yararlanılarak miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir.

3.4.1. PIP Yüklü PLGA Nanopartikül Salım Analizleri

PIP çözüldükten sonra pH' 1 7.0 olan PBS ile seyreltilerek çeşitli konsantrasyonlar elde edilmiştir. Hazırlanan PIP konsantrasyonlarında 340 nm dalga boyunda UV-Vis spektrofotometresi ile absorbans değerleri ölçülerek kalibrasyon doğrusu elde edilmiştir. Kalibrasyon doğrusu Şekil 3.10'te gösterilmektedir. Kalibrasyon doğrusunun R² değeri 1'e yakın olup, doğru denkleminin eğimi kullanılarak PIP yüklü NP'lerin salım çalışmasındaki PIP miktarları hesaplanmıştır.



Şekil 3.10. PIP-PBS kalibrasyon doğrusu (pH=7.0).

PIP çözüldükten sonra pH:5.5' da seyreltilerek çeşitli konsantrasyonlar elde edilmiştir. Kalibrasyon doğrusu Şekil 3.11'de gösterilmektedir. Kalibrasyon doğrusunun R² değeri 1'e yakın olup bu doğrunun eğimi kullanılarak PIP yüklü NP'lerin salım çalışmasındaki PIP miktarları hesaplanmıştır.



Şekil 3.11. PIP-pH:5.5 kalibrasyon doğrusu.

3.4.2. EGCG Yüklü KTS Kaplı PLGA Nanopartikül Salım Analizleri

EGCG çözüldükten sonra pH'ı 7.0 olan PBS ile seyreltilerek çeşitli konsantrasyonlar elde edilmiştir. HPLC kromatogramlarındaki çeşitli konsantrasyonlara denk gelen EGCG piklerinin alanı ile kalibrasyon doğrusu elde edilmiştir. Kalibrasyon doğrusu Şekil 3.12'de gösterilmektedir. Kalibrasyon doğrusunun R² değeri 1'e yakın olup bu doğrunun eğimi kullanılarak EGCG yüklü NP'lerin salım çalışmasındaki EGCG miktarları hesaplanmıştır.



Şekil 3.12. EGCG-PBS kalibrasyon doğrusu (pH:7.0).

EGCG çözüldükten sonra pH:5.5' da seyreltilerek çeşitli konsantrasyonlar elde edilmiştir. HPLC kromatogramlarındaki çeşitli konsantrasyonlara denk gelen EGCG piklerinin alanı ile kalibrasyon doğrusu elde edilmiştir. Kalibrasyon doğrusu Şekil 3.13'te gösterilmektedir. Kalibrasyon doğrusunun R² değeri 1'e yakın olup bu doğrunun eğimi kullanılarak EGCG yüklü NP'lerin salım çalışmasındaki EGCG miktarları hesaplanmıştır.



Şekil 3.13. EGCG-pH:5.5 kalibrasyon doğrusu.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu tezdeki çalışmalar nanopartikül sentezi, nanopartiküllere etken madde enkapsülasyonu ve nanopartiküllerden etken madde salımları olmak üzere 2 ana başlık altında toplanmıştır. Bu kapsamda i) PLGA NP, PIP Yüklü PLGA NP, KTS ile kaplanmış PLGA NP, KTS ile kaplanmış PIP yüklü PLGA NP, EGCG yüklü KTS ile kaplanmış PIP yüklü PLGA NP'lerin sentezlenmesi ve bu partiküllerin karakterizasyonları, ii) PIP yüklü PLGA NP, PIP yüklü KTS ile kaplanmış PLGA NP, EGCG yüklü KTS ile kaplanmış PIP yüklü PLGA NP'lerin etken madde enkapsülasyon verimlilikleri (%), yükleme kapasiteleri (%), salım analizleri ve salım analizlerinin kinetik modellere uyumları incelenmiştir.

4.1. Karakterizasyon Çalışmaları

4.1.1. Nanopartiküllerin Boyut ve PDI Analizleri

4.1.1.2. PLGA Nanopartikülü Boyut Analizleri

Organik faz sabit tutulurken sulu faz içerisindeki emülsifiyerin miktarının artması PLGA NP'lerin boyutunu arttığı Çizelge 4.1.'de görülmektedir. Bu sonuç Ige ve arkadaşlarının bulduğu sonuç ile uyumludur. [62]

PLGA (mg)	Aseton (mL)	Tween80 (mL)	Su (mL)	Boyut (nm)(ORT)
30	3	0,1	10	183,9±0,2
30	3	0,02	10	159,1±1,9

Çizelge 4.1. Emülsifiyer miktarının PLGA NP boyutuna etkisi



Şekil 4.1. 0.02 mL Tween 80 içeren PLGA NP Zeta Sizer analizleri.



Şekil 4.2. 0.1 mL Tween 80 içeren PLGA NP Zeta Sizer analizleri.

4.1.1.2. KTS Kaplı PLGA Nanopartikülü Boyut Analizleri

Tween 80 miktarı ise organik ve sulu faz oranlarına göre ayarlanmıştır. Burada da KTS miktarının NP boyutuna etkisi incelenmiştir. KTS miktarı arttırıldıkça boyut artmıştır. Çizelge 4.2'de sonuçlar ve Şekil 4.3-4.5 arasında Zeta Sizer grafikleri verilmiştir. Ahmad ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada KTS miktarının nanopartikül boyutunun arttırdığı gözlenmiştir. Bu durum bulunan sonuçları desteklemektedir [40].

PLGA (mg)	Aseton (mL)	KTS (mg)	Asetik (%1)(mL)	Asit	Tween 80 (mL)	Su (mL)	Boyut (nm)
30	3	5	2		0,06	30	186,5±0, 9
30	3	10	2		0,06	30	194,7±1, 97
30	3	15	2		0,06	30	211,6±1, 5

Çizelge 4.2. KTS kaplı PLGA NP'lerinde KTS miktarının NP boyutuna etkisi.



Şekil 4.3. 5 mg KTS içeren NP Zeta-Sizer analiz sonuçları.



Şekil 4.4. 10 mg KTS içeren NP Zeta-Sizer analiz sonuçları.



Şekil 4.5. 15 mg KTS içeren NP Zeta-Sizer analiz sonuçları.

4.1.2. FT-IR Analizleri

4.1.2.1. PIP Yüklü PLGA Nanopartikül Karakterizasyonu

Şekil 4.6, 4.7, 4.18 ve 4.9 ortak bir şekilde değerlendirdiğinde;

Şekil 4.6'daki spektrumda saf PLGA'nın karakteristik piki 1747.21 cm⁻¹ 'deki piktir. Aynı şekilde boş PLGA NP şekil 4.7'deki PLGA karakteristik piki 1746 cm-1'de gözlenmiştir. Bu pik C=O gerilme gruplarına işaret etmektedir. Pachauri ve Ark. Ve Kaur ve Ark. Çalışma gruplarının da sırasıyla 1760 cm⁻¹ ve 1734 cm⁻¹ absorblanan pikler PLGA polimer matrisine ait olduğunu kanıtlamıştır. Bu karakteristik pik PIP-PLGA NP'si içerisinde de 1750.19 cm⁻¹'de gözükmektedir [63, 64]. PLGA içerisindeki 1164.97, 1130.19 ve 1085.19 cm⁻¹ pikleri C-O gerilme bağlarını göstermektedir. PIP-PLGA NP içerisindeki 1166.26, 1131.66 ve 1088.43 cm⁻¹ C-O gerilme bağlarının varlığını göstermektedir. 2997.14 cm⁻¹ PLGA içerisindeki O-H gerilme bağlarına denk gelmektedir. Aynı şekilde PLGA-PIP içerisindeki PLGA'nın varlığı 3002.82 cm⁻¹ O-H gerilme bağlarından da kanıtlanmaktadır. PIP karakteristik piki 2941.07 cm⁻¹'deki C-H gerilme bağları ile gözükmektedir. PIP yüklü PLGA NP içerisinde de PIP olduğunu 2943.42 cm⁻¹'deki pik ile kanıtlanabilmektedir. Pachauri ve Ark. Ve Kaur ve Ark. Çalışma gruplarının da sırasıyla 2940 cm⁻¹, 2968 cm⁻¹ pikleri ile bulgular eşleşmektedir[63, 64]. PIP spektrumunda 2840.85 cm⁻¹'deki C-H gerilme bağları PIP yüklü PLGA NP içerisindeki 2846.54 cm⁻¹'deki pikle eşleşmektedir. PIPdeki 1632.93 cm⁻ ¹'deki C=C gerilme bağları absorbanslarıdır. PIP yüklü PLGA NP'sinde bu absorbanslar 1633.43 cm⁻¹'deki piklere denk gelmektedir. Pachauri ve ark. 1638 cm⁻¹ C=C gerilme bağlarını göstermiştir. PIP yüklemesinin gerçekleştiği bu çalışma ile de desteklenmektedir[64].



Şekil 4.6. Saf PLGA FT-IR spektrumu.



Şekil 4.7. PLGA NP FT-IR spekturumu.



Şekil 4.8. Saf PIP FT-IR Spektrumu.



Şekil 4.9. PIP yüklü PLGA NP FT-IR spektrumu.



Şekil 4.10. PIP, PLGA ve PIP yüklü PLGA NP'lerinin FT-IR spektrumlarının karşılaştırılması.

4.1.2.2. PIP Yüklü KTS ile Kaplanmış PLGA Nanopartikül Karakterizasyonu

Bölüm 4.1.2.1'de de açıklandığı gibi Şekil 4.13.'deki PLGA'nın karakteristik C=O gerilme gruplarına ait piki 1755.46 cm⁻¹'de partikül içerisindeki varlığını kanıtlamaktadır. PIP pikine ait C-H gerilme bağlarına ait 2939.69 cm⁻¹'de partikül içerisine PIP yüklendiğini göstermektedir [63, 64]. Saf KTS spektrumuna bakıldığında KTS'nin varlığının kanıtlanabilmesi için bakılması gereken pikler; 3290.55 cm⁻¹'deki O-H gerilme bağlarıdır. Şekil 4.13'deki PIP yüklü KTS kaplı PLGA NP spektrumuna bakacak olursak, KTS varlığını 3296.44 cm⁻¹, 1632.69 cm⁻¹ ve 1092.08 cm⁻¹ pikleri ile kanıtlayabilmektedir. Aynı şekilde Şekil 4.12.'deki 3295.91 cm⁻¹, 1653.50 cm⁻¹ pikleri KTS varlığına işaret etmektedir. Khan ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Buldukları sonuçlar, 3298.28 cm⁻¹'deki O-H gerilme bağı, 1653.



Şekil 4.11. Saf KTS FT-IR spektrumu.



Şekil 4.12. KTS kaplı PLGA NP FT-IR spektrumu.



Şekil 4.13. PIP yüklü KTS kaplı PLGA NP FT-IR spektrumu.

4.1.2.3. EGCG Yüklü KTS ile Kaplanmış PIP Yüklü PLGA Nanopartikül Karakterizasyonu

Şekil 4.14' deki saf EGCG spektrumu değerlendirildiğinde 1612.66 cm–1 C=C aromatik ring bağlarını, 1142.84 cm–1 ise C-O bağlarını göstermektedir ve 3551.23, 3468.83 ve 3347.06 cm–1 pikler EGCG'nin sahip olduğu OH gruplarının vibrasyonu ile oluşmuştur. Moreno-Vásquez ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada saf EGCG C=C ve C-O bağlarını sırasıyla 1606 and 1149 cm–1 'de elde etmişlerdir. Ayrıca 3500-3200 cm–1 arasında OH gruplarına ait fonksiyonel gruplar bulunmaktadır[66]. Elde etmiş olduğumuz FT-IR spektrumlarında gözlenen pikler Moreno-Vásquez ve arkadaşlarının elde etmiş olduğu pikler ile uyumludur. Saf PLGA, PIP, KTS ve EGCG (Şekil 4.7, 4.8, 4.11, ve 4.14) spektrumları beraber değerlendirildiğinde ise, Şekil 4.16'da 1751.74 cm–1' de PLGA karakteristik pikini, PIP fitokimyasalının varlığını ise 2940.91 cm–1' deki karakteristik pik ile görmekteyiz. 3645.00 ve 3525.66 cm–1 pikleri ise NP içerisindeki OH bağlarını göstermektedir. Bu bağlar EGCG ve KTS varlığına işaret etmektedir. 1611.19 cm–1 1132.72 cm–1 C=C ve C-O bağlarını göstererek saf EGCG spektrumu ile uyumludur. 1633.07 cm–1' deki N-H bükülme bağı da KTS varlığını göstermektedir.



Şekil 4.14. Saf EGCG FT-IR spektrumu.



Şekil 4.15. EGCG yüklü KTS kaplı PIP yüklü PLGA NP FT-IR spektrumu.

4.1.3. DSC Analizleri

4.1.3.1. PIP Yüklü PLGA Nanopartikül Karakterizasyonu

Şekil 4.17'deki saf PIP'in endotermik piki 131.36°C'de, Şekil 4.16'da ise PLGA'nın endotermik ayırt edici piki 51.54°C'de gözlenmiştir. Şekil 4.18'de 50.54°C'de şekil 4.16'ya göre alanı küçülmüş olan pik PLGA'nın amorf yapıya geçip erime noktası ve PIP'in PLGA içerisine yüklenmiş olduğunu kanıtlayarak pik gözlenmemektedir. Öztürk ve arkadaşlarının çalışması da PLGA amorf yapısında erime noktasının gözlenmediği durumu bulunan sonuçlarla kıyaslanarak dayanak olarak kullanılabilmektedir [67, 68].



Şekil 4.16. Saf PLGA DSC spektrumu.



Şekil 4.17. Saf PIP DSC spektrumu.



Şekil 4.18. PIP yüklü PLGA NP DSC spektrumu.



Şekil 4.19. PIP, PLGA ve PIP-PLGA DSC spektrumlarının karşılaştırılması.

4.1.3.2. PIP Yüklü KTS ile Kaplanmış PLGA Nanopartikül Karakterizasyonu

Şekil 4.17'deki saf PIP'in endotermik piki 131.36°C'de, Şekil 4.16'da ise PLGA'nın endotermik ayırt edici piki 51.54°C'de, Şekil 4.20'de KTS'ın ayırt edici 102.04°C ve 385.44°C'de pikler gözükmemektedir. Şekil 4.21'de bu pikler gözükmemektedir. Ahmad ve arkadaşlarının yaptığı çalışma doğrultusunda Şekil 4.21'de gözlenmeyen bu pikler PIP'in nanopartikül içerisine yüklendiğini göstermektedir. KTS ve PLGA pikleri de amorf yapıdan dolayı gözlenmemektedir [40, 67, 68].



Şekil 4.20. Saf KTS DSC spektrumu.



Şekil 4.21. PIP yüklü KTS ile kaplanmış PLGA NP DSC spektrumu.



Şekil 4.22. PIP, PLGA, KTS ve KTS kaplı PIP-PLGA DSC spektrumlarının karşılaştırılması.

4.1.4. SEM Analizleri

4.1.4.1. PLGA NP SEM görüntüleri

Şekil 4.23-4.25 arasında PLGA NP SEM görüntüleri verilmektedir. Zeta Sizer ile yapılan optimum boyut seçilen nanopartikül formülasyonu ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. NP'ler yuvarlak ve oldukça homojen şekilde oluştuğu görülmektedir.



Şekil 4.23. PLGA NP SEM görüntüsü



Şekil 4.24. PLGA NP SEM görüntüsü



Şekil 4.25. PLGA NP SEM görüntüsü.

4.1.4.2. KTS ile kaplanmış PLGA NP SEM görüntüleri

Şekil 4.26 ve 4.27'de optimum boyutun seçildiği KTS kaplı PLGA NP'nin SEM görüntüleri verilmektedir. Boyut ZetaSizer analiz sonuçlarına yakındır. NP'nin beklenildiği gibi küresel şekile sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 4.26. KTS kaplı PLGA NP SEM görüntüsü.



Şekil 4.27. KTS kaplı PLGA NP SEM görüntüsü.

4.2. İlaç Salım Analizleri

4.2.1. Enkapsülasyon Verimi ve İlaç Yükleme Analizleri

Sabit Tween 80 ve sabit PLGA miktarlarında PIP miktarının arttırılması enkapsülasyon veriminin artması ile sonuçlanmıştır (Çizelge 4.3). Sabit Tween 80 ve sabit PIP miktarında PLGA'nın artması enkapsülasyon verimini arttırmıştır. Ancak enkapsülasyon verimindeki artış çok fazla olmadığı için ve PLGA'nın arttırılması nanopartikül boyutunun artmasına neden olduğu için en uygun PLGA miktarı 30 mg olarak seçilmiştir.

PIP (mg)	PLGA (mg)	Tween 80 (mL)	Enkapsülasyon Verimi (%)	Yükleme Kapasitesi (%)
6	30	0,02	9,2	4,4
12	30	0,02	11,1	11,6
18	30	0,02	37,7	31,9
18	60	0,02	42,1	18,0

Çizelge 4.3. PIP miktarının enkapsülasyon verimi üzerindeki etkisi.

Çizelge 4.1'de Tween 80 miktarının artması NP boyutunu arttırdığı görülmüştür. Enkapsülasyon verimini arttırmak için daha yüksek miktarda Tween 80 kullanılarak, boyut büyütülerek enkapsülasyon verimini arttırmak hedeflenmiştir. Bu doğrultuda Çizelge 4.4'deki veriler elde edilmiştir. PIP miktarının arttırılması ile enkapsülasyon verimi artmıştır. Ancak 36 mg PIP içeren nanopartikülde partikülün doygunluğa ulaşması ile enkapsülasyon verimi azalmıştır. 36 mg' dan daha fazla ilaç yüklenmeyerek en yüksek enkapsülasyon verimi, 18 mg PIP ve 30 mg PLGA içeren nanopartiküllerde % 65.0 olarak elde edilmiştir. Katiyar ve arkadaşlarının yaptığı PIP ve Rapamisin yüklü PLGA NP'lerinde PIP enkapsülasyon veriminin %70 üzerine çıkmadığı görülmüş ve bu tez kapsamında hedeflenen NP boyutlarına yakın aralıkta çalışma yapmışlardır. Bu sonuçlar Çizelge 4.4'de bulunan sonuçlar ile uyumludur [55].

Çizelge 4.4. PIP yüklü PLGA NP'lerinde PIP miktarının enkapsülasyon verimi üzerindeki etkisi.

PIP (mg)	PLGA (mg)	Tween 80 (mL)	Enkapsülasyon Verimi (%)	Yükleme Kapasitesi (%)
15	30	0,1	19,3	21,3
18	30	0,1	65,0	55,4
24	30	0,1	59,0	71,9
36	30	0,1	42,0	42,5

Çizelge 4.5'de PIP yüklü KTS kaplı PLGA NP'lerinde PIP miktarının enkapsülasyon verimine ve yükleme kapasitesine etkisi görülmektedir. Sabit PLGA ve KTS miktarıyla, PIP miktarının arttırılması enkapsülasyon verimini arttırmıştır. Ancak 30 mg 'dan sonra enkapsülasyon verimi düşmüştür. PIP yüklü PLGA NP'de olduğu gibi, PIP yüklü KTS kaplı PLGA NP' de de 36 mg PIP miktarında doygunluğa ulaşılmıştır ve bu nedenle enkapsülasyon verimi düşmüştür. En yüksek enkapsülasyon verimi 30 mg PIP yüklenen NP'de %66.5 olarak elde edilmiştir.

PIP (mg)	PLGA (mg)	KTS (mg)	Enkapsülasyon Verimi (%)	Yükleme Kapasitesi (%)
12	30	5	24,8	14,3
18	30	5	50,4	35,9
24	30	5	56,7	45,3
30	30	5	66,5	61,7
36	30	5	47,0	43,6

Çizelge 4.5. PIP yüklü KTS kaplı PLGA NP'lerinde PIP miktarının enkapsülasyon verimine etkisi.

Çizelge 4.6'da PLGA' ya yüklenen PIP miktarı 30 mg' da sabit tutulup dış KTS tabakasına yüklenen EGCG miktarı arttırıldığında, beklenildiği gibi PIP enkapsülasyon veriminin hem tek başına PIP içeren KTS kaplı PLGA partiküllere göre azaldığı, hem de ikili sistemde artan EGCG miktarı ile azaldığı görülmüştür. En yüksek PIP enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi 30 mg PIP ve 4 mg EGCG içeren KTS-PLGA NP' lerde elde edilmiştir. En yüksek EGCG yükleme kapasitesi ise 30 mg PIP ve 8 mg EGCG içeren KTS-PLGA NP' lerde song KTS-PLGA NP' lerde elde edilmiştir.

Ayrıca Shanavas ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kabuk/çekirdek sistemine Doksuribisin ve Dosetaksel ilaçlarının yüklenmesinde kabuk bölümüne yani KTS'ye Doksuribisin ilacını en fazla %5 enkapsülasyon verimi ile yüklemişlerdir. Bunun nedenini KTS'nin düzensiz olarak PLGA dışına kaplanmış olması ve KTS'nin suda düşük çözünebilme özelliğinden kaynaklandığı şeklinde açıklamışlardır. Bu tez çalışmasında dış kitosan kabuğuna EGCG enkapsülasyon verimi diğer ikili ilaç sistemlerinde dış kitosan kabuğa yüklenen ikinci ilaç için elde edilen enkapsülasyon veriminden 4 mg ve 5 mg EGCG yüklemelerinde yüksektir. EGCG miktarı 8 mg' a arttırıldığında ise literatüre çok yakın bir sonuç elde edilmiştir [69]. Literatürde tek başına PIP' in PLGA' ya yüklendiği ya da tek başına EGCG' nin KTS NP' lerine yüklendiği çalışmalar mevcuttur. Ancak EGCG yüklenmiş KTS kabuk PIP yüklenmiş PLGA çekirdek çalışması literatürde bilindiği kadarıyla ilk kez bu tez kapsamında gerçekleştirildiğinden doğrudan bir karşılaştırma yapmak mümkün olmamıştır.

PIP (mg)	EGCG (mg)	PIP Enkapsülasyon Verimi (%)	EGCG Enkapsülasyon Verimi (%)	PIP Yükleme Kapasitesi (%)	EGCG Yükleme Kapasitesi (%)
30	4	41,5	18,7	33,0	2,0
30	5	22,6	9,6	19,6	1,4
30	8	15,3	4,2	32,7	2,4

Çizelge 4.6. EGCG yüklenmiş KTS ile kaplanmış PIP yüklü NP'lerinde EGCG miktarının enkapsülasyon verimine etkisi.

EGCG yüklü KTS ile kaplanmış PIP yüklü PLGA NP'lerde EGCG'nin sabit tutulup PIP miktarının arttırılması PIP enkapsülasyon veriminin düşmesine EGCG enkapsülasyon veriminin artmasına neden olmuştur (Çizelge 4.7.). En yüksek PIP enkapsülasyon verimi ve PIP yükleme kapasitesi 10 mg PIP yüklenmiş PLGA- 5mg EGCG yüklenmiş KTS kaplı NP' lerde elde edilmiştir. En yüksek EGCG enkapsülasyon verimi ve EGCG yüklenmiş kTS kaplı NP' lerde elde edilmiştir.

PIP (mg)	EGCG (mg)	PIP Enkapsülasyon Verimi (%)	EGCG Enkapsülasyon Verimi (%)	PIP Yükleme Kapasitesi (%)	EGCG Yükleme Kapasitesi (%)
10	5	50,5	6,0	21,5	1,3
18	5	22,7	11,6	13,7	2,0
30	5	22,6	9,6	19,6	1,4

Çizelge 4.7. EGCG yüklenmiş KTS ile kaplanmış PIP yüklü NP'lerinde PIP miktarının enkapsülasyon verimine etkisi.

Çizelge 4.8'de PIP miktarının sabit tutulup EGCG miktarı arttırıldığında PIP enkapsülasyon verimi artmış ancak EGCG enkapsülasyon verimi düşmüştür. Çizelge 4.6 ile karşılaştırılınca aynı etki gözlenerek EGCG'nin artması EGCG enkapsülasyon verimini azaltmıştır. Ancak Çizelge 4.6'da PIP enkapsülasyon verimi de azalmıştır. PIP miktarı Çizelge 4.8'de daha az olduğu için NP içerisindeki EGCG miktarı arttıkça EGCG enkapsülasyon verimi düşerek PIP enkapsülasyon verimi artmaktadır. Buradan da KTS-PLGA NP' lerdeki PIP ve EGCG miktarlarının karşılıklı olarak ve interaktif bir şekilde her iki bileşenin enkapsülasyon verimliliği ve yükleme kapasitesini etkilediği sonucuna varılmaktadır.

Çizelge 4.8. EGCG yüklenmiş KTS ile kaplanmış PIP yüklü NP'lerinde PIP miktarının enkapsülasyon verimine etkisi.

PIP (mg)	EGCG (mg)	PIP Enkapsülasyon Verimi (%)	EGCG Enkapsülasyon Verimi (%)	PIP Yükleme Kapasitesi (%)	EGCG Yükleme Kapasitesi (%)
18	5	22,7	11,6	13,7	2,0
18	10	33,4	5,9	18,9	1,8

4.2.2. Salım Çalışmaları ve Kinetik Modelleri

4.2.2.1. PIP Yüklü PLGA Nanopartiküllerden PIP Salımı

Çizelge 4.9.'da formülasyonu gösterilen NP'lerden PIP salımı pH:7.0 ve Çizelge 4.10'da formülasyonu gösterilen NP'lerden PIP salımı pH:5.5 ortamında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.9. PIP salımının pH 7.0' de gerçekleştirileceği PIP yüklü PLGA NP salım partiküllerinin özellikleri.

PIP (mg)	PLGA (mg)	Aseton (mL)	Tween 80 (mL)	Su (mL)	Enkapsülasyon Verimi (%)	İlaç Yüklemesi (%)
18	30	3	0,1	10	65,0	55,4
24	30	3	0,1	10	59,9	71,9

Çizelge 4.10. PIP salımının pH 5.5' da gerçekleştirileceği PIP yüklü PLGA NP salım partiküllerinin özellikleri.

PIP (mg)	PLGA (mg)	Aseton (mL)	Tween 80 (mL)	Su (mL)	Enkapsülasyon Verimi (%)	İlaç Yüklemesi (%)
18	30	3	0,1	10	65,0	55,4

Bölüm 2.3.3'de de anlatıldığı üzere PLGA NP'lerden PIP'in salımı çift fazlı salım olarak gerçekleşmektedir [16]. PLGA matrisinden PIP salımı, difüzyon-degredasyon aracılı süreç yoluyla gerçekleşmektedir. Salımın başlangıcında PLGA matrisinden PIP salımı difüzyon yoluyla gerçekleşirken, daha sonradan salım hem ilaç difüzyonu hem de PLGA matrisinin bozunması aracılığıyla gerçekleşmektedir. PLGA'nın sert zincir yapısı ve bozunma hızından kaynaklı PLGA NP'lerde salım hızı yavaş olarak gerçekleşmektedir. Şekil 4.28 ve Şekil 4.29'da görüldüğü üzere 0-3 saat arası hızlı salım fazı, pH:7.0'da

kontrollü, sürekli ve stabil salım fazı 3 saat-17 gün arasında, pH:5.5'de kontrollü, sürekli ve stabil salım fazı 3 saat - 9 gün arasında devam etmektedir. Katiyar ve arkadaşlarının çalışmasındaki salım zamanları da bu tez çalışmasına oldukça yakın olarak 0-3 saat arası hızlı salım fazı olarak görülmektedir ve 14 günde salımı tamamlamışlardır [55]. Nanopartiküllerden sürekli salım önemli bir özelliktir, çünkü tedavi amacı için gerekli olan sabit bir terapötik PIP konsantrasyonunun uzun süre korunması sağlanabilmektedir [64].



Şekil 4.28. PIP yüklü PLGA NP' lerden PIP salımının pH:7.0'daki salım grafiği.



Şekil 4.29. 18 mg PIP yüklü PLGA NP' lerden PIP salımının pH:5.5'deki salım grafiği.
Şekil 4.28'deki sonuçlara göre pH:7.0'da 18 mg PIP yüklü PLGA NP' lerden kontrollü ve stabil kümülatif salım %17 ve 24 mg PIP yüklü PLGA NP' lerden %13 kümülatif salım sonucuna ulaşmıştır. Şekil 4.30' da pH:5.5'de 18 mg PIP yüklü PLGA NP'lerden kontrollü ve stabil kümülatif %21 salım sonucuna ulaşmıştır. pH 5.5' da hem kümülatif salım % artmış hem de kontrollü ve stabil salıma daha kısa sürede ulaşılmıştır. Şekil 4.30'da görüldüğü üzere PLGA yapısındaki glikolidin varlığı daha asidik pH ortamında parçalanmaya eğilimlidir ve çözünme hızı ve daha asidik ortamda ani salım patlamasını kolaylaştırır. Kaur ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da pH:5.5 ortamında salımın pH:7.2'den daha hızlı olduğu gözlenmiştir [63]. Tümör hedefli ilaç salımında tümör ortamının daha asidik olmasından kaynaklı bu bölgelerde salımın daha çok olması bu tez kapsamında hedeflenmiştir.



Şekil 4.30. 18 mg PIP yüklü PLGA NP'lerden pH:5.5 ve pH:7.0 ortamlarındaki PIP salım grafiği.

4.2.2.2. PLGA Nanopartiküllerden PIP Salımının Kinetik Modellere Uyumunun İncelenmesi

PLGA NP'lerden PIP salım kinetiğinin sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi, Korsmeyer Peppas, Hixson-Crowell kinetik modellerine uyumu incelenmiştir. 24 mg PIP yüklü PLGA NP'den pH:7.0'da PIP salımının modellere uyumu Şekiller 4.31-35 arasında verilmiştir. 18 mg PIP yüklü PLGA NP'lerden pH:5.5'de PIP salımının modellere uyumu Şekiller 4.36-4.40 arasında verilmiştir.



Şekil 4.31. PIP (24 mg) yüklü PLGA NP' lerden pH 7.0' de elde edilen sıfırıncı derece kinetik model grafiği.



Şekil 4.32. PIP (24 mg) yüklü PLGA NP' lerden pH 7.0'de elde edilen birinci derece kinetik model grafiği.



Şekil 4.33. PIP (24 mg) yüklü PLGA NP' lerden pH 7.0' de elde edilen Higuchi kinetik model grafiği.



Şekil 4.34. PIP (24 mg) yüklü PLGA NP' lerden pH 7.0' de elde edilen Korsmeyer-Peppas kinetik model grafiği.



Şekil 4.35. PIP (24 mg) yüklü PLGA NP' lerden pH 7.0' de elde edilen Hixson-Crowell kinetik model grafiği.



Şekil 4.36. PIP (18 mg) yüklü PLGA NP' lerden pH 5.5' de elde edilen sıfırıncı derece kinetik model grafiği.



Şekil 4.37. PIP (18 mg) yüklü PLGA NP' lerden pH 5.5' de elde edilen birinci derece kinetik model grafiği.



Şekil 4.38. PIP (18 mg) yüklü PLGA NP' lerden pH 5.5' de elde edilen Hixson-Crowell kinetik model grafiği.



Şekil 4.39. PIP (18 mg) yüklü PLGA NP' lerden pH 5.5' de elde edilen Higuchi kinetik model grafiği.



Şekil 4.40. PIP (18 mg) yüklü PLGA NP' lerden pH 5.5' de elde edilen Korsmeyer-Peppas derece kinetik model grafiği.

Çizelge 4.11'de regresyon (R²) katsayılarının değerleri ve Çizelge 4.12'de kinetik model sabit değerleri verilmiştir. Kinetik salım grafiklerinden elde edilen doğrunun eğimleri kinetik model sabitlerini vermektedir. Diğerlerine ek olarak Korsmeyer-Peppas modelinde ise doğrunun kestiği noktadan k sabiti değeri hesaplanmaktadır.

R²'nin 1,0'a yakınlığı değerlendirilerek, pH 7.0' de PLGA NP' lerden PIP salım kinetiğinin en iyi Korsmeyer-Peppas kinetik modeline uyduğu bunu ise Higuchi modelinin izlediği görülmektedir. pH:5.5'de ise PLGA NP' lerden PIP salım kinetiğinin en iyi Higuchi modeline uyum sağladığı bunu ise Korsmeyer-Peppas modelinin izlediği görülmektedir. pH:7.0 ve pH:5.5'de Higuchi ve Korsmeyer-Peppas kinetik modelleri için elde edilen R² değerleri birbirlerine oldukça yakın sonuçlar elde edilmiştir. pH:5.5 ve pH:7.0' de R² değerleri değerlendirildiğinde sırasıyla Hixson-Crowell, Birinci derece ve Sıfırıncı derece modellerinin PIP salım kinetiğini azalan bir uyumla temsil ettiği anlaşılmaktadır.

Sıfırıncı Derece kinetik model ilaç taşıma sisteminden sürekli bir ilaç salımı olduğunu gösterir. Kandaki ilaç seviyesi ilaç salımı boyunca sabit kalmaktadır.

Birinci Derece kinetik modelde ise konsantrasyon ne kadar yüksek olursa reaksiyonun hızı o kadar yüksek olur şeklinde tanımlama yapılır. Bu yüzden de doğrusal kinetiği takip eder.

Kontrollü salımlı formülasyonların günümüzde sıklıkla kullanılması ile Higuchi denklemi yaygın olarak kullanılan ve en iyi bilinen kontrollü salım denklemlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Higuchi kinetik modelinde ilacın dozaj formunda tamamen tükenmesi sağlanana kadar geçerlidir. Matristeki ilaç konsantrasyonunun çözünürlüğünden daha düşük olduğu ve salmanın gözenekli sistem aracılığıyla gerçekleştiği düzlemsel heterojen bir matris sisteminden çözünmeyi göstermektedir. Bu kinetik modelde bazı varsayımlar yapılmaktadır;

- Sistemdeki ilk ilaç konsantrasyonu, matris çözünürlüğünden çok daha yüksektir.
- Mükemmel sink koşulları korunur.
- İlacın yayılma özelliği sabittir.

 Polimer şişmesi önemsizdir. Sink koşulları, salınan ilacın salma ortamındaki konsantrasyonunun asla doygunluk çözünürlüğünün yüzde 10'undan fazlasına ulaşmaması sağlanarak elde edilir.

Higuchi grafiğinden ilaç salımının ana mekanizmasının difüzyon kontrollü olduğu belirlendikten sonra hangi difüzyon tipine uygun olduğunu ve matristen çözünme mekanizmalarını anlamak için Korsmeyer-Peppas denklemindeki n değerine başvurulmaktadır.

Hixson-Crowell kinetik model partiküllerin veya tabletlerin yüzey alanı ve çapında bir değişikliğin olduğu sistemlerden salımı tanımlar. Bu yüzden düzenli alan parçacıkları, hacminin küp kökü ile orantılır. Bu denklem, geleneksel dozaj formunun, dağılabilir dozaj formunun veya hemen salınan dozaj formunun çözünme verilerinin yorumlanması için kullanılır. Bu kinetik modelde korelasyon katsayısının yüksek olması çözünme işlemi sırasında yüzey alanındaki değişikliğin ilaç salımı üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu yorumu yapılabilir [70].

Kinetik modellerin bu açıklamalarıyla birlikte sonuçlar değerlendirilecek olursa PIP yüklü PLGA NP'lerinden PIP salım çalışmasında Higuchi ve Korsmeyer-Peppas modellerine en iyi uyum elde edildiği için, Higuchi modeline uyum ile PIP salımının difüzyon kontrollü olduğu anlaşılmıştır. pH:5.5 ve pH:7.0 da Korsmeyer-Peppas modelinden elde edilen n değerlerinin sırasıyla 0,156 ve 0,1911 olarak bulunması ve bu değerlerin 0,45'den küçük olması difüzyon mekanizmasının Fickian difüzyon mekanizmasına uyduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

Katiyar ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ani salımdan, yani ilk 3 saatten sonra, en iyi uyumun Higuchi kinetik model ve Fickian difüzyon modeli ile gerçekleştiğini açıklamışlardır [55].

Rathee ve arkadaşlarının yaptığı PIP ve Nisoldipin ilaçlarının PLGA NP'lere yüklendikten sonra salım çalışmalarında ve Kaur ve arkadaşlarının PIP yüklü PLGA NP

salım çalışmalarında pH değerinin düşmesi ile daha çok ilaç salımı gözlenmiştir. Bu tezde elde edilen verilerde hem modellere uyum hem de ortam pH' ının pH 7.0' den pH 5.5' a düşmesi ile kümülatif % salım değerlerinin artış göstermesi açısından literatürle uyumlu bulunmuştur. [63, 68].

Çizelge 4.11. PIP yüklü PLGA NP'lerden PIP salımı için elde edilen kinetik modellerin R² değerleri.

PIP Yüklü PLGA NP	Sıfırıncı Derece Kinetik Modeli, R ²	Birinci Derece Kinetik Modeli, R ²	Higuchi Kinetik Modeli, R ²	Korsmeyer- Peppas Kinetik Modeli, R ²	Hixson- Crowell Kinetik Modeli, R ²
24 mg PIP pH:7.0	0,9082	0,9116	0,9752	0,988	0,9135
18 mg PIP pH:5.5	0,9096	0,919	0,9889	0,9773	0,9159

PIP Yüklü PLGA NP	Sıfırıncı Derece Kinetik Modeli Sabiti, K₀	Birinci Derece Kinetik Modeli Sabiti, K1	Higuchi Kinetik Modeli Sabiti, K _H	Korsmeyer- Peppas Kinetik Modeli Sabitleri K _{KP} ,n	Hixson- Crowell Kinetik Modeli Sabiti, K _{HC}
24 mg PIP pH:7.0	0,0122	-6E-05	0,329	K _{KP} =0,5958 n=0,1911	0,0002
18 mg PIP pH:5.5	0,2176	-0,0011	0,5694	K _{KP} =1,0288 n=0,1560	0,0038

Çizelge 4.12. PIP Yüklü PLGA NP'lerden PIP salımı için kinetik modellerden elde edilen kinetik sabitlerin değerleri.

4.2.2.3. KTS Kaplı PLGA Nanopartiküllerden PIP Salımının İncelenmesi

Cizelge 4.13.'de formülasyonları gösterilen KTS kaplı PLGA nanopartiküllerden pH:7.0 ve pH:5.5 ortamlarında PIP salımları gerçeklestirilmiştir. Şekil 4.41'de farklı miktarda PIP yüklü KTS kaplı PLGA nanopartiküllerden pH:7.0'deki PIP salım profilleri, Şekil 4.42'de pH:5.5'teki PIP salım profilleri gösterilmektedir. Şekil 4.43-4.45 arasında ise aynı miktarda PIP içeren KTS kaplı PLGA NP'lerin pH:5.5 ve pH:7.0'daki karşılaştırmalı PIP salım profilleri gösterilmektedir. PIP yüklenmiş KTS kaplı PLGA NP' lerden PIP salım profillerinin, PLGA NP' lerden PIP salım profillerine benzediği gözlenmiştir. İlk 3 saatte KTS-PIP-PLGA NP' lerden PIP, PIP-PLGA NP'lere göre daha yavaş bir şekilde salınmaktadır. pH 7.0' de 3. saat ile 17. gün arasında ise PIP hem difüzyon hem de matriks bozunma mekanizmalarının etkili olduğu daha ılımlı bir eğimle yükselen daha yavaş fakat sürekli bir PIP salım profili göstermiştir. Ancak sonuç olarak KTS kaplı PLGA NP'ler' den PIP salımı için, PLGA NP'lere yakın salım sonuçları elde edilmiştir. pH:7.0'da 17 günde 24 mg PIP yüklü KTS-PLGA NP' lerden %15, 30 mg PIP yüklü NP' lerden %14, 36 mg PIP yüklü NP' lerden %19 salım elde edilmiştir. pH:5.5'te 21 günde 24 mg PIP yüklü KTS-PLGA NP' lerden %20, 30 mg PIP yüklü NP'lerden %14, 36 mg PIP yüklü NP'lerden %21 salım sonuçları elde edilmiştir. PIP yüklü PLGA NP'lerinde olduğu gibi,

pH:5.5'te (tümör mikroortamında) pH 7.0' ye yakın olmakla beraber biraz daha fazla salım meydana gelmiştir. Bu daha yüksek salım sonucu KTS'nin pH' a duyarlı özelliğinden kaynaklanmaktadır[44]. Hızlı salım nanoçöktürme ile oluşturulan nanopartiküllerde gözlenmekte ve nanopartikül yüzeyine adsorplanan PIPin desorpsiyon mekanizması ile salımından da kaynaklanmaktadır. Yüzey yükü de PIP salımında önemli rol oynamaktadır.

Şekil 4.46' da bulunan 24 mg PIP yüklü PLGA ve 24 mg KTS kaplı PIP yüklü PLGA NP'lerinde ilk 3 saatteki ani salım PLGA NP'lerinde daha fazla gerçekleşmiştir. Bu da KTS kaplamanın PLGA NP' lerinden PIP' in başlangıçtaki ani salım etkisini önlediğini göstermektedir. KTS ile kaplı PLGA NP' lerden 120.-420. saatler arasında artan, sürekli ve kontrollü bir salım profili elde edilmiştir. KTS kaplamanın PIP salımını yavaşlatıcı, difüzyon kısıtlamalarına yol açan bir etki yaratmadığı salım profilinin KTS ile kaplı olmayan PIP-PLGA NP için elde edilen salım profiline çok benzer olmasından anlaşılmaktadır. Bu sonuç Aldawsari ve arkadaşlarının yaptığı Resveratrol yüklü KTS ile kaplı PLGA NP' lerinden resveratrol salım profilleri için elde edilen sonuçlarla da uyuşmaktadır [44].

PIP (mg)	PLGA (mg)	Aseton (mL)	Tween 80 (mL)	KTS (mg)	Enkapsülasyon Verimi (%)	İlaç Yüklemesi (%)
24	30	3	0,06	5	56,7	45,3
30	30	3	0,06	5	66,5	61,7
36	30	3	0,06	5	47,0	43,6

Çizelge 4.13. PIP salımının gerçekleştirileceği PIP yüklü PLGA NP' lerinin özellikleri.



Şekil 4.41. KTS ile kaplanmış PIP yüklü PLGA NP' lerden pH:7.0' de salım profilleri.



Şekil 4.42. KTS ile kaplanmış PIP yüklü PLGA NP' lerden pH:5.5' da salım profilleri.



Şekil 4.43. 24 mg PIP yüklü KTS ile kaplı PLGA NP'lerden farklı pH ortamlarında PIP salım profilleri.



Şekil 4.44. 30 mg PIP yüklü KTS ile kaplı PLGA NP'lerden farklı pH ortamlarında PIP salım profilleri.



Şekil 4.45. 36 mg PIP yüklü KTS ile kaplı PLGA NP'lerden farklı pH ortamlarında PIP salım profilleri.



Şekil 4.46. 24 mg PIP yüklü PLGA ve KTS kaplı PLGA NP' den PIP salım profilleri.

4.2.2.4. KTS Kaplı PLGA Nanopartiküllerden PIP Salımının Kinetik Modellere Uyumunun İncelenmesi

KTS kaplı PLGA NP' lerden PIP salım kinetiğinin sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi, Korsmeyer Peppas, Hixson-Crowell kinetik modellerine uyumu incelenmiştir. 24 mg PIP yüklü KTS kaplı PLGA NP' lerden PIP salımının yukarıdaki modellere göre doğrusallaştırılması ile pH 7.0 için elde edilen grafikler Şekiller 4.47-4.51 arasında, pH 5.5' için elde edilen grafikler Şekiller 4.52-4.56 arasında verilmiştir.



Şekil 4.47. PIP (24 mg) yüklü KTS kaplı PLGA NP' lerden pH 7.0' de elde edilen sıfırıncı derece kinetik model grafiği.



Şekil 4.48. PIP (24 mg) yüklü KTS kaplı PLGA NP' lerden pH 7.0' de elde edilen birinci derece kinetik model grafiği.



Şekil 4.49. PIP (24 mg) yüklü KTS kaplı PLGA NP' lerden pH 7.0' de elde edilen Higuchi kinetik model grafiği.



Şekil 4.50. PIP (24 mg) yüklü KTS kaplı PLGA NP' lerden pH 7.0' de elde edilen Hixson-Crowell kinetik model grafiği.



Şekil 4.51. PIP (24 mg) yüklü KTS kaplı PLGA NP' lerden pH 7.0' de elde edilen Korsmeyer -Peppas kinetik model grafiği.



Şekil 4.52. PIP (24 mg) yüklü KTS kaplı PLGA NP' lerden pH 5.5' da elde edilen sıfırıncı derece kinetik model grafiği.



Şekil 4.53. PIP (24 mg) yüklü KTS kaplı PLGA NP' lerden pH 5.5' da elde edilen birinci derece kinetik model grafiği.



Şekil 4.54. PIP (24 mg) yüklü KTS kaplı PLGA NP' lerden pH 5.5' da elde edilen Higuchi kinetik model grafiği.



Şekil 4.55. PIP (24 mg) yüklü KTS kaplı PLGA NP' lerden pH 5.5' da elde edilen Hixson-Crowell kinetik model grafiği.



Şekil 4.56. PIP (24 mg) yüklü KTS kaplı PLGA NP' lerden pH 5.5' da elde edilen Korsmeyer-Peppas kinetik model grafiği.

KTS kaplı PLGA NP' lerden PIP salımı için yukarıda verilen kinetik modellere uyumu gösteren regresyon (R²) katsayılarının değerleri Çizelge 4.14' de verilmiştir. Kinetik modellerin doğrusallaştırılması ile eğimden ve Korsmeyer-Peppas modeli için eğimden ve y-eksenini kesim noktasından elde edilen kinetik sabitlerin değerleri Çizelge 4.15'de verilmiştir.

pH:7.0'da 24 mg PIP içeren KTS kaplı PLGA NP'lerden PIP salımı için en iyi uyum Korsmeyer-Peppas ve Higuchi modelleri için elde edilmiş olup, regresyon katsayıları en yüksek ve birbirlerine oldukça yakın sonuçlar vermiştir. Bu modelleri sırasıyla birinci derece ve Hixson-Crowell modelleri çok yakın regresyon katsayıları ile takip etmektedir. Sıfırıncı derece kinetik modeli en düşük regresyon katsayısı değerine sahiptir. Kinetik modellere uyum için elde edilen bu sonuçlar beklenildiği gibi PIP yüklü PLGA NP' lerden PIP salımı için elde edilen sonuçlar ile uyumludur. Higuchi kinetik modeline en iyi uyumun sağlanması salımda difüzyon mekanizmasının etkili olduğunu göstermektedir. Korsmeyer-Peppas kinetik modeli ile de en yüksek uyumun sağlanması, model sabiti n' in 0,2436 değerine sahip olması ve bu değerin 0,45'den düşük olması difüzyonun Fick kanunua uygun olarak meydana geldiğini göstermektedir.

pH:5.5'da 24 mg PIP içeren KTS kaplı PLGA NP'lerden PIP salımı için en iyi uyum Higuchi kinetik modeli ile elde edilmiş olup, bunu gene yüksek bir regresyon katsayısı ile Korsmeyer-Peppas kinetik modeli takip etmektedir. Birinci derece, Hixson-Crowell ve Sıfırıncı derece kinetik modelleri için elde edilen regresyon katsayıları diğer iki modele göre daha düşük ancak birbirlerine oldukça yakın sonuç vermişlerdir. Elde edilen bu sonuç hem pH:7.0' de elde edilen sonuçla ve hem de PLGA NP'lerden PIP salımı için elde edilen sonuçlar ile uyumludur. Korsmeyer-Peppas kinetik modelinden elde edilen n değerinin 0,3171 olması ve bu değerinde 0,45' den düşük olması difüzyonun Fickian difüzyon modeli ile tanımlandığını göstermiştir.

PIP Yüklü KTS-PLGA NP	Sıfırıncı Derece Kinetik Modeli, R ²	Birinci Derece Kinetik Modeli, R ²	Higuchi Kinetik Modeli, R ²	Korsmeyer- Peppas Kinetik Modeli, R ²	Hixson- Crowell Kinetik Modeli, R ²
24 mg PIP pH:7.0	0,8886	0,9054	0,9783	0,9787	0,900
24 mg PIP pH:5.5	0,8740	0,8823	0,9818	0,9655	0,8796

Çizelge 4.14. PIP yüklü KTS-PLGA NP' lerden PIP salımının kinetik modellere uyumu için elde edilen R² değerleri.

Çizelge 4.15. PIP yüklü KTS-PLGA NP' lerden PIP salımı için kinetik modellerden elde edilen sabitlerin değerleri.

PIP Yüklü KTS-PLGA NP	Sıfırıncı Derece Kinetik Modeli Sabiti, K₀	Birinci Derece Kinetik Modeli Sabiti, K ₁	Higuchi Kinetik Modeli Sabiti, K _H	Korsmeyer- Peppas Kinetik Modeli Sabitleri K _{KP} ,n	Hixson- Crowell Kinetik Modeli Sabiti, K _{HC}
24 mg PIP pH:7.0	0,0312	-0,0001	0,6452	K _{KP} =0,4967 n=0,2436	0,0005
24 mg PIP pH:5.5	0,0338	-0,0002	0,7459	K _{KP} =0,3505 n=0,3171	0,0006

4.2.2.5. EGCG yüklü KTS ile Kaplı PLGA Nanopartiküllerden PIP ve EGCG Salımının Kinetik Modellere Uyumunun İncelenmesi

EGCG yüklü KTS ile Kaplı PLGA nanopartiküllerden PIP ve EGCG' nin salımının incelenmesi için her iki etken maddenin birlikte KTS-PLGA NP' lere yüklendiğinde enkapsülasyon verimi ve EGCG yükleme kapasitesinin en yüksek olduğu durum gözetilerek Çizelge 4.16'daki formülasyona sahip nanopartiküller kullanılmıştır. Şekil 4.57' de KTS-PLGA NP' lerden PIP ve EGCG' nin birlikte salım profilleri görülmektedir. 18 mg PIP ve 10 mg EGCG içeren KTS-PLGA NP'lerden PIP salımının 5. günün sonuna kadar artarak devam ettiği ve kümülatif PIP salımının pH 5.5' da %20' ye ulaştığı görülmektedir. Bu değer tek başına PIP içeren ortamda KTS-PLGA NP'lerden PIP salımı için pH 5.5' da elde edilen salım ile yaklaşık aynıdır. Bu durumda ortamda EGCG olmasının PIP salımını etkilemediği sonucuna varılabilir. Dış KTS tabakaya yüklenen 10 mg EGCG nin kümülatif salımı ilk 4 saatin sonunda %2,24 değerine ulaşmış bundan sonra ise 24-76. saat arasında % 2,32-%2,44 arasında çok az değişen sürekli, stabil ve kontrollü bir salım gözlenmiştir. 96-120. saatler arasında %2,05' lik sürekli ve stabil bir salım elde edilmiştir.

Shanavas ve arkadaşları Doksorubisin yüklü KTS kabuk –Dosetaksel yüklü PLGA NP' lerden ikili ilaç salım çalışması yapmışlardır. Bu çalışmada da Doksorubisin' in yükünden yararlanarak kabuk yani KTS' a elektrostatik olarak çapraz bağlama yapılmıştır. İkili ilaç sisteminde Dosetaksel salımı ve doksorubisin salımının limitli halde gerçekleştiği rapor edilmiştir [69].

PIP (mg)	EGCG (mg)	PIP Enkapsülasyon Verimi (%)	EGCG Enkapsülasyon Verimi (%)	PIP Yükleme Kapasitesi (%)	EGCG Yükleme Kapasitesi (%)
18	10	33,4	5,9	18,9	1,8

Çizelge 4.16. PIP ve EGCG salımının gerçekleştirileceği EGCG-KTS kaplı PIP-PLGA NP' lerinin özellikleri.



Şekil 4.57. PIP ve EGCG' nin EGCG-KTS kaplı PIP-PLGA NP' lerden pH:5.5'te salım profilleri.

EGCG yüklü KTS kaplı-PIP yüklü PLGA NP' lerden PIP ve EGCG salım kinetiğinin sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi, Korsmeyer Peppas, Hixson-Crowell kinetik modellerine uyumu incelenmiştir. EGCG-KTS-PIP-PLGA NP' lerden EGCG ve PIP salımının yukarıdaki modellere göre doğrusallaştırılması ile EGCG için elde edilen model grafikleri Şekiller 4.58-4.62 arasında, PIP için elde edilen model grafikler ise Şekiller 4.63-4.67 arasında verilmiştir.



Şekil 4.58. EGCG (10 mg) yüklü KTS kaplı- PIP yüklü (18 mg) PLGA NP' lerden EGCG için pH 5.5' da elde edilen sıfırıncı derece kinetik model grafiği.



Şekil 4.59. EGCG (10 mg) yüklü KTS kaplı- PIP yüklü (18 mg) PLGA NP' lerden EGCG için pH 5.5' da elde edilen birinci derece kinetik model grafiği.



Şekil 4.60. EGCG (10 mg) yüklü KTS kaplı- PIP yüklü (18 mg) PLGA NP' lerden EGCG için pH 5.5' da elde edilen Hixson-Crowell kinetik model grafiği.



Şekil 4.61. EGCG (10 mg) yüklü KTS kaplı- PIP yüklü (18 mg) PLGA NP' lerden EGCG için pH 5.5' da elde edilen sıfırıncı Korsmeyer-Peppas kinetik model grafiği.



Şekil 4.62. EGCG (10 mg) yüklü KTS kaplı- PIP yüklü (18 mg) PLGA NP' lerden EGCG için pH 5.5' da elde edilen sıfırıncı Higuchi kinetik model grafiği.



Şekil 4.63. EGCG (10 mg) yüklü KTS kaplı- PIP yüklü (18 mg) PLGA NP' lerden PIP için pH 5.5' da elde edilen sıfırıncı derece kinetik model grafiği.



Şekil 4.64. EGCG (10 mg) yüklü KTS kaplı- PIP yüklü (18 mg) PLGA NP' lerden PIP için pH 5.5' da elde edilen birinci derece kinetik model grafiği.



Şekil 4.65. EGCG (10 mg) yüklü KTS kaplı- PIP yüklü (18 mg) PLGA NP' lerden PIP için pH 5.5' da elde edilen Hixson-Crowell kinetik model grafiği.



Şekil 4.66. EGCG (10 mg) yüklü KTS kaplı- PIP yüklü (18 mg) PLGA NP' lerden PIP için pH 5.5' da elde edilen Higuchi kinetik model grafiği.



Şekil 4.67. EGCG (10 mg) yüklü KTS kaplı- PIP yüklü (18 mg) PLGA NP' lerden PIP için pH 5.5' da elde edilen Korsmeyer-Peppas kinetik model grafiği.

EGCG-KTS kaplı-PIP-PLGA NP' lerden PIP ve EGCG salımı için yukarıda verilen kinetik modellere uyumu gösteren regresyon (R²) katsayılarının değerleri Çizelge 4.17' de verilmiştir. Kinetik modellerin doğrusallaştırılması ile eğimden ve Korsmeyer-Peppas modeli için eğimden ve y-eksenini kesim noktasından elde edilen kinetik sabitlerin değerleri Çizelge 4.18'de verilmiştir.

10 mg EGCG içeren EGCG-KTS kaplı-PIP-PLGA NP'lerden EGCG salımı için en iyi uyum Korsmeyer-Peppas modeli için elde edilmiştir. Bu modeli sırasıyla Higuchi, birinci derece ve Hixson-Crowell modelleri azalan regresyon katsayıları ile takip etmektedir. Sıfırıncı derece kinetik modeli en düşük regresyon katsayısı değerine sahiptir. EGCG için kinetik modellere uyum için elde edilen bu sonuçlar PIP yüklü KTS-PLGA ve PLGA NP' lerden PIP salımı için elde edilen sonuçlar ile uyumludur. Korsmeyer-Peppas kinetik modeli ile de en yüksek uyumun sağlanması, model sabiti n' in 0,1041 değerine sahip olması ve bu değerin 0,45'ten düşük olması EGCG difüzyonunun Fick kanununa uygun olarak meydana geldiğini göstermektedir. 18 mg PIP içeren EGCG-KTS kaplı-PIP-PLGA NP'lerden PIP salımı için en iyi uyum Korsmeyer-Peppas modeli için elde edilmiştir. Ancak önceki durumlardan farklı olarak Higuchi modeline zayıf bir uyum elde edilmiştir. Bu sonuç EGCG-KTS kaplı-PIP-PLGA NP'lerden PIP salımı için ikili ilaç durumunda tek salım mekanizmasının difüzyon olmadığını göstermektedir. Nitekim PIP için yüksek uyum elde edilen Korsmeyer-Peppas modeli' nin n sabitinin değerinin 0,4728 olarak bulunmuştur. Bu değerin 0.45<n=0.89 aralığında olması ikili ilaç salımı durumunda PIP için Fickian olmayan taşınım mekanizmalarının etkili olmaya başladığını göstermektedir.

Rathee ve arkaşlarının PIP ve Nisoldipin yüklü PLGA NP' lerden ilaç salım çalışmasında verilerin Korsmeyer-Peppas modeline uyum sağladığı ve ikili ilaç yüklü sistemlerde Fickian olmayan taşınım mekanizmasının etkili olduğu gösterilmiştir [68].

NP	Sıfırıncı Derece Kinetik Modeli, R ²	Birinci Derece Kinetik Modeli, R ²	Higuchi Kinetik Modeli, R ²	Korsmeyer- Peppas Kinetik Modeli, R ²	Hixson- Crowell Kinetik Modeli, R ²
10 mg EGCG	0,7568	0,7578	0,8839	0,9735	0,7574
18 mg PIP	0,901	0,8822	0,8337	0,9554	0,8887

Çizelge 4.17. EGCG yüklü KTS-PIP yüklü PLGA NP' lerden PIP ve EGCG salımının kinetik modellere uyumu için elde edilen R² değerleri.

NP	Sıfırıncı Derece Kinetik Modeli Sabiti, K0	Birinci Derece Kinetik Modeli Sabiti, K1	Higuchi Kinetik Modeli Sabiti, KH	Korsmeyer -Peppas Kinetik Modeli Sabitleri KKP,n	Hixson- Crowell Kinetik Modeli Sabiti, KHC
10 mg EGCG	0,0147	-7E-05	0,1302	K _{KP} =0,2175 n=0,1041	0,0002
18 mg PIP	0,901	-0,0006	1,4286	K _{KP} =0,1599 n=0,4728	0,0021

Çizelge 4.18. EGCG yüklü KTS-PIP yüklü PLGA NP' lerden PIP ve EGCG salımının kinetik modellerden elde edilen sabitlerin değerleri.

5. YORUM

- PIP PLGA içerisine %65,0 enkapsülasyon verimi ve %55,4 yükleme kapasitesi ile yüklenmiştir. Bu formülasyonun nanopartikül boyutu 159,1 nm olmuştur.
- PIP yüklü PLGA NP'lerden kanı simüle eden ortamdaki pH 7.0' de en yüksek kümülatif PIP salımı %17 olarak 14. günde gerçekleşmiştir. 120 saatten sonra kontrollü, sürekli bir salım gözlenmektedir. Ani salım ilk 3 saat içerisinde gerçekleşmekte olup bu esnada PIP' in %9'u salınmıştır. Tümör mikroortamını simüle eden pH: 5.5'da ise en yüksek kümülatif PIP salımı %21 olarak 9 günde elde edilmiştir. %21 lik sabit, sürekli ve kontrollü salım değerine 48. saatte ulaşılmış olup yaklaşık 9 gün boyunca sabit bir salım elde edilmiştir. Ani salımı ise 3 saatte gözlenmiş olup kümülatif PIP salımı %12 olarak belirlenmiştir.
- PLGA NP' lerinin PIP salım kinetiğinin Higuchi ve Korsmeyer-Peppas salım kinetikleriyle en yüksek uyumu gösterdiği belirlenmiştir. PIP yüklü PLGA NP' lerden PIP salımının Higuchi modeline uyum sağlaması salımın asıl olarak difüzyon mekanziması ile oluştuğunu, Korsmeyer-Peppas kinetik modelindeki n sabitinin değeri ise Fickian difüzyon mekanizmasının geçerli olduğunu göstermiştir.
- KTS kaplı PLGA içerisine PIP enkapsülasyon verimi %66,5 ve yükleme kapasitesi %61,7 olarak elde edilmiştir. Bu sonuçların elde edildiği formülasyondaki boyut 186,5 nm olmuştur.
- PIP yüklü KTS kaplı PLGA NP' lerin kan ortamınını simüle eden pH 7.0' de en yüksek kümülatif salımının %19 olduğu ve 17 günde gerçekleştiği gözlenmiştir. Ani salım ilk 3 saatte %6 olarak gerçekleşmiştir. KTS ile kaplamanın PLGA NP' lerin ani PIP salımını düşürdüğü görülmektedir. Tümör mikroçevresini simüle eden pH:5.5' da yapılan salım çalışmasında ise 21 günde %21 kümülatif salım elde edilmiştir.

- KTS kaplı PLGA NP' lerinin PIP salım kinetiğinin Higuchi ve Korsmeyer-Peppas salım kinetikleriyle en yüksek uyumu gösterdiği belirlenmiştir. PIP salım profili Korsmeyer-Peppas kinetik modeli ile Fickian difüzyon modeli olarak tanımlanmaktadır.
- EGCG yüklü KTS kaplı PIP yüklü PLGA içerisine 30 mg PIP ve 4 mg EGCG yüklendiğinde PIP için bir maksimum enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi değerleri sırasıyla %41,5 ve %33,0 olarak elde edilmiştir. Bu partikülde EGCG için elde edilen enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi ise sırasıyla %33,0 ve %2,0 olarak bulunmuştur. Yüklenen EGCG miktarını arttırarak hem PIP hem de EGCG için en yüksek enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi elde edilen nanopartikül bileşimi ise 18 mg PIP ve 10 mg EGCG içeren EGCG-KTS-PIP-PLGA NP olarak belirlenmiştir. Bu bileşimdeki NP' de elde edilen PIP enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi sırasıyla %33,4 ve %18,9 olarak belirlenmiştir. En uygun EGCG enkapsülasyon verimi ve EGCG yükleme kapasitesi de sırasıyla %5,9 ve %1,8 olarak belirlenmiştir. Bu bileşim en uygun bileşim olarak kabul edilip ikili salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir.
- EGCG yüklü KTS kaplı PIP yüklü PLGA NP' lerden pH:5.5'de PIP salımı dış kabuğa EGCG yüklenmediği durum ile yaklaşık aynı olarak bulunmuştur. Bu da dış kabuğa EGCG yüklenmesinin PIP salımını önemli ölçüde etkilemediği şeklinde değerlendirilebilir. 10 mg EGCG içeren EGCG-KTS kaplı-PIP-PLGA NP'lerden EGCG salımı için en iyi uyum Korsmeyer-Peppas modeli için elde edilmiştir. Korsmeyer-Peppas kinetik modeli ile en yüksek uyumun sağlanması, model sabiti n' in 0,1041 değerine sahip olması ve bu değerin 0,45'ten düşük olması EGCG difüzyonunun Fick kanununa uygun olarak meydana geldiğini göstermektedir. 18 mg PIP içeren EGCG-KTS kaplı-PIP-PLGA NP'lerden PIP salımı için en iyi uyum Korsmeyer-Peppas modeli için elde edilmiştir. Ancak PIP için Korsmeyer-Peppas modeli'nin n sabitinin değerinin 0,4728 olarak bulunması, ikili ilaç salımı durumunda PIP için Fickian olmayan taşınım mekanizmalarının etkili olmaya başladığını göstermektedir.

6. KAYNAKLAR

- 1. Kumari, P., B. Ghosh, and S. Biswas, Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. Journal of Drug Targeting, (2016). 24(3): p. 179-191.
- Kumari, A., S.K. Yadav, and S.C. Yadav, Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. Colloids and surfaces B: biointerfaces, (2010). 75(1): p. 1-18.
- Al-Nemrawi, N.K., A.R. Okour, and R.H. Dave, Surface modification of PLGA nanoparticles using chitosan: Effect of molecular weight, concentration, and degree of deacetylation. Advances in Polymer Technology, (2018). 37(8): p. 3066-3075.
- Anissian, D., et al., Piperine-loaded chitosan-STPP nanoparticles reduce neuronal loss and astrocytes activation in chemical kindling model of epilepsy. International Journal of Biological Macromolecules, (2018). 107: p. 973-983.
- Cheng, Z., et al., A review on anti-cancer effect of green tea catechins. Journal of Functional Foods, (2020). 74: p. 104172.
- 6. Granja, A., M. Pinheiro, and S. Reis, Epigallocatechin Gallate Nanodelivery Systems for Cancer Therapy. Nutrients, **(2016)**. 8(5).
- Park, H., A. Otte, and K. Park, Evolution of drug delivery systems: From 1950 to 2020 and beyond. Journal of Controlled Release, (2022). 342: p. 53-65.
- Lu, J.M., et al., Current advances in research and clinical applications of PLGAbased nanotechnology. Expert Review of Molecular Diagnostics, (2009). 9(4): p. 325-341.
- 9. Chiu, H.I., et al., Cytotoxicity of targeted PLGA nanoparticles: a systematic review. Rsc Advances, (2021). 11(16): p. 9433-9449.
- Tabatabaei Mirakabad, F.S., et al., PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, (2014). 15(2): p. 517-535.
- Lai, P., et al., Overview of the preparation of organic polymeric nanoparticles for drug delivery based on gelatine, chitosan, poly(D,L-lactide-co-glycolic acid) and polyalkylcyanoacrylate. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, (2014). 118: p. 154-163.

- 12. Danhier, F., et al., PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. Journal of Controlled Release, (2012). 161(2): p. 505-522.
- Kumari, A., S.K. Yadav, and S.C. Yadav, Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, (2010). 75(1): p. 1-18.
- Acharya, S. and S.K. Sahoo, PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. Advanced Drug Delivery Reviews, (2011). 63(3): p. 170-183.
- Kim, K.T., et al., Recent Progress in the Development of Poly(lactic-co-glycolic acid)-Based Nanostructures for Cancer Imaging and Therapy. Pharmaceutics, (2019). 11(6).
- Makadia, H.K. and S.J. Siegel, Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. Polymers, (2011). 3(3): p. 1377-1397.
- Astete, C.E. and C.M. Sabliov, Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition, (2006). 17(3): p. 247-289.
- Chen, Q., et al., Photothermal therapy with immune-adjuvant nanoparticles together with checkpoint blockade for effective cancer immunotherapy. Nature Communications, (2016). 7(1): p. 13193.
- Liu, J., et al., Nanovaccine Incorporated with Hydroxychloroquine Enhances Antigen Cross-Presentation and Promotes Antitumor Immune Responses. ACS Applied Materials & Interfaces, (2018). 10(37): p. 30983-30993.
- Zhang, Q., et al., Employing ATP as a New Adjuvant Promotes the Induction of Robust Antitumor Cellular Immunity by a PLGA Nanoparticle Vaccine. ACS Applied Materials & Interfaces, (2020). 12(49): p. 54399-54414.
- Oseni, B.A., et al., Encapsulation of Andrographolide in poly(lactide-coglycolide) Nanoparticles: Formulation Optimization and in vitro Efficacy Studies. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, (2021). 9.
- 22. Yallapu, M.M., et al., Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. Journal of Colloid and Interface Science, (2010). 351(1): p. 19-29.
- 23. Akbari, E., et al., Dual drug delivery of trapoxin A and methotrexate from biocompatible PLGA-PEG polymeric nanoparticles enhanced antitumor activity

in breast cancer cell line. Journal of Drug Delivery Science and Technology, (2021). 61.

- 24. Koerner, J., et al., PLGA-particle vaccine carrying TLR3/RIG-I ligand Riboxxim synergizes with immune checkpoint blockade for effective anti-cancer immunotherapy. Nature Communications, (2021). 12(1): p. 2935.
- Zheng, H.L., et al., Nanoparticle mediated codelivery of nifuratel and doxorubicin for synergistic anticancer therapy through STAT3 inhibition. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, (2020). 193.
- Akhter, M.H., S. Kumar, and S. Nomani, Sonication tailored enhance cytotoxicity of naringenin nanoparticle in pancreatic cancer: design, optimization, and in vitro studies. Drug Development and Industrial Pharmacy, (2020). 46(4): p. 659-672.
- 27. Quinones, J.P., H. Peniche, and C. Peniche, Chitosan Based Self-Assembled Nanoparticles in Drug Delivery. Polymers, (2018). 10(3).
- Hu, L.M., Y. Sun, and Y. Wu, Advances in chitosan-based drug delivery vehicles. Nanoscale, (2013). 5(8): p. 3103-3111.
- Jhaveri, J., et al., Chitosan Nanoparticles-Insight into Properties, Functionalization and Applications in Drug Delivery and Theranostics. Molecules, (2021). 26(2).
- Esfandiarpour-Boroujeni, S., et al., Fabrication and study of curcumin loaded nanoparticles based on folate-chitosan for breast cancer therapy application. Carbohydrate Polymers, (2017). 168: p. 14-21.
- Gunasangkaran, G., et al., Preparation, Characterization, and Anticancer Efficacy of Chitosan, Chitosan Encapsulated Piperine and Probiotics (Lactobacillus plantarum (MTCC-1407), and Lactobacillus rhamnosus (MTCC-1423) Nanoparticles. BioNanoScience, (2022). 12(2): p. 527-539.
- 32. Nascimento, A.V., et al., Overcoming cisplatin resistance in non-small cell lung cancer with Mad2 silencing siRNA delivered systemically using EGFR-targeted chitosan nanoparticles. Acta Biomaterialia, (2017). 47: p. 71-80.
- Vikas, et al., Bioadhesive chitosan nanoparticles: Dual targeting and pharmacokinetic aspects for advanced lung cancer treatment. Carbohydrate Polymers, (2021). 274.
- 34. Manimaran, D., et al., Isolongifolene-loaded chitosan nanoparticles synthesis and characterization for cancer treatment. Scientific Reports, **(2022)**. 12(1).

- Fahmy, S.A., et al., PEGylated Chitosan Nanoparticles Encapsulating Ascorbic Acid and Oxaliplatin Exhibit Dramatic Apoptotic Effects against Breast Cancer Cells. Pharmaceutics, (2022). 14(2): p. 407.
- 36. Ullah, S., et al., 5-Fluorouracil-Loaded Folic-Acid-Fabricated Chitosan Nanoparticles for Site-Targeted Drug Delivery Cargo. Polymers, **(2022)**. 14(10).
- Bozorgi, A., et al., The anti-cancer effect of chitosan/resveratrol polymeric nanocomplex against triple-negative breast cancer; an in vitro assessment. Iet Nanobiotechnology.
- 38. Dhavale, R.P., et al., Chitosan coated magnetic nanoparticles as carriers of anticancer drug Telmisartan: pH-responsive controlled drug release and cytotoxicity studies. Journal of Physics and Chemistry of Solids, (2021). 148.
- Mahmoud, M.A., et al., Synthesis and characterization of berberine-loaded chitosan nanoparticles for the protection of urethane-induced lung cancer. International Journal of Pharmaceutics, (2022). 618.
- 40. Ahmad, N., et al., A Chitosan-PLGA based catechin hydrate nanoparticles used in targeting of lungs and cancer treatment. Saudi Journal of Biological Sciences, (2020). 27(9): p. 2344-2357.
- 41. Mohammed, M., et al., Chitosan surface modified PLGA nanoparticles loaded with brigatinib for the treatment of non-small cell lung cancer. Journal of Polymer Engineering, (2019). 39(10): p. 909-916.
- 42. Lu, B.T., X.K. Lv, and Y. Le, Chitosan-Modified PLGA Nanoparticles for Control-Released Drug Delivery. Polymers, (2019). 11(2).
- 43. Omar, A.I., et al., Enhanced oral bioavailability and biodistribution of atractylodin encapsulated in PLGA nanoparticle in cholangiocarcinoma. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, **(2021)**. 48(3): p. 318-328.
- 44. Aldawsari, H.M., et al., Preparation and Characterization of Chitosan Coated PLGA Nanoparticles of Resveratrol: Improved Stability, Antioxidant and Apoptotic Activities in H1299 Lung Cancer Cells. Coatings, (2020). 10(5).
- 45. Kang, B.S., et al., Enhancing the in vitro anticancer activity of albendazole incorporated into chitosan-coated PLGA nanoparticles. Carbohydrate Polymers, (2017). 159: p. 39-47.
- 46. Pitchika, S. and S.K. Sahoo, Paclitaxel and Lapatinib dual loaded chitosan-coated PLGA nanoparticles enhance cytotoxicity by circumventing MDR1-mediated
trastuzumab resistance in HER2 positive breast cancers: In-vitro and in-vivo studies. Journal of Drug Delivery Science and Technology, **(2022)**. 73.

- Alhakamy, N.A. and S. Md, Repurposing Itraconazole Loaded PLGA Nanoparticles for Improved Antitumor Efficacy in Non-Small Cell Lung Cancers. Pharmaceutics, (2019). 11(12): p. 685.
- 48. Ho, H.N., et al., Optimization and Characterization of Artesunate-Loaded Chitosan-Decorated Poly(D, L-lactide-co-glycolide) Acid Nanoparticles. Journal of Nanomaterials, (2015). 2015.
- Alshetaili, A.S., Gefitinib loaded PLGA and chitosan coated PLGA nanoparticles with magnified cytotoxicity against A549 lung cancer cell lines. Saudi Journal of Biological Sciences, (2021). 28(9): p. 5065-5073.
- Rather, R.A. and M. Bhagat, Cancer Chemoprevention and Piperine: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. Frontiers in Cell and Developmental Biology, (2018). 6.
- 51. Haq, I.-U., et al., Piperine: A review of its biological effects. Phytotherapy Research, (2021). 35(2): p. 680-700.
- Quijia, C.R. and M. Chorilli, Characteristics, Biological Properties and Analytical Methods of Piperine: A Review. Critical Reviews in Analytical Chemistry, (2020). 50(1): p. 62-77.
- 53. Gorgani, L., et al., Piperine-The Bioactive Compound of Black Pepper: From Isolation to Medicinal Formulations. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, (2017). 16(1): p. 124-140.
- 54. Zadorozhna, M., T. Tataranni, and D. Mangieri, Piperine: role in prevention and progression of cancer. Molecular Biology Reports, **(2019)**. 46(5): p. 5617-5629.
- Katiyar, S.S., et al., Co-delivery of rapamycin- and piperine-loaded polymeric nanoparticles for breast cancer treatment. Drug Delivery, (2016). 23(7): p. 2608-2616.
- 56. Farhan, M., Green Tea Catechins: Nature's Way of Preventing and Treating Cancer. International Journal of Molecular Sciences, (2022). 23(18).
- 57. Cheng, Z., et al., A review on anti-cancer effect of green tea catechins. Journal of Functional Foods, **(2020)**. 74.
- 58. Almatroodi, S.A., et al., Potential Therapeutic Targets of Epigallocatechin Gallate (EGCG), the Most Abundant Catechin in Green Tea, and Its Role in the Therapy of Various Types of Cancer. Molecules, (2020). 25(14): p. 3146.

- 59. Dash, S., et al., Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. Acta Pol Pharm, **(2010)**. 67(3): p. 217-223.
- 60. Singh, N.K., et al., UV-spectrophotometric method development for estimation of piperine in Chitrakadi Vati. Der Pharmacia Lettre, (2011). 3(3): p. 178-182.
- 61. Hong, Z., et al., Improving the effectiveness of (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) against rabbit atherosclerosis by EGCG-loaded nanoparticles prepared from chitosan and polyaspartic acid. Journal of agricultural and food chemistry, (2014). 62(52): p. 12603-12609.
- 62. Dhas, N.L., P.P. Ige, and R.R. Kudarha, Design, optimization and in-vitro study of folic acid conjugated-chitosan functionalized PLGA nanoparticle for delivery of bicalutamide in prostate cancer. Powder Technology, **(2015)**. 283: p. 234-245.
- Kaur, J., et al., Piperine-Loaded PLGA Nanoparticles as Cancer Drug Carriers. Acs Applied Nano Materials, (2021). 4(12): p. 14197-14207.
- Pachauri, M., E.D. Gupta, and P.C. Ghosh, Piperine loaded PEG-PLGA nanoparticles: Preparation, characterization and targeted delivery for adjuvant breast cancer chemotherapy. Journal of Drug Delivery Science and Technology, (2015). 29: p. 269-282.
- 65. Khan, N., et al., Chitosan coated PLGA nanoparticles amplify the ocular hypotensive effect of forskolin: Statistical design, characterization and in vivo studies. International Journal of Biological Macromolecules, (2018). 116: p. 648-663.
- 66. Moreno-Vásquez, M.J., et al., Functionalization of chitosan by a free radical reaction: Characterization, antioxidant and antibacterial potential. Carbohydrate polymers, (2017). 155: p. 117-127.
- Ozturk, A.A., et al., Diclofenac sodium loaded PLGA nanoparticles for inflammatory diseases with high anti-inflammatory properties at low dose: Formulation, characterization and in vivo HET-CAM analysis. Microvascular Research, (2020). 130.
- Rathee, P., A. Kamboj, and S. Sidhu, Enhanced oral bioavailability of nisoldipinepiperine-loaded poly-lactic-co-glycolic acid nanoparticles. Nanotechnology Reviews, (2017). 6(6): p. 517-526.
- 69. Shanavas, A., et al., Polymeric core-shell combinatorial nanomedicine for synergistic anticancer therapy. ACS omega, **(2019)**. 4(22): p. 19614-19622.

70. Gouda, R., H. Baishya, and Z. Qing, Application of mathematical models in drug release kinetics of carbidopa and levodopa ER tablets. J. Dev. Drugs, (2017). 6(02): p. 1-8.