

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

**HEDEFLENDİRİLMİŞ ANTİKANSER İLAÇ YÜKLÜ
POLİMERİK NANOTAŞIYICILARIN
FORMÜLASYONLARI VE KARAKTERİZASYONLARI**

Ecz. Naile ÖZTÜRK

**Farmasötik Teknoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2019**

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

**HEDEFLENDİRİLMİŞ ANTİKANSER İLAÇ YÜKLÜ
POLİMERİK NANOTAŞIYICILARIN FORMÜLASYONLARI VE
KARAKTERİZASYONLARI**

Ecz. Naile ÖZTÜRK

Farmasötik Teknoloji Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. İmran VURAL

ANKARA

2019

**HEDEFLENDİRİLMİŞ ANTİKANSER İLAÇ YÜKLÜ POLİMERİK NANOTAŞIYICILARIN
FORMÜLASYONLARI VE KARAKTERİZASYONLARI**

Naile Öztürk

Danışman: Prof. Dr. İmran Vural

Bu tez çalışması 06.02.2019 tarihinde jürimiz tarafından "Farmasötik Teknoloji Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Levent Öner

(Hacettepe Üniversitesi)

Üye:

Prof. Dr. Asuman Bozkır

(Ankara Üniversitesi)

Üye:

Prof. Dr. Selma Şahin

(Hacettepe Üniversitesi)

Üye:

Prof. Dr. Sevgi Takka

(Gazi Üniversitesi)

Üye:

Prof. Dr. Sibel Pehlivan

(Hacettepe Üniversitesi)



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

11 Şubat 2019


Prof. Dr. Diclehan ORHAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

06/02/2019



Naile ÖZTÜRK

“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) *Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*
- (2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*
- (3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.*
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

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



Naile Öztürk

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım boyunca bana her aşamada destek olan, bilimsel bilgisi ve tecrübelerini benimle paylaşan, sonsuz sabrı ve sevgisi ile bana çalışmalarımda ve hayatta rehberlik eden, bilimsel yönü kadar insani değerlerini de örnek aldığım ve beraber çalışmaktan onur duyduğum kıymetli hocam Sn. Prof. Dr. İmran Vural'a teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için her türlü imkânı sağlayan Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı başkanları Sn. Prof. Dr. Sema Çalış ve Sn. Prof. Dr. Levent Öner'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca bilimsel ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Sn. Prof. Dr. Asuman Bozkır ve Sn. Prof. Dr. Sibel Bozdağ Pehlivan'a teşekkürlerimi sunarım. Değerli hocam Sn. Prof. Dr. Selma Şahin'e çalışmalarım boyunca desteğini hissettirdiği için teşekkür ederim. Tez çalışmalarımda kullandığım polimerlerin sentezi ve karakterizasyonunu gerçekleştiren TÜBİTAK MAM ekibi Sn. Dr. Özgür Yılmaz, Sevgi Gülyüz ve Umut Uğur Özköse'ye teşekkür ederim. Tez çalışmalarımda kullandığım hedefleyici peptit ile ilgili ön çalışmaları yapan Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nden Sn. Prof. Dr. Dilek TELCİ'ye ve öğrencilerine teşekkürlerimi sunarım. Tezimde floresan spektroskopisi çalışmaları için her daim güler yüzle yardımlarını gördüğüm Dr. Ecz. Duygu Paşlı'ya teşekkürlerimi sunarım.

Doktora çalışmalarımız boyunca birlikte çalıştığım sevgili arkadaşım Dr. Bio. Aslı Kara'ya tez çalışmalarımız sırasında gösterdiği desteği, sabrı ve dostluğu için teşekkür ederim. Doktora sürecinde her zaman desteklerini hissettiğim Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Gülsün İnal, Dr. Ecz. Selin Seda Timur, Dr. Ecz. Yağmur Akdağ Çaylı, Dr. Öğr. Üyesi Kıvılcım Öztürk Atar, Dr. Ecz. Dilara Örgül, Ecz. Sedenay Akbaş, Ecz. Nihan İzat, Ecz. Ayşe Genç'er'e arkadaşlıkları için teşekkür ederim. Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarıma, tüm diğer arkadaşlarıma ve teknisyenimiz Orhan Çelik'e teşekkürlerimi sunarım. Sevgili arkadaşım Sonay Caner'e tez süreci boyunca verdiği manevi destek ve arkadaşlığı için teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımı yürütmem için proje desteği sağlayan TÜBİTAK'a (Proje No:213M728) teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde büyük emekleri olan, beni her zaman destekleyen ve cesaretlendiren ve sonsuz sevgilerini her zaman hissettiren anneme, babama ve kardeşlerim Semra ve Neşe'ye kalpten teşekkür ederim.

ÖZET

Öztürk, N., Hedeflendirilmiş Antikanser İlaç Yüklü Polimerik Nanotaşıyıcıların Formülasyonları ve Karakterizasyonları, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2019. Kanser kemoterapisinde kullanılan ilaçların hastalıklı bölge ile sağlıklı bölge arasında bir ayırım gözetmeden dağılımı, sağlıklı dokunun da zarar görmesine neden olmaktadır. Hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler ile kanser tedavisinde kullanılan ilaçların seçici bir şekilde hastalıklı bölgede biriktirilmesi ve bu şekilde sağlıklı dokuların zarar görmemesi amaçlanmaktadır. Doksorubisin kardiyotoksisite gibi ciddi yan etkileri olan antikanser bir ilaçtır. Bu çalışmada meme kanseri hücrelerini hedefleyen peptit-18 ligandı konjuge edilmiş pH duyarlı polimerik misellere doksorubisinin enkapsüle edilmesi ile pasif ve aktif hedeflendirilmiş yeni bir ilaç taşıyıcı sistemin formülasyonu ve karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır. “Görünmezlik etkisi” ve biyouyumluluk özellikleri nedeniyle, polimerik misellerin formülasyonunda poli (2-etil-2-oksazolin), poli (etilen glikol) 'e alternatif olarak kullanılmıştır. pH duyarlı gruplar olan poli(2-etil-2-oksazolin) ve katyonik poli(etilenimin) polimerlerini yapısında barındıran poli(2-etil-2-oksazolin)-b-poli(ϵ -kaprolakton) ile poli(2-etil-2-oksazolin)-ko-poli(etilenimin)-b-poli(ϵ -kaprolakton) polimerleri kullanılarak hazırlanan doksorubisin enkapsüle edilmiş miseller, kritik misel konsantrasyonu, misel büyüklüğü, zeta potansiyel, enkapsülasyon etkinliği, in vitro salım, kolloidal stabilite çalışmaları ile karakterize edilmişlerdir. Hazırlanan formülasyonlar hücre kültüründe L929 fibroblast hücreleri ile biyouyumluluk açısından değerlendirilmiş, MCF-7 ve SKBR-3 meme kanseri hücreleri ile antikanser etkinlikleri açısından değerlendirilmişlerdir. Bu çalışmada hazırlanan polimerik miseller yüksek miktarda doksorubisini enkapsüle edebilen, nötral koşullarda (pH 7,4, kan dolaşımı) kararlı iken, asidik koşullarda (tümör dokusu ve hücreleri) daha yüksek doksorubisin salımı sağlayan, MCF-7 ve SKBR-3 meme kanseri hücreleri üzerinde antikanser etkisi gösterilmiş, pasif ve aktif hedeflendirilmiş formülasyonlardır. Elde edilen sonuçlar, daha etkin bir kanser tedavisinde kullanılma potansiyeli olan, yeni bir ilaç taşıyıcı sistemin geliştirildiğini ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: Polimerik miseller, doksorubisin, hedeflendirilmiş sistemler, poli(2-etil-2-oksazolin), hücre kültürü

Bu çalışma TÜBİTAK 1003 (Proje numarası:213M728) kapsamında desteklenmiştir.

ABSTRACT

Öztürk N., Formulation and Characterization of Anticancer Drug Loaded Targeted Polymeric Nanocarriers, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Doctor of Philosophy Thesis in Pharmaceutical Technology, Ankara, 2019. The distribution of the drugs used in cancer chemotherapy without distinction between the diseased area and the healthy area causes damage to healthy tissue. By using targeted drug delivery systems it is intended to selectively accumulate cancer chemotherapy drugs at the diseased site, thus preventing healthy tissue damaging. Doxorubicin is an anticancer drug with serious side effects such as cardiotoxicity. In this study it was aimed to formulate and characterize a passive and active targeted drug delivery system by encapsulating doxorubicin to pH-sensitive polymeric micelles and by conjugating these micelles to peptide-18 which targets breast cancer cells. Due to its “stealth effect” and biocompatibility properties, poly(2-ethyl-2-oxazoline) was used as an alternative to poly(ethylene glycol) in the formulation of polymeric micelles. pH-sensitive poly(2-ethyl-2-oxazoline) and cationic poly(ethylenimine) containing block copolymers poly(2-ethyl-2-oxazoline)-b-poly(ϵ -caprolactone) and poly(2-ethyl-2-oxazoline)-co-poly(ethylenimine)-b-poly(ϵ -caprolactone) were used for the preparation of doxorubicin loaded micelles. In vitro characterization studies such as micelle size, zeta potential, encapsulation efficiency, in vitro pH sensitive release studies and colloidal stability studies were performed for these formulations. Prepared formulations were evaluated in terms of biocompatibility with L929 fibroblast cells in cell culture and evaluated for their anticancer activity with MCF-7 and SKBR-3 breast cancer cells. Polymeric micelles prepared in this study are passive and active targeted formulations. They are able to encapsulate a large amount of doxorubicin, and are stable in neutral conditions (pH 7.4, blood circulation), while providing higher doxorubicin release in acidic conditions (tumor tissue and cells) and their anticancer effect is shown on MCF-7 and SKBR-3 breast cancer cells. The results showed that a new drug delivery system was developed which has the potential to be used for a more effective cancer treatment.

Key words: Polymeric micelles, doxorubicine, targeted systems, poly (2-ethyl-2) oxazoline), cell culture

This study was supported by grant 213M728 from TÜBİTAK.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
ŞEKİLLER	xvi
TABLolar	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser	4
2.2. Doksorubisin	5
2.3. Nanoteknoloji ve İlaç Taşıyıcı Sistemler	7
2.4. Polimerik Miseller	8
2.5. Polimerik Misellerin Bileşimi ve Yapısı	9
2.6. Polimerik Misellerin Tipik Özellikleri	11
2.6.1. Misel Büyüklüğü	11
2.6.2. İlaç Salımı	14
2.6.3. Uyaran Duyarlı Polimerik Miseller ve Seçici İlaç Salımı	18
2.6.4. Misel Stabilitesi	25
2.7. Misel Hazırlama ve Misellere İlaç Yükleme Yöntemleri	27
2.7.1. Doğrudan Çözünme	27
2.7.2. Diyaliz	28
2.7.3. Yağ/Su Emülsiyonu	28

2.7.4. Çözücü Buharlaştırma	14
2.7.5. Film Hidratasyonu	29
2.7.6. Dondurarak Kurutma	29
2.7.7. Misellerin Saflaştırılması	29
2.8. Misellerin karakterizasyonu	30
2.8.1. Kritik Misel Konsantrasyonu	30
2.8.2. Morfoloji	32
2.8.3. Partikül Büyüklüğü ve Molekül Ağırlığı	33
2.9. RES'ten Kaçış ve Kanda Kalış Süresinin Uzatılması	33
2.10. Pasif ve Aktif Hedeflendirme	35
2.10.1. Pasif Hedeflendirme	35
2.10.2. Aktif Hedeflendirme	37
2.11. Misellerin Hücresel Alımı	40
2.12. Poli(Oksazolin)ler ve Kanser Tedavisinde Polimerik Misel Olarak Uygulamaları	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM	45
3.1. Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Maddeler	45
3.2. Kullanılan Cihazlar	46
3.3. Misel Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler	48
3.3.1. PEtOx-b-PCL Polimerlerinin Sentezi	49
3.3.2. PEtOx-ko-PEI-b-PCL Polimerlerinin Sentezi	51
3.3.3. Peptit-18 Konjuge Edilmiş PEtOx-ko-PEI-b-PCL Polimerinin Sentezi	53
3.4. Doksorubisinin Fizikokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi	54
3.4.1. Doksorubisinin FT-IR Spektrumu	54
3.4.2. Doksorubisinin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi	54
3.4.3. Doksorubisinin UV Spektrumu	54
3.5. Doksorubisinin UV-Görünür Bölge Spektroskopisi ile Miktar Tayini	54
3.6. Analitik Yöntem Validasyonu	55
3.7. Misel Formülasyonlarının Hazırlanışı ve Misellere Doksorubisin Yüklenmesi	57

3.7.1. Uygun Polimer Molekül Ağırlığının Belirlenmesi İçin PEtOx-b-PCL Polimerleri ile Yapılan Ön Çalışmalar	57
3.7.2. Etkin Madde İçermeyen Misellerin Hazırlanışı	60
3.7.3. Doksorubisin Enkapsüle Edilmiş Misellerin Hazırlanışı	60
3.7.4. Peptit-18 ile Modifiye Edilmiş Misellerin Hazırlanışı	63
3.8. Misel Formülasyonlarının Karakterizasyonu	64
3.8.1. Kritik Misel Konsantrasyonunun Belirlenmesi	64
3.8.2. Misel Oluşumunun ¹ H-NMR ile Doğrulanması	64
3.8.3. Misellerin Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Ölçümleri	65
3.8.4. Doksorubisinin Misellere Yükleme Etkinliği	65
3.8.5. Doksorubisinin Misellerden İn Vitro Salımı	65
3.8.6. Misellerin TEM ile Görüntülenmesi	66
3.8.7. Misel Formülasyonlarının Stabilitesi	66
3.9. Hücre Kültürü Çalışmaları	66
3.9.1. Etkin Madde İçermeyen Misellerin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Araştırılması	66
3.9.2. Doksorubisin Yüklü Misellerin Sitotoksitesinin Araştırılması	67
3.9.3. Doksorubisin Yüklü Misellerin Hücresel Alımının Floresan Mikroskop İle İncelenmesi	68
3.9.4. Peptit İle Hedeflendirilmiş Doksorubisin Yüklü Misellerin Hücresel Alımının Akış Sitometrisi İle İncelenmesi	69
3.10. İstatiksel Analiz	69
4. BULGULAR	70
4.1. Polimerlerin Sentezi ve ¹ H-NMR ile Karakterizasyonu	70
4.2. Doksorubisinin Fizikokimyasal Özellikleri	74
4.2.1. Doksorubisinin FT-IR Spektrumu	74
4.2.2. Doksorubisinin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi	76
4.2.3. Doksorubisinin UV Spektrumu	76
4.3. Doksorubisinin UV-Görünür Bölge Spektroskopisi ile Miktar Tayini	77
4.4. Misel Formülasyonlarının Hazırlanışı	80
4.4.1. PEtOx-b-PCL Polimerleri ile Yapılan Ön Çalışmalar	80
4.4.2. Etkin Madde İçermeyen Misellerin Hazırlanışı	83

4.4.3. Dokсорubisin Enkapsüle Edilmiş Misellerin Hazırlanışı	83
4.4.4. Peptit-18 ile Modifiye Edilmiş Misellerin Hazırlanışı	83
4.5. Misel Formülasyonlarının Karakterizasyonu	84
4.5.1. Kritik Misel Konsantrasyonunun Belirlenmesi	84
4.5.2. Misel Oluşumunun ¹ H-NMR ile Doğrulanması	86
4.5.3. Misellerin Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Ölçümleri	92
4.5.4. Dokсорubisinin Misellere Yükleme Etkinliği	95
4.5.5. Dokсорubisinin Misellerden İn Vitro Salımı	97
4.5.6. Misellerin TEM ile Görüntülenmesi	101
4.5.7. Misel Formülasyonlarının Stabilitesi	104
4.6. Hücre Kültürü Çalışmaları	107
4.6.1. Etkin Madde İçermeyen Misellerin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Araştırılması	107
4.6.2. Dokсорubisin Yüklü Misellerin Sitotoksitesinin Araştırılması	109
4.6.3. Dokсорubisin Yüklü Misellerin Hücresel Alımının Floresan Mikroskop İle İncelenmesi	119
4.6.4. Peptit İle Hedeflendirilmiş Dokсорubisin Yüklü Misellerin Hücresel Alımının Akış Sitometrisi İle İncelenmesi	122
5. TARTIŞMA	124
5.1. Misel Hazırlanmasında Kullanılan Polimerlerin ¹ H-NMR ile Karakterizasyonu	124
5.2. Dokсорubisinin Fizikokimyasal Özellikleri	125
5.3. Dokсорubisinin UV-Görünür Bölge Spektroskopisi ile Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonu	126
5.3.1. Analitik Validasyon	127
5.4. PEtOx-b-PCL Polimerleri ile Yapılan Ön Çalışmalar	128
5.5. Misel Formülasyonlarının Hazırlanışı ve Misellere Dokсорubisin Yüklenmesi	129
5.6. Misel Formülasyonlarının Karakterizasyonu	130
5.6.1. Kritik Misel Konsantrasyonunun Belirlenmesi	130
5.6.2. Misel Oluşumunun ¹ H-NMR ile Doğrulanması	132
5.6.3. Misellerin Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Ölçümleri	132

5.6.4. Doksorubisinin Misellere Yükleme Etkinliği	138
5.6.5. Doksorubisinin Misellerden İn Vitro Salımı	140
5.6.6. Misellerin TEM ile Görüntülenmesi	141
5.6.7. Misel Formülasyonlarının Stabilitesi	141
5.7. Hücre Kültürü Çalışmaları	142
5.7.1. Etkin Madde İçermeyen Misellerin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Araştırılması	142
5.7.2. Doksorubisin Yüklü Misellerin Sitotoksitesinin Araştırılması	144
5.7.3. Doksorubisin Yüklü Misellerin Hücresel Alımının Floresan Mikroskop İle İncelenmesi	146
5.7.4. Peptit İle Hedeflendirilmiş Doksorubisin Yüklü Misellerin Hücresel Alımının Akış Sitometrisi İle İncelenmesi	146
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	148
7. KAYNAKLAR	151
8. EKLER	
EK-1: Turnitin Dijital Makbuz	
EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

¹H-NMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans
ABC	Hızlandırılmış Kan Klerensi (Accelerated Blood Clearance)
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
AUC	Eğri Altında Kalan Alan
CMC	Kritik Misel Konsantrasyonu
DCM	Diklorometan
DMF	Dimetil Formamit
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DSPE-PEG-2000	1,2-Distearoil-Sn-Glisero-3-Fosfoetanolamin-Polietilen Glikol-2000
EPR	Artmış Geçiş ve Tutulma
FBS	Fetal Sığır Serumumu
GPC	Jel Permeasyon Kromatografisi
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
KRT 1	Keratin 1
LOD	Teşhis Alt Sınırı
LOQ	Tayin Alt Sınırı
mTHPC	Meta-Tetra(Hidroksifenil)Klorin
MTT	Thiazolil Mavisi Tetrazolyum Bromür
PBS	Fosfat Tamponlanmış Tuz Çözeltisi
PBuOx	Poli(2-Bütil-2-Oksazolin)
PCL	Poli(ϵ -Kaprolakton)
PEG	Polietilen Glikol
PEO-PCL	Poli(Etilen Oksit)-b-Poli(ϵ -Kaprolakton)
PEtOx-b-PCL	Poli(2-Etil-2-Oksazolin)-b-Poli(E-Kaprolakton)
PEtOx-ko-PEI-b-	Poli(2-Etil-2-Oksazolin)-ko-Poli(Etilenimin)-b-Poli(ϵ -
PCL	Kaprolakton)
PLA	Poli(Laktik Asit)
PMeOx	Poli(2-Metil-2-Oksazolin)
POx	Poli(2-Oksazolin)

RES	Retiküloendotelyal Sistem
SANS	Küçük Açılı Nötron Saçılımı
SAXS	Küçük Açılı X Işını Saçılımı
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SLS	Statik Işık Saçılımı
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
T_g	Camsı Geçiş Sıcaklığı
THF	Tetrahidrofur

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Doksorubisin Hidroklorür'ün yapısı.	5
2.2. Misellerin çekirdek-kabuk yapısı.	9
3.1. PEtOx-b-PCL polimerinin sentez reaksiyon şeması.	50
3.2. PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerinin sentez reaksiyon şeması.	52
3.3. Peptit-18 konjuge edilmiş PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerinin sentez reaksiyon şeması.	53
3.4. Doksorubisin yüklü misellerin film yöntemi ile hazırlanışı.	62
3.5. Doksorubisin yüklü misellerin yağ/su emülsiyonu yöntemi ile hazırlanışı.	62
4.1. PEtOx-b-PCL (P7) polimerine ait ¹ H-NMR spektrumu.	71
4.2. PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerlerine ait ¹ H-NMR spektrumları, A: P7-30, B:P7-60, C:P7-70.	72
4.3. Peptit 18-PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerinin ¹ H-NMR spektrumu.	74
4.4. Doksorubisinin FT-IR spektrumu.	75
4.5. Doksorubisin Hidroklorürün DSC termogramı.	76
4.6. Doksorubisin Hidroklorürün sudaki çözeltisinin UV spektrumu.	76
4.7. DMSO içindeki doksorubisin HCl ve doksorubisin baz çözeltilerinin UV spektrumları.	77
4.8. Doksorubisin hidroklorürün DMSO içindeki kalibrasyon doğrusu ve denklemi ($X \pm SS$, n=6).	78
4.9. Polimerlerin (P7, P7-30, P7-60, P7-70 kodlu) ve doksorubisin hidroklorürün DMSO içindeki spektrumları.	80
4.10. Pirenin eksitasyon spektrumu, A:suda, B: misel dispersiyonu içinde.	84
4.11. P7, P7-30, P7-60, P7-70 kodlu polimerlerin oluşturduğu misellerin konsantrasyona karşı $I_{336/332}$ grafiği ($X \pm SS$, n=3).	85

4.12.	P7 kodlu polimerin ¹ H-NMR spektrumları, A: CDCl ₃ ve B: D ₂ O içinde.	87
4.13.	P7-30 kodlu polimerin ¹ H-NMR spektrumları, A: CDCl ₃ ve B: D ₂ O içinde.	89
4.14.	P7-60 kodlu polimerin ¹ H-NMR spektrumları, A: CDCl ₃ ve B: D ₂ O içinde.	90
4.15.	P7-70 kodlu polimerin ¹ H-NMR spektrumları, A: CDCl ₃ ve B: D ₂ O içinde.	91
4.16.	pH 5 ve pH 7,4 tampon çözeltilerinde F7 formülasyonundan doksorubisinin salım profili (X±SH, n=3).	98
4.17.	pH 5 ve pH 7,4 tampon çözeltilerinde F9 formülasyonundan doksorubisinin salım profili (X±SH, n=3).	99
4.18.	pH 5 ve pH 7,4 tampon çözeltilerinde F12 formülasyonundan doksorubisinin salım profili (X±SH, n=3).	100
4.19.	pH 5 ve pH 7,4 tampon çözeltilerinde F15 formülasyonundan doksorubisinin salım profili (X±SH, n=3).	100
4.20.	pH 5 ve pH 7,4 tampon çözeltilerinde peptit-18 ile hedeflendirilmiş misel formülasyonundan doksorubisinin salım profili (X±SH, n=3).	101
4.21.	P7 ve P7-30 polimerleri ile hazırlanan misellerin TEM görüntüleri. 1A:P7 polimeri ile hazırlanan boş misel, 1B: P7 polimeri ile hazırlanan doksorubisin yüklü misel, 2A:P7-30 polimeri ile hazırlanan boş misel, 2B: P7-30 polimeri ile hazırlanan doksorubisin yüklü misel.	102
4.22.	P7-60 ve P7-70 polimerleri ile hazırlanan misellerin TEM görüntüleri. 1A:P7-60 polimeri ile hazırlanan boş misel, 1B: P7-60 polimeri ile hazırlanan doksorubisin yüklü misel, 2A:P7-70 polimeri ile hazırlanan boş misel, 2B: P7-70 polimeri ile hazırlanan doksorubisin yüklü misel.	103
4.23.	Peptit-18 ile hedeflendirilmiş misellerin TEM görüntüleri. A: Boş misel, B: Doksorubisin yüklü misel.	104
4.24.	%10 FBS içeren PBS ortamında misellerin büyüklüklerindeki değişim. Peptit-18: Peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü misel formülasyonunu ifade etmektedir. (X±SS, n=3).	105
4.25.	Peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü miselin 4 °C'deki kolloidal stabilitesi (X±SS, n=3).	106

- 4.26.** Peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü miselin 25 °C'deki kolloidal stabilitesi ($X \pm SS$, $n=3$). 106
- 4.27.** Etkin madde içermeyen misel formülasyonlarının L929 hücre canlılığı üzerine 24 saatlik etkileri ($X \pm SH$, $n=3$). 108
- 4.28.** Etkin madde içermeyen misel formülasyonlarının L929 hücre canlılığı üzerine 48 saatlik etkileri ($X \pm SH$, $n=3$). 108
- 4.29.** Etkin madde içermeyen misel formülasyonlarının L929 hücre canlılığı üzerine 72 saatlik etkileri ($X \pm SH$, $n=3$). 109
- 4.30.** Hedeflendirilmemiş misel formülasyonlarının MCF-7 hücre canlılığı üzerine 24 saatlik etkileri ($X \pm SH$, $n=3$). 112
- 4.31.** Hedeflendirilmemiş misel formülasyonlarının MCF-7 hücre canlılığı üzerine 48 saatlik etkileri ($X \pm SH$, $n=3$). 113
- 4.32.** Hedeflendirilmemiş misel formülasyonlarının MCF-7 hücre canlılığı üzerine 72 saatlik etkileri ($X \pm SH$, $n=3$). 114
- 4.33.** Hedeflendirilmiş misel formülasyonlarının MCF-7 hücre canlılığı üzerine A:24, B:48, C:72 saatlik etkileri ($X \pm SH$, $n=3$). 116
- 4.34.** Hedeflendirilmiş misel formülasyonlarının SKBR-3 hücre canlılığı üzerine A:24, B:48, C:72 saatlik etkileri ($X \pm SH$, $n=3$). 118
- 4.35.** F7 (A), F9 (B), F12 (C), F15 (D) formülasyonlarının ve doksorubisin çözeltisinin (E) hücre alımının floresan mikroskobu ile gösterilmesi. 120
- 4.36.** Peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü misel formülasyonu ile doksorubisin çözeltisinin hücre alımının MCF-7 ve SKBR-3 hücrelerinde floresan mikroskobu ile gösterimi. MCF-7 hücresi ile alınan görüntüler A: peptit-18 ile hedeflendirilmiş misel B: doksorubisin çözeltisi, SKBR-3 hücresi ile alınan görüntüler C: peptit-18 ile hedeflendirilmiş misel D: doksorubisin çözeltisi. 121
- 4.37.** Misel formülasyonları ve doksorubisin çözeltisinin MCF-7 ve SKBR-3 hücrelerindeki düzeltilmiş toplam hücre floresanı. 122
- 4.38.** Peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü misellerin L929, MCF-7 ve SKBR-3 hücrelerinin içine alınıp yüzdeleri. 123

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Uyararı duyarlı polimerik misel örnekleri.	21
3.1. Sentezlenen PEtOx-b-PCL polimerlerinin molekül ağırlıkları.	48
3.2. PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerlerinin molekül ağırlıkları.	49
3.3. Doksorubisin enkasüle edilmiş formülasyonların bileşimi.	63
4.1. Doksorubisin Hidroklorürün spektrofotometrik miktar tayini yönteminde elde edilen gün içi doğruluk ve kesinlik bulguları (n=3).	79
4.2. Doksorubisin Hidroklorürün spektrofotometrik miktar tayini yönteminde elde edilen günler arası doğruluk ve kesinlik bulguları (n=3).	79
4.3. Diyaliz ile saflaştırmanın PEtOx-b-PCL misellerinin büyüklüğüne etkisi (n=3, X±SS).	81
4.4. Farklı yöntemlerle hazırlanan PEtOx-b-PCL misellerinin büyüklük ve zeta potansiyel ölçüm sonuçları (n=3, X±SS).	82
4.5. İnce film hidratasyonu yöntemiyle hazırlanan etkin madde içermeyen misellerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel bulguları (X±SS, n=3).	92
4.6. İnce film hidratasyonu yöntemi ile hazırlanmış doksorubisin yüklü misellerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel bulguları (X±SS, n=3).	93
4.7. Yağ/su emülsiyonu yöntemi ile hazırlanmış doksorubisin yüklü misellerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel bulguları (X±SS, n=3).	94
4.8. Peptit-18 ile hedeflendirilmiş misellerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel bulguları (X±SS, n=3).	95
4.9. İnce film hidratasyonu yöntemi ile hazırlanmış doksorubisin yüklü misellerin enkasülasyon etkinliği ve etkin madde yükleme kapasitesi bulguları (X±SS, n=3).	96
4.10. Yağ/su emülsiyonu yöntemi ile hazırlanmış doksorubisin yüklü misellerin enkasülasyon etkinliği ve etkin madde yükleme kapasitesi bulguları (X±SS, n=3).	97

- 4.11.** Peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü misellerin enkapsülasyon etkinliği ve etkin madde yükleme kapasitesi bulguları ($\bar{X} \pm SS$, n=3).

1. GİRİŞ

Kanser tüm dünyada önde gelen ölüm sebeplerinden biridir. Kanser tedavisinde kullanılan yöntemler genel olarak cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi olarak sınıflandırılabilir. Bu üç yöntem kadar geniş ölçüde olmasa da hormonal tedaviler, kök hücre nakli, immünoterapi ve hedefe yönelik tedaviler (küçük moleküller ve monoklonal antikorlar) de kanser tedavisinde kullanılmaktadır (1, 2). Kemoterapi ve radyoterapi ile amaçlanan, sağlıklı hücrelere göre çok daha hızlı büyümeleri nedeniyle ilaçlara ve radyasyona karşı daha duyarlı olan tümör hücrelerinin öldürülmesidir. Etkili bir tedavi için, tedavi yönteminin kanser hücrelerini hedefleyip öldürmesi ve mümkün olduğunca az sağlıklı hücreyi etkilemesi gerekmektedir (3).

Kanser kemoterapisinde kullanılan konvansiyonel ilaçların, sağlıklı dokularda toksisite göstermeleri, düşük stabiliteye sahip olmaları ve ilaç direnci gelişmesi gibi kullanımlarını sınırlayıcı özelliklere sahip olmaları yeni tedavi yöntemlerinin araştırılmasını gerekli kılmaktadır. Nanometre boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler (nanotaşıyıcılar) kullanılarak pasif ve aktif hedeflendirme yoluyla kemoterapötik ilaçların tümör bölgesinde birikmesi sağlanıp, sağlıklı dokulardaki miktarı azaltılabilir. İlaçlar bu sistemlere yüklenerek degradasyondan korunabilir ve stabiliteleri artırılabilir. İlaç taşıyıcı sistem içine yüklenmiş etkin maddenin, hücre içine alımı değiştirilerek tümör hücrelerinde etkin maddeye karşı gelişen direnç aşılabılır.

Polimerik miseller hidrofobik çekirdek ve hidrofilik kabuk yapısına sahip nanometre boyutlu (genellikle <100 nm) ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Polimerik misellerin doğasından kaynaklı bu hidrofobik çekirdek yapısı, özellikle suda çözünürlüğü düşük etkin maddelerin, misellere hapsedilmesi ve çözünürlüklerinin sağlanması açısından faydalıdır. Polimerik miseller etkin maddeleri dış ortamdan koruyarak serbest etkin maddeye göre daha iyi bir stabilite sağlar ve etki bölgesine varmadan etkin maddenin biyolojik ortamla zamansız etkileşimini önlerler. Pasif hedeflendirmenin temelini oluşturan, artmış geçiş ve tutulma etkisi (EPR), tümör bölgesindeki kan damarlarının belirli boyuttaki makromoleküllere veya partiküllere karşı geçirgen olması ve bu bölgeden lenfatik drenajın yetersiz olması ile tanımlanır. EPR etkisi ile etkin madde

yüklü polimerik miseller tümör dokularında birikip, sağlıklı dokuya dağılmazlar ve böylece sistemik toksik etkileri azaltılarak, daha etkili bir tedavi sağlayabilirler. Polimerik misellerin EPR etkisi ile tümör dokusunda birikebilmesi için küçük partikül büyüklüğüne (<200nm) sahip olması ve kan dolaşımında kalış süresinin uzatılmış olması gerekmektedir. Kanda kalış süresinin uzatılması için misellerin retikuloendotelyal sistem (RES) tarafından tanınmaması, tutulmaması ve glomerüler filtrasyonla atılmaması gerekmektedir. Polimerik misel büyüklüğünün 6 nm'den büyük olması ve suda çözünen polimerler için, glomerüler filtrasyonu sınırlayan molekül ağırlığı eşiği 45 kDa'dan daha büyük molekül ağırlığına sahip polimerler ile misel hazırlanması, glomerüler filtrasyon ile atılımı azaltmayı veya önlemeyi sağlayabilir (4, 5). Polietilen glikol (PEG) gibi hidrofilik polimerlerin, miselleri oluşturan amfifilik polimerlerin yapısında yer alması ve misel büyüklüğünün 200 nm'den küçük olması RES tarafından tanınmayı önleyebilir.

PEG, RES tarafından tanınmayı önlemek amacıyla pek çok nanotaşıyıcıda kullanılmıştır ve polimerik misellerde de sıklıkla hidrofilik blok olarak kullanılmıştır. İlaç taşıyıcı sistemlere “görünmezlik” sağlayan PEG, her ne kadar bu alanda altın standart olsa da bazı çalışmalarda bildirilen; biyobozunur olmaması nedeniyle vucutta birikmesi, böbrek atılım sınırının belirsiz olması, tekrarlanan enjeksiyonlardan sonra immün yanıt ve hızlandırılmış kan klerensinin (ABC, accelerated blood clearance) görülmesi gibi sınırlamalara sahiptir (6, 7). PEG'e alternatif olarak son yıllarda poli(2-oksazolin) (POx) türevi polimerlerin biyomedikal alanda kullanımı araştırılmaktadır. Yapılan çalışmalar POx türevi polimerlerin fizikokimyasal özellikler, farmakokinetik özellikler ve in vitro sitotoksosite açısından PEG ile karşılaştırılabilir özelliklere sahip olduğunu göstermiştir (8).

Kanserli dokuya ilaç taşınmasını daha etkili kılmak için diğer bir yöntem aktif hedeflendirmedir. Bu hedeflendirmenin amacı, hedef bölgeye ulaşıldığında sadece tümör hücreleri ile ilaç taşıyıcı sistemin etkileşime girmesini sağlamaktır. Bu amaçla monoklonal antikorlar ve peptitler gibi hücreyi tanıyan ligandlar kullanılabilir. Bu ligandlar ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanıldıklarında hedef hücrelere etkin madde taşınması sağlanır ve sağlıklı dokularda etkin madde birikimi azaltılabilir.

Uyarıcı duyarlı ilaç taşıyıcı sistemler kullanılarak, belirli uyarıcı koşullar sağlandığında etkin madde salımının gerçekleşmesi daha etkili bir tedavi için

araştırılan yaklaşımlardan biridir. Redoks, pH, sıcaklık gibi uyarılara duyarlı ilaç taşıyıcı sistemler tasarlanarak hedef bölgede ve/veya hedef hücre içinde etkin madde salımı amaçlanmaktadır. Tümör dokularında artmış aerobik glikoliz sonucu çoğu tümörün mikroçevresi asidiktir ve endozomlarda ve lizozomlarda daha asidik bir pH mevcuttur. Buna karşın kanda ve normal dokularda pH değeri 7,4'tür. Bu pH farkından yararlanılarak kanser tedavisi için, nötral koşullarda dayanıklı ve hafif asidik koşullara duyarlı ilaç taşıyıcı sistemler tasarlanmaktadır.

Bu tez çalışmasında nötral koşullarda (kan dolaşımı) dayanıklı iken, asidik koşullarda daha fazla salım yapan ve böylece hedef tümör dokusu ve hücrelerinde etkin maddenin salımını sağlayan, pasif hedeflendirilmiş ve aynı zamanda taşıyıcı sisteme hedef doku hücrelerini tanıyan peptit bağlanarak aktif hedeflendirilmiş, yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ile daha etkin bir kanser tedavisi sağlanabileceği hipotezi öne sürülmüştür.

Tez çalışmasında bu hipotezin doğruluğunu araştırmak üzere TÜBİTAK MAM Malzeme Enstitüsünde sentezlenen poli(2-etil-2-oksazolin)-b-poli(ϵ -kaprolakton) (PEtOx-b-PCL), poli(2-etil-2-oksazolin)-ko-poli(etilenimin)-b-poli(ϵ -kaprolakton) (PEtOx-ko-PEI-b-PCL) kopolimerleri kullanılarak doksorubisin yüklü polimerik misel formülasyonlarının geliştirilmesi ve belirlenen en uygun formülasyonun peptit-18 bağlanarak aktif hedeflendirilmesi amaçlanmıştır. Hazırlanan misel formülasyonları üzerinde partikül büyüklüğü, zeta potansiyel, ilaç yükleme kapasitesi, in vitro salım, in vitro hücre kültürü çalışmaları yapılarak formülasyonların etkinliği değerlendirilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser anormal hücrelerin normal sınırlarının ötesinde büyümesi ve sonrasında vücuttaki bitişik kısımları istila edebilmesi ve/veya diğer organlara yayılabilmesi ile karakterize edilen geniş bir hastalık grubu için kullanılan genel bir terimdir (9). Tütün kullanımı, karsinojenik enfeksiyonlar, düşük sebze ve meyve alımı, alkol kullanımı, fiziksel inaktivite, obezite, hava kirliliği ve ev içi duman maruziyeti tüm kanserler için ana risk faktörleri olarak özetlenebilir. Bunlara ek olarak genetik yatkınlık, bağışıklığın baskılanması, pestisitler, hormonlar, radyasyon ve ilaçlar diğer risk faktörleri arasında sayılabilir (10).

Var olan kanser yükünün, nüfusun artması, yaşlanması ve kanser riskini arttıran yaşam biçimlerini benimsemesi nedeniyle hızla artması beklenmektedir (11). 2012 yılında dünya çapında tahmini 14,1 milyon yeni kanser vakası ve 8,2 milyon kanser ölümü meydana gelmiştir (12). 2015 yılında ise dünya çapında kansere bağlı 8,8 milyon ölüm gerçekleştiği ve kanserin önde gelen ölüm sebepleri sıralamasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada olduğu bildirilmiştir (13).

Meme kanseri dünya genelinde kadınlar arasında, en sık rastlanan kanser ve kadınlarda kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. Meme kanserinin 2015 yılında 534 bin ölüme neden olduğu bildirilmiştir (13). Meme kanseri için risk faktörleri iç ve dış kaynaklı olarak gruplandırılabilir. Yaş, cinsiyet, ırk, benign veya malign lezyonların ailesel oluşumuna genetik yatkınlık gibi faktörler iç faktörleri oluşturmakta, dış faktörleri ise yaşam tarzı, diyet ve uzun süreli tıbbi müdahaleler (oral kontraseptif kullanımı veya hormon replasman tedavisi gibi) ile şekillenmiş faktörler oluşturmaktadır (14).

Meme kanserine tedavi yaklaşımı genel olarak bölgesel ve sistemik olarak hastalığın tedavi edilmesidir. Bölgesel tedavide cerrahi ve radyasyon tedavisi ya da ikisi birden kullanılır. Sistemik tedavide ise kemoterapi, hormonal tedavi, biyolojik tedavi ya da bunların kombinasyonları kullanılır (15).

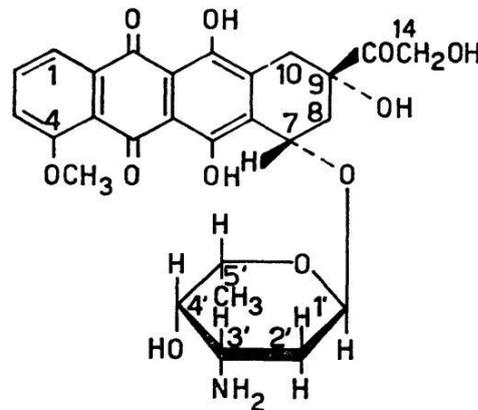
Geleneksel kemoterapide antikanser ilaçlar tümör dokusuna seçici olarak verilememektedir. Normal dokuların antikanser ilaçlara yüksek oranda maruziyeti doz sınırlayıcı toksisite ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle etkin bir tedavi sağlanması için

hedeflendirilmiş tedavilerin geliştirilmesi önem arz etmektedir (16). Hedeflendirilmiş tedavi antikanser etkin maddenin nanosistem ile verilerek pasif hedeflendirilmesi ile ya da kanser hücresi membranında aşırı eksprese edilen reseptör ve taşıyıcılara bağlanacak bir ligand kullanılarak bu sistem ya da doğrudan etkin maddenin aktif hedeflendirilmesi ile sağlanabilir (17).

Kanser tedavisinde kullanılmak üzere Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nden (FDA) onay almış ve anti-kanser etkin maddeleri içeren nanotaşıyıcılar mevcuttur. Doksorubisin, daunorubisin, sitarabin, vinkristin, irinotekan içeren lipozomlar ile serbest ilacın sistemik toksisitesinin azaltılması ve tümör bölgesine ilacın taşınmasının iyileştirilmesi sağlanabilmiştir. Meme kanseri tedavisinde kullanılmak üzere onayı bulunan albümin bağlı paklitaksel nanopartikülleri ile de serbest ilaca göre daha iyi çözünürlük ve tümör bölgesine arttırılmış ilaç birikimi sağlanabilmiştir (18).

2.2. Doksorubisin

Doksorubisin ilk kez *Streptomyces peucetius var. caesius* kültüründen izole edilmiş antrasiklin türevi bir antibiyotik olup, meme kanseri, yumurtalık kanseri ve Kaposi sarkomu gibi çeşitli kanser tiplerinin tedavisinde kullanılmaktadır (19, 20). Doksorubisin suda kolayca çözünen hidroklorür tuzu şeklinde bulunmaktadır. Doksorubisin hidroklorür suda ve metanolde kolayca çözünür ve organik nonpolar çözücülerde güç çözünür ya da pratik olarak çözünmez. Doksorubisin hidroklorürün yapısı Şekil 2.1.'de verilmiştir. Molekül formülü $C_{27}H_{29}O_{11}N.HCl$ ve molekül ağırlığı 579,98 g/mol'dür ve erime derecesi $205\text{ }^{\circ}C$ 'dir. $22\text{ }^{\circ}C$ 'de katı kristalize haldeyken 5 yıl, distile sudaki çözeltisi ise 1 ay dayanıklıdır (21).



Şekil 2.1. Doksorubisin Hidroklorür'ün yapısı (21).

Doksorubisinin %5 civarındaki emilim düzeyi oral olarak verilmesini engeller. Doksorubisin intravenöz olarak uygulandığında dağılım yarılanma ömrü 5-10 dakikadan az ve terminal faz eliminasyon yarılanma ömrü 30 ± 8 saattir. Plazma proteinlerine %50-85 oranında bağlanır, karaciğer ve diğer dokularda metabolize olur ve ana eliminasyon yolu olan safra ile verilen dozun yaklaşık %25-45'i atılır. Doksorubisinin hücre içine alımı pH ve sıcaklığa bağımlı olup hızlı bir difüzyon süreci ile ve taşıyıcı kolaylaştırılmış alım ile gerçekleşmektedir (22).

Doksorubisin antineoplastik etkisini, DNA çift sarmalının baz çiftlerine interkale olup ve topoizomeraz I ve II enzimlerini inhibe edip, DNA biyosentezini önleyerek gösterir (23, 24). Doksorubisinin topoizomeraz I ve II enzimleri gibi birden çok moleküler hedefe bağlanarak antiproliferasyon ile birlikte bir dizi sitotoksik etki oluşturur ve sonuçta DNA hasarı oluşur. DNA kırıklarının tamir etme girişimi başarısız olduğunda ve hücre büyümesi G_1 ve G_2 fazlarında inhibe edildiğinde apoptoz yolağı tetiklenir. Doksorubisin DNA'ya interkale olduğu bilinmektedir ve DNA ve RNA polimerazın inhibisyonu ile DNA replikasyonu ve RNA transkripsiyonunu tamamen durdurur. Bu süreç, doksorubisin sitoplazmanın proteazomuna bağlanmaya yönelik yüksek afinitesini kullanarak difüzyon yoluyla hücreye girdiğinde ortaya çıkar. Doksorubisin, proteazomun 20S alt birimine bağlandığında bir doksorubisin proteazom kompleksi oluşur ve burada nükleer gözenek kompleksleri içinden çekirdeğe translokasyon yapılır. Doksorubisinin, bağlandığı proteazoma göre nükleer DNA'ya karşı daha yüksek bir afiniteye sahip olması, proteazomdan ayrılıp DNA'ya bağlanmasına izin verir (25). Diğer doksorubisin etkileri arasında daha fazla DNA hasarına neden olan serbest radikal oluşumu, makromolekül üretiminin inhibisyonu, DNA gevşemesi/ayrılması ve alkilasyondaki artış sayılabilir (26, 27). Doksorubisinin sadece nükleer DNA değil mitokondri DNA'sına da interkale olabildiği bildirilmiştir (28).

Oldukça etkili bir anti-kanser ilaç olmasına rağmen, doksorubisin kanser hücrelerine karşı seçici değildir dolayısıyla sağlıklı dokulardaki toksisitesi kullanımını sınırlamaktadır. Doksorubisinin toksik etkileri kalp, beyin, karaciğer, böbreklerde görülmektedir ve toksik etkilerin sonuçlarının ortaya çıkması yıllar sürebilir (29). Kardiyotoksisite en belirgin yan etki olup akut veya kronik olarak görülebilir ve önemli bir doz sınırlayıcı faktördür. Doksorubisinin yan etkilerini azaltmak için çeşitli

yaklaşımlar benimsenmiştir. Bunlardan biri bolus verilmiş yerine uzun süreli infüzyon planları uygulamak ve aynı anda kardiyoprotektif bir ajan olan deksrazoksanın verilmesidir. Diğer bir yöntem ise antrasiklin analoglarının ve yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanılmasıdır (30, 31).

Doksorubisinin nanotaşıyıcılar içerisinde yüklenerek vücuda verilmesi, doksorubisinin farmakolojik dağılımını değiştirerek, tümör bölgesinde birikmesini artırırken diğer dokulardaki miktarını azaltarak yan etkilerin azaltılmasını sağlamaktadır. Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde meme ve yumurtalık kanseri gibi çeşitli kanser tipleri için kullanım onayı bulunan doksorubisin lipozom formülasyonlarının, serbest etkin maddeye göre kan dolaşımında kalış sürelerinin uzun olması ve düşük bir dağılım hacmi göstermeleri, tümör bölgesinde ilaç birikiminin artmasını sağlamaktadır (32). Lipozom formülasyonlarının konvansiyonel doksorubisine göre, doksorubisinin klinik kullanımını önemli ölçüde sınırlayan kardiyotoksikite riskini, önerilen yaşam boyu kümülatif konvansiyonel dozu aşan dozlarda bile azalttığı bildirilmiştir (33).

Doksorubisinin kanser tedavisinde daha etkili ve yan etkileri azaltılmış bir şekilde kullanılması için ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanılması, klinikte de kendine yer bulmuş gelecek vaad eden bir yöntemdir. Polimerik nanopartiküller (34), katı lipit nanopartiküller (35), nanoemülsiyonlar (36), altın nanopartiküller (37), nanotüpler (38), polimerik miseller (39) gibi sistemler doksorubisinin taşınması için araştırılan çeşitli sistemlere örnek olarak verilebilir. Doksorubisin enkapsüle edilmiş polimerik miseller kullanılarak doksorubisinin farmakokinetik profili değiştirilebilir, yan etkileri azaltılıp, tümör bölgesinde birikimi artmış daha etkili sistemler tasarlanabilir.

2.3. Nanoteknoloji ve İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nanoteknoloji maddenin atomik ve moleküler seviyede kontrolü, üretimi ve mühendisliği olarak tanımlanmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Nanoteknoloji Girişimi'nin tanımına göre nanoteknoloji 1-100 nm arası boyutlarda maddenin kontrolünü ifade eder (40, 41). Bu boyut kısıtlamasına rağmen birkaç yüz nanometreye kadar olan yapılar da yaygın olarak nanoteknoloji ile ifade edilir (41). Nanoteknolojinin bir alt dalı olarak nanotıp ise 2004 yılında Avrupa Bilim Vakfı tarafından, hastalığın önlenmesi, teşhisi ve tedavisi için ve hastalığın altta yatan

karmaşık patofizyolojisini daha iyi anlamak için nanometre boyutlu araçlar kullanılması olarak tanımlanmıştır (42).

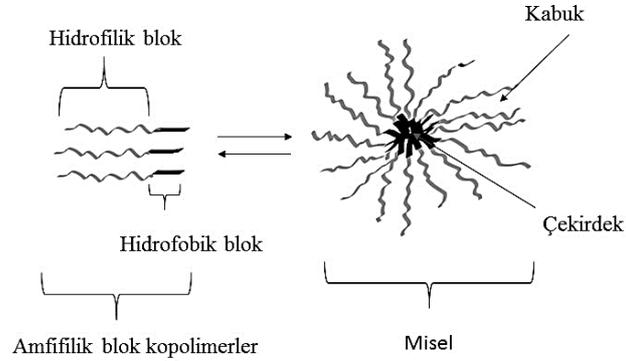
Nanoteknoloji kullanılarak, suda çözünürlüğü düşük ilaçların vücuda verilisinin iyileştirilmesi, ilaçların hücre veya dokuya özel bir şekilde hedeflendirilmesi, sıkı epitelyal ve endotelyal bariyerler arasından ilaçların transitozu, büyük makromolekül ilaçların hücre içi etki alanlarına iletilmesi, kombinasyon tedavisi için iki veya daha fazla etkin maddenin veya terapötik ajanın birlikte verilmesi, terapötik ajanların görüntüleme ajanları ile birlikte verilerek ilaç verilen yerlerinin görüntülenmesi mümkün olabilir (41).

Nanoteknoloji temelli ilaç taşıyıcı sistemler arasında lipozomlar, nanopartiküller, nanokapsüller, DNA-ilaç kompleksleri, polimer-ilaç konjugatları, antikör-ilaç konjugatları, albümin-ilaç konjugatları, polimerik miseller sayılabilir (43).

Tümör dokusu ve/veya hücrelerini hedefleyen kemoterapötiklerin geliştirilmesi ile kanser tedavisinde nanoteknoloji temelli yaklaşımların dönemi başlamıştır. Pasif hedeflendirmede, katı tümörlerde görülen EPR etkisi ile nanotaşıyıcıların tümör bölgesinde birikmesinden faydalanılmıştır. Pasif hedeflendirmeyi stratejik olarak temel alan ilk ürünler (lipozomlar ve polimer-protein konjugatları) 1990'lı yılların ortalarında pazara sunulmuşlardır (44).

2.4. Polimerik Miseller

Polimerik miseller hidrofilik ile hidrofobik bölümleri arasında büyük bir çözünürlük farkına sahip olan amfifilik özellikteki blok kopolimerlerin sulu bir ortamda bir araya gelmeleri ile oluşurlar. Miseller, hidrofobik bölümlerin sulu ortamdan ayrılıp bir araya gelmesi ile oluşan iç çekirdek kısım ile bunu çevreleyen hidrofilik kısımların (kabuk) oluşturduğu benzersiz bir çekirdek-kabuk yapısına (Şekil 2.2.) sahiptirler (45). Oldukça dar bir büyüklük dağılımına sahip misellerin, in vitro ve in vivo yüksek stabiliteleri, iyi biyouyumluluk göstermeleri, yüksek etkin madde yükleme kapasitesine sahip çekirdekleri, suda düşük çözünürlüğe sahip etkin maddeleri çözündürmek için kullanılabilirlikleri ve vücuttaki benzersiz dağılım özellikleri, ilaç taşıyıcı sistemler olarak ilgi çekmelerinin ana sebeplerindedir (45, 46).



Şekil 2.2. Misellerin çekirdek-kabuk yapısı.

Polimerik misellerin ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmaları 1980'lerin sonlarında ve 1990'ların başlarında Japonya' da Yokoyoma, Okano ve Kataoka (47) tarafından tasarlanan misel taşıyıcı sistem ve yaklaşık olarak aynı zaman diliminde Kabanov ve arkadaşları (48) tarafından tasarlanan Pluronic® miseller ile yapılan çalışmalarla başlamıştır. Kataoka ve arkadaşlarının hidrofobik bir amino asit bloğuna PEG bloğunu bağlayarak sentezledikleri blok kopolimerler çok düşük bir kritik misel konsantrasyonu (CMC) ile misel oluşturmuş ve bu misellere doksorubisin gibi hidrofobik bir molekülü fiziksel olarak hapsederek ya da aminoasit bloğuna konjuge ederek yüklemeyi başarmışlardır (47, 49, 50). Kabanov ve ark. (48) ise poli(oksietilen)-poli(oksipropilen) (Pluronic) blok kopolimerinin oluşturduğu misellere etkin madde yükleyerek, bu miselleri taşıyıcı sistem olarak kullanmışlardır. Geliştirilen bu sistemlerle hazırlanan farklı formülasyonlar klinik çalışmalarda faz 2 ve faz 3 aşamasına gelmiştir (51-54)

2.5. Polimerik Misellerin Bileşimi ve Yapısı

Genel olarak blok kopolimerlerin, seçici bir çözücüde, kapalı bir araya gelme/birleşme süreci sonucunda miselleri oluşturduğu varsayılabilir. Bu durum belirli bir kritik misel konsantrasyonu ile tanımlanır ve bu konsantrasyon altında çözeltide sadece moleküler olarak çözünmüş kopolimer, ünimerler halinde bulunur.

Kritik misel konsantrasyonu üzerinde miseller ünimerler ile denge halindedir (55). Sabit bir polimer konsantrasyonunda, sıcaklığın kritik misel sıcaklığı olarak adlandırılan sıcaklığın üstünde veya altında olacak şekilde değiştirilmesi ile de misel oluşumu gerçekleşir (56).

Farklı misel morfolojilerinin oluşumu iki blok arasındaki yüzeylerarası enerji ile zincir gerilmesine bağlıdır. Misel oluşumu gerçekleşirken (mikrofaz ayrışması), toplam yüzeyler arası enerjiyi düşürmek için, iki blok birbirinden yüzeyler arası alanı azaltacak şekilde ayrılır. Faz ayrımı, tercih edilen sarılmış polimer zincir konformasyonundan uzağa doğru zincir gerilmesini indükler (57). Diblok kopolimerlerde genel olarak, hidrofilik kısım, hidrofobik bloktan daha uzun olduğunda, ortaya çıkan misellerin şekli küreseldir. Tersine, hidrofobik bloğun uzunluğunun, hidrofilik zincirlerinkinden daha fazla olması, çubuklar ve lameller de dâhil olmak üzere çeşitli küresel olmayan yapılar oluşturabilir (58, 59).

Polimerik miselleri oluşturan blok kopolimerler, iki veya daha fazla monomer türü tarafından oluşturulan bağlı bloklardan (dizilerden) oluşurlar ve doğrusal ve/veya radyal bir düzenlemede olabilirler. En basit durumda, bir AB diblok kopolimeri, uç uca bağlı iki farklı homopolimerden oluşur. Bu kavramın genişletilmesi ile ABA veya BAB tribloklarına ve (AB)_n doğrusal çoklu blokları elde edilirken, ABC kopolimerleri, üçüncü bir bileşime sahip olan bir polimer dizisinin dâhil edilmesiyle elde edilir. Blok kopolimerlerin radyal düzenlemeleri, en basit durumda yıldız şekilli yapılardadır, burada n blok kopolimer zincirleri uçlarından biri ile çok işlevli bir kısma bağlanır (55).

Blok kopolimer miselleri çekirdeği oluşturan hidrofobik kısımların sulu ortamdan ayrılmasını sağlayan moleküller arası kuvvetlerin türüne göre sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırmaya göre miseller; amfifilik miseller (hidrofobik etkileşimler tarafından oluşturulan), poliyon kompleks miselleri (elektrostatik etkileşimler sonucu oluşan) ve metal kompleksleşmesinden kaynaklanan miseller olarak üç ana sınıfa ayrılabilir. Amfifilik misellerin oluşumu lipofilik blok kopolimer zincirleri arasındaki non-polar ve hidrofobik etkileşimlere dayanır. Hidrofobik bloklar sulu ortamdan uzaklaşıp bir araya geldikçe çözücü moleküllerinin entropisinde meydana gelen kazanım, eş zamanlı olarak bu sürecin ilerlemesini sağlar (59). Amfifilik miselleri oluşturan polimerler genellikle ester yapıda ya da aminoasit yapıda

polimerleri yapılarında barındırırlar. Poli(laktik asit) (PLA), poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) ve poli(glikolik asit) FDA tarafından insanlarda biyomedikal uygulamalar için onaylanmış biyouyumlu, biyolojik olarak parçalanabilen poliesterlerdir (59). Poli(aspartik asit), poli(glutamik asit), poli(l-lizin) ve poli(histidin) ilaç taşıyıcı sistemlerde sıklıkla kullanılan poli(aminoasit)lerdir. Poli(aminoasit)lerin misel oluşturabilmesi için hidrofobik bir polimere bağlanmaları ya da elektrostatik olarak nötral olmaları gerekmektedir (60). Polietilerler misel hazırlamada kullanılan diğer bir polimer grubudur. Farmasötik alanda kullanılan polietiler polimerlerine (poli(etilen glikol)-b-poli(propilen oksit)-b- poli(etilen glikol)) blok kopolimerleri (poloksamerler) örnek verilebilir. Poliyon kompleks miseller zıt yüklü poliyonların, etkileşmesi ile oluşur. Zıt yüklere sahip polimerlerin ayrılması ve nötralizasyonu ile meydana gelirler. İki zıt yüklü poliyonu sentetik blok kopolimerler oluşturabileceği gibi, birini DNA gibi doğal bir polimer ve diğerini pozitif yüklü bir blok kopolimer oluşturabilir (61, 62). Polimer metal kompleksleri ile oluşan miseller, polimer ile metalin sulu ortamda kompleks oluşturması sonucu oluşan misellerdir. Sisplatin ile poli(etilen glikol)-poli(aspartik asit) blok kopolimerinin sulu ortamda spontane olarak kompleks oluşturması ile meydana gelen misellerin dar bir partikül büyüklüğü dağılımına sahip oldukları ve uzatılmış salım gösterdikleri bildirilmiştir (63). Sisplatinin PEG-poli(glutamik asit) blok kopolimeri kompleks oluşturması sonucu oluşan misellerin, sistemik toksisiteyi azaltabileceği faz çalışmaları ile gösterilmiştir ve bu formülasyon için faz III çalışmaları başlamıştır (53, 64).

2.6. Polimerik Misellerin Tipik Özellikleri

2.6.1. Misel Büyüklüğü

Genel olarak taşıyıcı sistem büyüklüğünün 10 ila 200 nm arası olması nanotaşıyıcıların kan dolaşımında uzun süre kalması ve EPR etkisinden faydalanılması için uygun bulunmaktadır (65). Büyüklük için alt sınır böbreklerden atılım ile belirlenmiştir. Eğer nanotaşıyıcılar glomerüler filtrasyon ile hızlı bir şekilde kan dolaşımından uzaklaştırılıp atılırsa, taşıyıcı sistemin hedefleme etkinliği büyük oranda düşecektir. Kuantum noktacıları ile yapılan çalışmada böbreklerden filtrasyon ile taşıyıcı sistemin atılmaması için büyüklük alt sınırı 5,5 nm olarak bulunmuştur (66).

Büyüklik açısından göz önüne alınması gereken diğer bir faktör vasküler fenestrasyonlardan gerçekleşen karaciğer filtrasyonudur. Kan dolaşımı ile karaciğerin iç kısmı arasında geçirgen bir bariyer sağlayan ve hepatik sinüzoidleri (kapillerler) kaplayan oldukça özelleşmiş endotelial hücreler olan, karaciğer sinüzoidal endotelial hücrelerinin tipik morfolojik özelliği gözenekli bir yapıya sahip olmalarıdır (67). Türler arasında farklılık göstermekle birlikte bu gözeneklerin çapı 50-200 nm arasında değişmektedir (68, 69). Kan dolaşımındaki nanopartiküller karaciğer sinüzoidal fenestrasyonlarının çapından daha küçük boyutta olduklarında bu gözeneklerden geçip Disse boşluğuna ekstreaze olabilir ve hepatositler ile etkileşebilir (70). 50-200 nm gözenek çapı göz önüne alındığında, alt sınır olan 50 nm 'den büyük partiküller tasarlanarak hepatositler ile etkileşim azaltılabilir.

Partikül büyüklüğünün üst sınırı ise dalak filtrasyonu ve tümör geçirgenliği gibi iki faktörden etkilenmektedir. Dalakta kan akışı sırasında, yaşlı ve küresel kırmızı kan hücrelerini tutan interendotelial açıklıklar nanopartiküllerin de dalakta tutulumuna neden olmaktadır. Dalak sinüs duvarını kaplayan endotel hücreleri arasındaki bu boşluklardan sağlıklı kan hücreleri deforme olabildikleri için kolayca geçebilirken, rijit membranlara sahip sağlıklı kan hücreleri bu açıklıklara takılırlar ve dalak makrofajları tarafından elimine edilirler (71). Bu açıklıkların genişliği sıçanlarda 0,2-0,5 μm (72) aralığında olup insan dalağı için ölçülen genişlik 0.25 – 1.2 μm (73) arasındadır. İnterendotelial açıklıkların (200-250 nm) üzerinde üzerinde bir büyüklüğe sahip rijit nanopartiküllerin dalak tarafından kolaylıkla tutulması mümkündür. Moghimi ve arkadaşları (74) 230 nm partikül büyüklüğüne sahip polaksamin 908 kaplı polistiren nanopartiküllerinin uygulandıktan birkaç saat sonra dalakta tutulduğunu göstermişlerdir. Anraku ve arkadaşları (75) kolon adenokarsinomu (C-26) hücrelerini subkütan enjekte ettikleri farelerde partikül büyüklükleri 100-300 nm aralığında değişen PEG ile modifiye edilmiş polimerzomların kanda kalış sürelerini ve biyodağılımlarını incelemişlerdir. Polimerzomların tümör ve dalak dokularında birikiminin nanotaşıyıcının büyüklüğüne bağlı olduğu ve birbirine zıt eğilimler gösterdiğini bulmuşlardır, karaciğerde ise incelenen nanotaşıyıcılar için büyüklüklerinden bağımsız olarak önemli bir birikimin olmadığını bildirmişlerdir. 150 nm'den büyük polimerzomların dalakta birikiminin yüksek olduğu belirlenmiş olup, 150 nm polimerzomun en uzun kanda kalış süresine

sahip olduğu dolayısıyla tümör hedeflendirmesi için kritik büyüklüğün 150 nm olduğu bildirilmiştir (75). Dalak sinüs açıklığının büyüklüğü ve yukarıda bahsedilen çalışmalar nanotaşıyıcı tasarlanırken partikül büyüklüğü üst sınırının 200 nm olarak belirlenmesi dalak tutulumunu en aza indirmek ya da önlemek için gerekli olduğunu ortaya koymaktadır.

Tümör dokusunu hedefleyen ilaç taşıyıcı sistemler tasarlanırken EPR etkisi temel alınmaktadır. EPR etkisinde tümör dokusundaki kan damarlarında bulunan endotelial açıklıkların normal dokulardakilere göre daha geçirgen olması ilaç taşıyıcı sistemlerin kan dolaşımından tümör dokusuna ekstreaze olmasını sağlamaktadır. Ancak bu endotelial açıklıkların boyutu tümörden tümöre farklılık göstermektedir ve bu da nanotaşıyıcı tasarlanırken göz önüne alınması gereken bir boyut sınırı olmaktadır. Yuan ve arkadaşları (76) farelerde dorsal deri-kıvrımı odalarında oluşturdukları insan kolon adenokarsinomu modelinde 100-600 nm büyüklüğünde lipozomlar kullanarak tümörlerin mikrovasküler permeabilitesini belirlemeye çalışmışlardır. Kullanılan tümör modelinde damarların 400 nm'ye kadar olan lipozomlara geçirgen olduğunu ve bunun da tümör damarlarındaki gözeneklerin çapının 400 ila 600 nm arasında olduğuna işaret ettiğini bildirmişlerdir (76). Hobbs ve arkadaşları meme kanseri, kolorektal kanser, sarkoma, glioma ve hepatoma olmak üzere beş fare ve bir insan tümörünü farelerde dorsal deri-kıvrımı odalarına implante ederek oluşturdukları tümör modellerinde, transvasküler açıklıkların boyutunu belirlemek için farklı büyüklüklerde lipozomların ve lateks boncukların ekstreazyasyonunu araştırmışlardır. Deri altında büyütülen tümörlerin 200 nm ila 1,2 mm arasında bir gözenek büyüklüğü sergilediklerini bildirmişlerdir (77). Tümör dokusu kan damarlarındaki gözenek çapının değişkenliği, 200 nm'den daha küçük nanotaşıyıcılar tasarlanmasının, tümör hedefleme açısından daha yararlı olacağını ortaya koymaktadır.

Polimerik miseller büyüklük açısından diğer nanotaşıyıcılara göre bazı üstünlüklere sahiptir. Bunlardan birincisi oldukça küçük büyüklüklerde elde edilebilmeleridir. Çoğunlukla miseller 20 nm ila 100 nm arasında büyüklükte elde edilebilirler. Bu nedenle, polimerik miseller, partikül büyüklüklerine göre pasif hedeflendirme açısından idealdir (65). Özellikle lipozom ile karşılaştırıldığında oldukça küçük büyüklüklerde elde edilebilmeleri miselleri, ilaç taşıyıcı sistem olarak

daha cazip kılmaktadır. Geleneksel lipozom hazırlama yöntemleri lipozom büyüklüğünü azaltmak için sonikasyon ve membran ekstrüzyonu gibi işlem basamaklarını içermektedir. Sonikasyon yönteminde fosfolipit ve etkin madde parçalanması görülmesi ve oluşan lipozomların düşük miktarda su hapsedmesi bu yöntemin kullanımını sınırlamaktadır. Membran ekstrüzyonu yönteminde ise elde edilebilecek en düşük lipozom büyüklüğü kullanılan membranın gözenek çapına bağlıdır (78). Her ne kadar mikroakışkan tekniği gibi daha güncel yöntemler lipozom hazırlamada kullanılsa da 50 nm altında lipozomlar hazırlamak oldukça güçtür (65, 79). Polimerik misellerin büyüklüğünün tümör hedeflemeye etkisine ilişkin yapılan bir çalışmada, kan dolaşımındaki davranışları benzer olan farklı büyüklükteki misellerin tümör penetrasyonu araştırılmıştır. Bu çalışmada, ilaç taşıyıcı sistemlerin derin tümör dokusuna penetrasyonunu engelleyebilecek yoğun bir interstisyel dokuya sahip pankreas tümörü modeli kullanılmış ve ancak en küçük partikül büyüklüğüne sahip miselin (30 nm) tümör dokusuna penetre olabildiğini ve yüksek anti-tümör aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir (80).

Polimerik misellerin partikül büyüklüğü açısından diğer bir üstünlüğü, büyüklüğün çoğunlukla, blok kopolimerleri oluşturan hidrofobik ve hidrofilik kısımların kimyasal yapısı ve bu zincirlerin uzunluklarına bağlı olmasıdır (81-83). Partikül büyüklüğünün hazırlama yönteminden ziyade polimerlerin kimyasal yapısına bağlı olması ilaç taşıyıcı sistem olarak hazırlanan misellerin boyutlarının kolay ve daha hassas bir şekilde kontrolünü sağlamaktadır (65).

2.6.1. Çözücü Buharlaştırma

Bu yöntemde su ile karışabilen bir organik çözücüde polimer ve etkin madde çözündürülür ve daha sonra organik çözücünün uzaklaştırılması ile etkin madde yüklü miseller elde edilir. Kullanılan organik çözücü su ile karışabilen özellikte olduğu için bir faz ayrımı ve emülsiyon oluşumu görülmez. Organik çözücünün buharlaştırılarak uzaklaştırılması işlemi kademeli bir süreç olduğundan çözücünün bileşiminin ve seçiciliğinin değişimi de ani olmaz. Dolayısıyla polimer ve etkin madde kütle halinde çökmek yerine misel oluşturacak şekilde agregate olabilir (145). Aliabadi ve arkadaşları (146) çözücü buharlaştırma yöntemi ile metoksi poli(etilen oksit)-b-poli(ϵ -kaprolakton) polimerini kullanarak siklosporin A etkin maddesini yükledikleri miseller

hazırlamışlardır. Farklı organik çözümlerin kullanılmasının ve organik çözümlerin suya hacimsel oranının misellerin partikül büyüklüğünü ve etkin madde yükleme etkinliğini etkilediğini ve çözümlü buharlaştırma yöntemi ile en uygun sonuçları elde etmek için bu koşulları değiştirerek optimizasyon çalışmaları yapılabileceğini bildirmişlerdir (146).

2.6.2. İlaç Salımı

İlaç salımı ilaç taşıyıcı sistemlerin etkisini göstermesi açısından önemli bir faktördür. İlaç taşıyıcı sistemin hastalık bölgesini hedefleme etkinliği iyi olsa da, etkin maddeyi hedef dokuda/hücrede salmaması ya da yavaş salması ya da hedef bölgeye ulaşmadan kan dolaşımında iken salması tedavinin etkinliğini azaltacaktır (65). Polimerik misellere etkin madde yüklenmesi kovalent ya da kovalent olmayan yöntemlerle yapılabilir (84). Kovalent yöntemde etkin madde blok kopolimerin hidrofobik kısmına konjuge edilir ve bu monomerlerin oluşturduğu misellerden etkin madde salımı, çevreye-duyarlı bağların kırılması ile sağlanır (85, 86). Misellerden etkin madde salımını kontrol etmek ve etkin maddenin zamanından önce salımını önlemek için çeşitli kimyasal stratejiler kullanılabilir. Bunlar arasında hidrazon bağı oluşumları, serbest radikal polimerizasyonu ve disülfid bağları sayılabilir (87). Tümör bölgesi hedefleniyorsa, kanser hücrelerinde anaerobik glikoliz sonucu oluşan laktat üretimi nedeniyle tümör mikroçevresinde oluşan asidik ortam göz önüne alınarak, asit ile parçalanabilen hidrazon bağı gibi bağlar konjugasyon için tercih edilebilir (84, 88). Li ve arkadaşları (89) polimere kimyasal olarak konjuge edilen etkin madde miktarının etkin madde salım hızını etkilediğini, konjuge edilen hidrofobik etkin madde miktarı arttıkça salım hızının yavaşladığını bildirmişlerdir. Bunu konjuge edilen hidrofobik etkin madde miktarı arttıkça misel çekirdeğindeki hidrofobikliğin artması sonucu etkin madde salımını sağlayan hidrolitik reaksiyonların engellenmesine bağlamışlardır (89). Paklitakselin keton grubu içeren bir bağlayıcı ile hazırlanan ön ilacının, hidrazon bağı ile polimere konjugasyonu sonucu elde edilen polimerik misellerden, paklitaksel salımının pH 5'te pH 7,4'e göre daha hızlı olduğu bildirilmiştir (90). İlaçları polimerik misellere konjuge etmek için kullanılabilecek diğer bir yöntem serbest radikal polimerizasyonudur. Bu amaçla etkin maddeler polimerizasyon için gerekli olan vinil gruplarını içerecek şekilde modifiye edilirler. Polimerizasyon sonucu degrade

olmayan karbon-karbon bağları oluşacağı için etkin madde ile vinil grupları arasına degrade olabilen bağlayıcılar eklenerek konjuge edilen etkin maddenin salımı kontrol edilebilir (87). Hu ve arkadaşlarının (91) yaptığı çalışmada dosetaksele bir ester bağı ile metakrilat eklenmiş ve bu ön ilaç serbest radikal polimerizasyonu ile kovalent olarak misele yüklenmiştir. Misellere konjuge edilen dosetakselin tümörlerdeki birikimi, farelerde oluşturulan meme kanseri modelinde Taxatore® ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek bulunmuştur ve misellerin tek dozluk enjeksiyonu ile farelerdeki tümörlerin %100 regresyonu sağlanmıştır (91). Hücre içinde kırılabilen disülfid bağları da etkin maddeleri polimerik misellere konjuge etmek için kullanılmıştır. McRae ve arkadaşları (92) 2-metakriloksietil fosforilkolin ve lipoik asit ile modifiye edilmiş 2-hidroksietil metakrilatı kullanarak sentezledikleri amfifilik blok kopolimere, pridil disülfid grubu ile modifiye edilmiş kamptotesini konjuge etmişlerdir. Elde edilen misel polimerdeki tiyol grupları disülfid bağlarına okside edilerek çapraz bağlanmıştır. Polimerik misele konjuge edilen kamptotesin, fiziksel olarak misele yüklendiği formülasyona göre daha yavaş bir salım göstermiştir. Ancak salım ortamında bir indirgeme ajanının bulunması, kamptotesin konjuge edilmiş miselden salımı hızlandırmıştır (92).

Kovalent olmayan yöntemde etkin maddeler fiziksel olarak misellerin hidrofobik çekirdeklerine yüklenirler. Bu yöntem kovalent yöntemdeki gibi konjugasyon kimyası gerektirmediğinden etkin madde yükleme işlemi daha kolaydır ve dolayısıyla bu konuda daha çok çalışma mevcuttur. Fiziksel yöntemle etkin madde yüklenen polimerik misellerin uygun bir etkin madde salımı göstermesi için, en uygun polimer bileşiminin, etkin madde miktarının ve etkin madde yükleme yönteminin belirlenmesi, genellikle deneme yanılma yoluyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bilgiler her vakada kullanılacak sistemik bir yöntem oluşturmaya yetmese de bazı yararlı bilgilere ulaşılmıştır (65). Misellerde etkin madde salımı difüzyon ya çekirdek kısmının degradasyonu gibi mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Hidrofobik bloğun özellikleri (bileşimi ve etkin maddeye afinitesi gibi) etkin maddenin enkapsülasyonunu ve salımını etkilemektedir (81, 93-95). Misellerin hidrofobik çekirdeğinin intrinsik viskozitesinin etkin madde salımını etkilediği bilinmektedir (96). Yu ve arkadaşları (97) hazırladıkları Amfoterisin B yüklü poli(etilen oksit)-b-pol(β -benzil-l-aspartat) misellerinin çekirdeğinin yüksek viskoziteye sahip katı

benzeri bir yapısı olduğunu ve bu yapının misellerin dissosiyeye olmasını önleyerek amfoterisin B'nin yavaş salımına neden olabileceğini bildirmiştir (97). Poli(etilen oksit)-b-poli(ϵ -kaprolakton) (PEO-PCL) polimeri ile hazırlanan miseller ile Cremophor EL misellerinin çekirdek viskozitesinin karşılaştırıldığı bir çalışmada PEO-PCL misellerinin çekirdeğinin daha yüksek viskozite gösterdiği ve bunun sonucu olarak enkapsüle edilmiş ilacın difüzyonunun kısıtlandığı ve uzatılmış salım sağlanabileceği ifade edilmiştir (98).

Polimerik miseller iyi bir stabiliteye sahip olsalar dahi kan dolaşımındayken enkapsüle edilmiş etkin maddenin hızlı bir şekilde salımı gerçekleşebilir. Bu gibi durumlarda etkin maddenin polimerik misel içinde tutulamaması, etkin maddenin albümin gibi plazma bileşenlerine aktarılmasına bağlanmıştır (87, 99). Letchford ve Burt (100) paklitaksel enkapsüle edilmiş polimerik misel ve nanopartikülleri, *in vitro* stabilite ve paklitaksel farmokinetiği açısından karşılaştırdıkları çalışmalarında, *in vitro* plazma stabilite çalışmalarında nanopartikül formülasyonu daha iyi sonuçlar vermesine rağmen, *in vivo* enjeksiyon sonucu paklitakselin her iki nanotaşıyıcıdan benzer şekilde ayrılıp dakikalar içinde plazmadan elimine olduğunu gözlemlemişlerdir.

Miseller kan dolaşımındayken, misellere fiziksel olarak enkapsüle edilmiş ilacın, hızlı bir şekilde salınmasını önlemek amacıyla kullanılan çeşitli stratejiler mevcuttur. Bunlar arasında π - π etkileşimleri (istiflenmesi/yığılması), metal koordinasyon etkileşimleri, hidrojen bağları gibi fiziksel etkileşimler sayılabilir (87).

Nakanishi ve arkadaşları (101) tarafından π - π etkileşimlerinden faydalanmak üzere PEG-b-poli(α,β -aspartik asit) polimerinin poli(α,β -aspartik asit) bloğuna doksorubisin konjuge edilmiş ve bu modifiye polimer ile oluşturulan misellere doksorubisin fiziksel olarak yüklenmiştir. Bu sistemde serbest doksorubisin ile polimere bağlı doksorubisinin aromatik grupları arasında hidrofobik etkileşimler dışında π - π etkileşimlerinin meydana gelmesi beklenmektedir. Elde edilen polimerik miselin serbest doksorubisine göre plazma eğri altında kalan alanı (AUC) 29 kat daha yüksek bulunmuş ve doksorubisinin tümör dağılımı 3,9 kat daha yüksek bulunmuştur (101). Aynı çalışma grubu tarafından bu stratejiden farklı etkin maddeler için de yararlanılmıştır. PEG-b-poli(α,β -aspartik asit) polimeri 4-fenil-1-butanol ile modifiye

edilerek oluşturulan miselle paklitaksel yüklenmiş ve paklitaksel ile polimer arasında meydana gelmesi beklenen π - π etkileşimlerinden faydalanılmıştır (102). PEG-b-poli(aspartat) hidrofobik benzil grupları ile modifiye edilerek π - π etkileşimlerinden yararlanılmış ve hidrazin grupları ile de modifiye edilerek epirubisin konjugasyonu gerçekleştirilmiştir (103).

Metal organik platin bileşikler koordinasyon etkileşimleri vasıtasıyla karboksilat grupları ile kompleks oluşturabildikleri için karboksilik asit grupları barındıran blok kopolimerler sentezlenerek platin bileşiklerinin misellere enkapsülasyonu sağlanabilmektedir. Nishiyama ve arkadaşları bu amaçla PEG-b-poli(l-glutamik asit) polimerini kullanarak hazırladıkları misellere sisplatin yüklemiş ve serbest sisplatine göre 65 kat yüksek plazma AUC'si ve 20 kat yüksek tümör AUC'si elde etmişlerdir (53, 104).

Desale ve arkadaşları (105) tarafından PEG-p(glutamik asit)-p(fenilalanin) kullanılarak hazırlanan polimerik misellere paklitaksel ve sisplatin yüklenmiştir. Paklitaksel hidrofobik çekirdeğe yüklenmiştir sisplatin ise polimerin karboksil grupları ile arasındaki koordinasyon etkileşimlerinden faydalanılarak polimerik misellere yüklenmiştir. İkili etkin madde kombinasyonu ile hazırlanan miseller insan yumurtalık kanseri hücreleri (A2780) üzerinde sinerjistik sitotoksik etki göstermiştir ve in vivo tümör modelinde serbest sisplatin ve tek bir etkin madde yüklü misellere göre üstün antitümör etki göstermiştir (105).

Misellerden zamanından önce etkin madde salımını önlemek/yavaşlatmak için kullanılan diğer bir strateji hidrojen bağlarından faydalanmaktır. Kim ve arkadaşları (106) üre ile modifiye edilmiş polimerler kullanarak misellere doksorubisin yüklemişlerdir ve etkin maddenin miselde tutulmasını sağlamak için hidrojen bağlarından faydalanmışlardır. Elde edilen misellerden doksorubisin salımının oldukça yavaş ve uzatılmış olmasını doksorubisindeki karbonil, hidroksil ve amin gruplarının polimerdeki ürenin karbonat grupları ile moleküller arası hidrojen bağları oluşturmasına bağlamışlardır (106).

2.6.3. Uyarıcı Duyarlı Polimerik Miseller ve Seçici İlaç Salımı

Nanotaşıyıcıların yeterli antitümör etki gösterebilecek kadar tümör bölgesinde birikmesi için 24 saat gibi uzun bir süre gerektiği EPR etkisini ele alan çalışmalarda

incelenmiştir (65, 107, 108). Bu nedenle hedef tümör bölgesine ulaşana kadar, kan dolaşımındaki misellerden etkin madde salımının yavaş olması gerekmektedir. Kimyasal konjugasyon ile hazırlanan sistemler için etkin madde ve taşıyıcı sistem arasında uygun bir bağ seçimiyle, etkin maddenin fiziksel olarak enkapsüle edildiği sistemler için ise etkin madde yükleme şartları (hidrofobiklik, sıvı/katı çekirdek özelliği, çekirdek kısmının büyüklüğü ve etkin madde yükleme yöntemleri) değiştirilerek etkin madde salım hızı kontrol edilebilir. Bu yaklaşımlar ile zamanından önce hızlı etkin madde salımının önlenmesi mümkündür ancak kan dolaşımında nanotaşıyıcıdan istenmeyen etkin madde salımı kaçınılmazdır (65).

Etkili bir hedefleme için nanotaşıyıcı kan dolaşımındayken etkin madde salımı önlenmeli ve hedef bölgeye (kanser hücrelerinin içinde ve yakınında) ulaşıncaya hızlı bir etkin madde salımı sağlanmalıdır. Hedef bölgede seçici etkin madde salımını sağlamak için kan dolaşımı ile hedef bölge arasındaki çevresel farklılıklardan yararlanılarak uyaran duyarlı polimerik miseller tasarlanabilir. Tümör dokusu ile normal dokular arasındaki farklı biyolojik faktörler pH, sıcaklık ve spesifik enzimler olarak sayılabilir. Tümör dokularının intraselüler glutatyon seviyelerinin yüksek olması, normal dokulara göre daha yüksek bir sıcaklığa (yaklaşık 40-42 °C) sahip olmaları, tümör dokularında genel olarak normal dokulara göre pH'nın daha düşük olması ve spesifik enzimlerin aşırı ekspresyonu seçici etkin madde salımı için kullanılacak çeşitli çevresel faktörlerdir (109, 110). Bu özellikler polimerik misellerin destabilizasyonu ve etkin madde salımının kontrolü için iç tetikleyiciler olarak kullanılabilir. Bunun yanında manyetik alan, ultrason ve ışık gibi dış kaynaklı uyaranlar kullanılarak uyaran duyarlı misellerin hedef bölgede salım yapması sağlanabilir. Uyaran duyarlı miseller hazırlamak için kullanılan çeşitli stratejiler ve bu stratejiler kullanılarak hazırlanan polimerik misellere örnekler Tablo 2.1.'de özet olarak verilmiştir. Tez çalışmasında da kullanılan pH-duyarlı yaklaşım ise daha ayrıntılı bir şekilde aşağıda incelenmiştir.

pH-Duyarlı Polimerik Miseller

Kan ve normal dokularda pH 7,4 iken, artmış metabolik aktivite hızı ve anaerobik glikoliz sonucu çoğu katı tümörün mikroçevresi asidiktir (pH 6,5-7,2) ve pH değeri endozomlarda (pH 5,5-6,5) ve lizozomlarda (pH 4,5-5) daha düşük

seviyededir. Hedef tümör bölgesinde etkin madde salımını sağlamak için tümör bölgesi ya da organellerde aktive olabilen pH-duyarlı polimerik misellerden faydalanılabilir. Polimerlerin pH-duyarlılığı genel olarak iyonize olabilen grupların protonlanması ya da pH-duyarlı bağlayıcı grupların degrade olması ile gerçekleşir. Miselleri oluşturan polimere tümör ekstraselüler ya da intraselüler asidik pH değerlerinde iyonize olabilen grupların eklenmesi ile oluşturulan pH-duyarlı sistemler, misellerin dekompozisyonu ya da destabilizasyonu sonucu hedef bölgede etkin madde salımını gerçekleştirirler (110).

pH-duyarlı intraselüler ilaç taşıyıcı sistemler olarak PLA-b-PEtOx-b-PLA yapısını temel alan ABA triblok kopolimerleri Wang ve arkadaşları (111) tarafından tasarlanmışlardır. Hazırlanan misellerin asidik ortamda deformasyonlarının, protonlanmış nitrojen ve karbonil grupları arasında oluşan hidrojen bağları sonucu PEtOx gruplarının agregasyonu ile meydana geldiği bildirilmiştir. Misellere yüklenen doksorubisin salımı pH 7,4'te engellenmişken, asidik koşullarda hızlanmış bir salım gözlenmiştir. Konfokal mikroskop ile yapılan hücresel alım çalışmalarında doksorubisinin asidik organellerde bulunduğunu gösteren Wang ve arkadaşları, bu bulguların misel deformasyonu sonucu etkin madde salımının asidik organellerde tetiklendiğini düşündüğünü bildirmişlerdir (111).

Wu ve arkadaşları (112) endozomlardaki asidite ile hızlı etkin madde salımı elde etmek üzere pH-duyarlı poli(l-histidin) grubunu içeren PEG-poli(l-histidin) polimeri ile 1,2-distearoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin-polietilen glikol-2000 (DSPE-PEG-2000) polimerini kullanarak karışık miseller elde etmişlerdir. Bu misellere enkapsüle ettikleri paklitakselin salımının pH 5,5'te poli(l-histidin) içermeyen miselle göre hızlandığını ve 2 saat içinde etkin maddenin yaklaşık %75-95'inin salımının gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Paklitaksel yüklü misellerin pH 5,8'de pH 7,4'e göre daha yüksek sitotoksosite gösterdiği ve karışık misellerin antikanser nükleozom antikoru 2C5 ile modifiye edilmesi ile misellerin hücresel alımlarının ve sitotoksitelerinin arttığı bildirilmiştir (112). Li ve arkadaşları (113) pH-duyarlı birimler ile misel özellikleri arasındaki ilişkiyi araştırmak üzere metoksi-poli(etilen glikol)-b-poli(ϵ -kaprolakton)-b-poli(dietilaminoetil metakrilat) kopolimerlerini tasarlayıp sentezlemişlerdir. Elde edilen kopolimerler ile misel formülasyonları hazırlanmış ve kritik misel konsantrasyonu, misel büyüklüğü,

morfoloji, pH duyarlılığı, sitotoksisite ve etkin madde yükleme etkinliği ve etkin madde salımı gibi parametreler açısından bu formülasyonlar incelenmiştir. Elde edilen sonuçların pH duyarlılığı, sitotoksisite ve etkin madde yükleme etkinliği, etkin madde salımı gibi misel özelliklerinin, kopolimerlerdeki poli(dietilaminoetil metakrilat) birimleri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (113).

Tablo 2.1. Uyarıcı duyarlı polimerik misel örnekleri.

Uyarıcı Tipi	Biyolojik	Uyarıcı	Kullanılan Polimerler	Yüklenen İlaç	Özellikler	Kaynak
		pH	Poli(etilen glikol)metil eter-b-(poli laktik asit-ko-poli(β -amino esterleri))	Doksorubisin	pH-duyarlı poli(β -amino ester) grubu pH 7,4'te çözünmezken 6,5'ten daha düşük pH değerlerinde amino gruplarının protonlanması ile pozitif yüklü ve çözünür hale gelmektedir. pH 5'te PH 7,4'e göre hızlanmış salım elde edilmiştir.	(114)
Poli(dimetilsiloksan)-b-poli (2-(dimetilamino)etil metakrilat)	Doksorubisin		Asidik ortamda hidrofilik poli 2-(dimetilamino)etil metakrilat grubunun protonlanması sonucu oluşan yük yoğunluğu hidrofilik zincirlerin birbirini itmesi ile ve doksorubisinin pH 7,4'e göre daha hızlı salınması ile sonuçlanmaktadır.	(115)		
Redoks	Metoksi poli(etilen glikol)-poli(ϵ -kaprolakton)-ss-Dosetaksel	Dosetaksel	İndirgeyici ajan varlığında dosetakseli polimere bağlayan disülfid bağının kırılması ile hızlandırılmış dosetaksel salımı gerçekleşmektedir.	(116)		
	O, N-hidroksietil kitosan-oktilamin	Paklitaksel	Kana göre daha yüksek glutatyon konsantrasyonlarında paklitaksel salımı kitosan ile hidrofobik grup arasındaki disülfid bağlarının kırılması sonucu daha hızlı gerçekleşmektedir.	(117)		
Enzim	Biotin-poli(etilen glikol)-b-poli(L-lizin)-peptit-doksorubisin	Doksorubisin	Kanser hücrelerinde aşırı salgılanan matriks metalloproteinaz-2 tarafından misellerdeki peptit bağlantısı parçalanarak doksorubisinin tetiklenmiş salımı gerçekleşmektedir.	(118)		
	D- α -tokoferil polietilen glikol 1000 süksinat ve metoksi-poli(etilen glikol)-peptit- α -tokoferol süksinat	Dosetaksel	Metalloproteinaz-2/9 enzimine duyarlı olan peptit bağlantısının bu enzimler varlığında parçalanması ile etkili dosetaksel salımı ve artmış hücre alım sağlanmıştır.	(119)		

Tablo 2.1. (Devam) Uyarıcı duyarlı polimerik misel örnekleri.

Uyarıcı Tipi	Dış Kaynaklı	Uyarıcı	Kullanılan Polimerler	Yüklenen İlaç	Özellikler	Kaynak
		Işık	Tarak benzeri -poli(etilen glikol)-g-2-diazo-1,2 -naftokinon	Kumarin 102	Işığa maruz bırakılınca hidrofobik 2-diazo-1,2-naftokinon yapısının hidrofilik bir yapıya dönüşmesiyle misel yapısı bozulur ve ışık ile tetiklenen kumarin salımı gerçekleştirilmiştir.	(120)
Poli(etilen oksit)-b-poli(n-bütül metakrilat-ko-4-metil-[7-(metakrilolil)oksietiloksi] kumarin))	5-Fluorourasil		Polimerin kumarin grubuna konjuge edilen 5-fluorourasil, misel UV ışımaya maruz bırakıldığında siklobütan bağlantısının kopması sonucu kumarin-fluorourasil heterodimerlerinin ayrılması ile kontrollü salım göstermiştir.	(121)		
Sıcaklık	4s[poli (ε-kaprolakton)-b-2s (poli (N-izopropilakrilamid-ko-akrilamid)-b'-metoksi poli (etilen glikol)/poli (etilen glikol) -folat)	Paklitaksel	Paklitaksel yüklü miseller fizyolojik koşullarda (37°C) göreceli olarak stabil iken, misellerin düşük kritik çözelti sıcaklığının üzerindeki sıcaklıklarda (40°C) paklitaksel salımı tetiklenmiştir.	(122)		
Manyetik alan	Poli(etilen glikol)-b-kaprolakton)/Demir oksit manyetik nanopartikülleri	Doksozobisin	Misellere yüklenen manyetik nanopartiküllerin manyetik alan uygulanarak ısıtılması sonucu, misel çekirdeğini oluşturan polikaprolakton kristallerinin erimesiyle doksozobisin salımının hızlanması sağlanmıştır.	(123)		
Ultrason	Pluronic P-105	Doksozobisin	Ultrason uygulanarak misellerden doksozobisin salımının akustik olarak tetiklenmesi ve ultrason uygulaması ile hücre zarlarında oluşan düzensizlik ile doksozobisin hücresel alımının artırılması sağlanmıştır.	(124)		
	Poli(D,L-laktik asit)-b-PEG	Nil kırmızısı	Misellerden nil kırmızısı salımı yüksek şiddette odaklanmış ultrason uygulanması ile oluşan geçici kaviteasyon ile polimerlerin degradasyonu sonucu misel yapısının bozulması ile sağlanmıştır.	(125)		

Tablo 2.1. (Devam) Uyarıcı duyarlı polimerik misel örnekleri.

Uyarıcı Tipi	Çoklu	Uyarıcı	Kullanılan Polimerler	Yüklenen İlaç	Özellikler	Kaynak
		pH ve redoks	poli(ε-kaprolakton)-b-poli(2-(dietilamino) etil metakrilat) ve poli (etilen glikol) –SS-poli(ε-kaprolakton)	Kurkumin	Redoks duyarlı disülfid bağının kırılması ve asidik pH ortamında poli(2-(dietilamino) etil metakrilat) bloğunun amin gruplarının protonlanması ile misellerin monomerlerinin ayrılması sonucu hızlı etkin madde salımı sağlanmıştır.	(126)
pH ve ışık	Pluronic 123-Doksozobisin konjugatı ve poli(etilen glikol)-b-poli(diizopropanolamino etil metakrilat)-cypate	Doksozobisin	Asidik ortamda misellerin disosiyasyonu ile doksozobisin salımının tetiklenmesi ve bölgesel lazer ışını uygulaması oluşturulan hipertermi ile misellerin derin tümör penetrasyonunun artırılması ve sitozolde doksozobisin salımı sağlanmıştır.	(127)		
pH ve sıcaklık	Poli(stiren-ko-maleik anhidrit)-g-poli (2-(N, N-dimetilamino) etil metakrilat)	Doksozobisin	Asidik ortamda polimerin amin gruplarının ve doksozobisinin amino grubunun protonlanması ile pozitif yüklü grupların birbirini itmesi ile daha hızlı doksozobisin salımı sağlanmıştır. Ayrıca yüksek sıcaklık misellerden doksozobisin salımını arttırmaya yardımcı olmuştur.	(128)		
Redoks, ultrason, sıcaklık	Poli(N-izopropil akrilamid)-b-poli(4-sübstitüe-ε-kaprolakton)	İndometazin	Misellerden etkin madde salımı sıcaklık ve redoks ve ultrason uyarıcıları ile tetiklenebilmektedir. Ultrason ve redoks uyarıcıları birlikte uygulandığında tek başlarına uygulanmalarına göre daha etkili bir salım sağlanmıştır.	(129)		

2.6.4. Misel Stabilitesi

Miseller, ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılırken formülasyon ve uygulama sırasında ve etki bölgesine gidene kadar kan dolaşımındayken bütünlüğünü korumalıdır. Misellerin stabilitesi genellikle termodinamik ve kinetik stabilite başlıkları altında incelenir. Termodinamik stabilite miseller olduğu sırada ve dengeye erişirken sistemin nasıl hareket ettiğini inceler, kinetik stabilite ise sistemin zaman içindeki davranışını, miselin ayrışması ve polimer değiş tokuş hızını inceler (130).

Termodinamik stabilite

Misellerin termodinamik stabilitesini karakterize etmek için temel parametre kritik misel konsantrasyonudur. Polimer konsantrasyonu kritik misel konsantrasyonun altında olduğunda ortamda tek başına polimer zincirleri mevcuttur, kopolimer konsantrasyonu kritik misel konsantrasyonunun üstünde olduğunda ise polimer zincirleri misel oluşturmaya başlar ve ortamda miseller ve polimer zincirleri birarada bulunurlar (130). Bu konsantrasyon ne kadar düşük olursa sistemin termodinamik stabilitesi o kadar yüksek olur. Termodinamik stabiliteyi misellerin hidrofobik çekirdeğinin bileşimi ve uzunluğu etkilemektedir. Kopolimerin hidrofobikliğinin artırılması hidrofobik çekirdeğin kohezyonunu artırır ve daha düşük bir CMC eldesini sağlar (131). Aynı derecelerde polimerizasyona sahip olan ancak farklı derecelerde hidrofobikliğe sahip monomerleri olan birkaç PEG-b-poli(alkilmetakrilat) arasında en düşük CMC, en hidrofobik kopolimer için elde edilmiştir (132). Etkin madde yüklü miseller içinse etkin madde ile hidrofobik çekirdek arasındaki ek hidrofobik etkileşimler stabiliteyi arttırabilir (133). Termodinamik stabilite miselin kabuk kısmını oluşturan hidrofilik polimer zincirleri ile sulu ortam arasındaki etkileşimlerden de etkilenir. Hidrofobik çekirdek sulu ortamdan hidrofilik kabuk ile korunmaktadır ve hidrofobik çekirdeğin suya maruz kalması durumunda misel bütünlüğünü kaybedebilir (130). Yokoyama ve arkadaşları adriamisin-konjuge poli(etilen glikol)-poli(aspartik asit) misellerinin distile suda stabil olduğunu, ancak benzer koşullar altında fosfat tamponlu tuz çözeltisi içinde bütünlüklerini kaybettiklerini bildirmişlerdir. Poli (aspartik asit) gruplarının pH ve osmolariteye duyarlı iyonize olabilen gruplar içermesi fosfat tamponu içindeki bütünlük kaybını

açıklamaktadır (134). Hidrofilik blok ile hidrofobik blok oranlarının değiştirilmesi ile ortam koşullarının etkilerine dayanıklı stabil miseller elde edilebilir. Hidrofobik çekirdeğin suya maruz kalmasını önlerken, hidrofilik polimerin serbestçe hareket etmesini sağlayacak şekilde, hidrofilik polimer misellerin yüzeyini kaplamalıdır (130).

Kinetik stabilite

Kinetik stabilite misel sisteminin sulu çözelti içinde zaman içindeki davranışını ve özellikle misellerin birbirleriyle ve çevreleriyle olan dinamiklerini inceler (130). İlaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan misellerin bulunduğu çevre ani değişimlere uğrar. Ortalama bir bireyde toplam kan hacmi yaklaşık 5 litredir ve intravenöz olarak uygulanan bir ilaç taşıyıcı sistem kanda aşırı bir dilüsyona uğrar (135). Miseller oluşuktan sonra bireysel polimer zincirleri dinamik kalır ve miseller ile çözelti arasında değiş tokuş edilir. Ortamdaki değişikliklere veya basit seyreltmelere maruz kaldıktan sonra, miseller ayrılmaya başlayacaktır. Enkapsüle edilmiş etkin maddenin erken salımını önlemek için misellerin kinetik stabilitesini karakterize etmek gereklidir. Kinetik stabilite CMC, camsı geçiş sıcaklığı (T_g), blok oranları ve enkapsüle edilmiş etkin maddeye bağlıdır (130).

Van Domeselaar ve arkadaşları (136) misel stabilitesinin çekirdeği oluşturan blok uzunluğu ile ilişkili olduğunu göstermek için farklı hidrofobik blok uzunluklarına sahip miselleri dinamik ışık saçılımı ile incelemiştir. Miseller CMC altındaki bir konsantrasyonda iken ve 7 gün sonunda daha uzun hidrofobik bloğa sahip miselin %30'un altında bir ayrışma gösterdiğini ve kısa hidrofobik bloğa sahip misele göre daha stabil olduğunu bildirmişlerdir (136). Misel sistemi kritik misel konsantrasyonunun altında olsa bile, çekirdek büyükse ve çekirdek malzemesi T_g 'nin altındaysa veya kristalize ise yine de bir süre için kinetik olarak stabil kalabilir (135). Creutz ve arkadaşları poli((dimetilamino)alkil metakrilat)-b-sodyum metakrilattan oluşturulan miselleri incelemiş ve kopolimerin hidrofobik/hidrofilik dengesindeki bir artışla unimer değişimi oranının azaldığını bulmuştur (137). Yokoyama ve arkadaşları doksorubisinin misel çekirdeğine konjugasyonu ve/veya fiziksel olarak yüklenmesinin poli(etilen glikol)-b-poli(aspartik asit) misellerinin yapısal stabilitesini arttırdığını bulmuşlardır (138). Miseller sistemik verilmiş sonrası ortamdaki tuz konsantrasyonu, pH ve proteinlere maruz kalmaktadırlar. Proteinler misellerin yüzeyine adsorbe

olabilir ve misel stabilitesini bozabilirler. Protein adsorpsiyonunun misellerin ayrışmasına ve enkapsüle edilmiş etkin maddenin salımına neden olduğu bildirilmiştir (139).

Polimer yapısına π - π etkileşimleri, hidrojen bağları oluşturacak grupların eklenmesi, farklı konfigürasyonlara sahip polimerlerin stereoselektif birleşmesi ile stereokompleks oluşumu ve misel oluştuktan sonra uyaran duyarlı çapraz bağlama yapılması (hidrazon veya disülfid gibi), misel stabilitesini arttırmak üzere kullanılan çeşitli stratejiler olarak karşımıza çıkmaktadır (87).

2.7. Misel Hazırlama ve Misellere İlaç Yükleme Yöntemleri

Blok kopolimer miseller genel olarak iki yöntemle hazırlanırlar. Birinci yöntemde, kopolimerin katı bir örneği seçici bir çözücü içinde doğrudan çözündürülür; misel çözeltisi durularak tavllanır ve/veya tavlama işlemi, ısı işlemi ile ve son olarak ultrasonik karıştırma altında yapılır (55). Seçici çözücüde doğrudan çözme yöntemi için kullanılan diğer bir yaklaşım olan film hidrasyonu yönteminde blok kopolimerin ortak çözücüdeki çözeltisi, çözücünün uzaklaştırılması ile film haline getirilir ve oluşan filmin seçici çözücüde hidrasyonu ile misel oluşumu sağlanır (57).

İkinci yöntemde ise kopolimer her iki blok için de iyi bir çözücü olan ortak çözücüde moleküler olarak çözündürülür ve sonra sıcaklık, çözücü bileşimi gibi koşullar misellerin oluşumunu sağlayacak şekilde değiştirilir. Genellikle bloklardan birini seçici olarak çöktüren bir çözücü ilavesi ve devamında başlangıçta kullanılan ortak çözücünün uzaklaştırılması ile misel oluşumu sağlanır. Sıklıkla tavsiye edilen bir alternatif, ortak çözücünün yavaş yavaş seçici çözücü ile değiştirildiği diyaliz tekniğidir (55).

Misellere etkin madde yükleme genel olarak kullanılan polimerin hidrofobiklik derecesine göre farklı yöntemler ile yapılır. Bu yöntemler genel olarak doğrudan çözünme, diyaliz, yağ/su emülsiyonu, çözücü buharlaştırma, film hidrasyonu olarak sayılabilir.

2.7.1. Doğrudan Çözünme

Bu yöntemde etkin madde ve polimer suda birlikte çözündürülerek misel oluşumu ve misellere etkin madde yüklenmesi sağlanır. Bu yöntem daha çok polimerin

orta derecede hidrofobik olduğu durumlarda uygulanmaktadır. Poloksamer polimeri kullanılarak haloperidol yüklenmiş miseller hazırlanmasında Kabanov ve arkadaşları bu yöntemi kullanmışlardır (48). Nishiyama ve arkadaşları (63) ise sisplatin ve poli(etilen glikol–poli(α,β -aspartik asit) polimerini distile suda çözdükten sonra belirli oranlarda karıştırıp polimer-metal kompleks misellerini hazırlamışlardır. Gou ve arkadaşları (140) monometoksi poli(etilen glikol)-poli(ϵ -kaprolakton) polimerini distile suda çözdükten sonra ısı uygulayarak misel oluşumunu sağlamış ve oda sıcaklığına soğutma işleminden sonra honokiol etkin maddesini misellere ekleyip ultrason uygulayarak etkin madde yüklü miselleri hazırlamışlardır.

2.7.2. Diyaliz

Diyaliz yöntemi ile misellere etkin madde yüklenmesi, polimer ve etkin madde su ile karışabilen bir organik çözücünde çözüldükten sonra, bu çözücünün distile suya karşı membrandan diyalizle yavaş bir şekilde uzaklaştırılmasını gerektirir. Lee ve arkadaşları (141) PEtOx-PCL polimeri ve paklitakseli tetrahidrofuranda/asetonitrilde çözdükten sonra distile suya karşı diyaliz etmiş çözünmeyen paklitaksel agregatlarını uzaklaştırmak için santrifüj işlemi uyguladıktan sonra misel süspansiyonunu 0,22 μm 'lik filtreden süzerek liyofilize etmişlerdir. Kullanılan çözücünün ve etkin madde polimer oranının yüklenen etkin madde miktarını etkilediğini ancak misel büyüklüğünde önemli bir değişikliğe neden olmadığını (yaklaşık 18-23 nm) bildirmişlerdir (141). Vangeyte ve arkadaşları (142) diyaliz öncesi organik faza su eklenmesinin, organik fazın doğrudan suya karşı diyaliz edilmesine göre daha tekrarlanabilir ve dar bir partikül büyüklüğü dağılımına sahip miseller elde edilmesini sağladığını bildirmişlerdir.

2.7.3. Yağ/Su Emülsiyonu

Bu yöntemde su ile karışmayan bir organik çözücünde polimer ve etkin madde çözüldürülür, üzerine su eklenir ve karıştırma/sonikasyon ile emülsifikasyon gerçekleştirilir. Oluşan emülsiyon damlacıkları misel oluşumu için bir şablon görevi görür. Organik fazın buharlaştırılması ile etkin madde yüklü miseller elde edilir. Metoksi poli(etilen oksit)-b-poli(ϵ -kaprolakton) polimeri ile amiodaron etkin maddesi kloroformda çözüldürülüp, şiddetli bir şekilde karıştırılan suya tek seferde eklenerek

elde edilen yağ/su emülsiyonundan karıştırma belli bir süre devam ederken kloroformun buharlaşması ile etkin madde yüklü miseller elde edilmiştir (143). Kataoka ve arkadaşları doksorubisinin kloroformdaki çözeltisini karıştırılmakta olan ve önceden oluşturulmuş misel çözeltisine ekleyerek yağ/su emülsiyonu oluşumunu sağlamış ve kloroformun buharlaşması ile etkin madde yüklü miseller elde etmişlerdir (144).

2.7.4. Film Hidratasyonu

Bu yöntemde polimer ve etkin madde bir organik çözücüde çözündürülür, daha sonra çözücü genellikle vakum ya da nitrojen altında uzaklaştırılır ve oluşan film su eklenerek hidrate edilir. İlaç ile polimerin hidrofobik bloğunun etkileştiği ince filme su eklendiğinde hidrofilik bloklar çözünür ve hidrate olurken etkin madde ile hidrofobik bloklar arasındaki etkileşim artmaktadır. Zhao ve arkadaşları (147) kurkumin etkin maddesini ve Pluronic polimerlerini kloroformda çözmüş ve kloroformu vakum altında döner vakum evaporatörü ile buharlaştırıldıktan sonra oluşan filmi suda ultrasonikasyon yardımıyla hidrate etmişlerdir. Oluşan misellerin ortalama büyüklüğü 68,2 nm iken, etkin madde yükleme etkinliği yaklaşık %7 olarak elde edilmiştir.

2.7.5. Dondurarak Kurutma

Bu yöntemde etkin madde ve polimer, su ve tersiyer butil alkol karışımında çözündürülür ve ardından dondurulur. Dondurulmuş çözücü vakum altında süblimasyon ile uzaklaştırılır ve oluşan katı kek %0,9 NaCl gibi enjekte edilebilecek bir çözücüde rekonstitüye edilerek etkin madde yüklü misellerin kendiğinden oluşması sağlanır. Bu yöntem genel olarak kriyoprotektan özelliğe sahip olduğu için polivinilpirolidonu hidrofilik blok olarak içeren polimerle misel hazırlamak için uygundur (148).

2.7.6. Misellerin Saflaştırılması

Çeşitli yöntemlerle hazırlanan etkin madde yüklü misellerin saflaştırılması için santrifüj, ultrafiltrasyon, diyaliz, filtrasyon ve dondurarak kurutma yöntemleri kullanılmaktadır. Saflaştırmadaki amaç enkapsüle olmayan serbest etkin maddeyi ve

kalıntı organik çözücüü uzaklaştırmaktır. Yüksek hızda santrifüj ile misellerin çöktürülerek süpernatanın uzaklaştırılması ve misellerin yeniden saf suda dağıtılması ile kalıntı organik çözücü uzaklaştırılabilir. Dondurarak kurutma ile vakum altında kalıntı çözücü uzaklaştırılabilir ancak misellerin yeniden suda dağılılırlığını sağlamak için kriyoprotektanlar kullanmak gerekebilir (148). Eğer kullanılan etkin madde suda çözünmüyorsa enkapsüle olmayan etkin maddeyi uzaklaştırmak için düşük hızda santrifüj uygulanıp serbest etkin madde çöktürülüp uzaklaştırılabilir (149). Hidrofobik bir etkin madde kullanılıyorsa 0,22 veya 0,45 µm gibi çeşitli por çaplarında filtreler kullanılarak yapılan filtrasyon ile etkin maddenin oluşturduğu agregatları uzaklaştırırken ve misel agregatları da uzaklaştırılıp homojen bir partikül büyüklüğü dağılımı elde edilebilir (150). Suda çözünürlüğü olan serbest etkin madde, etkin madde yükleme işlemi sırasında veya sonrasında suya karşı diyaliz ile uzaklaştırılabilir (151). Ultrafiltrasyon ile ise oluşturulan misel büyüklüğünden daha küçük ancak uzaklaştırılmak istenen molekülün ağırlığından daha büyük por çaplarına sahip membran filtreler kullanılarak, serbest etkin maddenin süzüntü içersine geçip, filtrenin üstünde kalan konsantrasyon haldeki etkin madde yüklü misellerden ayrılması sağlanabilir (144).

2.8. Misellerin karakterizasyonu

Miselleri karakterize etmek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Genel pratikte kullanılan tipik karakterizasyon yöntemleri aşağıda başlıklar halinde özetlenmiştir.

2.8.1. Kritik Misel Konsantrasyonu

Blok kopolimer miseller için CMC düşük molekül ağırlıklı sürfaktanlarda olduğu gibi çeşitli saçılma teknikleri (statik ışık saçılımı-SLS, -küçük açılı X ışını saçılımı-SAXS, küçük açılı nötron saçılımı-SANS gibi), floresan ya da boya çözme tekniği ve yüzey gerilimi ölçümü gibi çeşitli yöntemlerle belirlenebilir. Ancak bu teknikler kullanılırken blok kopolimerlerin çok düşük CMC değerlerine sahip oldukları, difüzyon katsayıları düşük olduğu için denge durumuna çok uzun bir süre sonunda erişilebildiği ve '*frozen-in*' misellerde denge durumuna erişilmediği göz önünde bulundurulmalıdır (55).

Statik ışık saçılımı, eğer ölçümler CMC değerinin çok üstünde, misel oluşumu dengesinin misellere doğru kaydığı ve çözeltideki ünimer miktarının çok az olduğu dolayısıyla ünimerlerin ışık saçılımına katkılarının ihmal edilebilir olduğu durumda yapılırsa misellerin ortalama görünür molekül ağırlığının belirlenmesini sağlayabilir. Büyük moleküller küçük moleküllere göre daha fazla ışık saçarlar ve saçılan ışığın intensitesi molekül ağırlığı ile orantılıdır. SLS'nin büyük partiküllere olan daha fazla hassasiyeti CMC tayininde kullanılmasını sağlamıştır (152). Misellerden oluşan bir çözelti seyreltikçe çözelti bileşimi benzer miktarlarda misellerden ve ünimerlerden oluşan bir sisteme dönüşür. Daha fazla seyreltme üzerine CMC'ye ulaşılır ve çözelti sadece ünimerleri içerir. Bu geçiş konsantrasyonun bir fonksiyonu olarak ters molekül ağırlığının davranışı takip edilerek incelenebilir. CMC ters molekül ağırlığının sabit kaldığı, yani sadece ünimerlerin mevcut olduğu nokta olarak alınır (153).

SAXS ve SANS teknikleri CMC, misellerin molekül ağırlıkları, büyüklükleri ve misellerin çekirdek/kabuk yapısı gibi çeşitli parametrelerin belirlenmesinde kullanılmaktadır (55). SAXS yönteminin prensibi çözücü ile çözünenlerin farklı kısımları arasındaki elektron yoğunluğu farklılıklarına dayanır. SANS ise nötron ışınının örneğe uygulanmasıyla nötronların çekirdekle etkileşerek saçılmasına dayanır. Misel ve çözücü arasındaki kontrast, misel ya da çözücünün döteryumlanması ile kolaylıkla arttırılabilir. Ayrıca, bileşenlerin kısmi olarak döteryumlanması ile seçici bir kontrast oluşturularak çok bileşenli misel sistemleri basitleştirilerek incelenebilir (152).

Yüzey gerilimi ölçümü yönteminde çözücüdeki ünimer konsantrasyonu arttıkça yüzey gerilimi düşecektir ancak CMC değerine ulaşıldığında yüzey gerilimi değeri platoya ulaşır ve konsantrasyona karşı yüzey gerilimi grafiklerinden CMC hesaplanabilir (56).

Floresan spektroskopide, kopolimer zinciri üzerindeki belirli bölgelerde kovalent bir bağ ile bağlanan veya bir misel çekirdeği içinde kolaylıkla enkapsüle edilebilen prob molekülleri kullanılır. Enerji transferi, floresan söndürme ve zamana bağlı floresan depolarizasyon teknikleri kullanılarak, misellerin mikro ortamı keşfedilebilir. Yerel ölçekte olan duyarlılıklarından ötürü, saçılma yöntemlerinin küresel ölçekte duyarlılıklarının tersine, spektroskopik tekniklerin kullanımı, saçılma teknikleri ile erişilemeyen küçük CMC değerlerinin belirlenmesini sağlar. Misel

ünimer dengeleri veya miseller arasındaki zincir değişimi florofor grupları ile özel olarak etiketlenmiş blok kopolimerleri kullanılarak da incelenebilir (152).

2.8.2. Morfoloji

Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) misellerin doğrudan görüntülenmesi için sıklıkla kullanılan bir tekniktir. Blok kopolimer miseller esasen C, H, N ve O gibi hafif elementler içerdiğinden, gözlem sırasında bozulmaya maruz kalırlar ve gözlem sırasında kaydedilen bu nesnelere "hayalet" resmidir. Değişik örnek hazırlama teknikleri kullanılarak TEM gözlemleri sırasında misellerin stabilitesi ve elektronik kontrastı artırılmaya çalışılabilir. Ağır metallerle kontrastlama teknikleri bu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu deneylerde, miseller genellikle başlangıçta amorf bir filmle kaplanmış bir TEM ızgarası üzerinde sıvı halde bırakılır ve daha sonra kurutulmuş halde gözlemlenir. Ağır metaller, uygun fonksiyonel kısımları taşıyan blok kopolimer miselleri ile etkileşime girebilir (154). Tipik örnekler, RuO₄'ün aromatik çift bağlara ve OsO₄'ün alifatik çift bağlara tepkimeleridir (155). Bu boyama teknikleri ayrıca misellerin çekirdek gibi belirli bir bölümünün doğrudan görüntülenmesine izin verir. Negatif kontrastlama teknikleri, miseller ile etkileşmeyen ve dolayısıyla substrat üzerine yayılan bir kontrast maddenin kullanımına dayanır. Miseller daha sonra karanlık bir arka plan üzerinde parlak noktalar olarak görünür. Fosfotungstik asit tipik bir negatif boyama ajanıdır (156).

Son zamanlarda geliştirilen kriyo TEM tekniği, blok kopolimer misel karakterizasyonu için sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemde miseller camsı bir su fazında doğrudan gözlenirler ve misellerin çekirdek ve suda şişmiş kabuk yapılarının karakteristik boyutları eğer iki alan arasında yeterli elektronik kontrast elde edilirse belirlenebilir (156).

Blok kopolimer misellerinin doğrudan görüntülenmesi, atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile de elde edilebilir. AFM ölçümleri ya kurutulmuş halde ya da bir sıvı hücre içinde doğrudan "*in situ*" olarak gerçekleştirilebilir. "Kuru" ölçümler, düz bir katı substrat (silikon, mika gibi) üzerine adsorbe edilmiş veya sıvı halde bırakılmış misellerin kurutulması ile gerçekleştirilir (157).

Taramalı elektron mikroskobu tekniklerinin de blok kopolimer misellerinin görüntülenebilmesi için uygun olduğu kanıtlanmıştır (158).

2.8.3. Partikül Büyüklüğü ve Molekül Ağırlığı

Blok kopolimer misellerinin partikül büyüklükleri ve molekül ağırlığı, saçılma ve hidrodinamik karakterizasyon teknikleri ile belirlenebilir. Genel uygulamada, hidrodinamik yarıçap, dinamik ışık saçılımı teknikleriyle belirlenir. Bu teknikte misellerin difüzyon katsayılarının ölçümünden yola çıkarak hidrodinamik yarıçaplarına ilişkin bir tahmin elde edilebilir (55). SLS, SAXS ve SANS gibi saçılma teknikleri ile de misellerin büyüklükleri ve molekül ağırlığı belirlenebilir (152).

Boyut dışlama kromatografisi olarak da bilinen jel permeasyon kromatografisi (GPC) ile çözültideki misel ve ünimerlerin dağılımı belirlenebilir. Bu teknikte poröz katı bir jel ayırma işleminde kullanılır ve farklı hidrodinamik çaptaki partiküller jelden elüe olurken fraksinasyon gerçekleşir. Bu yöntemin sakıncası ayrıca bir kalibrasyon gerektirmesidir. Ayrıca ünimer-misel dengesinin bozulması ve kopolimerin muhtemelen jele absorbe olarak kaybı bu yöntemle ilgili endişe edilmesi gereken durumlardır (56).

2.9. RES'ten Kaçış ve Kanda Kalış Süresinin Uzatılması

Bağışıklık sisteminin bir parçası olan RES, monositler ve makrofajlar gibi fagositik hücrelerden oluşur. İntravenöz olarak enjekte edilen koloidal partiküllerin büyük bir kısmı mononükleer fagositik sistem tarafından tanınarak kan dolaşımından hızlı bir şekilde uzaklaştırılırlar (159). Oponin proteinlerinin nanotaşıyıcılara absorpsiyonu (opsonizasyon) ile nanotaşıyıcılar fagositik hücrelere görünür hale gelirler ve fagositoz ile kan dolaşımından elimine edilebilirler (159, 160). Karaciğerde bulunan makrofajlar (Kupffer hücreleri) ve dalak makrofajları, serum proteinleri ile kaplanmış nanotaşıyıcıları hızlı bir şekilde alırlar. Nanotaşıyıcılar, büyüklüklerine ve yüzey özelliklerine bağlı olarak genellikle karaciğer, dalak ve RES'nin diğer organları tarafından alınırlar. Daha hidrofobik yüzeylere sahip olan nanotaşıyıcılar öncelikle karaciğer tarafından olmak üzere dalak ve akciğerler tarafından alınırlar (160). Makromoleküler yapıdaki nanotaşıyıcıların tedavide başarılı olabilmeleri için kan dolaşımında stabil olarak bulunmaları, kan bileşenleri ve RES ile etkileşime girmemeleri ve hastalık bölgesine seçici olarak ekstravaze olarak burada etkilerini göstermeleri gerekmektedir (161). Pasif hedeflendirme açısından düşünüldüğünde kandan hedef bölgeye ekstravazasyon doğal olarak yavaş bir süreçtir. Dolayısıyla RES

ile etkileşimden kaçınan ve böylece kan dolaşımında daha uzun süre kalan nanotaşıyıcılar başarılı bir pasif hedeflendirme için gereklidir. Aktif hedeflendirmede de kanda kalış süresi uzatılmış nanotaşıyıcılar kullanılarak, hedeflendirilmiş nanotaşıyıcı ile hedefin etkileşime girmesi için yeterli süre sağlanmış olur (162).

Nanotaşıyıcıların kanda kalış süresinin uzatılması için kullanılan temel strateji belirli sentetik ya da doğal polimerler ile modifiye edilmeleridir. Bu amaçla kullanılan polimer kovalent olarak nanotaşıyıcıya konjuge edilebilir ya da adsorpsiyon yolu ile nanotaşıyıcının yüzeyi kaplanabilir. Her iki durumda da konjuge edilmiş ya da adsorbe edilmiş polimerin hidrofilik kısımları nanotaşıyıcıların içinde bulunduğu sulu ortamla temas halindedir ve böylece nanotaşıyıcılar kandaki plazma proteinleriyle etkileşime girmekten korunmaktadırlar. Polimerler aracılığı ile sağlanan bu koruma sterik stabilizasyon olarak adlandırılmaktadır (162). Bu amaçla kullanılan polimerler arasında polisakkaritler, polivinil piroolidon, polivinil alkol ve PEG gibi hidrofilik polimerler sayılabilir (163). Kanda kalış süresi uzun nanotaşıyıcılar tasarlanmasında PEG sıklıkla kullanılmıştır. Bunun nedeni PEG'in sulu çözelti içindeki mükemmel çözünürlüğü ve su moleküllerini bağlayabilme yeteneği, polimer zincirinin yüksek esnekliği, düşük immünojenisite göstermesi, kolayca nanotaşıyıcıların yapısına konjugasyon veya adsorpsiyon ile dâhil edilebilmesi gibi özellikleridir (162, 163). Ancak PEG'in proteinleri uzak tutma kapasitesini ve makrofaj plazma membranı ile etkileşimini molekül ağırlığı, polimer zincirlerinin esnekliği ve konformasyonu, yoğunluk gibi parametreler büyük oranda etkilemektedir (163).

Polimerik miselleri meydana getiren blok kopolimerin hidrofilik bloğunun yüksek yoğunluğa sahip PEG gibi uygun bir polimer olması halinde, kandaki proteinlere karşı görünmezlik etkisinin sağlanması mümkündür. Ayrıca polimerik misellerin kabuk yapısını oluşturan PEG, oluşturduğu sterik engel ile çekirdeğin yükünün maskelenmesini sağlar ve zeta potansiyel nötralize olacağı için, vücutta yüke bağlı etkileşimleri azaltır (161). Yamamoto ve arkadaşları intravenöz enjeksiyon ile uyguladıkları PEG-b-PLA misellerinin yarı ömrünün yaklaşık 18 saat olduğunu ve başlangıçta enjekte edilen dozun %25'inin 24 saat sonunda kan dolaşımında muhafaza edildiğini bildirmişlerdir (164).

PEG biyobozunur olmadığı için uzun dönem maruziyette vücutta birikmesi söz konusudur. Bazı prelinik çalışmalarda kronik olarak PEG kullanımında hayvanların

böbreklerinde PEG içeren intraselüler veziküllerin oluştuğu bildirilmiştir (165). Ayrıca bazı çalışmalar PEG'e karşı spesifik antikor cevaplarının meydana gelebileceğini ve bunun da hızlandırılmış kan klerensi fenomeni (ABC-accelerated blood clearance) olarak adlandırılan ve ilacın yarı ömrünü kısaltan bir durum ile sonuçlanabileceğini bildirmişlerdir (7). Kimi nadir durumlarda ise belirli bireylerde alerjik durumları tetikleyebileceği bildirilmiştir (165, 166).

PEG içeren polimerik misellerde ABC fenomeni görülme de yukarıda anlatılan sebeplerden dolayı PEG'e alternatif olabilecek polimerler araştırılmaktadır. Poli(amino asit)ler, poli(N-vinil-2-pirolidon), poli(gliserol), poli(akrilamid), poli(vinil alkol), POx'ler gibi çeşitli biyoyumlu polimerler PEG'e alternatif olarak araştırılmaktadır (167-170). Bu polimerlerden POx'lerin nonspesifik protein bağlanmasını azaltabildikleri ve insan olmayan primatlarda güvenli bir şekilde uygulanabildikleri bildirilmiştir (165, 167). POx'lerin kimyasal ve yapısal değişkenlikleri ve bunların hassas bir şekilde kontrol edilebilmesi, bu polimerlerin polimerik ilaç taşıyıcı sistem olarak tasarlanmalarını kolaylaştıran üstün özelliklerinden biridir (171). Ancak henüz POx'ler için klinik kullanım onayı bulunmamaktadır ve PEtOx, FDA tarafından sadece gıda katkı maddesi olarak onay almıştır (172).

2.10. Pasif ve Aktif Hedeflendirme

2.10.1. Pasif Hedeflendirme

Kanser tedavisinde pasif hedeflendirme EPR etkisini temel almaktadır ve EPR kavramı ilk kez 1986 yılında Matsumura ve Maeda (108) tarafından bildirilmiş ve Maeda ve arkadaşları tarafından daha ayrıntılı olarak araştırılıp tanımlanmıştır (173-177). Çeşitli koşullar (hipoksi/enflamasyon, enfarktüs ve tümörler gibi) altında kan damarı duvarındaki endotel hücrelerinin oluşturduğu dizilimin normal dokulara göre daha geçirgen olduğu günümüzde artık iyi tanımlanmış bir durumdur (178). Tümörlerde kan damarlarındaki artmış geçirgenlik makromoleküllerin kan damarlarından sızıp tümör intersitisyel alanına girmesini sağlarken tümör dokusundaki bozulmuş lenfatik filtrasyon bu makromoleküllerin burada kalmasına izin verir. Küçük moleküller difüzyon ile dolaşıma dönme yetenekleri nedeniyle makromoleküller gibi tümör bölgesinde tutulamazlar (179).

Araştırmacılar çoğu katı tümörün kusurlu bir yapıya sahip kan damarlarına sahip olduğunu ve genellikle büyük miktarlarda vasküler permeabilite faktörlerini ürettiklerini ortaya koymuştur. Dolayısıyla çoğu tümör, tümörün hızlı büyümesini sağlayan oksijen ve besinlerin teminini sağlayacak şekilde artmış vasküler geçirgenlik gösterir. Bu tümör kan damarlarının yapısının özel durumu makromoleküllerin tümör dokusuna taşınmasını kolaylaştırmaktadır. Normal dokularda gözlenmeyen bu durum 40 kDa'dan büyük makromoleküllerin seçici olarak tümör damarlarından dışarı sızarak tümör dokusunda birikmelerini sağlamaktadır (107, 174-176, 179). Makromoleküler ilaçlar proteinler, peptitler, DNA-tabanlı yapılar ve ilaç yüklü farmasötik nanotaşıyıcılar gibi ortak noktaları nanometre büyüklüğüne sahip olmaları olan çeşitli preparatları kapsamaktadır (178).

Tümörlerin geçirgenliği artmış damarlarındaki açıklıkların büyüklük sınırı 200-800 nm gibi geniş bir aralıkta olup vakadan vakaya değişmektedir (76, 77). Ayrıca tümör kan damarlarından nanotaşıyıcıların tümör dokusuna taşınmasının interendotelyal boşluklar ile transendotelyal kanallardan gerçekleştiği bildirilmiştir (77). Dvorak ve arkadaşları endotel hücrelerinin sitoplazması boyunca uzanan 60-80 nm vezikül ve vakuollerden oluşan organellerin makromoleküllerin transvasküler olarak taşınmasından sorumlu olabileceğini belirtmişlerdir (180). Yakın zamanda yapılan bir çalışma intratümöral ve vasküler basınç gradyanlarının aracılık ettiği tümör damarlarındaki dinamik vasküler patlamalar sonucu tümör intersitisyel boşluğuna kısa süreli sıvı akışlarının gerçekleştiğini ve bunun da tümör kan damarlarının permeabilitesinin dinamik bir yapıda olduğuna işaret ettiğini bildirmiştir. Yazarlar oluşan bu dinamik sızıntıların geçici açıklıklar ve kapanışlar oluşturduğunu ve bunun tümör kan damarlarından nanopartiküllerin artmış ekstrasvazasyonunu ve ilacın tümör dokusunda dağılımını açıklayabileceğini belirtmişlerdir (181). EPR etkisinden faydalanılarak hedeflendirme yapılması için öncelikle nanotaşıyıcının kanda kalış süresinin uzun olması gerekmektedir. Diğer önemli faktör kanda kalış süresi uzatılmış nanotaşıyıcının büyüklüğüdür. Tümörlerin damarlanma yapısı ve permeabilitelerindeki heterojenlik nanotaşıyıcıların tümör kütlesi içindeki perfüzyonu ve biyodağılımının düzensiz olmasına neden olabilir. Bu nedenle tümör hedeflendirmede EPR etkisinden faydalanabilmek için başarılı bir şekilde kandan tümör dokusuna ekstravaze olabilecek tümör dokularına derin bir penetrasyon

sağlayabilecek uygun büyüklüklere sahip kanda kalış süresi uzatılmış nanotaşıyıcılar kullanılmalıdır (161). Tang ve arkadaşları (182) PEG ile kaplanmış silika nanopartiküllerini farklı büyüklüklerde (20, 50, 200 nm) hazırlamış ve kanser tedavisi için optimum büyüklüğü belirlemeye çalışmışlardır. Bu üç nanopartikül arasından, derin doku penetrasyonu ve tümörlerde yüksek tutulma açısından 50 nm büyüklükteki nanopartikül ile en iyi sonuçlar elde edilmiştir. 50 nm nanopartiküle karşıt olarak 200 nm nanopartikül sınırlı tümör doku penetrasyonu gösterirken, 20 nm nanopartikülün tümör dokusundan klerensi hızlıdır (182). Cabral ve arkadaşları (80) ise farelerde oluşturdukları farklı tümör modellerinde 100 nm altı polimerik misellerin birikimi ve etkinliğini araştırmışlardır. 30, 50, 70 ve 100 nm büyüklükteki misellerin yüksek permeabiliteye sahip tümörlere penetre olabildiğini ve antitümör etkinlik gösterebildiğini ancak permeabilitesi düşük pankreatik tümöre yalnızca 30 nm büyüklükteki miselin penetre olabildiğini ve anlamlı bir antitümör etki gösterebildiğini bildirmişlerdir. Wang ve arkadaşları (183) ise misel büyüklüğünün tümörde birikme, tümöre penetrasyon ve tedavi üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmalarında, miselin kanda kalış süresinin ve tümörde birikiminin misel büyüklüğü arttıkça arttığını ve optimum büyüklüğün 100-160 nm arasında olduğunu bildirmişlerdir. 100 nm büyüklüğe sahip misellerin tümör bölgesinde 30 nm misellere göre daha fazla biriktiğini ancak 100 nm misellerin derin tümör penetrasyonlarının 30 nm misellerden daha düşük olması nedeniyle tedavi etkinliğini 30 nm misellere göre anlamlı derecede iyileştiremediğini bildirmişlerdir (183).

2.10.2. Aktif Hedeflendirme

Aktif hedeflendirmede, hedef bölgede eksprese edilen uygun reseptörlere bağlanmak üzere hedefleyici ligandlar nanotaşıyıcı yüzeyine eklenir. Ligand, tümör hücreleri veya tümör damarları tarafından aşırı eksprese edilen ve normal hücreler tarafından eksprese edilmeyen bir reseptöre bağlanacak şekilde seçilmektedir (184). Nanotaşıyıcıların aktif hedeflendirilmesi, monoklonal antikorlar, transferrin, çeşitli peptitler, folat, aptamerler (tek zincirli oligonükleotidler) veya bazı şekerler gibi hedefleme ligandlarının yüzeylerine eklenmesiyle sağlanabilir (185). Genel olarak aktif hedeflendirme stratejileri, hücresel hedefler olarak kanser hücrelerini ve tümör endotelini hedefleyen sistemler şeklinde sınıflandırılabilir (184).

Polimerik misellerin hidrofilik koruyucu kabuğu, kan bileşenleriyle teması azaltarak ve miselin kandaki yarı ömrünün uzamasını sağlar. Ancak hidrofilik polimer aynı zamanda nanotaşıyıcıların hücre içine alımını sınırlamaktadır. Misellere yüklenen etkin maddenin belirli hücre içi hedeflere ulaşması gereken uygulamalar için hücre içine alımın sınırlı olması çok önemli bir sorundur. Bu etki, nanotaşıyıcıların PEG ile modifiye edilmiş yüzeyleri ile ilişkilendirildiği için, “PEG ikilemi” (*PEG dilemma*) olarak adlandırılmaktadır (186). PEG dışında diğer hidrofilik polimerler için de benzer bir etki gözlenmiştir (187). Bu sorunu çözmek için kullanılan yaklaşımlardan biri tümör bölgesinde hidrofilik polimerin nanotaşıyıcıdan ayrılabilmesini sağlayan bir bağ ile sisteme konjuge edilmesi olup diğeri ise nanotaşıyıcının yüzeyinin ligand ile modifiye edilerek hücrelerle spesifik etkileşiminin sağlanması ve hücre içine alımının artırılmasıdır (186). Ligandların hedefleyici kısımları ile nanotaşıyıcının yüzeyini kaplayan hidrofilik polimer (PEG gibi) arasında sterik engeli önlemek için, hedefleme ligandı genellikle hidrofilik polimerik zincirin kimyasal olarak aktive edilmiş uzak ucuna bağlanır (188). Ligand ile modifiye edilmiş misellerin etkinliği, ligandların misel yüzeyindeki yoğunluğu, misel ve ligand arasındaki ara bağlantının esnekliği ve hücrelerde hedef reseptörlerin ekspresyonunun değişkenliği gibi koşullara bağlıdır (184, 189).

Nanotaşıyıcıların, belirli hücre popülasyonlarını hedefleme etkinliği çeşitli ligandlar kullanılarak modifiye edilmeleri ile iyileştirilebilmektedir. İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) antikoru bağlanmış PEG ile modifiye edilmiş doksorubisin yüklü lipozomların, HER2 aşırı eksprese eden SKBR-3 hücrelerini başarılı bir şekilde hedeflediği, nanotaşıyıcıların hücre içine alımının ve sitotoksitesinin antikor bağlanmamış nanotaşıyıcıya göre iyileştirildiği bildirilmiştir (190). Ahn ve arkadaşları (191) doku faktörünü hedefleyen antikor fragmentini konjuge ettikleri ve oksaliplatinin aktif kompleksini yükledikleri polimerik miseller ile *in vivo* pankreatik tümör modellerinde hedeflendirilmemiş misel ve serbest etkin maddeye göre tümör baskılanması açısından daha başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Prostat spesifik membran antijenini tanıyan RNA aptameri ile modifiye edilmiş ve dosetaksel yüklü nanopartiküller ile yapılan çalışmalarda hedeflendirilmemiş nanopartiküllere göre daha üstün bir *in vitro* sitotoksite ve *in vivo* çalışmalarda da daha üstün bir etkinlik ve azaltılmış toksisite elde edilmiştir (192). Folat

hedeflendirilmiş paklitaksel ve doksorubisin yüklü polimerzomlar, hedeflendirilmemiş polimerzomlar ve serbest etkin madde kombinasyonuna göre in vivo çalışmada tümör büyümesini daha yüksek bir oranda inhibe etmişlerdir (193).

Ligandlar ile modifiye edilmiş aktif hedeflendirilmiş nanotaşıyıcılar hedef hücrelerin tanınması, hücre alım, hücre içine ilaç taşınması gibi alanlarda belirgin bir başarı sağlasalar da sistemik olarak uygulanan aktif hedeflendirilmiş nanotaşıyıcıların tümör bölgesinde birikmesi EPR etkisine bağlıdır. Nanotaşıyıcıların kanda kalış süresi, ekstrevasyonu, tümör dokusuna penetrasyonu ve burada tutulması bu süreci kontrol etmektedir (161). Aktif hedeflendirmenin her zaman etkili bir tümör birikimine neden olmadığına işaret eden bazı çalışmalar, ligand ile modifiye edilmiş nanotaşıyıcıların tümörlerdeki ilaç miktarını arttırmadığını bildirmişlerdir (194, 195). Bununla birlikte ligandlar, geçirgen olmayan dokularda ekstrevasyon ve doku penetrasyonu dâhil olmak üzere çeşitli biyolojik engellerin üstesinden gelmek için de kullanılabilir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada tümör endotelinde ve kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilen $\alpha_v\beta_3$ ve $\alpha_v\beta_5$ integrinlerini hedefleyebilen siklik Arg-Gly-Asp (cRGD) peptidleri ile modifiye edilmiş polimerik misellerin, kanser hücreleri tarafından misellerin hücre alımını arttırmanın yanında, düşük geçirgenliğe sahip glioblastoma tümör modelinde hedeflendirilmemiş misellere göre tümör dokularında hızlı bir birikim ve penetrasyon gösterdikleri bildirilmiştir (196, 197).

Kanser hücrelerine yüksek afinitesi olan peptitlerin hedefleyici ligandlar olarak kullanımını kimyasal olarak stabil olmaları, üretim ve modifikasyonlarının kolay olması, monoklonal antikorlara göre küçük moleküller olmaları nedeniyle ilgi çekmektedir (198). Meme kanserine spesifik bir peptit olan peptit 18 (WXEAAAYQRFL) yakın zamanda geliştirilmiş bir peptit olup, p160 peptidinin bir analogudur (199). Polimerik misellerin peptit 18 ile modifikasyonu, p160, c-RGD ile modifiye edilmiş veya hedeflendirilmemiş misellere kıyasla, meme kanseri hücrelerinde (MCF-7, MDA-MB-231) hücre alımda bir artışa yol açmıştır (200). Başka bir çalışmada peptit 18 konjuge edilmiş altın nanopartiküllerinin MCF-7 hücrelerine afinitesinin normal 3T3-L1 fibroblast hücrelerine göre yüksek ve konsantrasyona bağımlı olduğu bildirilmiştir (201). Peptit 18 amino asit sekansındaki iki amino asitin D formları ile değiştirilmesi ile elde edilen peptit 18-4'ün (WxEAAAYQRFL), meme kanseri hücrelerine (MCF-7,

MDA-MB-231) afinitesini korurken enzimatik olarak daha stabil oldukları bildirilmiştir (202).

Peptit 18'in genel olarak p160'ın bağlandığı kabul edilen reseptöre bağlandığı düşünülmektedir (199). Soudy ve arkadaşları (203) peptit p160 ve bunun enzimatik olarak stabil analogu peptit 18-4 (W_xEAAYQrFL) bağlandığı kabul edilen reseptörü tanımlamak için yaptıkları çalışmada meme kanseri hücrelerinde aşırı eksprese edilen ve normal meme hücrelerinde minimum ekspresyonu olan keratin 1 (KRT 1) reseptörünü tanımlamışlardır. Peptit p160 ve bunun analoglarının KRT 1 reseptörüne bağlandığı ve doğrudan etkileşim çalışmaları ile peptit p160 veya 18-4'ün KRT1 protein fragmanına sırasıyla yaklaşık 1,1 ve 0,98 μ M bağlanma sabiti ile kuvvetli bir şekilde bağlandığının gösterildiği bildirilmiştir (203).

2.11. Misellerin Hücresel Alımı

Misellerin hücre içine girişini incelemek için floresan ya da radyoaktif problar kullanılabilir (204). Allen ve arkadaşları DiI veya [³H]FK506 enkapsüle ettikleri misellerin hücre içine girişinin zaman, sıcaklık ve pH bağımlı olduğunu ve endositoz yoluyla gerçekleştiğini bildirmişlerdir (205). Luo ve arkadaşları (206) ise misellerin doğrudan alımını inceleyebilmek için fiziksel olarak enkapsüle edilen problar yerine poli(etilen oksit)-b-poli(ϵ -kaprolakton) blok kopolimerlerini kimyasal olarak tetrametilrodamin ile işaretleyerek çalışmalar yapmışlardır. Misellerin zaman ve konsantrasyona bağımlı olarak endositoz yoluyla hücre içine alındığını göstermişlerdir (206). Blok kopolimer zincirlerine floresan özellik gösteren bir probun kimyasal olarak konjuge edilmesi veya floresan probun misellere enkapsüle edilmesi ile misellerin hücre içine girişi floresan mikroskop veya akış sitometrisi gibi yöntemlerle incelenebilmektedir (207). Verilen bu iki yöntem de kullanılmaktadır ancak misellerin hücre içine girişini incelemek için ideal yöntem blok kopolimerlerin bir prob ile işaretlenmesidir. Chen ve arkadaşları (208) miselleri hem blok kopolimerleri işaretleyerek hem de fiziksel olarak DiIC₁₈ enkapsüle ederek incelemişlerdir. DiIC₁₈ probunun hücre içine alımının floresan işaretli blok kopolimerden çok daha hızlı olduğunu belirlemişlerdir. Çekirdeğe yüklü moleküllerin gerçek zamanda misellerden salımını izlemek için Förster rezonans enerji transferi (FRET) yöntemini kullanmışlardır ve misel çekirdeğindeki moleküllerin açığa çıkarak

hücre membranına geçtiğini ve buradan muhtemelen membran aracılı bir yolakla hücre içine girdiğini bildirmişlerdir (208).

Ligand ile hedeflendirilmiş misellerin hücre içine alınımında reseptör aracılı endositoz etkili olmaktadır. Biotin ile hedeflendirilmiş misellerin hücre içine alınımında hücrelerin önceden serbest biotin ile muamele edilmesinin, misellerdeki biotinin reseptör aracılı endositozunun bloke edilmesinden dolayı misellerin hücre içine alınımını önemli miktarda düşürdüğü bildirilmiştir (118). RGD ile modifiye edilmiş doksorubisin yüklü misellerin modifiye edilmemiş misellere göre hücre alımının yarım saatlik bir uygulamadan sonra dahi daha yüksek olduğu ve doksorubisin floresanının serbest ilaçtan farklı olarak çekirdek yerine sitoplazmada yoğunlaşmasının misellerin bir bütün olarak hücreye girdiğinin bir göstergesi olduğu Hu ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (209).

2.12. Poli(Oksazolin)ler ve Kanser Tedavisinde Polimerik Misel Olarak Uygulamaları

Poli(2-oksazolin)ler (POx), polipeptidlere yapısal olarak benzemeleri nedeniyle, psödopeptitler olarak kabul edilen polimerlerdir ve 2-oksazolinin yaşayan katyonik halka açılması polimerizasyonu ile elde edilebilirler (210). 2000’li yıllardan itibaren biyomedikal uygulamalarda poli(2-oksazolin) kullanımına olan ilgi artmıştır. Bunun başlıca nedeni biyoyumlu olmaları ve “görünmezlik” davranışlarının poli(etilen oksit) ile benzemesidir. Ayrıca monomer bileşiminin kolayca değiştirilebilmesi ve yan zincire kolayca farklı fonksiyonlar kazandırılabilmesi ile elde edilebilen hidrofilik, hidrofobik polimerler, amfifilik polimerlerin sentezi ve kendiliğinden bir araya gelmeleri üzerine araştırmaların artmasını sağlamıştır (167).

POx biyoyumluluğuna ilişkin in vitro ve in vivo çeşitli çalışmalar yapılmıştır. In vitro sitotoksitesite pek çok POx temelli polimer için çalışılmıştır ve genel olarak lineer, amfifilik ve yıldız şekilli POx polimerlerinin sitotoksitesitesi insan nöral progenitor hücreleri, Madin Darby köpek böbrek hücreleri, MCF-7 hücreleri, insan karaciğer karsinom hücrelerinde (HEPG2) düşük bulunmuştur (211-213). Katyonik POx polimerlerinin beklenildiği üzere sitotoksik olduğu bildirilmiştir (214). PLA–PEtOx–PLA 50g/L konsantrasyonda insan deri fibroblast hücrelerinde toksik bulunmazken, PEtOx–PCL insan epidermoid karsinom hücrelerinde (KB hücreleri) ve

PEtOx-PLA insan fibroblast hücrelerinde (HFW) 1g/L konsantrasyonunun altında dahi toksik bulunmuştur (141, 215, 216). PEtOx sıçanlara 2 g/kg dozda tekrarlayan enjeksiyonlarla verildiğinde kontrol grubuna göre histolojik değişiklikler gözlenmemiştir (217). POx polimerlerinin spesifik olmayan protein adsorpsiyonuna yatkınlığı genel olarak düşük bulunmuştur (218, 219). Poli(2-metil-2-oksazolin) (PMeOx) kaplı lipozomların, PEG kaplanmış lipozomlara göre uygulamadan 24 saat sonra daha yüksek kan seviyeleri ve daha düşük karaciğer birikimi gösterdiği bildirilmiştir (220, 221). PMeOx, PEtOx, and PBUOx (Poli(2-bütül-2-oksazolin)) polimerleri serumla inkübe edildikten sonra, orta düzeyde ancak negatif kontrolün anlamlı derecede üstünde bir kompleman aktivasyonu sergiledikleri bildirilmiştir (222). Ayrıca PMeOx kaplanmış silica nanopartiküllerinin insan serumunda C1q aracılı kompleman aktivasyonunu tetiklediği Tavano ve arkadaşları (223) tarafından bildirilmiştir. PEG ve PEtOx'un karşılaştırmalı olarak incelendiği çalışmada fare fibroblastları ve kırmızı kan hücreleri tarafından iyi tolere edildikleri ve ancak uzun dönem (12 ve 24 saat) inkübasyon ve yüksek konsantrasyonda orta derecede sitotoksik etkiler gözlemlendiği ve sitotoksitenin polimer konsantrasyonu, molekül ağırlık ve polimer saflığına bağımlı olduğu bildirilmiştir (8).

POx polimerlerinin klinik olarak kullanımı açısından güvenli olduklarını doğrulamak için özellikle immünojenisite ve genomik gibi daha pek çok çalışmanın yapılması gerekmektedir ancak mevcut veriler güvenli bir materyal olarak kabul edilebileceği açısından umut vericidir (210).

POx polimerleri PMeOx ve PEtOx'un hidrofilik ve biyouyumlu karakteri nedeniyle amfifilik polimerlerin eldesi için iyi adaylardır. Ayrıca, PEtOx, FDA tarafından dolaylı bir gıda temas ajanı (biyomedikal uygulamalar için onaylanmadan önce PEO'nun başlangıç durumu) olarak onaylanmıştır (224). POx türevi amfifilik blok kopolimerler ile antikanser ilaç yüklü misellerin hazırlandığı çeşitli çalışmalar mevcuttur. Lee ve arkadaşları (141) PEtOx-PCL blok kopolimerlerini kullanarak paklitaksel yüklü miseller hazırlamışlardır. Yaklaşık 18-23 nm partikül büyüklüğüne sahip misellerin etkin madde yükleme etkinliği % 0,5-7,6 aralığında olup, polimerlerin bileşimleri, kullanılan organik çözücü ve paklitaksel:polimer oranına bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir. Paklitaksel yüklü misellerin KB hücreleri üzerinde

Cremophore EL-paklitaksel formülasyonları ile karşılaştırılabilir sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir (141).

PEtOx-b-PLA diblok kopolimerleri kullanılarak Hsiue ve arkadaşları (215) tarafından hazırlanan misellere diyaliz yöntemi kullanılarak doksorubisin yüklenmiştir ve etkin madde yüklü misellerin ortalama partikül büyüklüğü 170 nm olarak bildirilmiştir. Misellerin yapılarındaki PEtOx nedeniyle pH'ya duyarlı salım sergilediği ve küçük hücreli akciğer karsinomu CL3 hücrelerinin canlılığını etkili bir şekilde azalttığı belirtilmiştir (215). Shieh ve arkadaşları (225) fotodinamik tedavi için, PEtOx-b-PLA blok kopolimerlerini kullanarak oluşturdukları misellere meta-tetra(hidroksifenil)klorin (mTHPC) enkapsüle etmişler ve bu miseller ile fare tümör modelinde serbest mTHPC çözeltisine benzer antitümör etki elde ederken mTHPC yüklü miseller ile daha düşük bir deri fototoksitesi sağlanmıştır. Peng ve arkadaşları (226) hidrofobik blok olarak poli(4-metil-ε-kaprolakton) veya poli(4-fenil-ε-kaprolakton) ve hidrofobik blok olarak PEtOx kullanarak sentezledikleri blok kopolimerler ile indometazin yüklü miseller hazırlamışlardır. İlaç yükleme etkinliğinin blok kopolimer bileşimine bağlı olduğunu ve insan serviks kanseri hücreleri (HeLa hücreleri) ile yapılan alım çalışmalarında hücrel doksorubisin alımının 2 saat içinde tamamlandığını ve doksorubisinin hücre çekirdeğine erişebildiğini bildirmişlerdir (226). Schulz ve arkadaşları (227) hidrofilik blok olarak PMeOx ve hidrofobik blok olarak poli(2-n-bütül-2-oxazoline) ya da poli(2-n-nonil-2-oksazolin) kullanarak sentezledikleri triblok kopolimerleri kullanarak büyüklükleri 50 nm'nin altında ve etkin madde yükleme kapasiteleri %40'a ulaşan paklitaksel yüklü miseller hazırlamışlardır. Paklitaksel yüklenmesinin misellerin stabilitesini arttırdığı ve misellerin morfolojisinin çubuktan küresele dönüştüğünü bildirmişlerdir (227).

Qui ve arkadaşlarının (228) folik asit ile modifiye edilmiş PEtOx-PCL kopolimeri ile hazırladıkları doksorubisin yüklü misellerin, folik asit reseptörünü eksprese eden kanser hücrelerinde modifiye edilmemiş misellere göre daha yüksek bir hücrel alım ve sitotoksite gösterdikleri bildirilmiştir. Ayrıca in vivo tümör modelinde serbest doksorubisine göre daha etkili bir tümör inhibisyonu sağladığı bildirilmiştir (228). Gaspar ve arkadaşları (151) PEtOx-b-PLA-g-PEI triblok kopolimerini kullanarak hazırladıkları misellere doksorubisin enkapsüle etmiş ve aynı zamanda PEI bloğunun DNA ile etkileşimiyle misellere DNA yükleyerek

doksorubisin ile beraber taşınmasını sağlayan bir sistem geliştirmişlerdir. Elde edilen miseller ile gen aktarımının başarılı olduğu üç boyutlu tümör modellerinde gösterilmiş ve antitümör aktivitenin MCF-7 hücrelerinde serbest doksorubisine göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (151). Redoks duyarlı disülfid bağlarının PEI grubuna eklenmesiyle elde edilen PEOx-b-PLA-g-PEI-SS kopolimeriyle hazırlanan doksorubisin ve DNA yüklü misellerin fare tümör modelinde kanser hücrelerinin canlılığı ve tümör hacminde kayda değer bir düşüş sağladığı bildirilmiştir (229).

Zhao ve arkadaşları (230) PEOx-b-PLA kopolimeri ile ligand aracılı hedeflendirme sağlamak için DSPE-PEG-folat ile karışık miseller hazırlamışlardır. Doksorubisin ve D-alfa-tokoferil polietilen glikol 1000 süksinatı birlikte enkapsüle ettikleri misellerin pH'ya duyarlı olarak asidik pH'da hızlı bir salım gösterdiklerini ve çoklu ilaç direnci gösteren insan oral epidermoid karsinom hücrelerini (folat reseptör-pozitif KBv hücreleri) başarılı bir şekilde hedefledikleri bildirilmiştir. KBv hücreleriyle farelerde oluşturulan tümör modelinde folat ile hedeflendirilmemiş misellere göre hedeflendirilmiş miseller tümör bölgesinde daha yoğun bir şekilde birikmişlerdir (230). Raveendran ve arkadaşları (231) 2- (büt-3-enil) -2-oksazolin (ButenOx) ve 2-ethyl-2-oxazoline (EtOx) monomerlerini kullanarak farklı molekül ağırlıklarında Poli(EtOx-b-ButenOx) blok kopolimerlerini hazırlamışlardır. Bu polimerler ile yaklaşık olarak 100 nm büyüklüğe sahip kurkumin yüklü miseller hazırlanmıştır. Kurkumin yüklü misellerin pH'ya duyarlı salım sağladığı ve C6 glioma hücrelerinde hücre sel alımlarının serbest kurkumine göre daha yüksek olduğu ve kurkumin çözeltisine göre anlamlı bir sitotoksik etki gösterdikleri bildirilmiştir (231).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Maddeler

Diklorometan	Merck, Almanya
Dimetil formamit (DMF)	Merck, Almanya
Dimetil sülfoksit	Sigma-Aldrich, ABD
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 4.5 g/L glikoz, sodyum pirüvat, stabil glutamin içeren	Biochrom AG, Almanya
Dokсорubisin hidroklorür	Deva İlaç, Türkiye
Fetal sığır serumu (FBS)	Biochrom AG, Almanya
Fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi, Phosphate buffered saline (PBS) tabletleri	Sigma-Aldrich, ABD
Hidroklorik asit	Merck, Almanya
Kloroform	Sigma-Aldrich, ABD
L929 fare fibroblast hücre hattı	American Type Culture Collection (ATCC), ABD
MCF-7 insan meme adenokarsinom hücre hattı	American Type Culture Collection (ATCC), ABD
Metanol	Sigma-Aldrich, ABD
Penisilin / Streptomisin	Biochrom AG, Almanya
PEtOx- <i>b</i> -PCL ve PEtOx- <i>ko</i> -PEI- <i>b</i> -PCL polimerleri	Tübitak-MAM
Piren (Pyrene)	Sigma-Aldrich, ABD
SKBR-3 insan meme adenokarsinom hücre hattı	American Type Culture Collection (ATCC), ABD
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich, ABD
Sodyum hidroksit	Merck, Almanya
Tetrahidrofur	Sigma-Aldrich, ABD
Thiazolil mavisi tetrazolyum bromür (MTT)	Appllichem GmbH, Almanya
Trietilamin	Sigma-Aldrich, ABD
Tripan mavisi	Biochrom AG, Almanya
Tripsin-EDTA çözeltisi	Biochrom AG, Almanya

3.2. Kullanılan Cihazlar

¹ H-NMR spektroskopisi, Biospin 300 MHz	Bruker, ABD
96 ve 24 kuyucuklu steril plakalar	Grenier Bio-one, Almanya
Akış sitometrisi cihazı, Accuri C6	BD Biosciences, ABD
Amicon santrifüj filtre ünitesi (100 kDa)	Merck Millipore, Almanya
Biyogüvenlik kabini, Class 2, BHG 2004	Faster, İtalya
Çok noktalı manyetik karıştırıcı, Variomag	Thermo, ABD
Diyaliz membran (2000 Da)	SpectraPor, ABD
Enjektör ucu filtre 0,22 µm, steril	Sartorius Stedim, Almanya
Evaporatör, RV 10 basic	IKA, Almanya
Floresan mikroskop, Leica DMIL, DFC 320	Leica, Almanya
Geçirimli elektron mikroskobu (TEM), Tecnai G ² Spirit Biotwin	FEI, Hollanda
Hassas terazi	Schimadzu, Japonya
Hücre kültür kapları (flask, 25 ve 75 cm ²)	Grenier Bio-one, Almanya
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Heidolph, Almanya
Karbondioksit inkübatör	Sanyo, Japonya
Mikropipet ucu	Eppendorf, Almanya
Mikroplaka okuyucu	Molecular Devices, ABD
pH metre	Hanna Instruments, ABD
Polipropilen tüp, kapaklı, 15 mL ve 50 mL	Corning, ABD
Santrifüj	Hettich, Almanya
Spektroflorimetre, Spectramax M2	Molecular Devices, ABD
Steril polistiren serolojik pipet	Capp, Danimarka
Su banyolu yatay çalkalayıcı	Memmert, Almanya
Ultra saf su cihazı, Mili-Q İntegral 5	Millipore, ABD

UV küveti, QS

Hellma, Almanya

UV spektrofotometresi, UV-1800

Shimadzu, Japonya

Vorteks

IKA, Almanya

Zetasizer Nano-ZS

Malvern Ins., İngiltere

3.3. Misel Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler

Misel formülasyonlarını hazırlamak için kullanılan polimerler TÜBİTAK MAM Malzeme Enstitüsü çalışma ekibi tarafından 213M760 numaralı TÜBİTAK 1003 projesi kapsamında sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Blok kopolimerin hidrofobik ve hidrofilik bloklarının molekül ağırlıkları misel oluşumunu ve misel büyüklüğünü etkilemektedir. Bu nedenle öncelikle farklı molekül ağırlıklarına sahip PEtOx-b-PCL blok kopolimerleri (7 adet) sentezlenmiş ve bu polimerler ile misel hazırlanarak partikül büyüklükleri ölçülmüştür. Sentezlenen PEtOx-b-PCL polimerleri molekül ağırlıkları ile birlikte Tablo 3.1.'de verilmiştir. Partikül büyüklüğü ölçüm sonuçlarına göre en uygun misel büyüklüğünün elde edildiği PEtOx-b-PCL polimerinin molekül ağırlığı temel alınarak katyonik PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerleri sentezlenmiştir. PEtOx polimerinin üç farklı derecede (%30, %60 ve %70) kısmi hidrolizi ile elde edilen PEtOx-ko-PEI bloğu, PCL grubu ile konjuge edilerek farklı molekül ağırlığına sahip PEtOx-ko-PEI-b-PCL blok kopolimerleri (Tablo 3.2.) sentezlenmiştir. TÜBİTAK MAM çalışma ekibi tarafından sentezlenen blok kopolimerlerin molekül ağırlıkları aynı ekip tarafından GPC ile belirlenmiştir. Blok kopolimerlerin GPC analizleri hidrofobik blok için Agilent Instrument (Model 1100) ve hidrofilik blok için ViscoTek TDA 302 GPC cihazları kullanılarak ayrı ayrı iki farklı sistem ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1. Sentezlenen PEtOx-b-PCL polimerlerinin molekül ağırlıkları.

Blok Kopolimer	Molekül Ağırlığı (Da)	
	PEtOx	PCL
P1	3800	1900
P2	4500	2250
P3	9200	5100
P4	7400	2600
P5	7400	1500
P6	6400	1500
P7	10700	2100

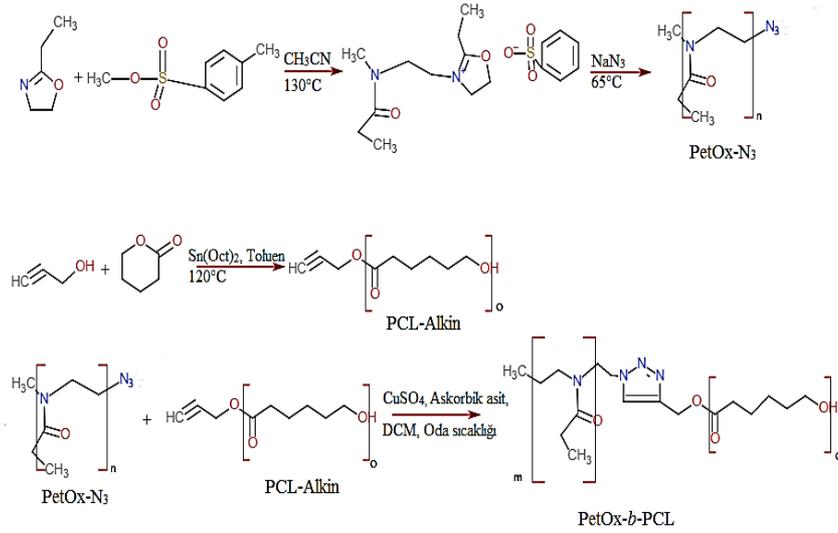
Tablo 3.2. PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerlerinin molekül ağırlıkları.

Polimer kodu	PEtOx-ko-PEI		PCL (Da)	Hidroliz yüzdesi, %
	PEtOx (Da)	PEI (Da)		
P7-30	7500	1400	2100	30
P7-60	4300	2800	2100	60
P7-70	2750	3600	2100	70

Dokso rubisin yüklü miselleri hazırlamak için en uygun misel büyüklüğünün elde edildiği PEtOx₁₀₇₀₀-b-PCL₂₁₀₀ polimeri ve bu polimerden hareketle sentezlenen üç farklı hidroliz derecesine sahip PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerleri kullanılmıştır. Dokso rubisin yüklü miselleri hazırlamak için farklı molekül ağırlıklarına ve molekül yapılarına sahip polimerler kullanılarak, etkin madde yükleme kapasiteleri, misel büyüklükleri ve biyolojik ortamda dayanıklılıkları açısından en uygun sistemin belirlenmesi amaçlanmıştır. Peptit 18 ile hedeflendirilmiş dokso rubisin yüklü miselleri hazırlamak için PEtOx-ko-PEI-b-PCL blok kopolimerinin PEtOx bloğuna peptit 18 konjuge edilerek peptit 18 ile modifiye edilmiş blok kopolimer TÜBİTAK MAM çalışma ekibimiz tarafından sentezlenmiştir. Dokso rubisin yüklü miselleri hazırlamak için kullanılan polimerlerin yapıları Ortadoğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkez Laboratuvarı'nda bulunan Bruker Biospin 300 MHz NMR cihazı kullanılarak proton nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (¹H-NMR) analizleri ile doğrulanmıştır. Analizler cihazdan sorumlu uzman tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. PEtOx-b-PCL Polimerlerinin Sentezi

PEtOx-b-PCL polimerlerinin sentezlenmesi için öncelikle azid ile sonlandırılmış PEtOx ve alkin ile sonlandırılmış PCL blokları sentezlenmiş ardından çıt-çıt reaksiyonları ile bloklar konjuge edilerek kopolimerler elde edilmiştir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. PEtOx-b-PCL polimerinin sentez reaksiyon şeması. (Kaynak (232)'deki şekil temel alınarak yeniden çizilmiştir.)

Azid Sonlandırılmış PEtOx-N₃ Polimerinin Sentezi

PEtOx-N₃ polimerini sentezlemek için öncelikle içinde manyetik balık bulunan bir reaksiyon tüpü ısı tabancasıyla ısıtılmıştır. Ardından tüp bir lastik ile kapatıldıktan sonra vakum altında tekrar ısıtılmıştır. Vakum altında tüp soğutulduktan sonra, oda sıcaklığında inert atmosferde 2-etil-2-oksazolin monomerinin asetonitrildeki çözeltisine başlatıcı metil *p*-toluensülfonatın (metil tosilat) eklenmesi ile PEtOx-N₃ polimeri katyonik halka açılması polimerleşmesi yöntemiyle hazırlanmıştır. 130°C'de 24 saat boyunca gerçekleşen polimerleşmeden sonra, reaksiyon karışımı oda sıcaklığına soğutulmuştur. Polimerleşmeyi sonlandırmak için sodyum azid (NaN₃) eklenmiş ve karanlıkta 65°C'de 24 saat boyunca karıştırılmıştır. Polimerleşmenin sonlandırılmasından sonra çözücü vakum altında uzaklaştırılmış ve kalıntı diklorometanda çözündürülüp soğuk dietilerde çöktürülmüştür. Çöktürülerek elde edilen polimer vakum altında bir gün boyunca kurutulmuştur (232).

Alkin Sonlandırılmış PCL-Alkin Polimerinin Sentezi

Başlatıcı olarak propargil alkol ve katalizör olarak kalay oktoat (Sn(Oct)₂) kullanılarak ε-kaprolaktonun halka açılma polimerleşmesiyle PCL-Alkin sentezlenmiştir. PCL-Alkin polimerini hazırlamak için ε-kaprolakton ve propargil alkol ve tolüen içindeki kalay oktoat çözeltisi kurutulmuş tüpe eklenmiştir ve tüp azot

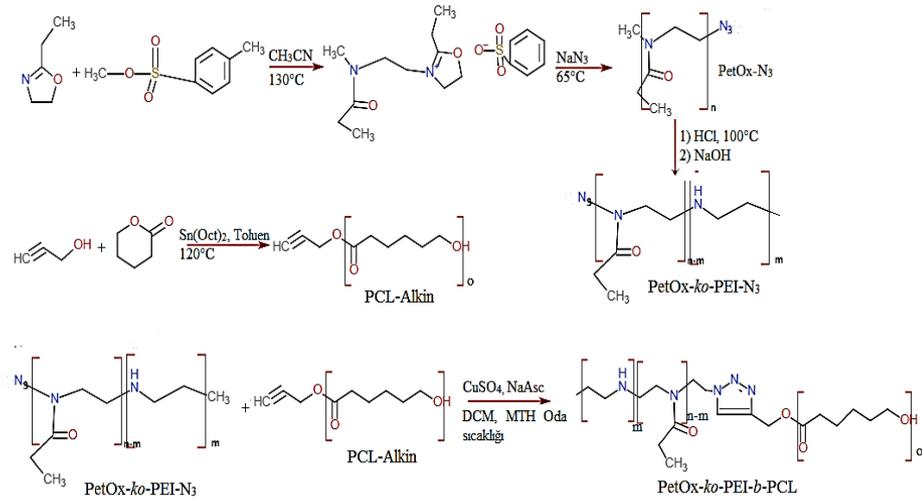
gazı ile doldurularak hava uzaklaştırılmıştır. Sonra tüp 120°C’de termostatlı bir yağ banyosunda 5 saat boyunca tutulmuştur. Çözücü düşük basınç ile uzaklaştırılmış ve kalıntı diklorometan içerisinde zndrlmştır. Soğuk metanolde çöktürülen polimer vakum altında bir gün boyunca kurutulmuştur (232).

Çıt-ıt Reaksiyonu ile PEtOx-b-PCL Polimerinin Sentezi

PCL-Alkin, PEtOx-N₃, bakır sülfat (CuSO₄) ve askorbik asit N,N-dimetilformamid (DMF) içinde çözündürülüp, kurutulmuş bir reaksiyon tüpüne şırınga yardımıyla eklenmiştir. Daha sonra karışımdan azot gazı geçirilerek hava uzaklaştırılmış ve karışım 24 saat boyunca oda sıcaklığında karanlıkta karıştırılmıştır. Reaksiyon süresinin tamamlanmasının ardından reaksiyon karışımı silika bir kolondan geçirilerek saflaştırılmış ve düşük basınç altında çözücü uzaklaştırılmıştır. Son olarak kalıntı diklorometan içerisinde zndrlmştır ve soğuk dietileterde çöktürülen polimer vakum altında bir gün boyunca kurutulmuştur (232).

3.3.2. PEtOx-ko-PEI-b-PCL Polimerlerinin Sentezi

Öncelikle daha önce sentezlenen PEtOx-b-PCL polimerleri ile çeşitli yöntemlerle miseller hazırlanmış (Bkz. Bölüm 3.6.1.) ve en uygun misel büyüklüğünün elde edildiği polimer molekül ağırlığı ve blok uzunluklarından hareketle PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerleri sentezlenmiştir. PEtOx-ko-PEI-b-PCL blok kopolimerinin sentezi için ilk olarak PEtOx polimerinin farklı oranlarda hidrolizi ile lineer PEI içeren PEtOx-ko-PEI polimeri elde edilmiş ve ardından PCL ile çıt-çıt reaksiyonu yapılarak blok kopolimer elde edilmiştir (şekil 3.2.).



Şekil 3.2. PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerinin sentez reaksiyon şeması. (Kaynak (233)'deki şekil temel alınarak yeniden çizilmiştir.)

Azid uçlu PEtOx Polimerinin Hidrolizi

Azid uçlu PEtOx₁₀₇₀₀ polimerinin PEtOx-ko-PEI polimerine hidrolizi geri soğutucu altında kaynatma ile gerçekleştirilir. Bunun için azid uçlu PEtOx₁₀₇₀₀ (0,48 M, amit konsantrasyonu) polimeri ve HCl_(sulu), içinde manyetik balık bulunan bir reaksiyon tüpüne konulmuş ve 100°C'de ısıtılarak hidroliz reaksiyonunun gerçekleşmesi sağlanmıştır. Farklı oranlarda hidroliz sağlamak için farklı reaksiyon sürelerinin tamamlanması sağlanmıştır. Reaksiyon süresi tamamlanan karışım soğutulmuş ve 5 M NaOH ile nötralize edilmiştir. Oluşan tuzlar filtre edilmiş çözücü düşük basınç altında uzaklaştırılmış ve kalıntı diklorometan içerisinde çözündürülmüştür. Soğuk dietileterde çöktürülen polimer vakum altında bir gün boyunca kurutulmuştur (232, 233).

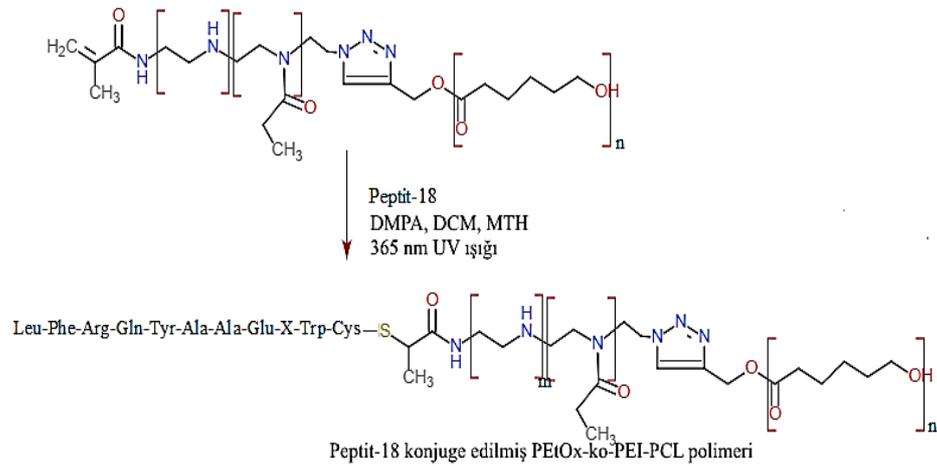
Çıt-Çıt Reaksiyonu ile PEtOx-ko-PEI-b-PCL Polimerinin Sentezi

İçinde manyetik balık bulunan reaksiyon tüpü ısı tabancasıyla ısıtılmış ve ağzı tıpa ile kapatılmıştır. Tüp soğuduktan sonra PCL-Alkin ve azid ile sonlandırılmış poli(2-etil-2-oksazolin)-polietilenimin polimerleri, bakır sülfat ve sodyum askorbat ilave edilmiştir. Çözücü olarak diklorometan, metanol karışımı kullanılmıştır. Daha sonra vakum ile gazlardan arındırılan reaksiyon tüpü argon gazı ile doldurulmuştur. 48 saat boyunca reaksiyon karışımı manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında karıştırılmış ve sonra silika kolondan geçirilmiştir. Çözücü düşük basınç altında

uzaklaştırılmış ve kalıntı diklorometanda çözülmüştür. Soğuk dietileterde çöktürülen polimer vakum altında bir gün boyunca kurutulmuştur (232, 233).

3.3.3. Peptit-18 Konjuge Edilmiş PEtOx-ko-PEI-b-PCL Polimerinin Sentezi

İlk olarak içinde manyetik balık bulunan reaksiyon tüpü ısı tabancasıyla ısıtılarak kurutulmuş ve ağzı tıpa ile kapatılmıştır. Tüp soğuduktan sonra allil-PEtOx-ko-PEI-b-PCL, Peptit 18 ve 2,2-dimetoksi-2-fenil asetofenon, diklorometan ve metanol karışımında çözüldürülerek tüpe ilave edilmiştir. Tüpe argon gazı doldurularak inert atmosfer oluşturulmuş ve 48 saat boyunca 365 nm UV ışığı altında reaksiyon karışımının manyetik karıştırıcıda karışması sağlanmıştır. Reaksiyon süresi sonunda karışım silika kolondan geçirilmiş ve çözücü vakum ile uzaklaştırılmıştır. Elde edilen kalıntı diklorometanda çözüldürülmüş ve soğuk dietileterde çöktürülen polimer vakum altında bir gün boyunca kurutulmuştur. Peptit-18 konjuge edilmiş PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerinin sentezi reaksiyon şeması 213M760 proje gelişme raporunda daha önce verilmiş olup tekrar çizilerek Şekil 3.3.'de verilmiştir.



Şekil 3.3. Peptit-18 konjuge edilmiş PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerinin sentez reaksiyon şeması.

3.4. Dokсорubisinin Fizikokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi

3.4.1. Dokсорubisinin FT-IR Spektrumu

Dokсорubisinin FT-IR spektrumu, dokсорubisine ait toz numunesi ile Perkin Elmer FT-IR System Spectrum BX cihazı kullanılarak elde edilmiştir. Analiz 4000 – 600 cm⁻¹ dalga sayıları arasında gerçekleştirilmiştir.

3.4.2. Dokсорubisinin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Analiz için DSC Q100 V9.9 Build 303 (Universal V4.5A TA Instruments) cihazı kullanılmıştır. Dokсорubisinin toz numunesi alimünyum hücre içerisine konulmuş ve sıcaklık dakikada 10°C arttırılarak 100°C'den 270°C'ye çıkarılmıştır. Referans olarak boş bir alimünyum hücre kullanılmıştır. Elde edilen termogram ile etkin maddenin erime derecesi tayin edilmiştir.

3.4.3. Dokсорubisinin UV Spektrumu

Dokсорubisin HCl'ün 10 µg/mL konsantrasyondaki sudaki çözeltisinin UV spektrumu, kuartz küvetler kullanılarak 200 - 800 nm arasında taranmış ve çözeltinin λ_{maks} değeri tespit edilmiştir.

3.5. Dokсорubisinin UV-Görünür Bölge Spektroskopisi ile Miktar Tayini

Dokсорubisinin hazırlanan formülasyonlar içindeki ve in vitro salım çalışmalarındaki miktar tayininin yapılabilmesi için UV Spektrofotometre kullanılmıştır. Dokсорubisin Hidroklorür'ün dimetil sülfoksit (DMSO) içinde stok çözeltisi hazırlanmış ve bu stoktan hazırlanan standartlar kullanılarak 482,5 nm dalgaboyunda kalibrasyon doğrusu çizilmiştir.

Dokсорubisin HCl formülasyonlara yüklenirken trietilamin ile muamele edilerek HCl uzaklaştırılacaktır. Bu işlem ile dokсорubisin hidrofobik hale getirilerek hidrofobik misel çekirdeği ile etkileşiminin arttırılması ve misellere yüklenen dokсорubisin miktarının arttırılması amaçlanmıştır (144). Bu nedenle dokсорubisin hidroklorür ile hazırlanmış kalibrasyon doğrusu ile formülasyonlardaki baz dokсорubisinin tayin edilebileceğini göstermek için dokсорubisin hidroklorür ve baz

doksorubisinin DMSO içindeki spektrumları karşılaştırılarak aynı spektrumun elde edildiği gösterilmiştir. Bu amaçla sudaki Doksorubisin Hidroklorür (0,5 mg/mL) çözeltisine 3 molar ekivalanı trietilamin eklenmiş ve elde edilen baz doksorubisin kloroform ile ekstrakte edildikten sonra kloroform rotavaporda uçurulmuş ve doksorubisin vakum altında 48 saat boyunca kurutulmuştur. Elde edilen baz doksorubisin DMSO içerisinde çözündürülerek UV spektrofotometrede spektrumu alınmıştır ve doksorubisin hidroklorürün DMSO içerisindeki çözeltisinin spektrumu ile karşılaştırılmıştır.

3.6. Analitik Yöntem Validasyonu

Doksorubisinin miktar tayini için geliştirilen yöntemin validasyonu, yöntemin amaçlanan uygulamalara, uygunluğunu göstermek üzere yapılmıştır. Analitik yöntem validasyonu için, özgüllük, doğrusallık, teşhis ve tayin alt sınırları, doğruluk, kesinlik, uygulama aralığı parametreleri incelenmiştir (234).

Özgüllük

Özgüllük, bir metodun, analiti, bir örnek matriksindeki diğer bileşenler varlığında ve deneyde belirtilen koşullar altında, diğer bileşenlerin girişimi olmaksızın doğru ve özgül olarak tayin edebilme yeteneğidir. Bu amaçla formülasyonda kullanılacak polimerlerin girişim yapıp yapmadığı etkin madde analizinin yapıldığı koşullarda incelenmiştir. Doksorubisin Hidroklorür ve etkin madde yükleme çalışmalarında kullanılan polimerlerin DMSO içerisinde çözeltileri hazırlanmış ve 200-800 nm arasında spektrumları kaydedilmiştir. Doksorubisin ile polimerlerin spektrumları incelenmiş ve analiz dalga boyu olan 482,5 nm'de doksorubisinin absorbands değeri ile girişim yapmayacak şekilde polimerlerin absorbands vermediği gösterilmiştir.

Doğrusallık

Bir analitik yöntemin belirli bir aralıktaki deney bulgularının örnek içindeki madde konsantrasyonu ile orantılı olarak elde edilebilmesi bu yöntemin doğrusallığını ifade eder. Bu amaçla doğrusallık parametresinin sağlandığını göstermek için hazırlanan standart çözeltilerin konsantrasyonları ile absorbandslarının arasında

regresyon analizi yapılarak kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Doksorubisin Hidroklorür'ün DMSO içindeki stok çözeltisinden (100 µg/mL) faydalanılarak hazırlanan standart çözeltilerin (8-32 µg/mL) 482,5 nm'de absorbansları ölçülmüş ve konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizilerek kalibrasyon doğru denklemi elde edilmiştir. Korelasyon katsayısının 0,999'dan büyük olması genellikle verilerin kalibrasyon doğrusuna uyumunun kanıtı olarak kabul edilmektedir (235).

Uygulama Aralığı

Uygulama aralığı doğrusallık çalışmalarından elde edilir ve amaçlanan uygulama prosedürüne bağlıdır. Analitik prosedürün belirtilen uygulama aralığı içindeki konsantrasyonlarda ya da bu aralığın uç konsantrasyonlarındaki örnekler için kabul edilebilir bir düzeyde doğrusallık, doğruluk, kesinliğinin prosedür tarafından sağlandığının teyit edilmesi ile gösterilir.

Teşhis Alt Sınırı

Bir analitik prosedürün analiti, sistemin gürültü sinyalinden güvenilir olarak teşhis edebildiği en düşük konsantrasyona karşılık gelen sinyal teşhis alt sınırıdır (LOD). LOD cevabın standart sapmasından ve eğimden faydalanılarak hesaplanabilir. LOD aşağıda verilen eşitlik ile hesaplanmıştır (Eşitlik 3.1.)

$$LOD = 3,3\sigma/S \quad (3.1.)$$

σ : Kalibrasyon denkleminde cevabın standart sapması

S: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

Tayin Alt Sınırı

Örnek içindeki analitin uygun kesinlik ve doğrulukta tayin edilebildiği en düşük miktar tayin alt sınırı (LOQ) olarak tanımlanır. LOQ aşağıda verilen eşitlik ile hesaplanmıştır (Eşitlik 3.2.)

$$LOD = 10\sigma/S \quad (3.2.)$$

σ : Kalibrasyon denkleminde cevabın standart sapması

S: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

Doğruluk

Analitik yöntemin doğruluğu, yöntem ile elde edilen sonuçların kabul edilen gerçek ya da referans değere yakınlığıdır. Doğruluk farklı yollardan değerlendirilebilir. Bu yollardan biri; yöntemin sonuçlarını, iyi karakterize edilmiş yöntemlerden birinin sonuçları ile karşılaştırmaktır. Diğer referans materyal ile karşılaştırmaktır. Doğruluk çalışmaları geri alma-recovery testleri ile de yapılabilir. Doğruluk, en az 3 konsantrasyon ile en az 3 tayin yapılarak ölçülmelidir. Doğruluk çalışması için muhtemel konsantrasyon aralığında üç konsantrasyon seçilmiş, bu bilinen konsantrasyonlarda geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Doğruluk aşağıdaki eşitlik ile değerlendirilmiştir (Eşitlik 3.3.). Geri kazanım doğruluk için %97- %103 aralığında olmalıdır (236, 237).

$$\text{Geri Kazanım (\%)} = X/Y \times 100 \quad (3.3.)$$

X= Ölçülen konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)

Y= Hazırlanan konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)

Kesinlik

Kesinlik bir yöntemin aynı örnekten alınan bir seri ölçümü arasındaki yakınlığın derecesini ifade etmektedir. Standart sapma ve varyasyon katsayısı ile ifade edilir. Kullanılan yöntemin kesinliğinin araştırılması için üç farklı konsantrasyonda gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmıştır. Kesinlik bağıl standart sapma ile değerlendirilmiştir. Varyasyon katsayısı, kesinlik ölçümleri için %2'den küçük olmalıdır (236).

3.7. Misel Formülasyonlarının Hazırlanışı ve Misellere Doksorubisin Yüklenmesi

3.7.1. Uygun Polimer Molekül Ağırlığının Belirlenmesi İçin PEtOx-b-PCL Polimerleri ile Yapılan Ön Çalışmalar

Miselleri hazırlamak için kullanılacak polimerler ticari olarak temin edilmeyip sentezlenerek hazırlanacağı için öncelikle farklı molekül ağırlıklarına sahip polimerler sentezlenmiş ve bu polimerlerin istenilen büyüklükte miselleri oluşturup oluşturmadıkları araştırılmıştır. Misel büyüklüğü açısından en uygun polimeri

belirlemek amacıyla, sentezlenen PEtOx-b-PCL polimerleri (7 adet) ile çeşitli yöntemler kullanılarak miseller hazırlanmıştır. Hazırlanan misellerin dinamik ışık saçılımı yöntemi ile partikül büyüklükleri belirlenmiş ve en küçük partikül büyüklüğüne sahip misel formülasyonunu meydana getiren polimer etkin madde yükleme çalışmaları için seçilmiştir. Ayrıca polimer yapısına katyonik PEI grubunun eklenmesinin, misellerin negatif yüklü hücre membranı ile etkileşimini arttıracığı düşünüldüğünden ön çalışmalar sonucunda belirlenen PEtOx-b-PCL polimerinin molekül ağırlığından hareketle PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerleri sentezlenmiştir. Polimer bloklarının kimyasal yapısının etkin madde yükleme etkinliğini etkilediği literatürde bildirilmiştir (59, 81, 93). Farklı oranlarda PEI içeren PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerleri sentezlenerek tez çalışmasının ileriki aşamalarında polimer yapısının doksorubisinin enkapsülasyon etkinliğine etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

PEtOx-b-PCL polimerleri ile yapılan ön çalışmalarda, sentezlenen polimerlerin misel hazırlamak için kullanılmadan önce diyaliz işlemi ile saflaştırılmasının misel büyüklüğüne etki edip etmediğini incelemek amacıyla sentezlenen polimerlerden bazılarında diyaliz ile saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Bu ön çalışma ile polimerlerin sentez işlemleri sırasında meydana gelen muhtemel safsızlıkları ve kalıntıları uzaklaştırmak amaçlanmıştır. Bu amaçla 400 mg polimer 4 mL ultra saf su içerisinde dağıtılmış ve 2 L ultra saf suya karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz işlemi 6 gün boyunca devam ettirilmiş ve her gün 2 kez diyaliz ortamı yenilenmiştir. Diyaliz işlemi için ilk olarak molekül ağırlık sınırı (Molecular weight cut-off, MWCO) 3500 Da olan rejenere selüloz diyaliz membran kullanılmıştır ancak diyaliz esnasında aşırı madde kaybı yaşandığı için sonraki saflaştırma işlemlerinde MWCO 2000 Da olan diyaliz membran kullanılmıştır. Saflaştırma işleminde kullanılan membranlar % 0,05 sodyum azit içeren bir koruyucu çözelti içinde ıslak olarak paketlenmiş olup kullanıma hazır diyaliz membranlarıdır. 6 günlük diyaliz sonrası polimerler -20C'de bir gece dondurulmuş ve ardından 48 saat süreyle liyofilize edilmişlerdir. Suyun liyofilizasyon ile uzaklaştırılması sonucu kuru toz halinde elde edilen polimerler ile misel formülasyonları hazırlanmış ve partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümleri yapılmıştır. Saflaştırma öncesi aynı polimerler ile hazırlanan misel formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümleri ile bu

ölçümlerin karşılaştırılması sonucu ileriki aşamalarda kullanılacak polimerlerin saflaştırılarak kullanılması kararlaştırılmıştır.

PEtOx-b-PCL polimerleri kullanılarak etkin madde içermeyen miseller literatürde sıklıkla karşılaşılan diyaliz (141), çözücü buharlaştırma (238) ve ince film hidratasyonu (239) yöntemleriyle ve bu yöntemlerde küçük değişiklikler yapılarak hazırlanmıştır. Bu yöntemler aşağıda verilmiştir.

Diyaliz Yöntemi:

20 mg polimer (PEtOx-b-PCL) tartılarak 4 mL tetrahidrofur (THF) içerisinde 40°C'de 5 dakika manyetik karıştırma altında çözüldürülmüş ardından polimer çözeltisi oda sıcaklığında bir gece karıştırıldıktan sonra rejenere selüloz diyaliz membran içerisine alınıp (MWCO 2000 Da) 48 saat boyunca ultra saf suya karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz sonrası misel formülasyonu 0,22 µm selüloz asetat enjektör ucu filtrelerinden süzölmüş ve polipropilen tüplere konularak bir gece -20°C'de dondurulmuştur. Dondurulan örnekler 48 saat süreyle liyofilize edilmişlerdir. Liyofilizasyon işleminden sonra miseller konsantrasyon 2 mg/mL olacak şekilde ultra saf su içerisinde redisperse edilmişlerdir ve partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümleri yapılmıştır.

Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Bu yöntemde 20 mg polimer (PEtOx-b-PCL) 1 mL THF içerisinde çözüldürülmüş ve manyetik karıştırma altındaki 20 mL ultra saf su üzerine enjektör yardımıyla damla damla eklenmiştir. 5 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra karışım balona alınarak rotavaporda vakum altında ve 30°C'de 2 saat süreyle tutularak organik çözücünün uzaklaştırılması sağlanmıştır. Elde edilen misel formülasyonu 0,22 µm'lik filtrelerden süzölmüş, polimer konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde ultra saf su ile seyreltilmiştir ve partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümleri yapılmıştır.

İnce Film Hidratasyonu Yöntemi

İnce film hidratasyonu yönteminde 20 mg polimer (PEtOx-b-PCL) tartılarak 4 mL THF içerisinde manyetik karıştırıcıda 1 saat boyunca karıştırılarak

çözündürülmüştür. Daha sonra polimer çözeltisi balona alınarak film oluşumunun sağlanması için organik çözücü rotavaporda vakum altında ve 60°C sıcaklıkta 20 dakika süre buharlaştırılmıştır. Oluşan ince film tabakasını hidrate etmek için balona 60°C sıcaklıktaki 10 mL ultra saf su eklenmiş ve 5 dakika boyunca vorteks yardımıyla şiddetle karıştırılmıştır. Elde edilen misel süspansyonu 0,22 µm'lik filtrelerden süzülüş ve partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümleri yapılmıştır.

3.7.2. Etkin Madde İçermeyen Misellerin Hazırlanışı

Etkin madde içermeyen miseller film hidratasyonu yöntemi ile hazırlanmışlardır. Öncelikle sentezlenen polimerlerin çözündüğü organik çözücüler belirlenmiştir. 1 mg polimere, polimeri çözüp berrak bir çözelti oluşturana kadar organik çözücüler (metanol, tetrahidrofur, kloroform, diklorometan) kısım kısım eklenmiş ve polimeri çözebilen minimum organik çözücü miktarları ve çözeltilerin berraklığı karşılaştırılarak en uygun organik çözücüye deneysel olarak karar verilmiştir. PEtOx-b-PCL için en uygun çözücü tetrahidrofur (THF), PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerleri için de diklorometan (DCM) olarak belirlenmiştir. Polimer (10 mg) belirlenen organik çözücüde çözündürüldükten sonra, oluşan çözelti bir balona alınıp rotavapor yardımıyla organik çözücü (2 mL) vakum altında 60 °C'de buharlaştırılmıştır. Oluşan film üzerine 10 mL 60 °C'deki ultra saf su eklenmiş ve 5 dakika boyunca vorteks kullanılarak şiddetli bir çalkalama işlemiyle film rehidrate edilmiştir. Elde edilen misel dispersiyonu 0,22 µm por çapına sahip filtrelerden süzülerek agregatlar uzaklaştırılmıştır.

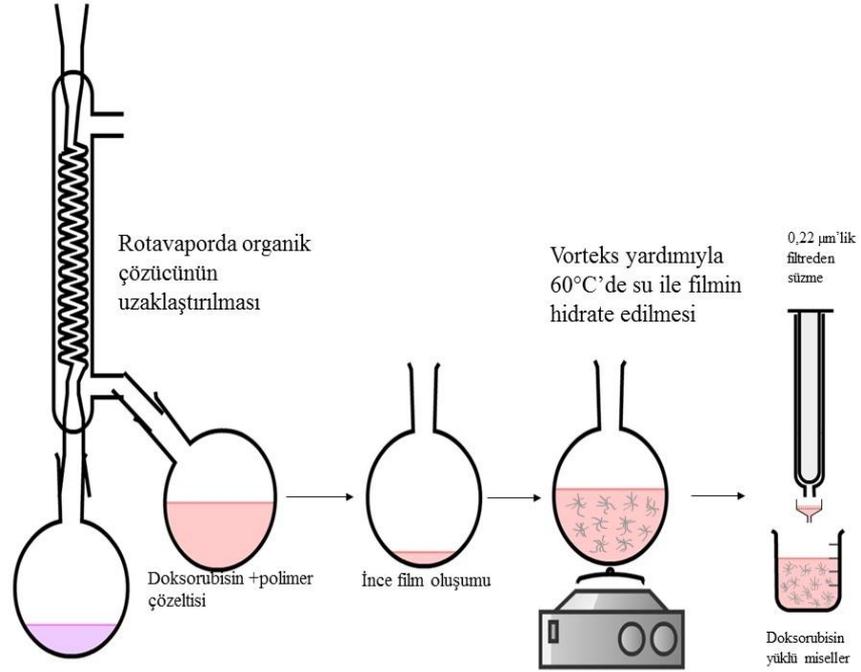
3.7.3. Doksorubisin Enkapsüle Edilmiş Misellerin Hazırlanışı

Etkin madde yüklü miselleri hazırlamak için ince film hidratasyonu (229) ve yağ/su emülsiyonu (144) olmak üzere iki yöntem küçük değişiklikler yapılarak denenmiştir. Doksorubisin misellerin hidrofobik çekirdeğine yüklenme oranını arttırmak için öncelikle doksorubisin hidroklorür uygun bir baz ile muamele edilerek hidroklorürün uzaklaştırılması sağlanır. Kataoka ve arkadaşları (144) doksorubisin hidroklorürün sulu çözeltisini (50 µg/mL), değişen oranlarda trietilamin (0-10 ekivalan) ile muamele etmişler ve ardından bir ayırma hunisi kullanarak kloroform ile doksorubisini ekstrakte etmişlerdir. Doksorubisinin sulu fazdaki konsantrasyonunu

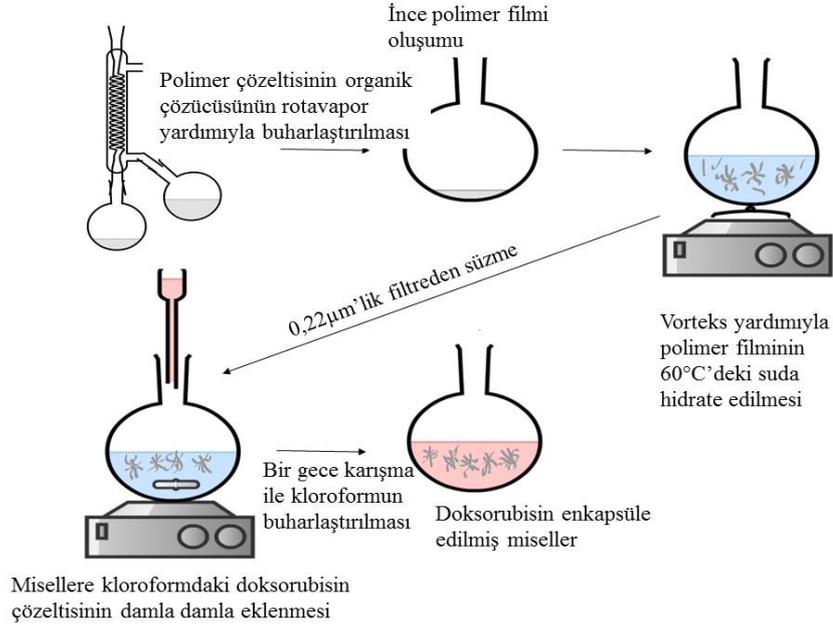
485 nm’de tayin ederek doksorubisinin iki faz arasındaki dağılımını belirlemişlerdir. Doksorubisinin kloroform fazına ekstraksiyonunun, 3 ve üzeri ekivalanı trietilamin kullanıldığı zaman yaklaşık % 100 oranında başarılı olduğunu bildirmişlerdir (144). Bu nedenle çalışmamızda doksorubisinin hidrofobikleştirilmesi için doksorubisin hidroklorür (5 mg/mL) ve 3 molar ekivalanı olacak şekilde trietilamin kloroform içerisinde 1 gece karıştırılmıştır.

Film yönteminde (Şekil 3.4.) polimer (10 mg) uygun çözücüde (THF/DCM) çözündürüldükten sonra üzerine kloroformdaki doksorubisin çözeltisinden (5 mg/mL) gerekli miktar eklenir ve çözelti karıştırılır. Ardından rotavapor kullanılarak organik çözücü 60 °C’de buharlaştırılır ve oluşan film 60 °C’deki ultra saf suda vorteks yardımıyla karıştırılarak hidrate edilir. Oluşan agregatların uzaklaştırılması için misel dispersiyonu 0,22 µm’lik filtrelerden süzülür. Misellere hapsolmayan serbest etkin maddeyi uzaklaştırmak için misel dispersiyonu Amicon santrifüj filtreleri yardımıyla 4,146 g’de 10 dakika santrifüj edilir. Bu ultrafiltrasyon işlemi üç kez tekrarlanır. Ardından miseller başlangıçtaki hacimlerine seyreltilerek karakterize edilirler.

Yağ/su emülsiyonu yönteminde (Şekil 3.5.) ise öncelikle etkin madde içermeyen misel dispersiyonu film yöntemi ile hazırlanır. Doksorubisinin kloroformdaki çözeltisi misel dispersiyonuna 400 rpm manyetik karıştırma altında enjektör yardımıyla damla damla eklenir. Bir gece karıştırılarak kloroformun buharlaşması sağlanır. Serbest doksorubisini uzaklaştırmak için Amicon ultrasantrifüj filtreleri ile 3 kez ultrafiltrasyon yapılır. Ultrasantrifüj sonrası miseller başlangıçtaki hacimlerine seyreltilerek karakterize edilirler.



Şekil 3.4. Doksorubisin yüklü misellerin film yöntemi ile hazırlanışı.



Şekil 3.5. Doksorubisin yüklü misellerin yağ/su emülsiyonu yöntemi ile hazırlanışı.

İnce film hidratasyonu yöntemi ve yağ/su emülsiyonu yöntemi kullanılarak hazırlanan doksorubisin yüklü misel formülasyonlarının bileşimi ve kullanılan doksorubisin: polimer oranları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 3.3. Doksorubisin enkapsüle edilmiş formülasyonların bileşimi.

Yöntem	Formülasyon No	Kullanılan Polimer Kodu	Polimer: Doksorubisin oranı (mg/mg)
İnce film hidratasyonu yöntemi	F1	P7	10:5
	F2	P7-30	10:5
	F3	P7-60	10:5
	F4	P7-70	10:5
Yağ/su emülsiyonu yöntemi	F5	P7	10:5
	F6	P7	10:2,5
	F7	P7	10:1,25
	F8	P7-30	10:5
	F9	P7-30	10:2,5
	F10	P7-30	10:1,25
	F11	P7-60	10:5
	F12	P7-60	10:2,5
	F13	P7-60	10:1,25
	F14	P7-70	10:5
	F15	P7-70	10:2,5
	F16	P7-70	10:1,25

3.7.4. Peptit-18 ile Modifiye Edilmiş Misellerin Hazırlanışı

Ligand ile modifiye edilmiş miseller hazırlanması için peptit-18 konjuge edilmiş polimer ile aynı yapıdaki peptit-18 ile modifiye edilmemiş polimerin karışımı kullanılmıştır. Toplam polimer ağırlığının %20'sini peptit-18 konjuge edilmiş polimer oluşturacak şekilde bir polimer karışımı hazırlanmıştır. Bu karışımı hazırlamak için peptit-18 konjuge edilmiş polimer metanolde (MTH) ve peptit-18 konjuge edilmemiş polimer diklorometanda çözündürülmüş ve her birinden gerekli miktarlarda alınarak karıştırılmıştır. Toplam polimer miktarı 10 mg ve çözücü bileşimi %50 MTH: %50 DCM (h/h) olacak şekilde polimer çözeltisi hazırlanmıştır. Etkin madde içermeyen ligand ile hedeflendirilmiş miselleri hazırlamak için bu polimer çözeltisi balona alınır ve rotavaporda organik çözücü buharlaştırılır. Oluşan film ultra saf suda vorteks yardımıyla hidrate edilir ve misel dispersiyonu 0,22 µm'lik filtrelerden süzülür. Bu misellere doksorubisin yüklemek için yağ/su emülsiyonu yönteminin yukarıda anlatılan aşamaları uygulanır (Bkz. Bölüm 3.6.2.).

3.8. Misel Formülasyonlarının Karakterizasyonu

3.8.1. Kritik Misel Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Hazırlanan misellerin CMC değerleri hassas bir yöntem olan floresan spektroskopisi ile tayin edilmiştir. Bu amaçla piren floresan probu kullanılmıştır. Pirenin THF içinde çözeltisi hazırlanmıştır ve şişelere eşit hacimde eklenmiştir. THF azot gazı altında uçurulduktan sonra her şişede son piren konsantrasyonu 6×10^{-7} M olacak şekilde 1'er mL farklı konsantrasyonda sudaki misel dispersiyonları şişelere eklenmiştir. Oda sıcaklığında bir gece karıştırıldıktan sonra örneklerin floresan intensiteleri iki farklı eksitasyon dalga boyunda (eksitasyon: 332 ve 336 nm, emisyon: 390 nm) spektroflorimetre ile ölçülmüştür.

Pirenin 300-360 nm arasındaki eksitasyon spektrumunda (0,0) bandı piren sudayken 332 nm'de iken piren misel çekirdeğine geçtiğinde 336 nm'ye kaymaktadır ve aynı zamanda pirenin floresan intensitesi polimer konsantrasyonu arttıkça artmaktadır. Pirenin maksimum intensitesinin bu iki dalga boyunda her örnek için ölçülmesi ve bu intensitelerin oranlanması (I_{336}/I_{332}) ile CMC hesaplanabilir. Piren sudayken I_{336}/I_{332} oranı sabit bir değerde kalacaktır ancak belirli bir konsantrasyondan (CMC) sonra, misel oluşmasıyla bu oran artmaya başlayacaktır. I_{336}/I_{332} değerine karşı polimer konsantrasyonunun logaritmasının grafiğe geçirilmesi ve bu grafikteki iki doğrunun kesim noktasındaki konsantrasyonun hesaplanması ile CMC değeri belirlenebilir (240, 241).

3.8.2. Misel Oluşumunun $^1\text{H-NMR}$ ile Doğrulanması

Misel oluşumunun doğrulanması için polimerlerin ve misellerin CDCl_3 ve D_2O çözücülerinde $^1\text{H-NMR}$ analizleri yapılmıştır. Ortadoğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda bulunan Bruker Biospin 300 MHz NMR cihazı kullanılarak yapılan analizler cihazdan sorumlu uzman tarafından gerçekleştirilmiştir. Film yöntemi ile hazırlanan miseller analiz öncesi 24 saat süreyle liyofilize edilerek kurutulmuşlardır. Misel formülasyonu D_2O ve blok kopolimerler CDCl_3 içinde çözülerek $^1\text{H-NMR}$ analizleri yapılmıştır.

Farklı çözücülerdeki polimer ve misel $^1\text{H-NMR}$ spektrumları incelendiğinde CDCl_3 'teki blok kopolimerin rezonans piklerinin açıkça görülmesi beklenirken, PCL

bloğunun piklerinin, misel oluşumu nedeniyle PCL bloğunun kısıtlı hareketliliği sonucu D₂O'da kaybolması beklenmektedir (141).

3.8.3. Misellerin Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

Misellerin partikül büyüklükleri ve zeta potansiyellerinin ölçülmesinde Malvern NanoZS cihazı kullanılmıştır. Ultrasaf su içinde hazırlanan misel dispersiyonları tek kullanımlık ölçüm küvetlerine konulmuş ve önce partikül büyüklüğü ardından zeta potansiyel ölçümleri yapılmıştır. Her bir ölçüm üç defa tekrarlanmıştır.

3.8.4. Doksorubisin'in Misellere Yükleme Etkinliği

Doksorubisin yüklü misellerin enkapsülasyon etkinliği ve etkin madde yükleme kapasitelerini belirlemek için elde edilen taze misel formülasyonları 24 saat boyunca liyofilize edilmişlerdir ve kuru toz haline getirilen misel formülasyonları tartılarak toplam misel miktarı belirlenmiştir. Liyofilize edilen formülasyonlar DMSO içinde çözündürülerek UV spektrofotometrede 482,5 nm'de analiz edilmiştir. Analizler birbirinden bağımsız olarak hazırlanan formülasyonlar üzerinde 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Enkapsülasyon etkinliği ve etkin madde yükleme kapasitesi aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır (Eşitlik 3.4. ve 3.5.).

$$\% \text{Enkapsülasyon etkinliği} = 100x \frac{\text{Misellerdeki ilaç miktarı}}{\text{Başlangıçta kullanılan ilaç miktarı}} \quad (3.4.)$$

$$\% \text{Etkin madde yükleme kapasitesi} = 100x \frac{\text{Misellerdeki ilaç miktarı}}{\text{Elde edilen misellerin ağırlığı}} \quad (3.5.)$$

3.8.5. Doksorubisin'in Misellerden İn Vitro Salımı

Misel formülasyonlarından doksorubisin salımını incelemek için sink koşulun sağlandığı, salım ortamının hacminin oldukça yüksek tutulduğu Ponta ve Bae (242) tarafından bildirilen dinamik diyaliz yöntemi kullanılmıştır (242). Bu amaçla, hazırlanan misel fomülasyonları (750 µL) diyaliz kasetleri (MWCO 3500) içine konulmuş ve farklı pH'lardaki salım ortamına (2 L) kasetler yerleştirilmiştir. Salım ortamı manyetik olarak deney süresince karıştırılmış ve sıcaklık 37°C'de sabit tutulmuştur. Deney 72 saat sürdürülmüş ve salım ortamı bu süre içinde üç kez değiştirilmiştir. Örnek alma zaman aralıkları 3, 6, 9, 12, 24, 48 ve 72 saat olarak

belirlenmiştir. Her bir deney için iki kaset kullanılmıştır. İlk kaset 3, 6, 9 saatlik zaman noktalarında örnek almak için kullanılmıştır ve ikinci kaset 12, 24, 48,72 saatlik zaman noktalarında örnek almak için kullanılmıştır. Salım ortamı olarak pH 5 ftalat tamponu ve pH 7,4 fosfat tamponu pH'ya bağımlı olarak doksorubisin salımında bir değişiklik olup olmayacağını araştırmak için kullanılmıştır. Belirli zaman aralıklarında diyaliz kasetlerinden 50 µl örnek alınmış ve örnekler DMSO ile seyreltilerek, örneklerdeki doksorubisin miktarı UV spektrofotometrede, analiz edilmiştir. Salım çalışmaları üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.8.6. Misellerin TEM ile Görüntülenmesi

Misel formülasyonlarının görüntülemek için TEM cihazı kullanılmıştır. TEM analizi için misel formülasyonunun bir damlası (10 µL) karbon film kaplı bakır ızgara üzerine damlatılmıştır. Izgara atmosfer koşullarında kurutulduktan sonra görüntüleme yapılmıştır. TEM analizi ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda bulunan FEI Tecnai G² Spirit BioTwin cihazı kullanılarak cihazdan sorumlu uzman tarafından yapılmıştır.

3.8.7. Misel Formülasyonlarının Stabilitesi

Hazırlanan doksorubisin yüklü misel formülasyonlarının protein varlığındaki stabilitesini incelemek için, miseller %10 fetal sığır serumu içeren fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) ortamında ve 37⁰C'de inkübe edilmiş ve misellerin partikül büyüklüğündeki değişim Malvern NanoZS cihazı kullanılarak izlenmiştir.

Peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü miseller hazırlandıktan sonra 4 °C'de ve oda sıcaklığında saklanmış ve 6 ay süresince takip edilmişlerdir. Belirli aralıklarla örnekler alınarak formülasyonların partikül büyüklükleri, zeta potansiyellerinin ölçümü Malvern NanoZS cihazı kullanılarak yapılmıştır. Ölçümler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.9. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.9.1. Etkin Madde İçermeyen Misellerin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Araştırılması

Misel formülasyonlarının hazırlanmasında yeni sentezlenen polimerler kullanıldığı için etkin madde içermeyen misellerin biyoyumluluğunu değerlendirmek üzere L929 fare fibroblast hücreleri kullanılmıştır. L929 hücre hattı Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO) tarafından in vitro biyoyumluluk testi için önerilmektedir (243).

L929 hücreleri %10 (h/h) FBS, 50 U/mL Penisilin ve 50 µg/mL Streptomisin içeren DMEM kullanılarak 25 cm² flaklarda 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörlerde büyütülmüşlerdir. Hücreler konfluent hale (flaşın yüzeyinin %80'ini kapladıklarında) geldiklerinde %0,25 Tripsin ve %0,02 EDTA içeren Tripsin-EDTA çözeltisi yardımıyla flask yüzeyinden kaldırılıp taze kültür ortamında süspande edilmişlerdir. Hücreler deney öncesi tripan mavisi kullanılarak mikroskop yardımıyla sayılmış ve kuyucuk başına 5000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilmişlerdir. Bir gece inkübasyon sonrası kültür ortamında hazırlanan misel dispersiyonu seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda kuyucuklara uygulanmıştır. Kontrol grubu olarak sadece kültür ortamı uygulanan hücreler kullanılmıştır. Uygulama sonrası plakalar 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübatörde bekletilmişlerdir. İnkübasyon süresi sonunda PBS içinde hazırlanan MTT çözeltisinden (5 mg/mL) her bir kuyucuğa 25 µL eklenmiştir. 4 saatlik inkübasyon sonunda her kuyucuğa 80 µL %23 SDS pH 4,7 (%45 DMF: %55 su (h/h) içinde) çözeltisi eklenmiştir. Plakalar 1 gece inkübatörde bekletildikten sonra 570 nm'de mikrolaka okuyucuda absorbanlar ölçülmüştür. Sonuçlar kontrol grubunun hücre canlılığı %100 kabul edilerek hesaplanmıştır. Deneyler üç tekrarlı olarak (farklı günlerde) yapılmıştır.

3.9.2. Doksorubisin Yüklü Misellerin Sitotoksitesinin Araştırılması

Doksorubisin yüklü hedeflendirilmemiş misellerin sitotoksitesi MCF-7 insan meme adenokarsinom hücreleri kullanılarak araştırılmıştır. Peptit-18 ile modifiye edilmiş doksorubisin yüklü misellerinin sitotoksitesi, peptit-18 tarafından hedeflendiği literatürde (199, 201, 244, 245) bildirilen MCF-7 hücreleri ve literatürde bu konuda bir bilgi bulunmayan SKBR-3 hücreleri (insan meme adenokarsinom hücre hattı) kullanılarak araştırılmıştır. SKBR-3 ve MCF-7 hücreleri %10 (h/h) FBS, 50 U/mL Penisilin ve 50 µg/mL Streptomisin içeren DMEM kullanılarak 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörlerde büyütülmüşlerdir.

Hücreler deney için kuyucuk başına 5000 hücre olacak şekilde ekilmiş ve bir gece inkübasyon sonrasında formülasyonlar kuyucuklara uygulanmıştır. Doksorubisinin sudaki stok çözeltisi ve misel formülasyonları (doksorubisin içeren ve içermeyen), hücre kültürü ortamında seyreltilerek kuyucuklara uygulanacak konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Formülasyonlarla hücreler 24, 48 ve 72 saatlik inkübe edildikten sonra her bir kuyucuğa 25 µL MTT çözeltisi eklenmiştir. Plakalar inkübatörde 4 saat bekletildikten sonra her kuyucuğa 80 µL %45 DMF içinde %23 SDS (pH 4,7) çözeltisi eklenmiştir. Ertesi gün plakaların 570 nm'deki absorbansları mikropilaka okuyucu kullanılarak ölçülmüştür. Kontrol grubu olarak formülasyonlar ile aynı oranda su içeren kültür ortamı ve sadece kültür ortamı kullanılmıştır. Deneyler bağımsız günlerde üç kez tekrar edilerek yapılmıştır. Sonuçlar hesaplanırken kontrol grubunun hücre canlılığı %100 kabul edilmiştir.

3.9.3. Doksorubisin Yüklü Misellerin Hücresel Alımının Floresan Mikroskop İle İncelenmesi

Doksorubisin floresan özellik gösteren bir etkin madde olduğu için doksorubisin enkapsüle edilmiş misellerin hücresel alımı floresan mikroskop ile doğrudan görüntülenebilir. Doksorubisin yüklü hedeflendirilmemiş misellerin hücre içine girişini görüntülemek için MCF-7 hücreleri kuyucuk başına 100 bin hücre düşecek şekilde 24 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Hücreler 24 saat inkübatörde bekletildikten sonra kuyucuklardaki ortam atılmış ve doksorubisin çözeltisi ve doksorubisin yüklü misel formülasyonları kültür ortamı ile seyreltilerek kuyucuklara uygulanmıştır. Kuyucuklardaki doksorubisin konsantrasyonu 5 µg/mL olarak sabit tutulmuştur. Plakalar 37°C'de 1 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklardaki ortam atılmış ve kuyucuklar soğuk PBS ile üç kez yıkandıktan sonra plakalara birer mL PBS eklenmiş ve plakalar floresan mikroskop ile görüntülenmiştir. Peptit-18 ile modifiye edilmiş doksorubisin yüklü misellerin hücresel alımı hedeflendirilmemiş miseller için kullanılan deney koşulları uygulanarak ve MCF-7, SKBR-3 hücreleri kullanılarak araştırılmıştır. Farklı olarak SKBR-3 hücreleri kuyucuk başına 100 bin hücre düşecek şekilde 24 kuyucuklu plakalara ekildikten sonra yapışıp konfluent olmaları için 48 saat beklenmiş ve bu süre sonunda formülasyonlar uygulanarak görüntüleme çalışmaları yapılmıştır.

3.9.4. Peptit İle Hedeflendirilmiş Doksorubisin Yüklü Misellerin Hücresel Alımının Akış Sitometrisi İle İncelenmesi

Peptit-18 ile hedeflendirilmiş misellerin hücresel alımının MCF-7 ve SKBR-3 meme kanseri hücreleri için daha hassas ve nicel olarak belirlenebilmesi için hedeflendirilmiş formülasyonların hücresel alımı akış sitometrisi ile incelenmiştir. L929 hücreleri ise kontrol olarak kullanılmıştır. Hücreler kuyucuk başına 500 bin hücre düşecek şekilde 24 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Hücreler 1 gece inkübe edildikten sonra üzerlerindeki ortam atılıp, doksorubisin çözeltisi, peptit-18 ile modifiye edilmiş doksorubisin yüklü misel formülasyonu ve kontrol olarak kültür ortamı kuyucuklara uygulanmıştır. Uygulanan doksorubisin konsantrasyonu 5 µg/mL olacak şekilde seyreltmeler yapılmıştır. Bir saatlik inkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerindeki ortam atılmış ve hücreler üç kez 1 mL soğuk PBS ile yıkanmıştır. Her kuyucuğa 200 µL Tripsin-EDTA çözeltisi eklenmiş ve 2 dakikalık inkübasyon sonunda hücreler plaka yüzeyinden ayrılınca kuyucuklara 500 µL kültür ortamı eklenmiştir. Plaka yüzeyinden ayrılan hücreler pipet ile plaka yüzeyi yıkanarak ependorf tüplere alınmış ve 500 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış ve hücreler 200 µL %5 FBS içeren PBS içinde 2 saniye vorteks yapılarak süspansiyon edilmiştir. Örnekler aynı gün analiz edilmiştir ve analize kadar 4°C'de saklanmıştır.

Hazırlanan örnekler ODTÜ Biyomalzeme ve Doku Mühendisliği Mükemmeliyet Merkezi (BIOMATEN) Laboratuvarı'nda bulunan Accuri C6 Flow Cytometer (BD Biosciences, ABD) cihazı kullanılarak cihazdan sorumlu uzman tarafından analiz edilmişlerdir. Analizler FL1 kanalı kullanılarak ve geçitleme bölgesindeki minimum 10 bin hücre kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.10. İstatiksel Analiz

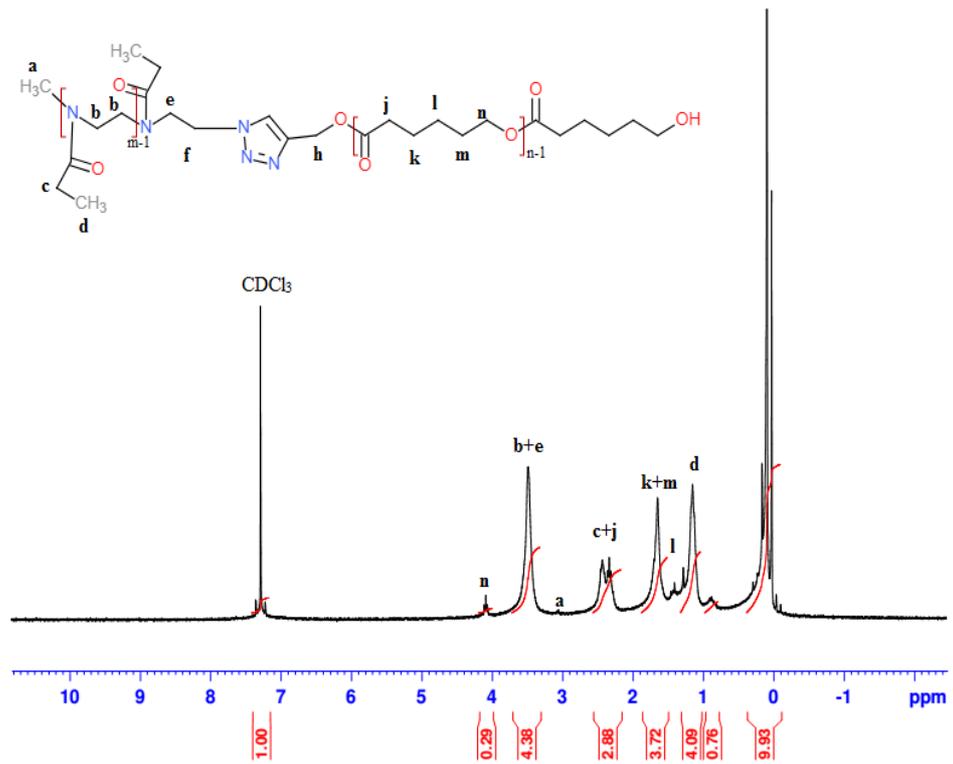
Bulgular üç bağımsız deneyin ortalama (\bar{X}) \pm standart sapması (SS) ya da ortalama (\bar{X}) \pm standart hatası (SH) şeklinde sunulmuştur. İstatistiksel analizler GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., CA,USA) yazılımı ile tek/iki yönlü ANOVA analizi kullanılarak yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılıklar Tukey testi ile değerlendirilmiştir. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

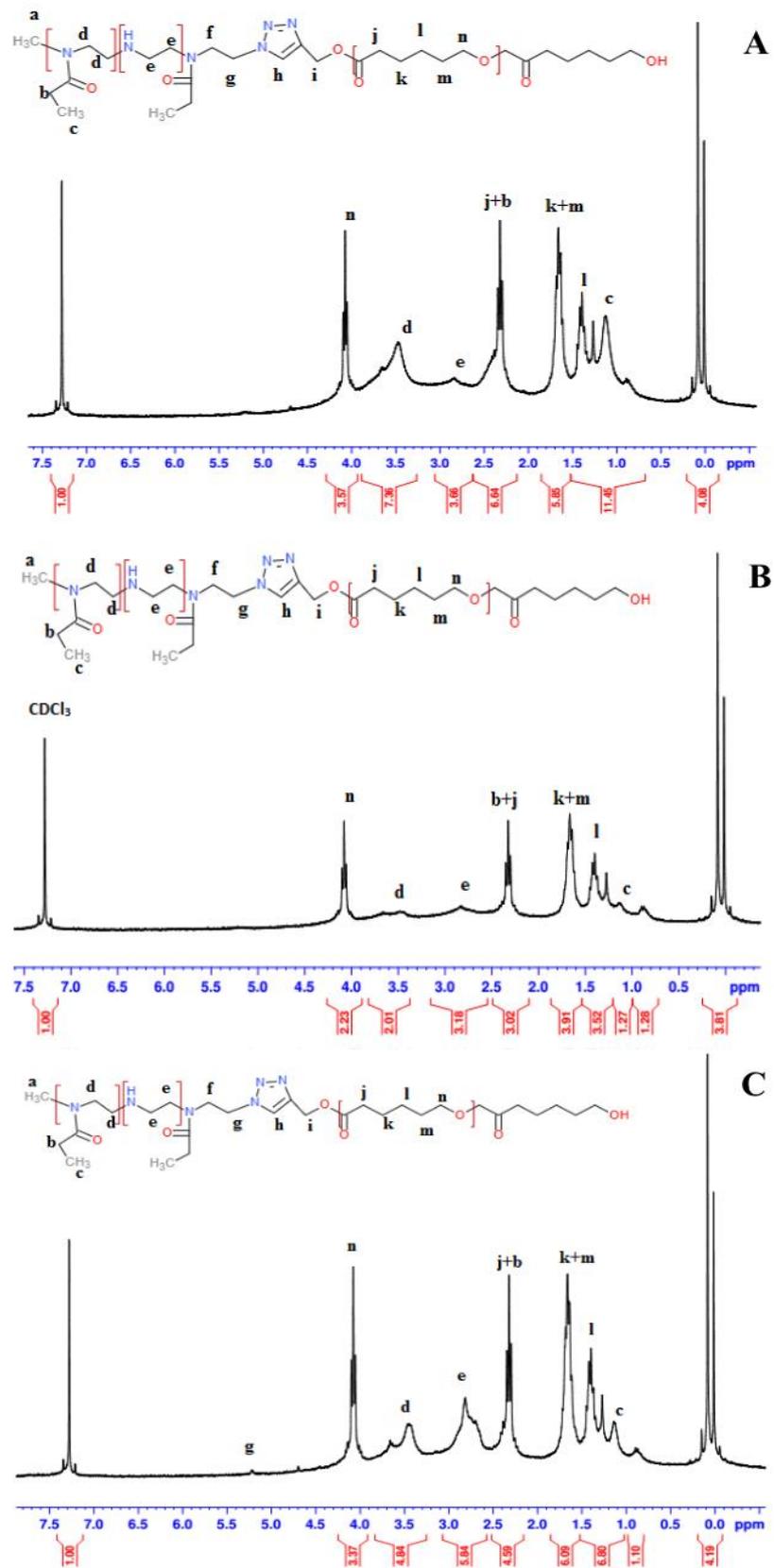
4.1. Polimerlerin Sentezi ve ¹H-NMR ile Karakterizasyonu

Misel hazırlanmasında kullanılan polimerler Bölüm 3.3.'te verilen yöntemlerle sentezlenmiştir. Azid uçlu PEtOx-N₃ polimerini sentezlemek için metil tosilat başlatıcı olarak kullanılmış ve reaksiyon sodyum azid ile sonlandırılmıştır. PCL-alkin polimerini sentezlemek için ise kalay oktoat kullanılmıştır. PEtOx-N₃ ve PCL-alkin polimerlerinin çit-çit reaksiyonu ile PEtOx-b-PCL polimerleri elde edilmiştir. Reaksiyon oda sıcaklığında gerçekleştirilmiş olup bakır sülfat katalizör olarak kullanılmış ve askorbik asit redüktan olarak kullanılmıştır. PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerini sentezlemek için azid uçlu PEtOx-N₃ (10700 Da) polimeri HCl kullanılarak %30, 60 ve 70 oranlarında hidroliz edilmiş ve elde edilen PEtOx-ko-PEI polimeri çit çit reaksiyonu ile PCL-alkin ile konjuge edilmiştir. Farklı oranlarda lineer PEI içeren PEtOx-ko-PEI polimeri elde etmek için hidroliz reaksiyonunun süresi değiştirilmiştir.

Doksorubisin yüklü miselleri hazırlamak için kullanılan polimerlerin dötero kloroform içerisinde ¹H-NMR analizleri ODTÜ Merkez laboratuvarında gerçekleştirilmiş olup polimerlere ait spektrumlar Şekil 4.1., 4.2. ve 4.3.'de verilmiştir. PEtOx-b-PCL (P7 kodlu polimer) polimerine ait spektrumda (Şekil 4.1.) PEtOx bloğunda yer alan -CH₃ (d) gruplarından kaynaklı hidrojenlere ilişkin pik 1,14 ppm'de, -CH₂ (b,e) gruplarındaki hidrojenler ise 3,47 ppm'de görülmektedir. PCL bloğunda yer alan karbonil grubuna komşu -CH₂ (j) ve PEtOx bloğunda karbonil grubuna komşu -CH₂ (c) gruplarındaki hidrojenler 2,30 ppm'de görülmektedir. PCL bloğunda bulunan -CH₂ (k+m) gruplarındaki hidrojenler ise 1,6 ppm'de görülmektedir. PEtOx için karakteristik d pikinin 1,14 ppm'de spektrumda görülmesi ve PCL için de 4 ppm'de görülen n pikinin spektrumda yer alması PEtOx-b-PCL yapısını doğrulamaktadır.



Şekil 4.1. PEtOx-b-PCL (P7) polimerine ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu.

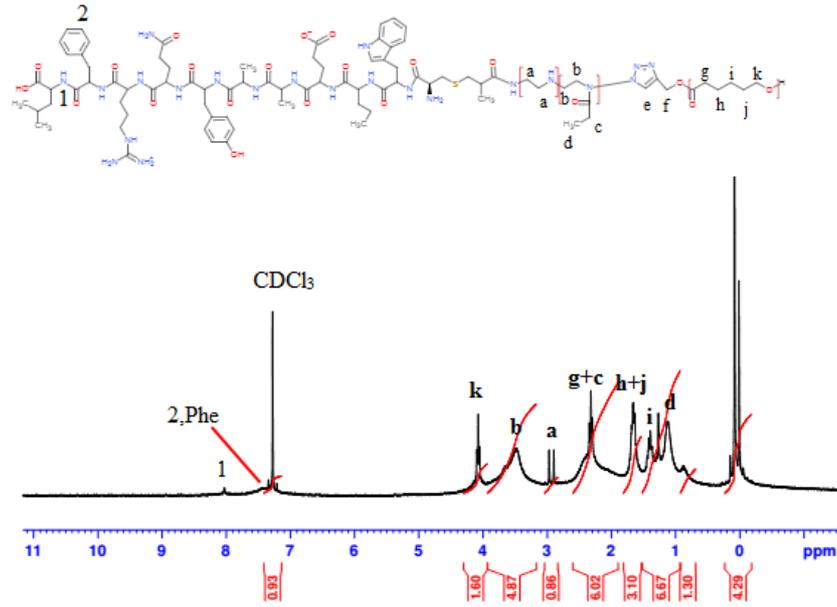


Şekil 4.2. PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerlerine ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumları, A: P7-30, B:P7-60, C:P7-70.

PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerlerine ilişkin $^1\text{H-NMR}$ spektrumları Şekil 4.2.'de verilmiştir. PEtOx₁₀₇₀₀ polimerinin farklı oranlarda (%30, 60 ve 70) hidrolizi ile elde edilen PEtOx-ko-PEI polimerlerinin, PCL₂₁₀₀ ile bloklanması sonucu farklı molekül ağırlıklarına ve farklı PEI oranlarına sahip PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerleri sentezlenmiştir. Şekil 4.2.'de yer alan A bölümünde P7-30 kodlu polimerin (PEtOx₇₅₀₀-ko-PEI₁₅₀₀-b-PCL₂₁₀₀), B bölümünde P7-60 (PEtOx₄₃₀₀-ko-PEI₃₀₀₀-b-PCL₂₁₀₀) ve C bölümünde P7-70 kodlu polimerin (PEtOx₂₇₅₀-ko-PEI₃₆₀₀-b-PCL₂₁₀₀) spektrumları birlikte incelendiğinde, PEtOx polimerinin hidrolizi sonucu elde edilen PEI polimerine ait NH-CH₂ grubundaki protonların (e) 2,8 ppm civarında ortaya çıktığı görülmektedir. Spektrumlar incelendiğinde üçünde de PEtOx polimerine ait -CH₂-CH₂-N- grubundaki protonların (d) her üç polimer için de 3,5 ppm civarında ortaya çıktığı görülmektedir. P7-30 kodlu polimerin spektrumunda, polimerdeki PEtOx yüzdesinin PEI yüzdesinden yüksek olması ile uyumlu olarak, PEtOx kaynaklı -CH₂-CH₂-N- grubundaki protonların pikinin (d) şiddetinin, PEI polimerine ait NH-CH₂ grubundaki protonların pikinin (e) şiddetine göre daha yüksek olduğu görülmektedir. P7-60 kodlu polimerin spektrumunda ise polimerdeki PEI yüzdesinin artışına bağlı olarak NH-CH₂ grubundaki protonların pikinin (e) şiddetinin PEtOx polimerine ait -CH₂-CH₂-N- grubundaki protonların pikinin (d) şiddetinden daha yüksek olduğu görülmektedir. P7-70 kodlu polimer için de polimerdeki PEI yüzdesinin artışı nedeniyle 2,8 ppm'deki (e) pikinin şiddetinin, PEtOx bloğu kaynaklı 3,5 ppm'deki (d) pikinin şiddetinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Her üç polimer için de PCL bloğunda yer alan karbonil grubuna komşu -CH₂ (j) hidrojenleri spektrumlarında 2,30 ppm'de görülmektedir ve PCL bloğundaki -CH₂-CH₂-CH₂- (k+m) gruplarındaki hidrojenler ise 1,6 ppm'de görülmektedir. Spektrumlarda PEtOx, PEI ve PCL gruplarına özgü piklerin bulunması, PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerlerinin başarılı bir şekilde sentezlenmiş olduğunu göstermektedir.

Peptit ile hedeflendirilmiş miselleri hazırlamak için kullanılacak polimer, formülasyon çalışmaları ile belirlenmiş olup, bu çalışmalar sonucunda misel büyüklüğü, etkin madde yükleme kapasitesi gibi parametreler açısından en uygun sonuçların elde edildiği P7-30 kodlu polimeri Peptit-18 konjugasyonu için seçilmiştir. P7-30 kodlu polimere Peptit-18'in konjugasyonu ile elde edilen peptit-18 bağlanmış P7-30 polimerinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu Şekil 4.3.'de verilmiştir. Spektrum

incelendiğinde PEtOx (b,c,d), PEI (a), ve PCL (g,h,i,j,k) gruplarına özgü protonların 1-4 ppm arasında ortaya çıktığı ve peptit yapısında bulunan amit grubundaki $-NH$ hidrojenin 8 ppm civarında ve fenil gruplarında yer alan hidrojenlerin 7,4 ppm civarında ortaya çıktığı görülmektedir. Peptit ve polimere özgü proton piklerinin spektrumunda bulunması Peptit-18 konjugasyonunun başarı ile gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 4.3. Peptit 18-PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerinin 1H -NMR spektrumu.

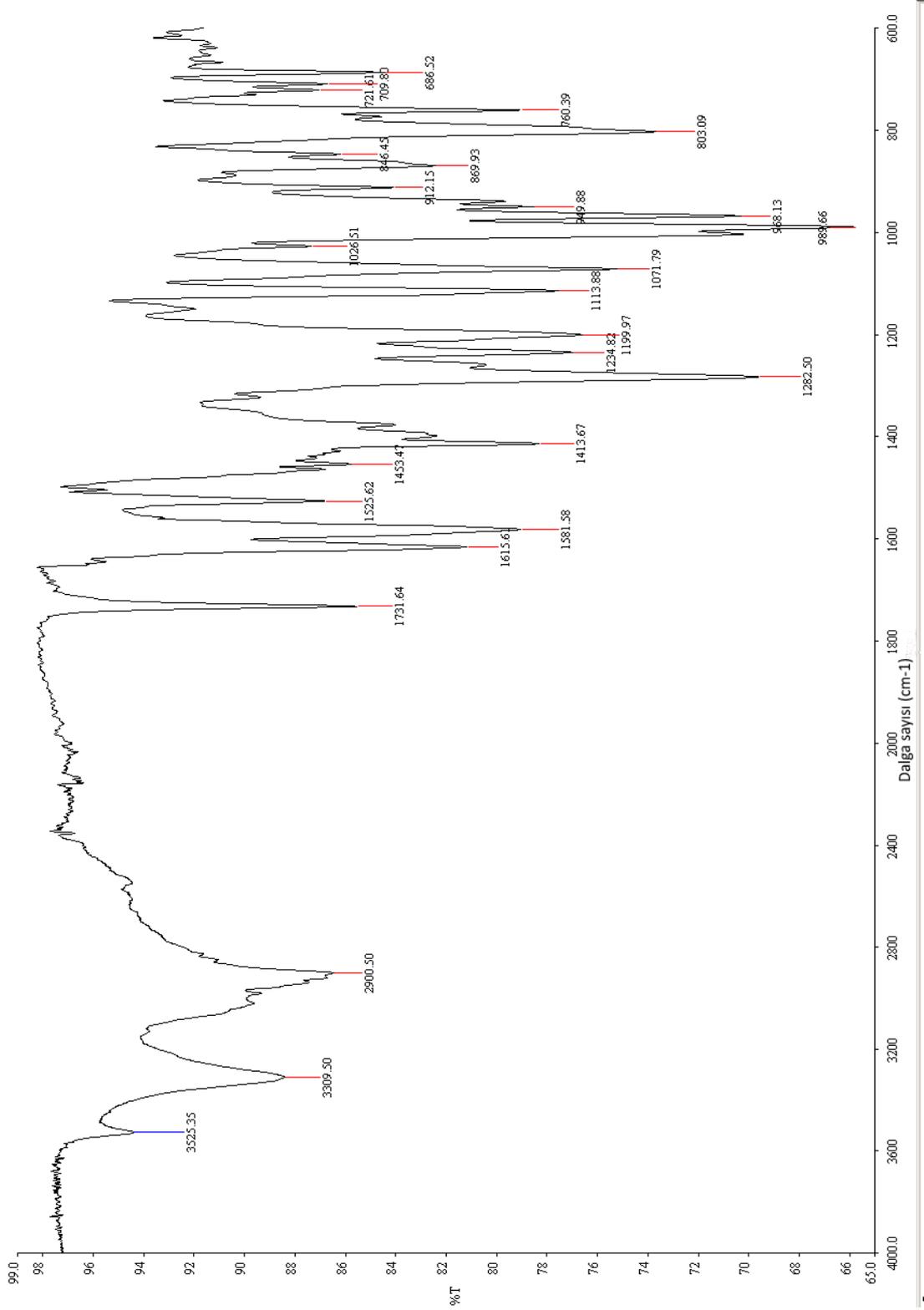
4.2. Doksorubisinin Fizikokimyasal Özellikleri

Tez çalışmasında kullanılan doksorubisin etkin maddesinin FT-IR Spektrumu UV spektrumu alınarak ve DSC Analizi yapılarak etkin maddenin literatürde verilen özellikleri sağladığı doğrulanmıştır.

4.2.1. Doksorubisinin FT-IR Spektrumu

Bölüm 3.4.1.'de açıklandığı şekilde doksorubisin hidroklorürün FT-IR spektrumu çekilmiştir ve spektrum Şekil 4.4.'de verilmiştir. Spektrum incelendiğinde doksorubisin için daha önce bildirilen bulgularla (246) uyumlu olarak O-H gerilme bandının 3525 cm^{-1} dalga sayısında, C-H gerilme bandının 2900 cm^{-1} dalga sayısında,

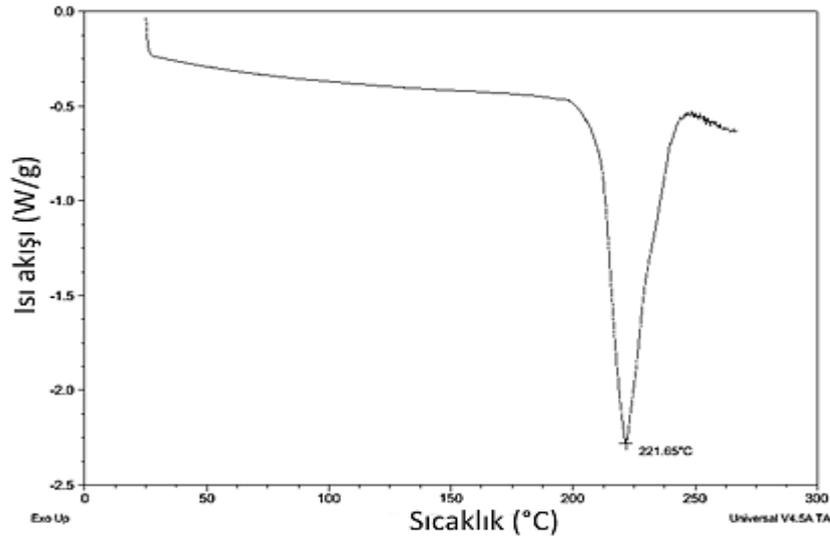
C=O (keton) gerilme bandını 1731 cm^{-1} dalga sayısında, 1071 cm^{-1} dalga sayısında C-O-C (eter) gerilme bandının bulunduğu görülmektedir.



Şekil 4.4. Dokсорubisinin FT-IR spektrumu.

4.2.2. Dokсорubisinin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

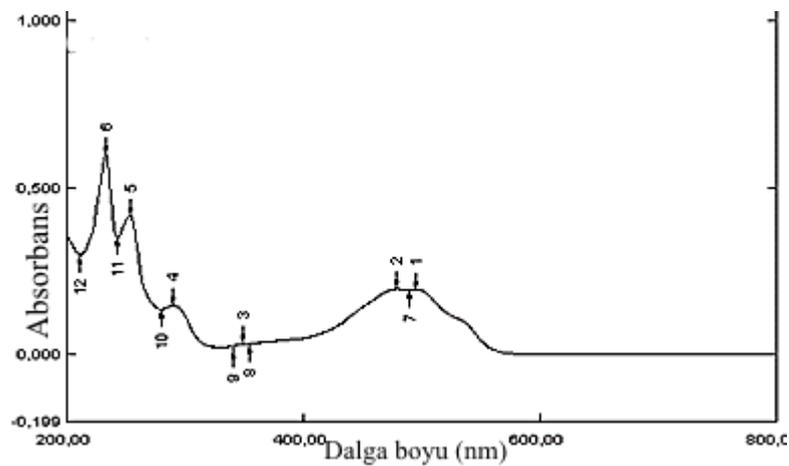
Bölüm 3.4.2.'de belirtilen koşullarda gerçekleştirilen analizi sonucu elde edilen DSC termogramı Şekil 4.5.'de verilmiştir. Dokсорubisinin erime endotermik piklerinin literatüre uygun olarak 200 ile 240°C arasında ortaya çıktığı DSC termogramında görülmektedir (247).



Şekil 4.5. Dokсорubisinin Hidroklorürü DSC termogramı.

4.2.3. Dokсорubisinin UV Spektrumu

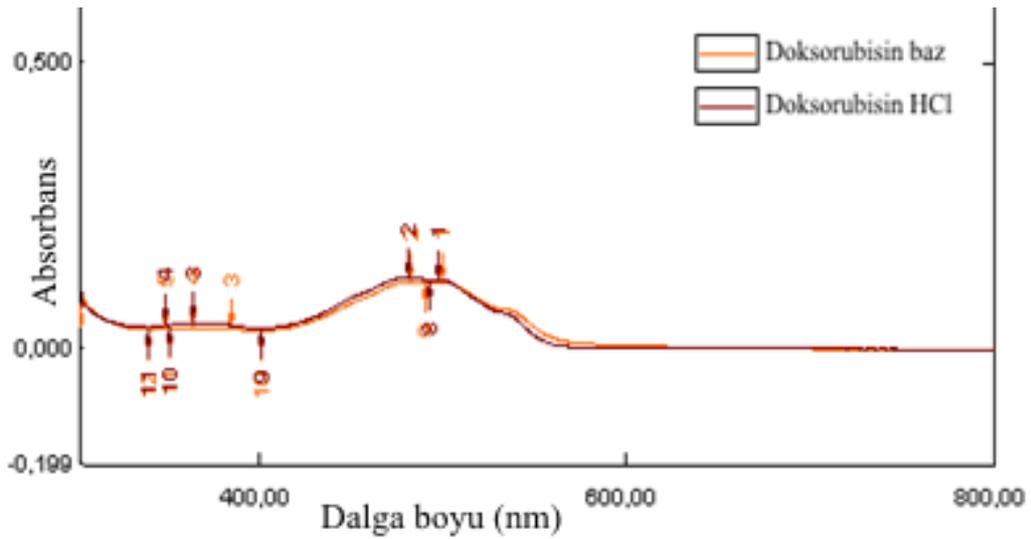
Dokсорubisinin hidroklorürü sudaki çözeltisinin (10 µg/mL) UV spektrumu Şekil 4.6.'da verilmiştir. Spektrum incelendiğinde maksimum absorbansın gözlemlendiği dalga boyu 482,5 nm olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.6. Dokсорubisinin Hidroklorürü sudaki çözeltisinin UV spektrumu.

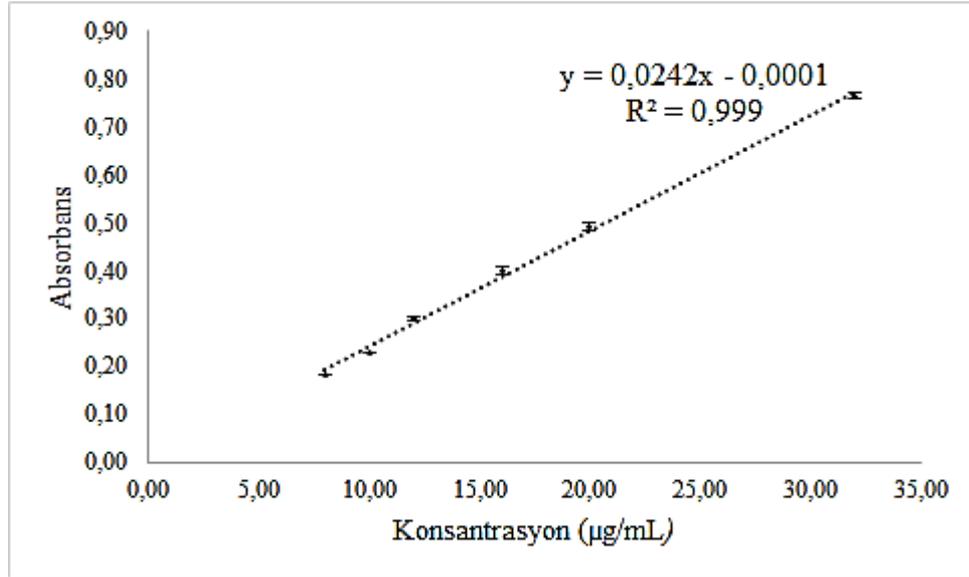
4.3. Dokсорubisinin UV-Görünür Bölge Spektroskopisi ile Miktar Tayini

Dokсорubisinin miktar tayini için spektrofotometrik bir yöntem kullanılmıştır. Bu amaçla dokсорubisin hidroklorürün DMSO içerisindeki standart çözeltileri kullanılarak 482,5 nm'de kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Formülasyonlara dokсорubisin yüklenirken trietilamin muamelesi ile HCL uzaklaştırılacağı için öncelikle dokсорubisin hidroklorür ve Bölüm 3.5.'te anlatıldığı şekilde elde edilen dokсорubisin baz DMSO içinde çözündürülerek spektrumları alınmış ve karşılaştırılmıştır. DMSO içinde dokсорubisin hidroklorür ve dokсорubisin baz çözeltilerinin spektrumları Şekil 4.7.'de verilmiştir. Şekil 4.7. incelendiğinde spektrumlarda bir değişim olmadığı ve kalibrasyon doğrusu çizilirken kullanılan 482,5 nm dalga boyunda iki çözeltinin absorbanlarının aynı olduğu görülmektedir.



Şekil 4.7. DMSO içindeki dokсорubisin HCl ve dokсорubisin baz çözeltilerinin UV spektrumları.

Dokсорubisin hidroklorürün DMSO içindeki standart çözeltileri kullanılarak 482,5 nm'de yapılan absorban ölçümleri elde edilen kalibrasyon doğrusu Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.8. Dokсорubisin hidroklorürün DMSO içindeki kalibrasyon doğrusu ve denklemi ($X \pm SS$, $n=6$).

Analitik Yöntem Validasyonu

Doğrusallık

Dokсорubisin hidroklorürün DMSO içindeki stok çözeltisinden faydalanılarak hazırlanan standart çözeltilerin, dokсорubisinin maksimum absorbans dalga boyu olan 482,5 nm'deki absorbansları ölçülmüş ve konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmiştir. Konsantrasyon ile absorbans arasındaki ilişkinin 8-32 µg/mL aralığında doğrusal olduğu gösterilmiştir ($R^2=0.999$; y-intersept= 0,0001; eğim=0,0242).

Doğruluk ve Kesinlik

Yöntemin kesinlik ve doğruluğunun gösterilmesi için yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar Tablo 4.1. ve 4.2.'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde varyasyon katsayısının %2'den küçük olduğu ve geri kazanımın %97-103 arasında olduğu görülmektedir. Bulgular yöntemin kesinlik ve doğruluk parametreleri açısından uygunluğunu göstermektedir.

Tablo 4.1. Dokсорubisin Hidroklorürün spektrofotometrik miktar tayini yönteminde elde edilen gün içi doğruluk ve kesinlik bulguları (n=3).

Hazırlanan Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Ölçülen Konsantrasyon ($X \pm SS$)	VK (%)	% Geri Kazanım
12	12,0 \pm 0,2	1,8	100,3 \pm 1,8
16	15,6 \pm 0,1	0,7	97,4 \pm 0,6
20	19,5 \pm 0,1	0,7	97,4 \pm 0,7

VK: Varyasyon katsayısı.

Tablo 4.2. Dokсорubisin Hidroklorürün spektrofotometrik miktar tayini yönteminde elde edilen günler arası doğruluk ve kesinlik bulguları (n=3).

Hazırlanan Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Ölçülen Konsantrasyon ($X \pm SS$)	VK (%)	% Geri Kazanım
12	12,2 \pm 0,2	1,6	101,8 \pm 1,6
16	15,5 \pm 0,2	1,2	97,0 \pm 1,2
20	19,6 \pm 0,2	1,0	98,1 \pm 1,0

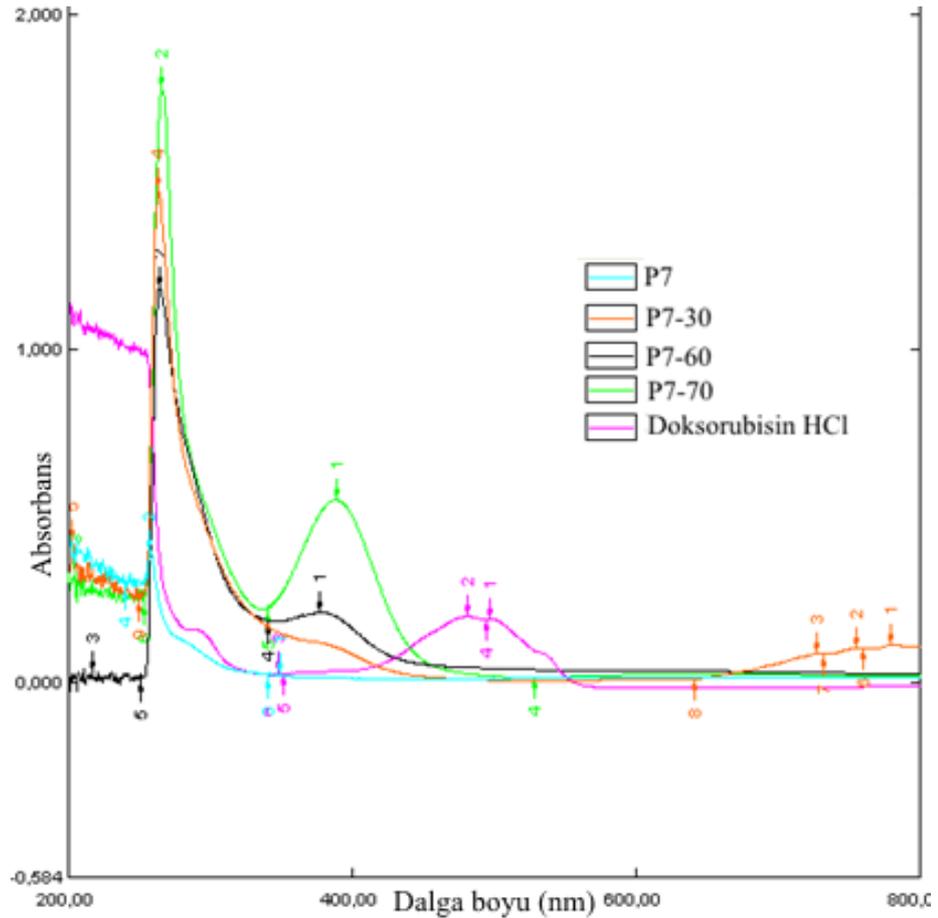
VK: Varyasyon katsayısı.

Teşhis Alt Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Teşhis alt sınırı etkin maddenin teşhis edilebilen, en küçük miktarı olup kullanılan yöntem için 0,3 $\mu\text{g} / \text{mL}$ olarak hesaplanmıştır. Tayin alt sınırı ise kullanılan yöntem ile kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikte tayin edilebilen en küçük miktar olup 1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ olarak hesaplanmıştır.

Özgüllük

Dokсорubisin yüklü miselleri hazırlamak için kullanılan polimerlerin dokсорubisinin analizi için kullanılan maksimum dalga boyu 482,5 nm'de girişim yapmadığının gösterilmesi için P7, P7-30, P7-60, P7-70 kodlu polimerlerin DMSO içindeki çözeltilerinin spektrumları alınmıştır. Spektrumlar (Şekil 4.9.) incelendiğinde polimerlerin 482,5 nm'de absorbans vermedikleri görülmektedir.



Şekil 4.9. Polimerlerin (P7, P7-30, P7-60, P7-70 kodlu) ve dokсорubisin hidroklorürün DMSO içindeki spektrumları.

4.4. Misel Formülasyonlarının Hazırlanışı

4.4.1. PEtOx-b-PCL Polimerleri ile Yapılan Ön Çalışmalar

Blok kopolimerlerin kimyasal yapıları, molekül ağırlıkları ve hidrofilik blok: hidrofobik blok oranları misel oluşumunu ve oluşan misellerin partikül büyüklüğünü etkilemektedir. Bu nedenle dokсорubisin yüklü miselleri hazırlamak için en uygun polimeri belirlemek üzere farklı molekül ağırlıklarına ve hidrofilik blok: hidrofobik blok oranlarına sahip PEtOx-b-PCL polimerleri sentezlenmiştir. Sentezlenen polimerler ile Bölüm 3.7.1.'de belirtilen yöntemler kullanılarak etkin madde içermeyen miseller hazırlanmıştır ve partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyel ölçümleri yapılmıştır. Ayrıca sentezlenen polimerlerin kullanılmadan önce diyaliz ile saflaştırılmasının partikül büyüklüğüne etkisini

araştırmak üzere diyaliz ile saflaştırılmış ve saflaştırılmamış polimerler kullanılarak miseller hazırlanmıştır ve partikül büyüklüğü ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen bulgular saflaştırma sonucu elde edilen polimerler ile daha düşük partikül büyüklüğüne sahip miseller elde edilebildiğini göstermiştir (Tablo 4.3.) bu bağlamda tüm polimerlerin kullanılmadan önce saflaştırılmasına karar verilmiştir.

Tablo 4.3. Diyaliz ile saflaştırmanın PEtOx-b-PCL misellerinin büyüklüğüne etkisi (n=3, X±SS).

Polimer Kodu	Yöntem	Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)	
P2	Saflaştırma Öncesi	Diyaliz	272,6± 13,5	0,3±0,02	1,5±0,2
		Çözücü	369,6±36,6	0,4±0,03	-5,4±0,2
		Buharlaştırma			
	Saflaştırma Sonrası	Diyaliz	103,3±44,8	0,3 ± 0,2	-4,9 ± 0,4
		Çözücü	278,2±16,7	0,5±0,1	-2,7±1,4
		Buharlaştırma			
P3	Saflaştırma Öncesi	Diyaliz	105,6±5,6	0,5±0,1	-8±1,6
		Çözücü	164,8±12,8	0,3±0,1	-25,2±0,8
		Buharlaştırma			
	Saflaştırma Sonrası	Diyaliz	116,4±2,4	0,8±0,05	-8,8±0,3
		Çözücü	132,3±11,2	0,4±0,1	-17,2±0,2
		Buharlaştırma			

Saflaştırılmış PEtOx-b-PCL polimerleri ile organik çözücü olarak THF kullanılarak ve farklı yöntemler denenerek hazırlanan misellerin partikül büyüklükleri ve zeta potansiyel ölçümleri Tablo 4.4.'de verilmiştir. Bulgular incelendiğinde misel büyüklüğü açısından en küçük değer P7 polimeri ile ve ince film hidratasyonu yöntemi ile elde edilmiştir. Bu nedenle P7 polimeri doksorubisin yüklü miseller hazırlamak için seçilmiştir. Ayrıca PEtOx polimerinin hidrolizi ile elde edilecek katyonik PEtOx-ko-PEI polimerini sentezlemek için en düşük misel büyüklüğünün elde edildiği P7 polimerinin molekül ağırlığı temel alınmıştır. PEtOx polimerinin hidrolizi ile üç farklı molekül ağırlıktaki PEtOx-ko-PEI polimerleri sentezlenerek PCL ile konjuge edilmiş ve elde edilen PEtOx-ko-PEI-PCL polimerleri doksorubisin yüklü miselleri hazırlamak için kullanılmıştır.

Tablo 4.4. Farklı yöntemlerle hazırlanan PEtOx-b-PCL misellerinin büyüklük ve zeta potansiyel ölçüm sonuçları (n=3, X±SS).

Polimer kodu	Yöntem	Boyut (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
P1	Diyaliz	693,3 ± 86,1	0,6 ± 0,03	-25,1 ± 0,3
	Çözücü buharlaştırma	257,6±4,6	0,2±0,01	-19,9±0,7
P2	Diyaliz	103,3±44,8	0,3 ± 0,2	-4,9 ± 0,4
	Çözücü buharlaştırma	278,2±16,7	0,5±0,1	-2,7±1,4
	İnce film hidrasyonu	81,2±1,6	0,2±0,01	-6,9±0,4
P3	Diyaliz	116,4±2,4	0,8±0,05	-8,8±0,3
	Çözücü buharlaştırma	132,3±11,2	0,4±0,1	-17,2±0,2
	İnce film hidrasyonu	102,0±2,5	0,4±0,02	-3,9±0,5
P4	Diyaliz	185,4±8,5	0,4±0,1	-15,4±0,7
	Çözücü buharlaştırma	116,± 21,2	0,2±0,1	-13,2±0,5
	İnce film hidrasyonu	160,4±11,5	0,5±0,1	-1,0± 0,4
P5	Diyaliz	119,2±7,5	0,7±0,1	-11,6±0,7
	Çözücü buharlaştırma	116,8±6,9	0,5±0,04	-14,3± 0,4
	İnce film hidrasyonu	87,3±2,6	0,5±0,01	-3,1± 0,5
P6	Diyaliz	206,3±28,6	0,4±0,2	-11,2±0,8
	Çözücü buharlaştırma	68,4±4,7	0,4±0,01	-9,8± 1,0
	İnce film hidrasyonu	112,9±4,1	0,4±0,04	-9,7 ±0,2
P7	Diyaliz	91,2±14,0	0,4 ± 0,1	-13,8 ± 0,5
	Çözücü buharlaştırma	79,8 ± 3,0	0,5 ± 0,02	-9,9 ± 0,2
	İnce film hidrasyonu	39,7±0,5	0,3±0,0	-9,9±0,9

4.4.2. Etkin Madde İçermeyen Misellerin Hazırlanışı

Dokso rubisin enkapsüle edilmesine karar verilen polimerler ile (P7, P7-30, P7-60, P7-70 kodlu polimerler) öncelikle etkin madde içermeyen miseller hazırlanmıştır. PEtOx-b-PCL polimeri ile yapılan ön çalışmalar ince film hidrasyonu yöntemi ile diğer yöntemlere nazaran daha küçük miseller elde edilebildiğini göstermiştir. Bu nedenle etkin madde içermeyen miselleri hazırlamak için bu yöntem Bölüm 3.7.2.'de anlatıldığı şekilde uygulanmıştır. Yöntem PEtOx-b-PCL ve PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerleri için başarı ile uygulanmıştır. Elde edilen misel dispersiyonları görsel olarak PEtOx-b-PCL (P7) polimeri için renksiz ve PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerleri (P7-30, P7-60, P7-70) için hafif yeşil tonda saydam özellik göstermişlerdir.

4.4.3. Dokso rubisin Enkapsüle Edilmiş Misellerin Hazırlanışı

Dokso rubisinin misellere enkapsülasyonu için Bölüm 3.7.3.'te belirtilen ince film hidrasyonu ve yağ/su emülsiyonu yöntemleri farklı polimer:etkin madde oranları (ağırlıkça) için sorunsuzca uygulanmıştır. Elde edilen miseller dokso rubisinin karakteristik kırmızı rengini taşıyan saydam dispersiyonlar olup, yüklenen etkin madde miktarı arttıkça misel dispersiyonunun renginin yoğunlaşması enkapsüle edilen etkin madde miktarını görsel olarak da takip etme imkânı sunmuştur. Misellere hapsedilmeyen dokso rubisinin ultrafiltrasyon ile uzaklaştırılabilmiş ve görsel olarak da süzütünün kırmızı renginden serbest etkin maddenin uzaklaştığı takip edilebilmiştir.

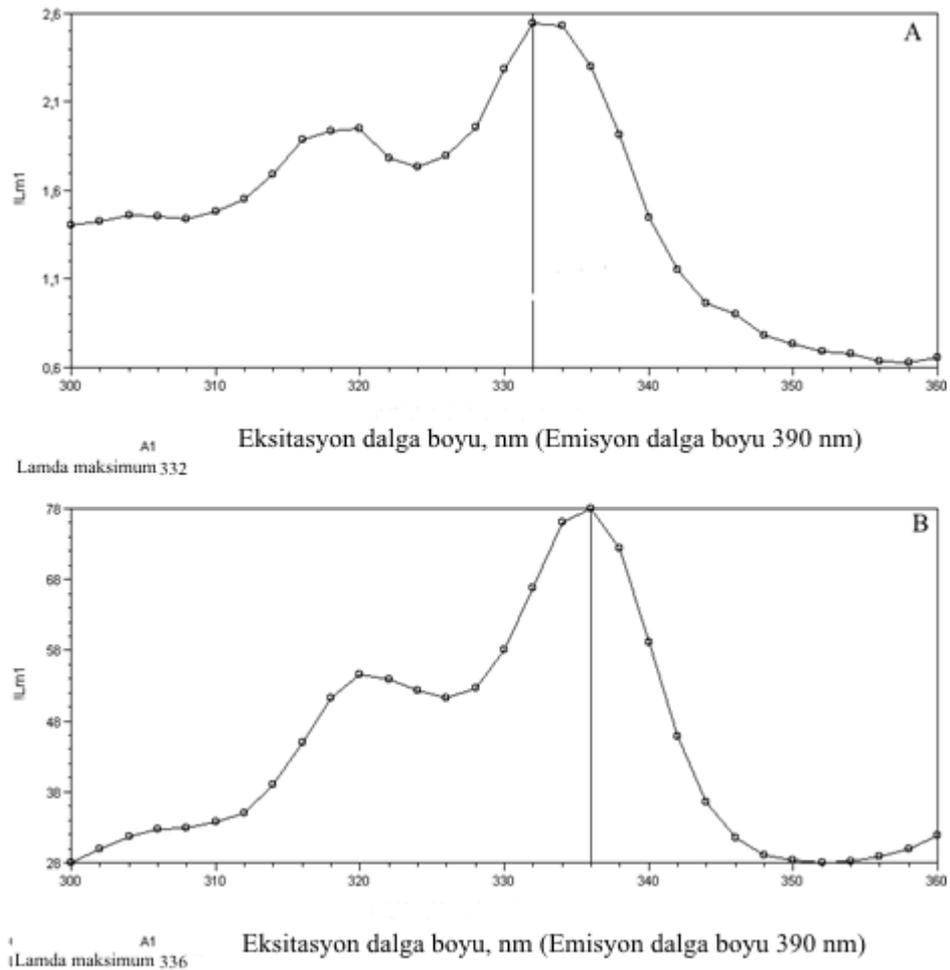
4.4.4. Peptit-18 ile Modifiye Edilmiş Misellerin Hazırlanışı

Peptit-18 konjuge edilmiş polimerin %20 oranında formülasyona katılması ile hazırlanan etkin madde içermeyen miseller, metanol ve diklorometan çözücü karışımı kullanılarak ince film hidrasyonu yöntemi ile başarılı bir şekilde hazırlanmıştır. Formülasyona giren peptit-18 bağlı polimer oluşan misel büyüklüğünü etkilediği için, hazırlama aşamasında 0,22 µm filtreden süzme işleminin zorlaştığı gözlenmiştir. Etkin madde hapsedilmiş hedeflendirilmiş miseller, yağ/su emülsiyonu yöntemi ile sorunsuz bir şekilde hazırlanmıştır.

4.5. Misel Formülasyonlarının Karakterizasyonu

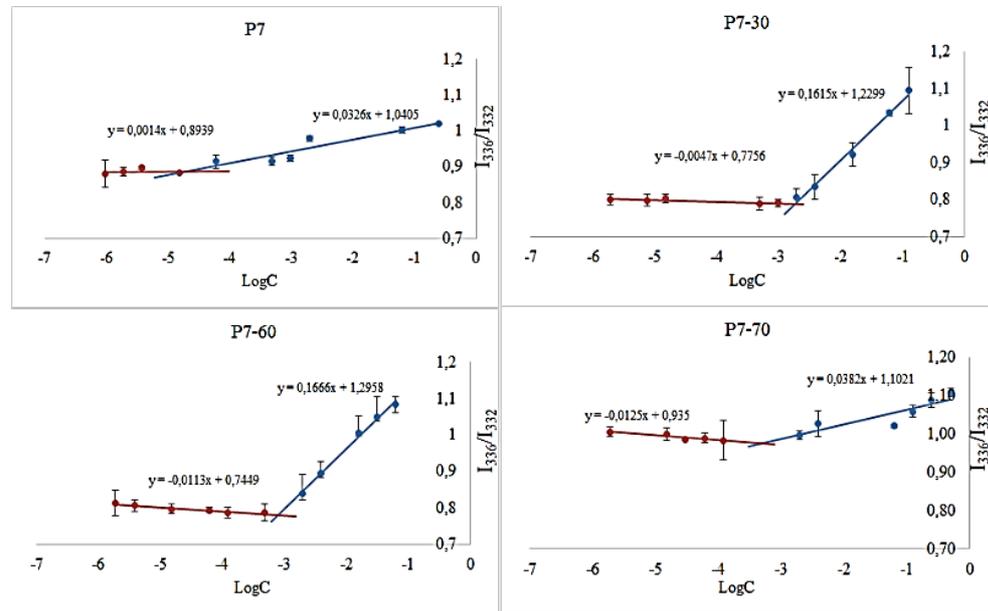
4.5.1. Kritik Misel Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Doksorubisinin enkapsülasyonu için kullanılacak blok kopolimerlerin CMC değerleri Bölüm 3.8.1.'de anlatılan piren yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Öncelikle pirenin sudaki ve misel dispersiyonundaki eksitasyon spektrumu alınarak (300-360 nm arasında) spektrumdaki karakteristik değişim gözlenmiştir. Piren misel oluşumu ile birlikte apolar misel çekirdeğine girmeye başladığında eksitasyon spektrumunda karakteristik olarak bir bant kayması gerçekleşmektedir. Şekil 4.10.'da verilen spektrumlar incelendiğinde piren sudayken 332 nm'de olan maksimum intensite piki, piren misel içindeyken 336 nm'ye kaymıştır ve aynı zamanda pirenin floresan intensitesi artmıştır.



Şekil 4.10. Pirenin eksitasyon spektrumu, A:suda, B: misel dispersiyonu içinde.

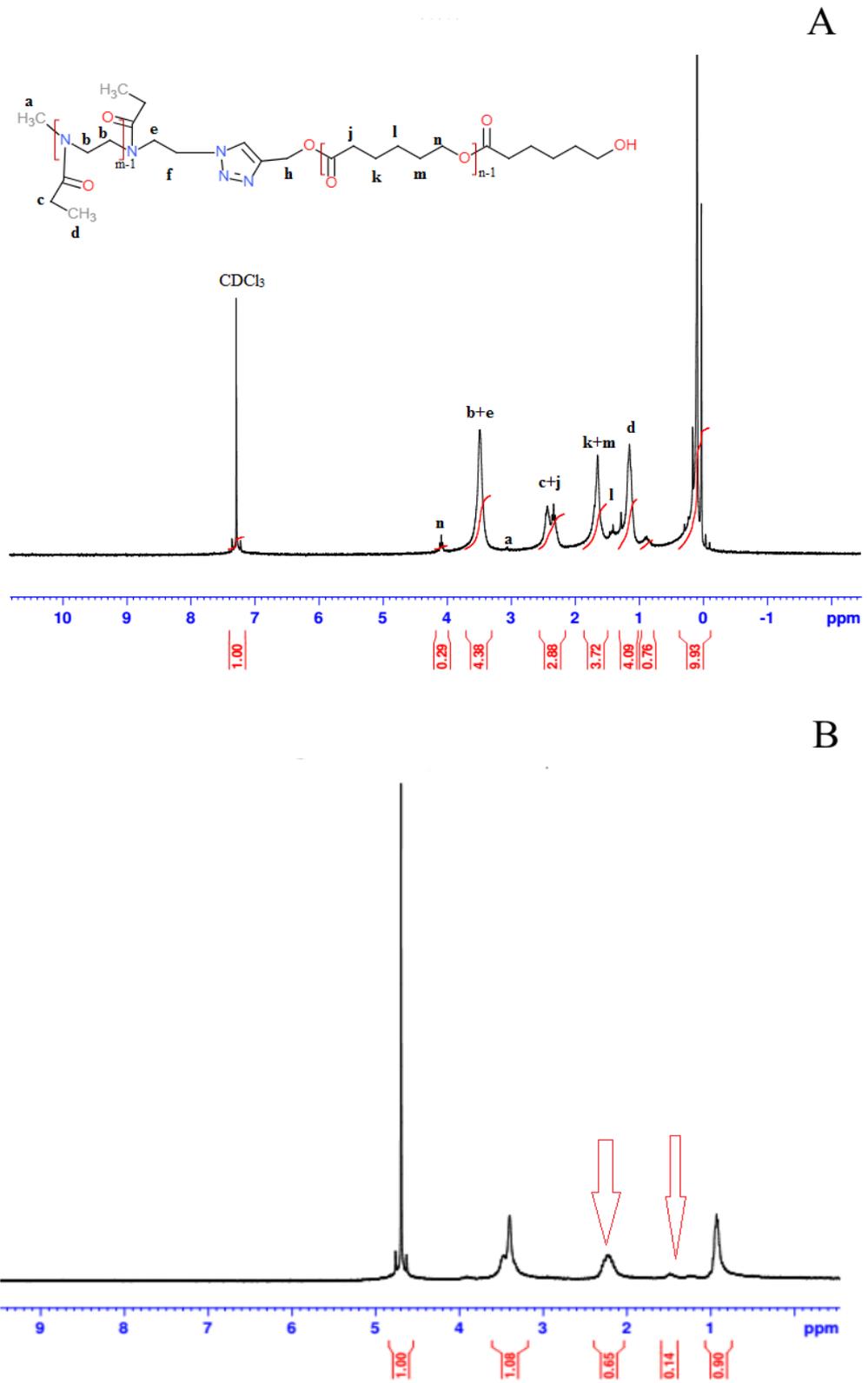
Sabit bir miktarda piren içeren tüplere farklı kopolimer konsantrasyonlarındaki misel dispersiyonlarının eklenmesi ve sonrasında floresan spektrofotometre ile her örneğin pirenden kaynaklı floresan intensitesinin ölçülmesi ile polimerlerin CMC değeri belirlenmiştir. CMC grafiğini çizmek için pirenin suda ve misel dispersiyonunda maksimum intensite gösterdiği dalga boyları olan 332 ve 336 nm'deki (emisyon dalga boyu 390 nm) piren floresan intensiteleri ($I_{336/332}$) oranlanmıştır. $I_{336/332}$ değerine karşı kopolimer konsantrasyonunun (mg/mL, C) logaritması kullanılarak grafik çizilmiş ve grafikteki iki doğrunun kesişim noktasındaki konsantrasyonun hesaplanması ile CMC değeri belirlenmiştir. $I_{336/332}$ oranı belirli konsantrasyonlarda (piren su ortamındayken) sabitken, belli bir konsantrasyondan (CMC) sonra yükselmeye başlar. Bu yükseliş misel oluşumunun başladığını ve pirenin su ortamından daha hidrofobik bir ortam olan misel çekirdeğine geçerek artık apolar bir ortamda bulunduğunu göstermektedir. Şekil 4.11.'de P7, P7-30, P7-60 ve P7-70 polimerlerinin $I_{336/332}$ oranına karşı logC grafiği verilmiştir. Bu grafiklerden CMC P7 için 2×10^{-5} , P7-30 için $1,6 \times 10^{-3}$, P7-60 için $0,8 \times 10^{-3}$ ve P7-70 $0,5 \times 10^{-3}$ mg/mL olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.11. P7, P7-30, P7-60, P7-70 kodlu polimerlerin oluşturduğu misellerin konsantrasyona karşı $I_{336/332}$ grafiği ($X \pm SS$, $n=3$).

4.5.2. Misel Oluşumunun $^1\text{H-NMR}$ ile Doğrulanması

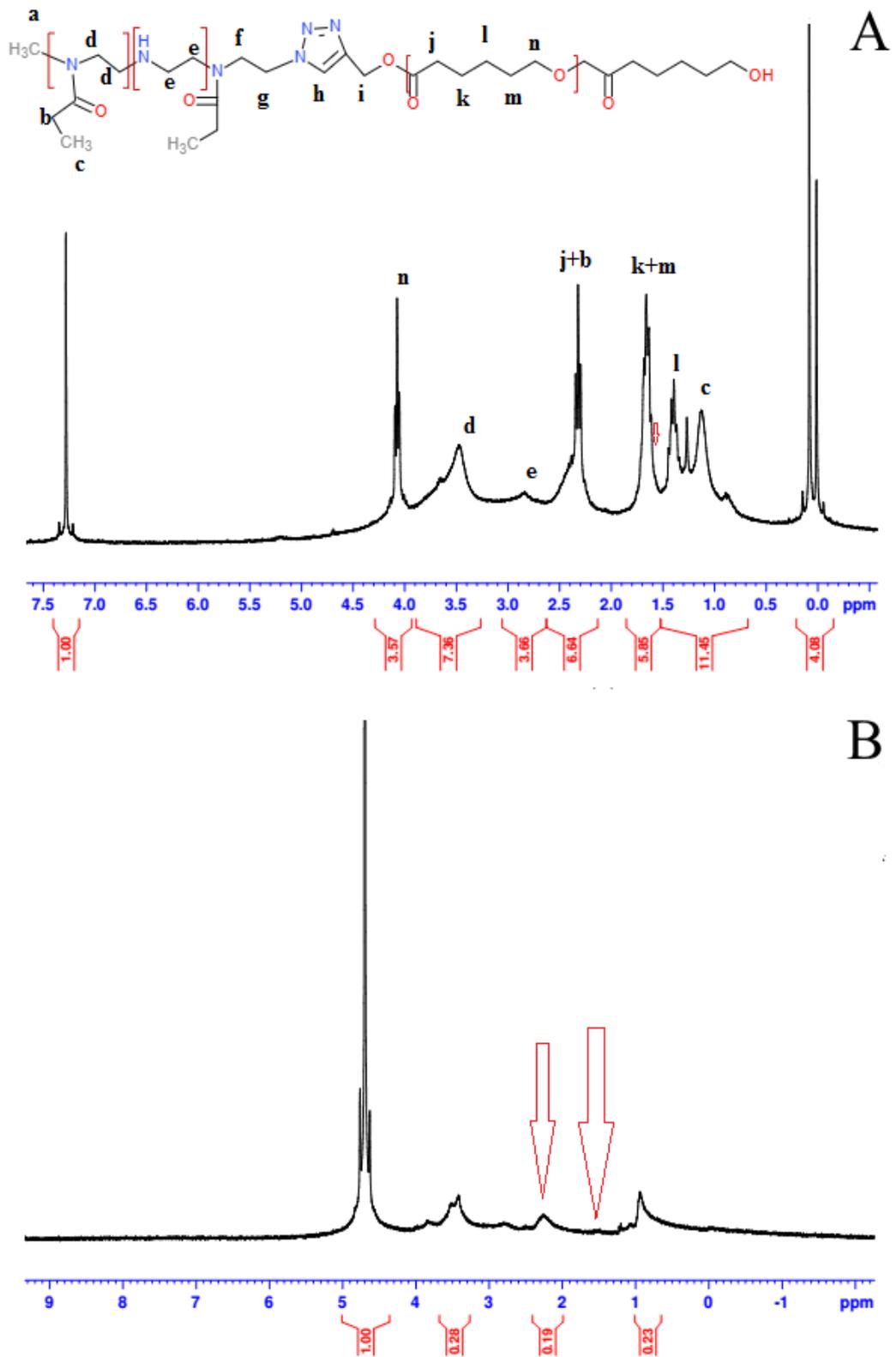
Misel oluşumu sırasında kopolimerin hidrofobik bloklarının bir araya gelip misel çekirdeğini oluşturması $^1\text{H-NMR}$ ile misel oluşumunun doğrulanmasına olanak sağlamaktadır. Miselleri oluşturan blok kopolimerler CDCl_3 içindeyken $^1\text{H-NMR}$ spektrumları alındığında hidrofobik ve hidrofilik blokların her ikisine de ait grupların pikleri görülebilirken, kopolimerler D_2O içindeyken $^1\text{H-NMR}$ spektrumları alındığında misel oluşumu sonucu hidrofobik blokların piklerinin kaybolması beklenmektedir. Doksorubisinin enkapsülasyonu için kullanılacak blok kopolimerlerin CDCl_3 ve D_2O çözücüleri içerisinde $^1\text{H-NMR}$ spektrumları alınarak misel oluşumunun doğrulanması amaçlanmıştır. P7, P7-30, P7-60 ve P7-70 polimerlerinin CDCl_3 ve D_2O çözücüleri içerisinde $^1\text{H-NMR}$ spektrumları sırasıyla Şekil 4.12., 4.13., 4.14., ve 4.15'te verilmiştir.



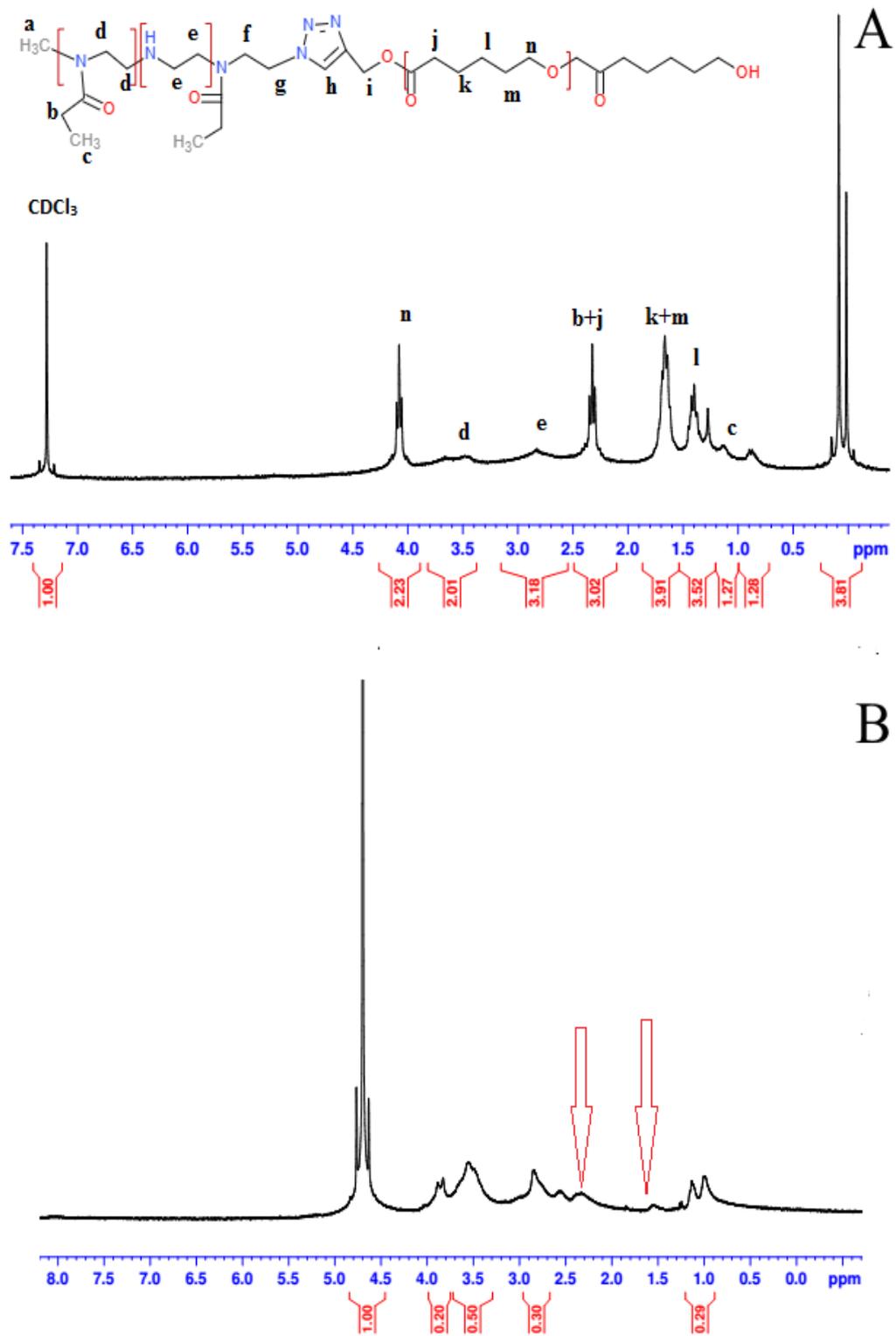
Şekil 4.12. P7 kodlu polimerin ¹H-NMR spektrumları, A: CDCl₃ ve B: D₂O içinde.

P7 kodlu polimerin $^1\text{H-NMR}$ spektrumları (Şekil 4.12.) incelendiğinde; CDCl_3 içindeki spektrum ile karşılaştırıldığında, polimerler D_2O içindeyken PCL bloğundan kaynaklı 4 ppm'deki pikin (n) ve 1-2 ppm arasındaki piklerin (k+m ve l) kaybolduğu, 2-3 ppm arasındaki pikin PCL bloğundan kaynaklı hidrojenlerin (j) kaybolması nedeniyle şiddetinin azaldığı görülmektedir.

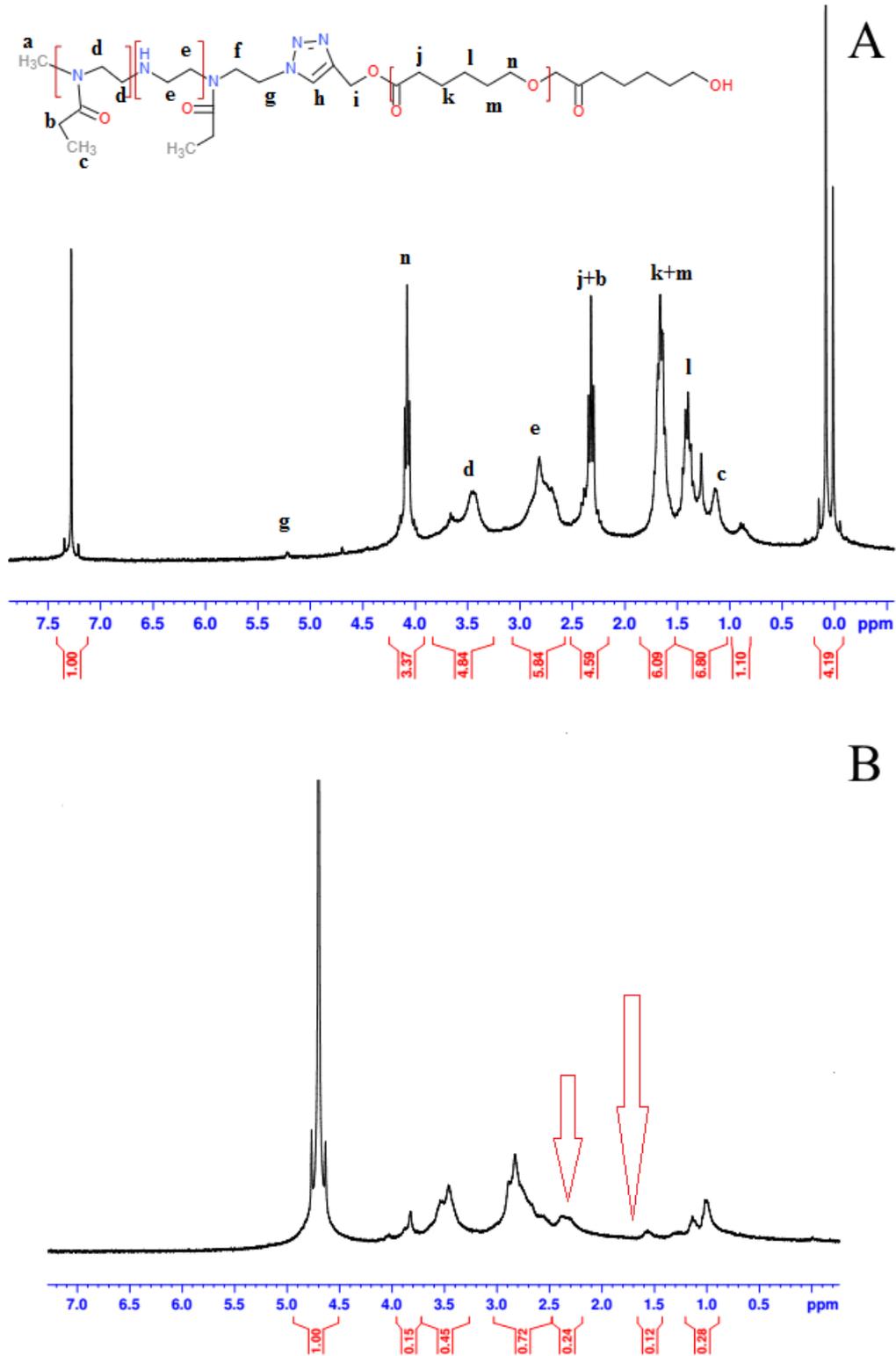
P7-30 kodlu polimerin $^1\text{H-NMR}$ spektrumları (Şekil 4.13.) incelendiğinde de D_2O içindeyken PCL bloğundan kaynaklı 4 ppm'deki pikin (n) ve 1-2 ppm arasındaki piklerin (k+m ve l) kaybolduğu, 2-2,5 ppm arasındaki pikin PCL bloğundan kaynaklı hidrojenlerin (j) kaybolması nedeniyle şiddetinin azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.13. P7-30 kodlu polimerin ¹H-NMR spektrumları, A: CDCl₃ ve B: D₂O içinde.



Şekil 4.14. P7-60 kodlu polimerin ¹H-NMR spektrumları, A: CDCl₃ ve B: D₂O içinde.



Şekil 4.15. P7-70 kodlu polimerin ¹H-NMR spektrumları, A: CDCl₃ ve B: D₂O içinde.

Şekil 4.14. ve 4.15. incelendiğinde P7-60 ve P7-70 polimerlerinin $CDCl_3$ içindeki spektrumlarında görülen PCL bloğu kaynaklı 4 ppm'deki pikin (n) ve 1-2 ppm arasındaki piklerin (k+m ve l) şiddetlerinin oldukça azaldığı, neredeyse kayboldukları görülmektedir. Ayrıca $CDCl_3$ içindeki spektrumlarında görülen 2-2,5 ppm arasındaki pikin PCL bloğundan kaynaklı hidrojenlerin (j) kaybolması nedeniyle şiddetinin azaldığı, polimerlerin D_2O içindeki spektrumlarında net bir şekilde görülmektedir. Bu sonuçlar misellerin kabuk-çekirdek yapısını doğrulamaktadır.

4.5.3. Misellerin Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

Doksorubisin enkapsülasyonu için kullanılacak polimerler ile öncelikle etkin madde içermeyen misel formülasyonları hazırlanmış ve partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümleri yapılmıştır. İnce film hidrasyonu yöntemi ile hazırlanan etkin madde içermeyen misellere ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümleri Tablo 4.5.'te verilmiştir. Sonuçlar hazırlanan misellerin 200 nm'den küçük partikül büyüklüklerine sahip olduklarını göstermektedir. Zeta potansiyel değeri PEtOx-b-PCL (P7) polimeri ile hazırlanan misel için negatifken, katyonik PEI içeren polimerler ile hazırlanan miselerde pozitifdir. Polimerdeki PEI yüzdesi arttıkça pozitif zeta potansiyel değerinin de arttığı görülmektedir.

Tablo 4.5. İnce film hidrasyonu yöntemiyle hazırlanan etkin madde içermeyen misellerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel bulguları ($X \pm SS$, n=3).

Polimer Kodu	Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
P7	39,7±0,5	0,3±0,03	-9,9±0,9
P7-30	59,5±0,4	0,2±0,01	24,2±4,1
P7-60	108,8±3,2	0,3±0,01	27,1±2,1
P7-70	139,6±0,4	0,1±0,02	48,7±2,5

Doksorubisinin misellere enkapsülasyonu için öncelikle ince film hidrasyonu yöntemi denenmiştir. Bu yöntemle hazırlanan misellerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümleri Tablo 4.6.'da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde P7 ve P7-30 kodlu polimerler ile hazırlanan misellerin 200 nm'den küçük partikül büyüklüğüne sahip oldukları görülmektedir. Ancak P7-60 ve P7-70 polimerleri ile 200 nm altına düşülemediği. Polidispersite indeksi tüm formülasyonlar (F1-F4) için 0,4'ün üstünde

elde edilmiştir. Zeta potansiyel ölçümlerinin ise etkin madde içermeyen misellere göre daha yüksek ve pozitif değerlere ulaştığı görülmektedir. İnce film hidratasyonu yönteminde miseller 0,22 µm'lik filtreden süzülmemektedir, buna rağmen partikül büyüklüklerinin ve polidispersite indeksinin yüksek olması misellerin agregasyonuna işaret etmektedir.

Tablo 4.6. İnce film hidratasyonu yöntemi ile hazırlanmış doksorubisin yüklü misellerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel bulguları ($X \pm SS$, $n=3$).

Formülasyon	Polimer	Polimer:etkin madde oranı (a/a)	Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
F1	P7	10:5	99,7±0,7	0,4±0,02	5,0±1,1
F2	P7-30	10:5	170,4±5,7	0,5±0,06	43,3±1,6
F3	P7-60	10:5	328,4±9,0	0,4±0,03	47,4±0,2
F4	P7-70	10:5	396,0±43,8	0,6±0,06	61,5±0,6

İnce film hidratasyonu yöntemi ile hazırlanan doksorubisin yüklü misellerin partikül büyüklüğü açısından istenilen sonuçları vermemesi üzerine yağ/su emülsiyonu yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde önceden hazırlanmış sudaki misel dispersiyonuna, doksorubisinin kloroformdaki çözeltisi eklenip, kloroformun karıştırma altında kademeli olarak buharlaşması sağlandığından doksorubisinin misel yapılarına hapsedilmesi yavaş yavaş gerçekleşmektedir. Bu nedenle bu yöntemle daha düşük partikül büyüklüklerine sahip misellerin elde edilmesi hedeflenmiştir. Tablo 4.7.'de yağ/su emülsiyonu yöntemiyle hazırlanan misellerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümleri verilmiştir. Üç farklı polimer:etkin madde oranı kullanılarak hazırlanan misellerin partikül büyüklüğü üzerine bu oranların etkisi incelenmiştir. P7 polimeri ile hazırlanan misel formülasyonlarının partikül büyüklüğü bulguları incelendiğinde oldukça yüksek misel büyüklüklerine sahip oldukları görülmektedir. Her ne kadar en düşük etkin madde miktarının kullanıldığı F7 formülasyonu ile yaklaşık 156 nm büyüklüğe sahip miseller elde edilse de, polidispersite indeksinin 1 olması partikül büyüklüğü dağılımının oldukça geniş olduğunu göstermektedir. P7-30 polimeri ile hazırlanan misellerin partikül büyüklükleri 100 nm'nin altında olup, F7 ve F8 formülasyonları için PDI değerleri 0,4 ve altında elde edilmiştir. P7-60 polimeri ile en düşük misel büyüklüğü 10:2,5 (a/a) polimer:etkin madde oranında elde

edilmiştir ve 0,3-0,2 arasındaki PDI değerleri dar partikül büyüklüğü dağılımı elde edildiğini göstermektedir. P7-70 polimeri ile hazırlanan üç formülasyon ile de 100 nm'nin altında miseller elde edilmiştir. Zeta potansiyel değerleri polimerlerdeki PEI oranları uyumlu olarak tüm formülasyonlar için farklı derecelerde pozitif olarak elde edilmiştir.

Tablo 4.7. Yağ/su emülsiyonu yöntemi ile hazırlanmış doksorubisin yüklü misellerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel bulguları ($X \pm SS$, n=3).

Formülasyon	Polimer	Polimer: Doksorubisin oranı (a/a)	Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
F5	P7	10:5	1056,7±37,5	0,4±0,19	8,2±0,2
F6	P7	10:2,5	1329,3±279,4	0,2±0,22	7,4±0,1
F7	P7	10:1,25	156,8±3,3	1,0±0,05	8,5±0,4
F8	P7-30	10:5	91,3±2,4	0,4±0,04	21,4±0,7
F9	P7-30	10:2,5	66,4±6,2	0,3±0,05	16,7±0,4
F10	P7-30	10:1,25	80,1±2,7	0,6±0,01	20,3±0,9
F11	P7-60	10:5	223,0±5,0	0,3±0,01	18,4±1,0
F12	P7-60	10:2,5	105,7±1,7	0,2±0,01	24,9±1,6
F13	P7-60	10:1,25	120,1±0,9	0,2±0,01	29,0±1,2
F14	P7-70	10:5	79,6±0,9	0,4±0,01	28,6±1,3
F15	P7-70	10:2,5	71,8±1,3	0,3±0,02	37,4±1,9
F16	P7-70	10:1,25	96,3±1,5	0,3±0,04	32,1±0,6

Peptit-18 ile hedeflendirilmiş miselleri hazırlamak için partikül büyüklüğü ve etkin madde yükleme kapasitesi açısından en uygun polimer olarak belirlenen ve en düşük miktarda PEI içeren polimer olduğu için en düşük sitotoksositeye sahip olabilecek P7-30 polimeri kullanılmıştır. P7-30 polimerine peptit-18'in konjugasyonu ile elde edilen polimerin ağırlıkça %20 oranında P7-30 polimeri ile karıştırılması ile elde edilen polimer karışımı ile hazırlanan hedeflendirilmiş misellerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümleri Tablo 4.8.'da verilmiştir. P7-30 polimeri kullanılarak ince film hidratasyonu ile elde edilen etkin madde içermeyen misel formülasyonunun büyüklüğü 59,5 nm civarındayken (Bkz. Tablo 4.5.), peptit-18 bağlanmış P7-30 polimerinin formülasyona eklenmesi ile partikül büyüklüğü yaklaşık

171 nm civarında elde edilmiştir. Yağ/su emülsiyonu yöntemi ile elde edilen doksorubisin hapsedilmiş hedeflendirilmiş miseller ise 148 nm misel büyüklüğüne sahipken, PDI değeri de peptit ile modifiye edilmemiş F9 formülasyonuna göre daha yüksek bulunmuştur.

Tablo 4.8. Peptit-18 ile hedeflendirilmiş misellerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel bulguları ($X \pm SS$, $n=3$).

Formülasyon	Polimer	Polimer: Doksorubisin oranı (a/a)	Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
Etkin madde içermeyen misel	Peptit-18 bağlanmış P7-30 (%20, a/a) ve P7-30 (%80,a/a)	-	170,9±10,7	0,4±0,08	15,6±1,4
Doksorubisin yüklü misel (F17)		10:2,5	148,2±5,1	0,5±0,01	32,1±2,2

4.5.4. Doksorubisinin Misellere Yükleme Etkinliği

İnce film hidratasyonu yöntemi ile hazırlanan doksorubisin yüklü misellere ait enkapsülasyon etkinliği ve etkin madde yükleme kapasitesine ilişkin bulgular Tablo 4.9.'da verilmiştir. Bulgular incelendiğinde en küçük partikül büyüklüğünün elde edildiği P7 polimeri ile hazırlanan formülasyonda (Bkz. Tablo 4.6.), diğer formülasyonlara kıyasla etkin madde yükleme kapasitesi (% 5) daha düşük bulunmuştur. P7-30 polimeri kullanılarak hazırlanan formülasyon ile yüksek bir etkin madde yükleme etkinliğine ulaşılmıştır. Ancak P7-60 ve P7-70 polimerleri ile hazırlanan misellerin etkin madde yükleme etkinlikleri yaklaşık %6,5-7,5 arasında bulunmuştur. Partikül büyüklüğü sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde hedeflenen büyüklük olan 200 nm altına P7-60 ve P7-70 polimerleri ile düşülemediği için ve elde edilen etkin madde yükleme etkinlikleri de P7-30'a göre düşük olduğu için yağ/su emülsiyonu yönteminin denenmesine karar verilmiştir. Yağ-su emülsiyonu yönteminin Kataoka ve arkadaşları (144) tarafından doksorubisin enkapsülasyonu için (etkin madde yükleme kapasitesi ve partikül büyüklüğü açısından) başarılı bir şekilde uygulandığı bildirildiği için kullanılan dört polimer için de bu yöntem denenmiştir.

Tablo 4.9. İnce film hidrasyonu yöntemi ile hazırlanmış doksorubisin yüklü misellerin enkapsülasyon etkinliği ve etkin madde yükleme kapasitesi bulguları ($X \pm SS$, $n=3$).

Formülasyon	Polimer Kodu	Enkapsülasyon Etkinliği, %	Etkin Madde Yükleme Kapasitesi, %
F1	P7	15,1 \pm 1,5	5,0 \pm 0,5
F2	P7-30	58,3 \pm 2,0	19,4 \pm 0,7
F3	P7-60	22,9 \pm 0,9	7,6 \pm 0,3
F4	P7-70	19,2 \pm 0,4	6,4 \pm 0,1

Tablo 4.10.'da yağ/su emülsiyonu yöntemi kullanılarak hazırlanan misel formülasyonlarına ait bulgular verilmiştir. F5-F16 formülasyonları incelendiğinde etkin madde yükleme kapasitesinin başlangıçta kullanılan etkin madde miktarı arttıkça arttığı görülmektedir. Genel olarak polimerik miselerde etkin madde yükleme kapasitesi düşüktür (248). Ancak yağ/su emülsiyonu yöntemi ile % 48'e varan etkin madde yükleme etkinliği elde edilmiştir. En yüksek etkin madde yükleme kapasitesi F11 formülasyonunda elde edilmiştir, ancak bu formülasyonun enkapsülasyon etkinliği sonucu F8 ve F14 formülasyonlarına göre daha düşüktür bu da misel formülasyonunda daha az polimer olduğunu göstermektedir. F11 formülasyonunda ağırlıkça daha az polimer bulunmasına rağmen daha fazla etkin madde hapsedilebilmiştir. Partikül büyüklüğü sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde (Bkz. Tablo 4.7.) F5-F6 formülasyonlarında 1000 nm'nin üzerinde büyüklüklere sahip miseller elde edilmişken F7 ile 150 nm civarı (PDI:1) miseller elde edilmiştir. İlaç yükleme kapasiteleri, yüksek partikül büyüklüğüne sahip F5-F6 polimerleri için misel büyüklükleri ile orantılı olarak yüksek bulunmuştur. P7-30, P7-60 ve P7-70 polimerleri ile hazırlanan formülasyonlar için partikül büyüklükleri genel olarak 100 nm altında elde edilmiştir (Bkz. Tablo 4.7.). Bu bulgular incelendiğinde farklı oranlarda doksorubisin enkapsülasyonunun partikül büyüklüğüne büyük bir etkisinin olmadığı görülmektedir. En küçük partikül büyüklüğünün elde edildiği F9 formülasyonunun etkin madde yükleme kapasitesinin de oldukça yüksek (%18,3) bulunması ile, peptit-18 ile modifiye edilmiş misellerin hazırlanması için bu formülasyonun kullanılmasına karar verilmiştir.

Tablo 4.10. Yağ/su emülsiyonu yöntemi ile hazırlanmış doksorubisin yüklü misellerin enkapsülasyon etkinliği ve etkin madde yükleme kapasitesi bulguları ($X \pm SS$, $n=3$).

Formülasyon	Polimer	Polimer: Doksorubisin oranı (mg/mg)	Enkapsülasyon Etkinliği, %	Etkin Madde Yükleme Kapasitesi, %
F5	P7	10:5	50,3±0,8	19,0±0,3
F6	P7	10:2,5	39,6±0,7	10,1±0,2
F7	P7	10:1,25	14,3±0,2	2,5±0,04
F8	P7-30	10:5	81,3±7,1	32,6±3,9
F9	P7-30	10:2,5	70,5±16,5	18,3±4,2
F10	P7-30	10:1,25	62,2±11,8	8,7±1,9
F11	P7-60	10:5	68,6±3,2	48,3±2,3
F12	P7-60	10:2,5	62,9±2,1	35,3±1,2
F13	P7-60	10:1,25	60,5±7,3	10,7±1,3
F14	P7-70	10:5	77,8±2,2	34,8±1,0
F15	P7-70	10:2,5	68,7±7,4	17,8±1,9
F16	P7-70	10:1,25	11,7±0,5	1,9±0,1

Peptit-18 ile hedeflenfirilmiş miseller yağ/su emülsiyonu yöntemi ile hazırlanmıştır. Elde edilen enkapsülasyon etkinliği ve etkin madde yükleme kapasitesi değerleri formülasyonu hazırlamak için örnek alınan F9 formülasyonuna yakın çıkmıştır.

Tablo 4.11. Peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü misellerin enkapsülasyon etkinliği ve etkin madde yükleme kapasitesi bulguları ($X \pm SS$, $n=3$).

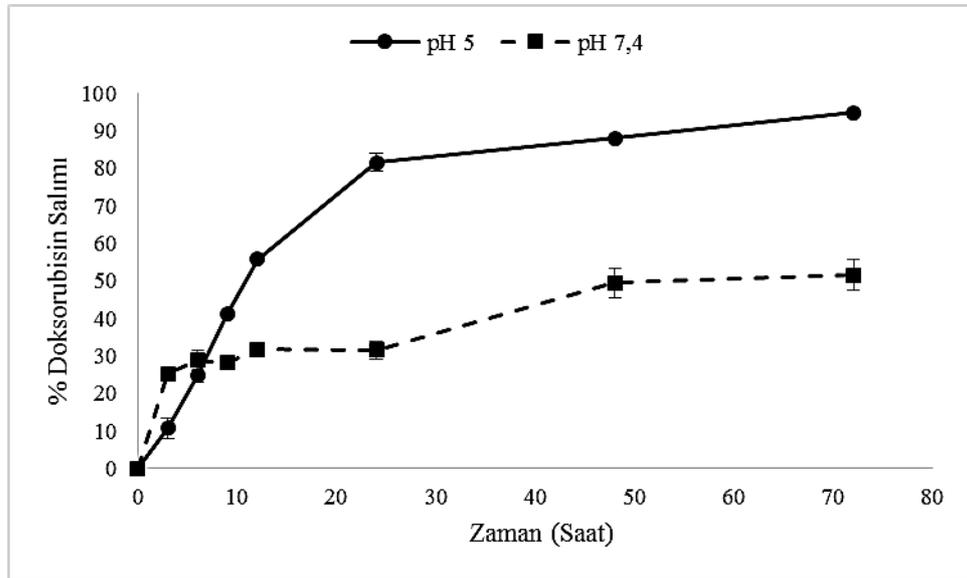
Formülasyon	Polimer	Enkapsülasyon Etkinliği, %	Etkin Madde Yükleme Kapasitesi, %
F17	Peptit-18 bağlanmış P7-30 (%20, a/a) ve P7-30 (%80,a/a)	65,5±11,2	18,7±2,2

4.5.5. Doksorubisinin Misellerden İn Vitro Salımı

Doksorubisinin enkapsüle edildiği misel formülasyonlarının in vitro salım profilleri pH 5 ve pH 7,4 tampon çözeltilerinde incelenmiştir. Salım üzerindeki pH

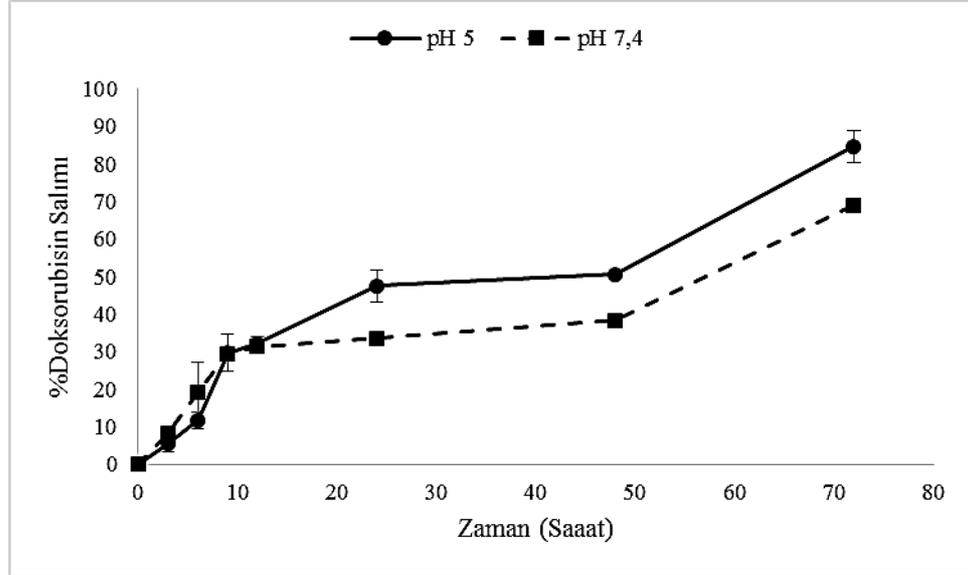
etkisini net bir şekilde ortaya koymak için 72 saatlik bir süre zarfında toplam doksorubisin salımı analiz edilmiştir. Salım deneyleri için farklı polimerlerle hazırlanan ve partikül büyüklüğü, etkin madde yükleme kapasiteleri açısından en uygun (en küçük partikül büyüklüğüne sahip ve yeterli miktarda etkin madde yüklenmiş) formülasyonlar olarak belirlenen F7, F9, F12 ve F15 formülasyonları seçilmiştir.

F7, F9, F12 ve F15 formülasyonlarının salım profilleri sırası ile Şekil 4.16., 4.17., 4.18. ve 4.19.'da verilmiştir. F7 formülasyonu polimer yapısında en fazla PEtOx barındıran polimer olan P7 polimeri ile hazırlanmıştır. PEtOx polimerinin pH'ya duyarlı bir polimer olduğu daha önce bildirilmiştir (215). F7 formülasyonunun salım profilleri incelendiğinde pH'ya duyarlı salımı doğrular nitelikte doksorubisin salımının pH 5 tamponunda pH 7,4 tamponuna göre daha yüksek olduğu görülmektedir. F7 formülasyonu için ilk 24 saat içerisinde pH 5 tamponunda doksorubisinin salımının yaklaşık %80'e ulaştığı görülmektedir, pH 7,4 tamponunda ise 72 saat sonunda dahi salım ancak %51 civarındadır.



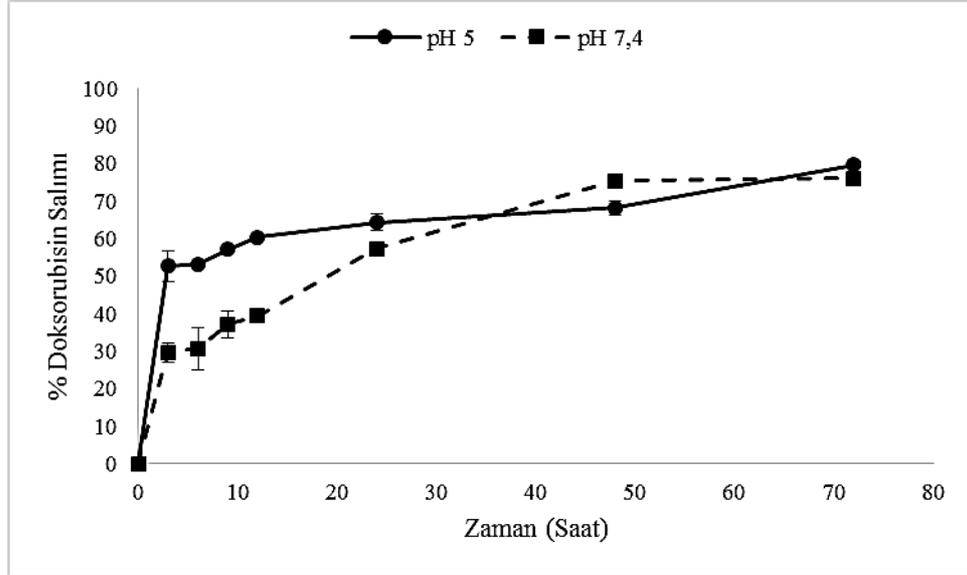
Şekil 4.16. pH 5 ve pH 7,4 tampon çözeltilerinde F7 formülasyonundan doksorubisinin salım profili ($X \pm SH$, $n=3$).

F9 formülasyonunun salım profili incelendiğinde (Şekil 4.17.) pH 5 ve pH 7,4 tampon çözeltilerindeki doksorubisin salımı arasında belirgin bir fark olduğu görülmektedir. pH 7,4 tampon çözeltisinde doksorubisin salımı 72 saat sonunda %68,9 iken pH 5'te bu oran %84,7'ye çıkmıştır.

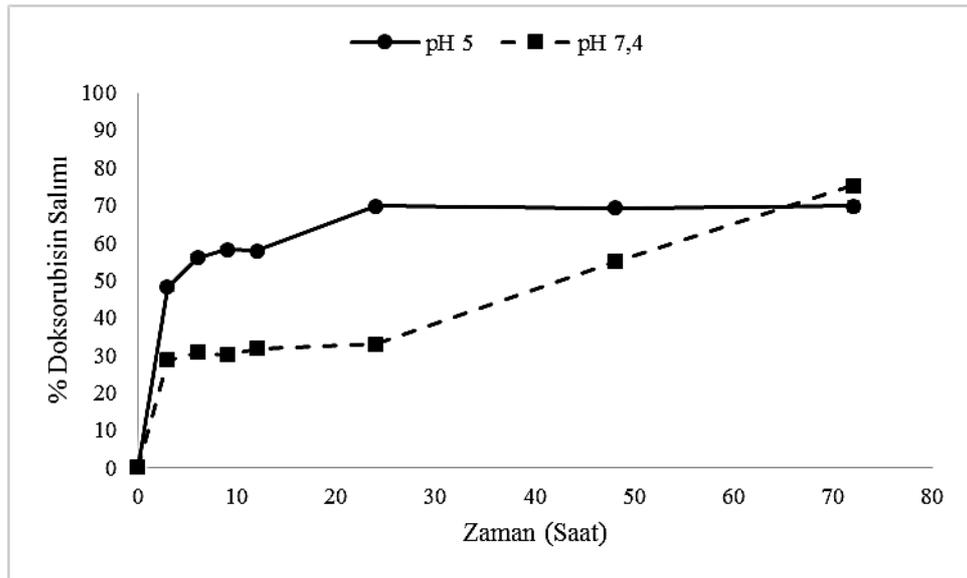


Şekil 4.17. pH 5 ve pH 7,4 tampon çözeltilerinde F9 formülasyonundan doksorubisin salım profili ($X \pm SH$, $n=3$).

F12 formülasyonunun salım profili (Şekil 4.18.) incelendiğinde pH 5 tampon çözeltisinde ilk 24 saat içinde doksorubisin salımının %64,3'e ulaştığı görülmektedir. İlk üç saat içinde pH 5 ortamında hızlı salım görülürken (%52,6), daha sonra salımda kademeli bir artış gerçekleşmiştir. pH 7,4 ortamında ise daha yavaş bir salım görülmektedir ancak 24 saat sonunda % doksorubisin salımı 57,2'ye ulaşmıştır. 48 saat sonunda doksorubisin salımı pH 5 ortamında %68,2, pH 7,4 ortamında ise %75,3 bulunmuştur. 72 saatlik salım sonuçları ise pH 5 için % 79 ve pH 7,4'de %76 bulunmuştur. Sonuçlar salımdaki pH'ya bağımlı farkı ilk 24 saatlik zaman dilimi içindeki noktalarda net bir şekilde ortaya koymaktadır. Ancak devam eden süre zarfında bu belirgin fark ortadan kaybolmuş ve her iki ortamdaki doksorubisin salımı birbirine yaklaşmıştır. F15 formülasyonunun salım profili (Şekil 4.19.) de benzer bir şekilde ilk 48 saat içinde pH'ya bağımlı salımı net bir şekilde göstermektedir. 48 saat sonunda doksorubisin salımı pH 5 ortamında %69,2, pH 7,4 ortamında ise %55 bulunmuştur. 72 saatlik salım sonuçları ise pH 5 için %69,8 ve pH 7,4'de %75,2 şeklindedir.

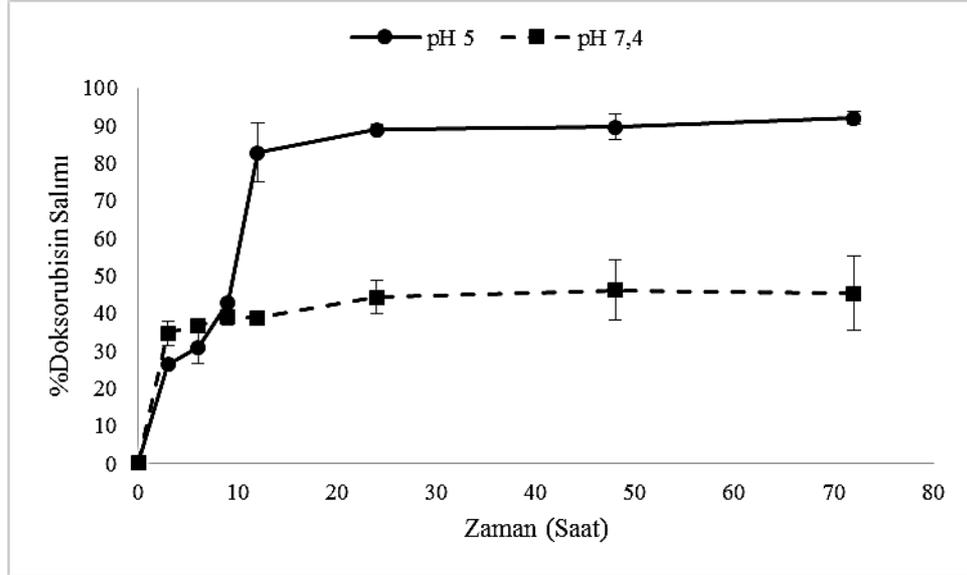


Şekil 4.18. pH 5 ve pH 7,4 tampon çözeltilerinde F12 formülasyonundan doksorubisinin salım profili ($X \pm SH$, $n=3$).



Şekil 4.19. pH 5 ve pH 7,4 tampon çözeltilerinde F15 formülasyonundan doksorubisinin salım profili ($X \pm SH$, $n=3$).

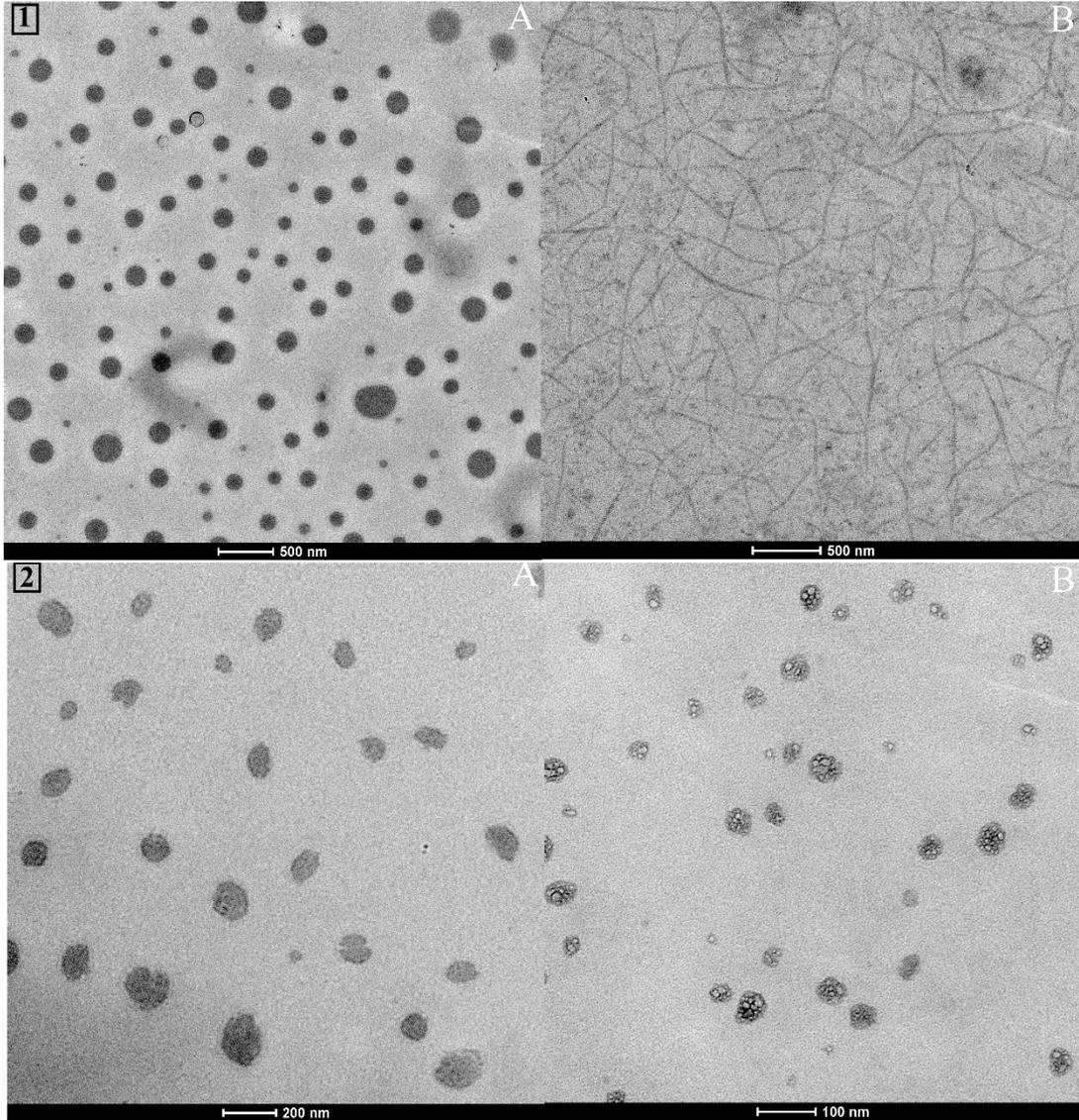
Peptit-18 ile hedeflendirilmiş misel formülasyonunun salım profili Şekil 4.20.'de verilmiştir. pH 5 ortamında doksorubisin salımı 24 saat sonunda %88,9, pH 7,4 ortamında ise %44,3 olarak bulunmuştur. 48 saat sonunda salım pH 5 ortamında %89,6, pH 7,4 ortamında %46,1 ve 72 saat sonunda ise salım pH 5 ortamında %89,6 değerine ulaşmıştır. 72 saatlik salım süresi boyunca pH 7,4 ortamında miseller kararlılığını korurken pH 5 ortamında yaklaşık iki katı fazla bir salım gözlenmiştir.



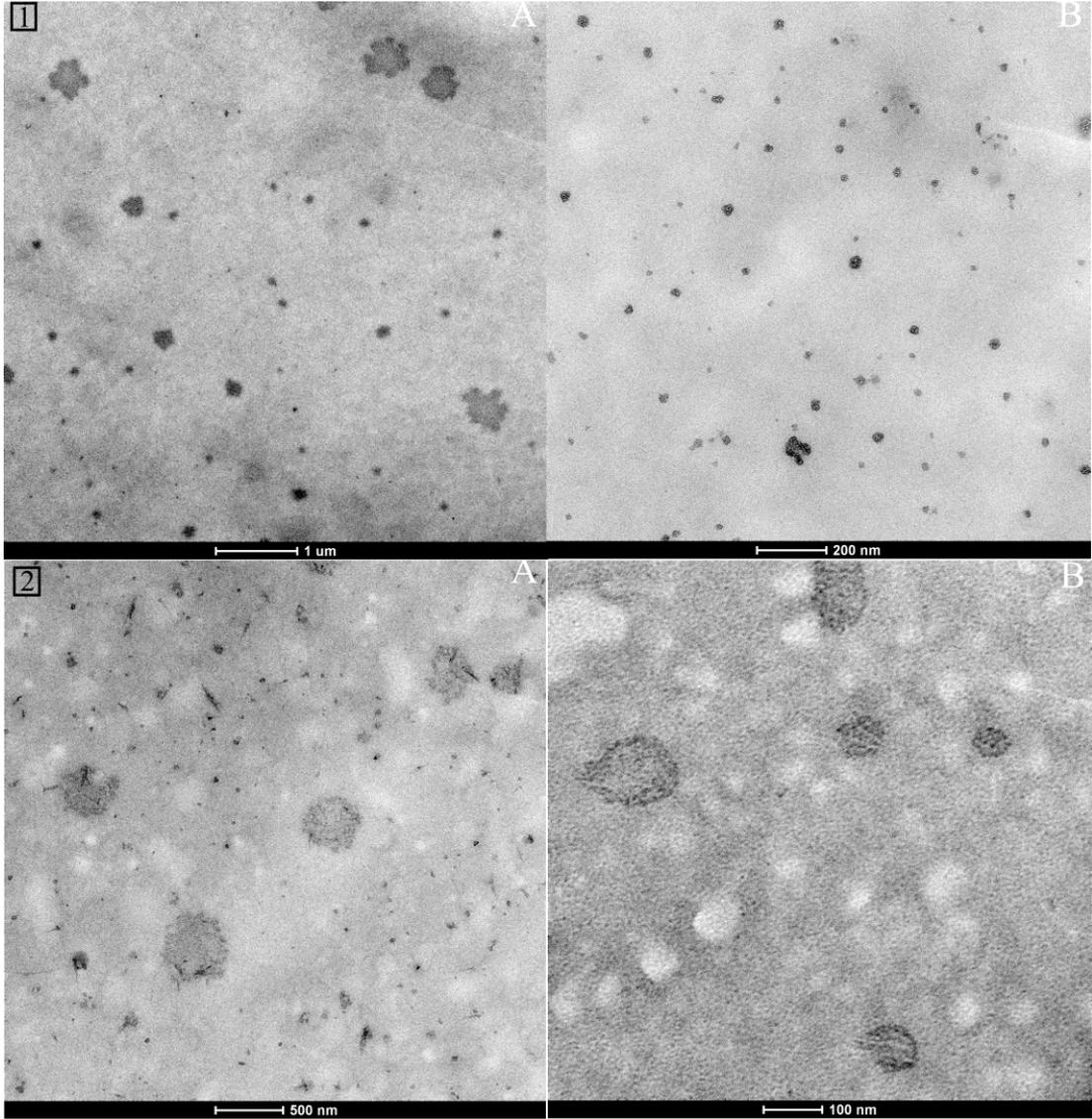
Şekil 4.20. pH 5 ve pH 7,4 tampon çözeltilerinde peptit-18 ile hedeflendirilmiş misel formülasyonundan doksorubisinin salım profili ($X \pm SH$, $n=3$).

4.5.6. Misellerin TEM ile Görüntülenmesi

Doksorubisin yüklü miselleri hazırlamak için kullanılan P7, P7-30, P7-60 ve P7-70 polimerleri ile hazırlanan etkin madde içermeyen miseller ve bu polimerlerle hazırlanan doksorubisin yüklü F7, F9, F12, F15 formülasyonların TEM görüntüleri Şekil 4.21. ve 4.22.'de verilmiştir. Hazırlanan formülasyonlar karbon gridler üzerine damlatılmış ve oda koşullarında kurutulduktan sonra görüntülenmişlerdir. Şekil 4.21. incelendiğinde P7 polimeri ile hazırlanan etkin madde içermeyen miseller küresel yapıdayken doksorubisin yüklenmesi ile hazırlanan F7 formülasyonu TEM görüntüsünde çubuk şeklinde (*worm-like*) miseller şeklinde görüntülenmiştir. F7 formülasyonu ile yapılan partikül büyüklüğü ölçümünde misel büyüklüğü için 156,8 nm PDI ise 1 olarak ölçülmüştür. Misellerin çubuk şeklinde oluştuğunu gösteren TEM görüntüleri ile bu ölçüm sonuçları anlam kazanmıştır. P7-30 polimeri ile hazırlanan etkin madde içermeyen misellerin küresel yapıda olduğu TEM görüntüsünde görülmektedir (Şekil 4.21. 2A), görüntü incelendiğinde 100 nm'nin üzerinde miseller olduğu görülse de misellerin genel olarak yaklaşık 50 nm ve altında bir büyüklüğe sahip oldukları olduğu görülmektedir. P7-30 polimeri ile hazırlanan doksorubisin yüklü miseller (F9) de küresel yapıda olup TEM görüntülerinde yaklaşık 10-50 nm aralığında büyüklüklere sahip miseller görülebilmektedir (Şekil 4.21., 2B).



Şekil 4.21. P7 ve P7-30 polimerleri ile hazırlanan misellerin TEM görüntüleri. 1A:P7 polimeri ile hazırlanan boş misel, 1B: P7 polimeri ile hazırlanan dokсорubisin yüklü misel, 2A:P7-30 polimeri ile hazırlanan boş misel, 2B: P7-30 polimeri ile hazırlanan dokсорubisin yüklü misel.

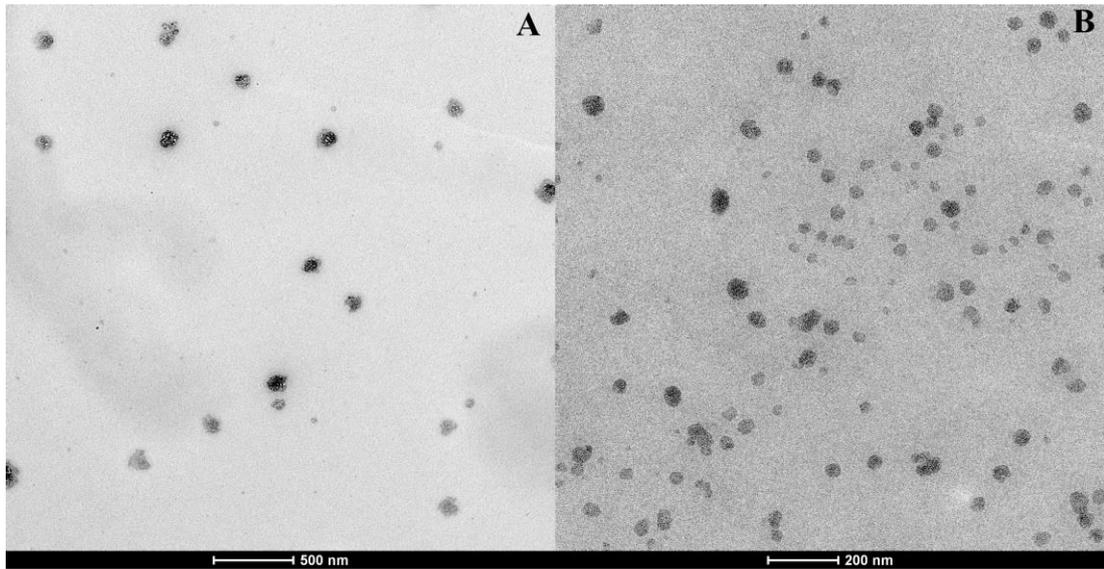


Şekil 4.22. P7-60 ve P7-70 polimerleri ile hazırlanan misellerin TEM görüntüleri. 1A:P7-60 polimeri ile hazırlanan boş misel, 1B: P7-60 polimeri ile hazırlanan doksorubisin yüklü misel, 2A:P7-70 polimeri ile hazırlanan boş misel, 2B: P7-70 polimeri ile hazırlanan doksorubisin yüklü misel.

P7-60 polimeri ile hazırlanan etkin madde içermeyen misellerin TEM görüntüsü incelendiğinde (Şekil 4.22., 1A) misel agregatlarının varlığı görülmektedir, bireysel olarak görülen misellerin küresel benzeri bir yapıda olduğu ve genel olarak yaklaşık 100 nm civarı bir büyüklüğü sahip oldukları görülmektedir. P7-60 polimeri ile hazırlanan doksorubisin yüklü misellerin TEM görüntüsü incelendiğinde (Şekil 4.22., 1B) misellerin küresel yapıda ve 50 nm'den küçük büyüklüklere sahip oldukları görülmektedir.

P7-70 polimeri ile hazırlanan etkin madde içermeyen misellerin TEM görüntüsü incelendiğinde (Şekil 4.22., 2A) yaklaşık 500 nm büyüklüğünde misel agregatlarının varlığı görülmektedir, görüntülenebilen bireysel misellerin sayısı az olmakla beraber küresel benzeri bir yapıda oldukları ve genel olarak yaklaşık 100 nm civarı bir büyüklüğü sahip oldukları görülmektedir. P7-70 polimeri ile hazırlanan doksorubisin yüklü misellerin TEM görüntüsü incelendiğinde (Şekil 4.22., 2B) misellerin küresel yapıda ve yaklaşık 100 nm civarı büyüklüklere sahip oldukları görülmektedir.

Peptit-18 ile hedeflendirilmiş etkin madde içermeyen misellerin TEM görüntüsü incelendiğinde (Şekil 4.23., A) yaklaşık 100 nm büyüklüğe sahip küresel benzeri bir morfolojiye sahip olduğu miseller görülmektedir. Peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü misellerin TEM görüntüsü incelendiğinde (Şekil 4.23., B) misellerin küresel yapıda ve yaklaşık 50 nm civarı büyüklüklere sahip oldukları görülmektedir.

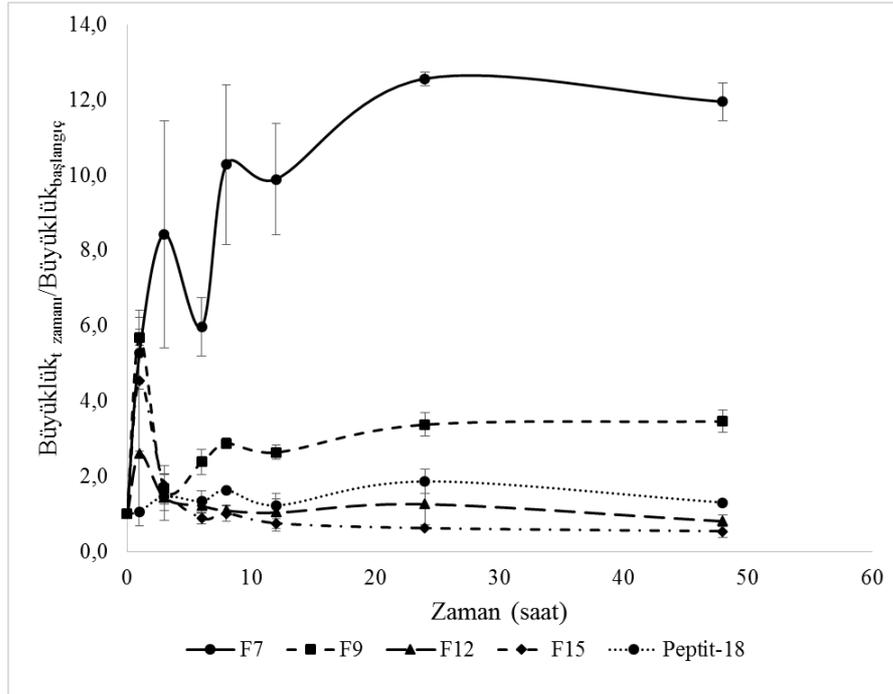


Şekil 4.23. Peptit-18 ile hedeflendirilmiş misellerin TEM görüntüleri. A: Boş misel, B: Doksorubisin yüklü misel.

4.5.7. Misel Formülasyonlarının Stabilitesi

Miseller ile serum proteinleri arasında bir etkileşim olup olmadığını anlayabilmek için hazırlanan misel formülasyonları (F7, F9, F12, F15 ve peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü misel) %10 FBS içeren PBS ortamında ve 37°C'de inkübe edilmiş ve misellerin partikül büyüklüğündeki değişim izlenmiştir

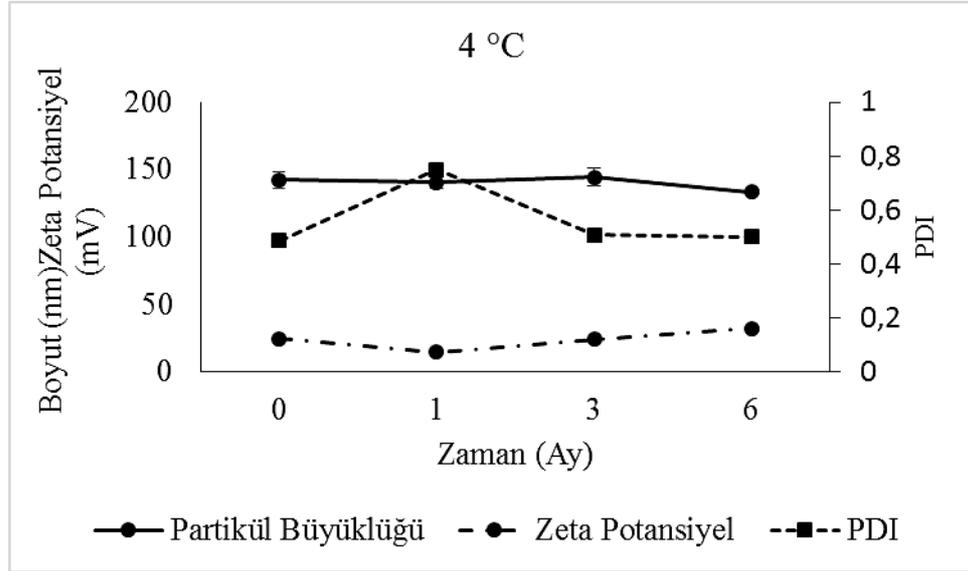
(Şekil 4.24.). Misel büyüklüğünün F7 formülasyonu için FBS ile muamele edildikten sonra zamanla kademeli olarak arttığı görülmektedir. F7 formülasyonunun çubuk yapıda miseller olması partikül büyüklüğü ölçümlerini etkilemektedir. Bu nedenle partikül büyüklüğünde artış FBS ile etkileşimi değerlendirmek için yeterli değildir. F12 ve F15 formülasyonları için partikül büyüklüğü ani bir artış göstermiş ardından belli bir değere düşüp bu değerde seyretmiştir. F9 formülasyonunda ise başlangıçtaki partikül büyüklüğü ilk 10 saat içinde kademeli olarak artmış ve ilerleyen zaman noktalarında büyük bir değişiklik görülmemiştir. Peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü misellerin büyüklüğü ilk 10 saat içinde artmış, daha sonra belirli bir düzeyde seyretmiştir. F9 ve peptit hedeflendirilmiş misellerin %10 FBS içeren PBS ortamında göreceli olarak daha kararlı oldukları görülmektedir.



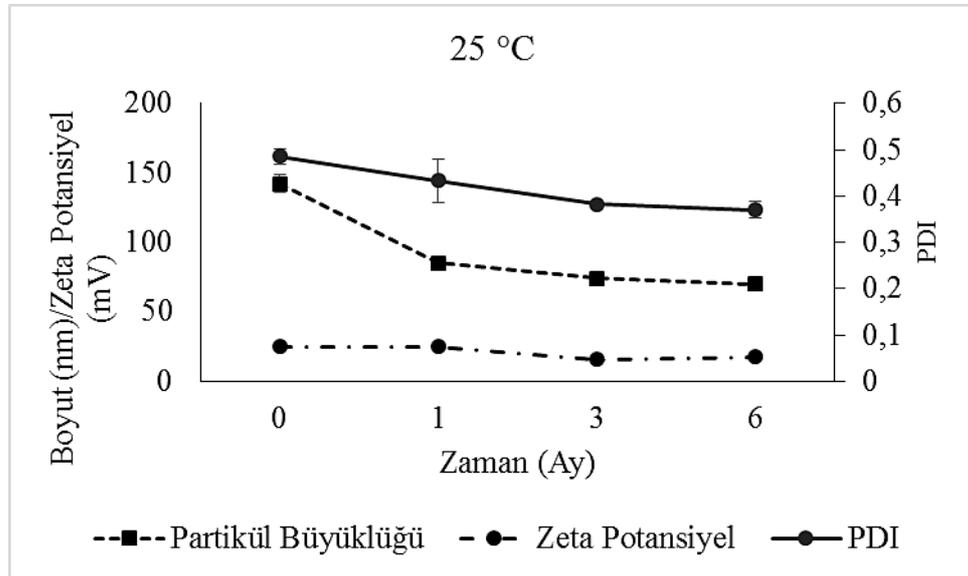
Şekil 4.24. %10 FBS içeren PBS ortamında misellerin büyüklüklerindeki değişim. Peptit-18: Peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü misel formülasyonunu ifade etmektedir. ($\bar{X} \pm SS$, $n=3$).

Peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü misellerin 4 °C’de ve oda sıcaklığındaki kolloidal stabilitesi 6 ay süresince takip edilmiştir ve bulgular Şekil 4.25. ve Şekil 4.26.’da verilmiştir. Misel dispersiyonu 25°C’de saklandığında 1 ay sonra gözle görülür agregasyonlar meydana gelmiştir. 4°C’de saklanan formülasyonda 6 ay süresince gözle görülür agregasyon tespit edilmemiştir. Doksorubisin yüklü misel

formülasyonu 4°C’de saklandığında farklı zaman noktalarında yapılan partikül büyüklüğü ölçümleri karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 4.25. Peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü miselin 4 °C’deki kolloidal stabilitesi ($X\pm SS$, $n=3$).



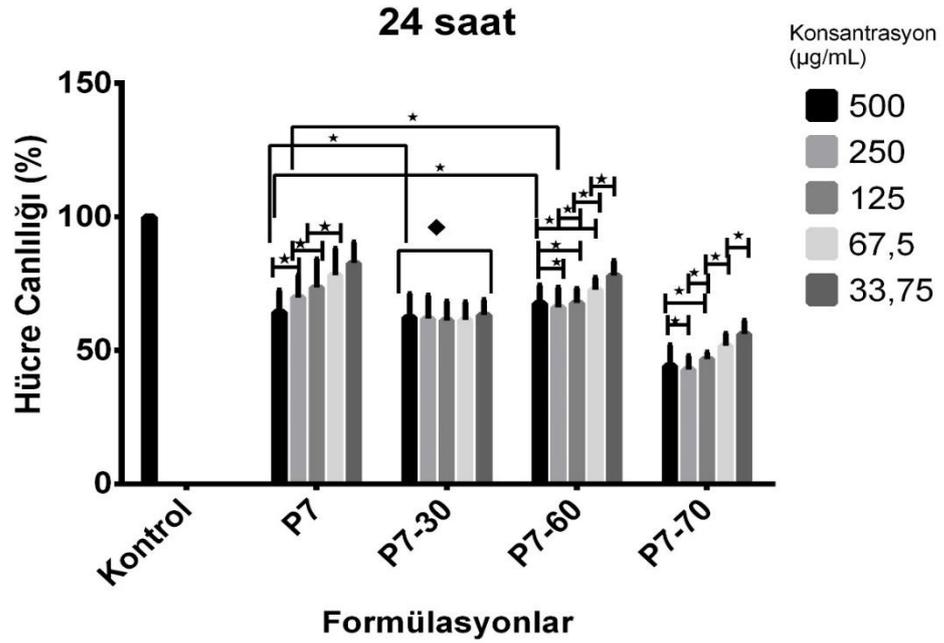
Şekil 4.26. Peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü miselin 25 °C’deki kolloidal stabilitesi ($X\pm SS$, $n=3$).

4.6. Hücre Kültürü Çalışmaları

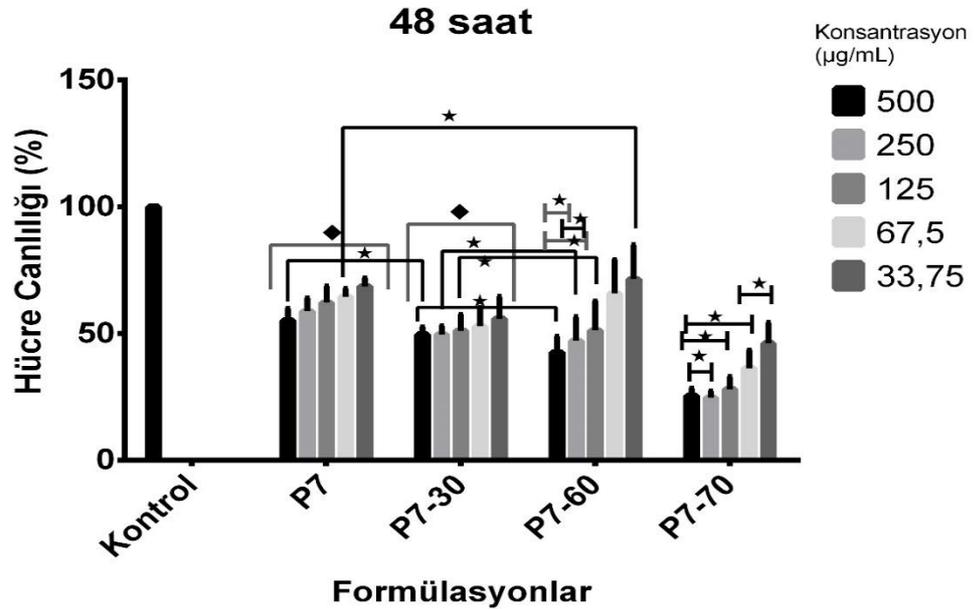
4.6.1. Etkin Madde İçermeyen Misellerin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Araştırılması

Doksorubisin yüklü miselleri hazırlamak için kullanılan polimerler ile hazırlanan misellerin biyoyumluluğunu değerlendirmek için L929 fare fibroblast hücrelerinde MTT analizi ile hücre canlılıkları incelenmiştir. P7, P7-30, P7-60, P7-70 polimerleri kullanılarak ince film hidrasyonu yöntemi ile miseller hazırlanmış ve farklı konsantrasyonlarda hücrelere uygulanmıştır. Misellerin hücrelerle 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonu sonucu elde edilen hücre canlılığı sonuçları sırasıyla Şekil 4.27., 4.28., 4.29.'da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde 24 saatlik inkübasyon sonrasında hücre canlılığının P7-70 formülasyonu dışında %60'ın üzerinde olduğu görülmektedir. P7-70 polimeri ile hazırlanan miseller için canlılık % 42,8-56 arasında bulunmuştur. Uygulanan bütün konsantrasyonlar ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p < 0,0001$). P7-30 miselleri için uygulanan beş farklı konsantrasyonun cevapları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). P7-30 misellerinden kaynaklanan toksisitenin ise konsantrasyona bağımlı olmadığı görülmektedir.

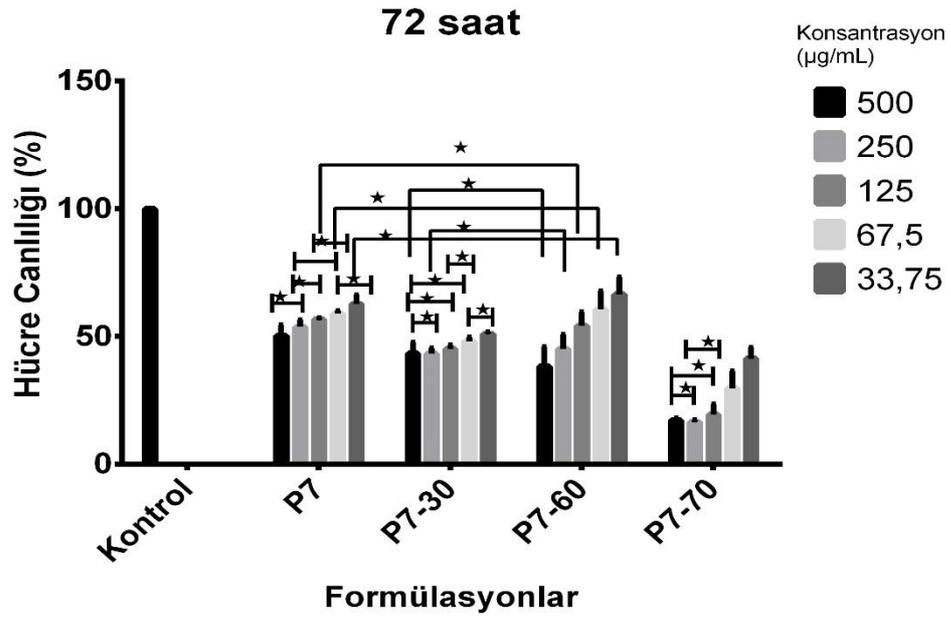
48 saatlik inkübasyon sonrasında P7, P7-30 ve P7-60 miselleri için canlılık %42-71 arasında bulunmuştur (Şekil 4.28.). P7-70 polimeri ile hazırlanan miseller ile yüksek polimer konsantrasyonlarında canlılık yaklaşık %25'e kadar düşmüştür. P7 ve P7-30 misellerinin farklı konsantrasyonlarına karşı elde edilen cevaplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Kontrol grubu ile uygulanan tüm formülasyonların cevabı arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,0001$). 72 saatlik canlılık sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.29.) P7-30 misellerinin, P7 ve P7-60 misellerinden daha düşük bir hücre canlılığına neden oldukları, P7-70 misellerinin ise yüksek polimer konsantrasyonlarında oldukça düşük bir hücre canlılığına (%17-30) sebebiyet verdiği görülmektedir. P7-70 misellerinin her üç zaman noktasında da bütün konsantrasyonları için diğer formülasyonlar ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,0001$).



Şekil 4.27. Etkin madde içermeyen misel formülasyonlarının L929 hücre canlılığı üzerine 24 saatlik etkileri ($X \pm SH$, $n=3$). ♦ işareti bulunan grupta bütün konsantrasyonların cevapları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir, * işareti bulunan iki formülasyon arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir $P>0,05$.



Şekil 4.28. Etkin madde içermeyen misel formülasyonlarının L929 hücre canlılığı üzerine 48 saatlik etkileri ($X \pm SH$, $n=3$). ♦ işareti bulunan grupta bütün konsantrasyonların cevapları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir, * işareti bulunan iki formülasyon arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir $P>0,05$.



Şekil 4.29. Etkin madde içermeyen misel formülasyonlarının L929 hücre canlılığı üzerine 72 saatlik etkileri ($X \pm SH$, $n=3$). * işareti bulunan iki formülasyon arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir $P > 0,05$.

4.6.2. Doksorubisin Yüklü Misellerin Sitotoksitesinin Araştırılması

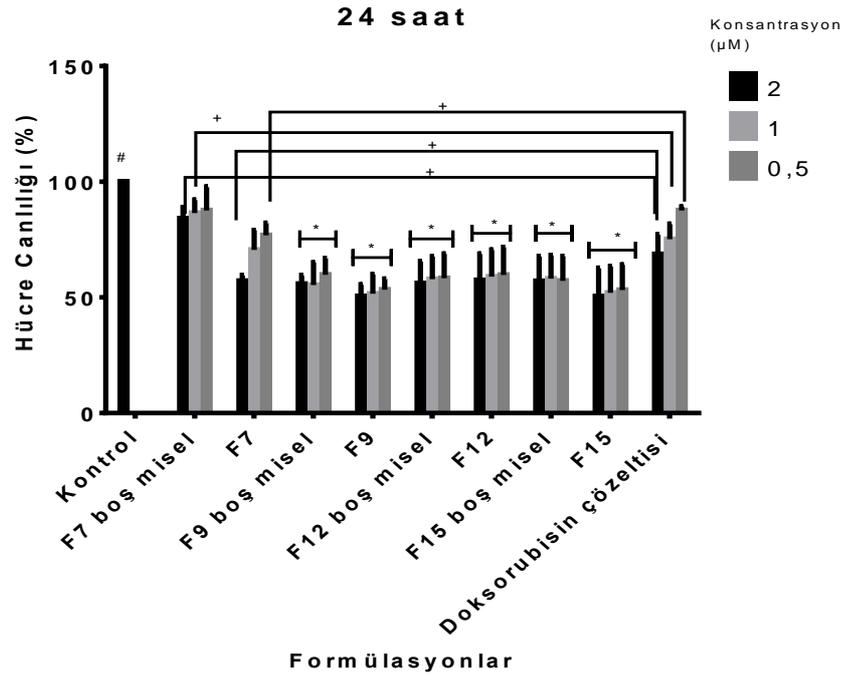
Doksorubisin hapsedilmiş miselleri elde etmek için dört farklı polimer kullanılmıştır. Kullanılan bu polimerler ile yağ/su emülsiyonu yöntemi kullanılarak hazırlanmış doksorubisin enkapsüle edilmiş miseller (F7, F9, F12 ve F15), en küçük partikül büyüklüğüne sahip olmaları ve doksorubisin yükleme kapasitelerinin yeterince yüksek olması nedeniyle daha ayrıntılı bir şekilde karakterize edilmek ve değerlendirilmek üzere seçilmişlerdir. F7 formülasyonu yüksek bir polidispersite indeksine sahiptir ($PDI:1$) ve TEM görüntüleri ile açığa çıkan çubuk şekilli misellerden oluşmaktadır. F7 formülasyonu misel şeklinin hücre kültüründe olumlu ya da olumsuz bir etkisinin olup olmadığını değerlendirmek üzere hücre kültüründe değerlendirilecek formülasyonlar arasına katılmıştır. Miselleri oluşturan polimer yapısının kanser hücreleri üzerindeki etkisini araştırmak üzere farklı miktarlarda katyonik PEI polimeri içeren doksorubisin yüklü formülasyonlar (F9, F12 ve F15) ve F7 formülasyonu MCF-7 hücre hattı kullanılarak MTT testi ile değerlendirilmişlerdir. F7, F9, F12 ve F15 formülasyonlarından partikül büyüklüğü, zeta potansiyel, doksorubisin yükleme kapasitesi, *in vitro* salım ve L929 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri gibi etkenler değerlendirilerek F9 formülasyonunun peptit ile

hedeflendirilmiş nihai formülasyon olarak kullanılması kararı alınmıştır. Peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü misel formülasyonunun etkinliği MCF-7 ve SKBR-3 hücreleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Formülasyonlar üç farklı doksorubisin konsantrasyonu için (2, 1 ve 0,5 μM) için değerlendirilmiş olup, grafiklerde etkin madde içermeyen misel formülasyonları, doksorubisin içeren misellerin formülasyon kodlarının yanına boş misel ifadesi eklenerek verilmiştir.

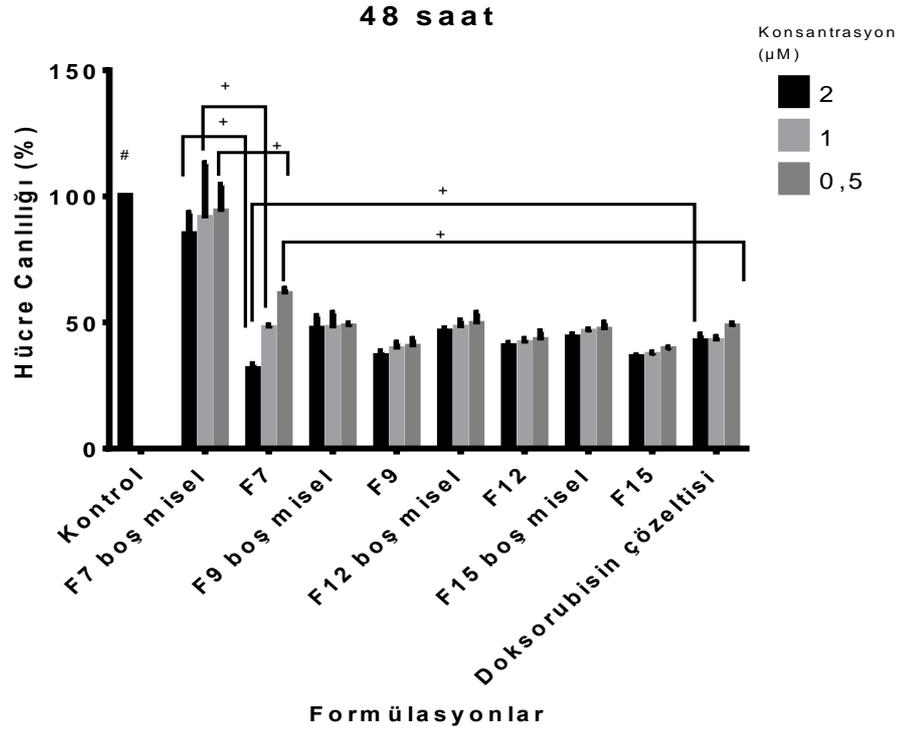
F7, F9, F12 ve F15 formülasyonlarının MCF-7 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri için değerlendirilmiş olup bulgular sırasıyla Şekil 4.30, 4.31. ve 4.32'de verilmiştir. 24 saatlik hücre canlılığı sonuçları incelendiğinde F7 boş misellerinin hücre canlılığı sonuçlarının % 84 ve üzerinde olduğu görülmektedir. F7 formülasyonu için farklı konsantrasyonlardaki canlılık %57-76,8 arasında değişmiştir ve 2 ve 0,5 μM konsantrasyonlarındaki canlılık bulguları ile doksorubisinin aynı konsantrasyonlarındaki bulguları karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (2 μM $p=0,0003$, 0,5 μM için $p=0,0008$). F9 boş misel formülasyonu için canlılık bulguları % 55,3-59,8 arasında ve F9 formülasyonu için sonuçlar %50,5-53,3 arasında bulunmuştur. F9 ile F9 boş misellerinin canlılık bulguları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir sonuç bulunmamıştır ($p>0,05$). Doksorubisin çözeltisinin hücre canlılığı sonuçları % 68,6-87,6 arasında olup, F9 miselleri ile doksorubisin çözeltisine göre daha düşük canlılık sonuçları elde edilmiştir fakat F9 boş misellerinin toksisitesi, F9 formülasyonu ile elde edilen düşük canlılık sonuçlarının polimerden kaynaklı bir toksisite olduğunu düşündürmüştür. F12 boş misel formülasyonu için canlılık değerleri %56,1-58,2 arasında, F12 formülasyonu için %57,4-59,7 arasında, F15 boş misel formülasyonu için %57-58,1 arasında ve F15 formülasyonu için %50,5-53,2 bulunmuş olup, boş ve doksorubisin yüklü miseller arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir sonuç bulunmamıştır ($p>0,05$). F12 ve F15 formülasyonları ile doksorubisin çözeltisi karşılaştırıldığında uygulanan tüm konsantrasyonlara karşı alınan cevaplar arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p<0,0001$). Ancak F12 ve F15 boş misellerinin toksisitesi, F12 ve F15 formülasyonu ile elde edilen düşük canlılık sonuçlarının polimerden kaynaklandığını düşündürmüştür. Kullanılan bütün formülasyonlar ile kontrol arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,0001$). F9, F12 ve F15 formülasyonlarının

hücre canlılıkları karşılaştırıldığında 24 saatlik bulgular arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

F7, F9, F12 ve F15 formülasyonlarının 48 saatlik hücre canlılığı sonuçları Şekil 4.31.'de verilmiştir. 48 saatlik canlılık bulguları F7 boş misel formülasyonu için %84,8-93,8, F7 formülasyonu için %31,3-61,0, arasında bulunmuştur. F7 boş misel formülasyonu 48 saatlik inkübasyon sonucunda da toksik etki göstermemiştir ve F7 formülasyonu ile aralarındaki fark tüm konsantrasyonlar için istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,0001$). 2 μ M doksorubisin konsantrasyonundaki canlılıklar karşılaştırıldığında F7 formülasyonunun serbest doksorubisin çözeltisine göre daha etkili olduğu görülmektedir ve iki formülasyon arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,0062$) bulunmuştur. Ancak daha düşük doksorubisin konsantrasyonlarında F7 formülasyonuna göre doksorubisin çözeltisi daha etkilidir. F9 boş misel formülasyonu için 48 saatlik canlılık %47,3-48,2 ve F9 formülasyonu için %36,5-40,1 arasında bulunmuştur. F12 boş misel formülasyonu için hücre canlılığı %46,2-49,2 arasında F12 formülasyonu için %40,4-42,9 arasında bulunmuştur. F15 boş misel formülasyonu için ise hücre canlılığı %43,8-50 arasında F15 formülasyonu için 36-39,2 arasında bulunmuştur. F9, F12 ve F15 formülasyonları doksorubisin çözeltisi ile karşılaştırıldığında hücre canlılıklarının birbirine yakın olduğu görülmektedir ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). F9, F12 ve F15 formülasyonlarının farklı konsantrasyonları kendi aralarında karşılaştırıldığında aralarındaki fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Genel olarak F9, F12 ve F15 boş miselleri aynı polimerle hazırlanmış doksorubisin yüklü F9, F12 ve F15 misellerine göre daha yüksek bir canlılık yüzdesine sahiptirler ancak aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).



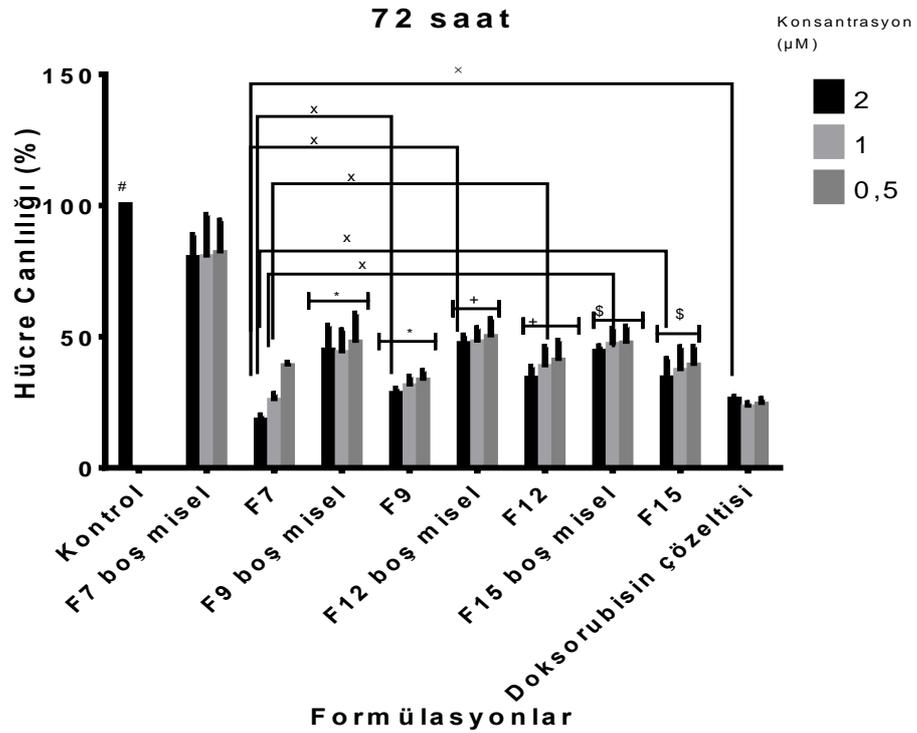
Şekil 4.30. Hedeflendirilmemiş misel formülasyonlarının MCF-7 hücre canlılığı üzerine 24 saatlik etkileri ($X \pm SH$, $n=3$). # işareti bulunan formülasyon ile tüm formülasyonlar ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. + işareti bulunan iki formülasyon arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. * işareti bulunan formülasyon grupları ile doksorubisin çözeltisi grubundaki aynı konsantrasyondaki formülasyonlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.31. Hedeflendirilmemiş misel formülasyonlarının MCF-7 hücre canlılığı üzerine 48 saatlik etkileri ($X \pm SH$, $n=3$). # işareti bulunan formülasyon ile tüm formülasyonlar ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır.+ işareti bulunan iki formülasyon arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).

Hedeflendirilmemiş misel formülasyonları için 72 saatlik hücre canlılığı sonuçları Şekil 4.32.'de verilmiştir. F7 boş misel formülasyonu için 24 ve 48 saatlik bulgulara benzer şekilde hücre canlılığı değerleri %80'in üzerinde bulunmuştur. F7 formülasyonu için hücre canlılığı %17,8-38,6 arasındadır. 2 µM dokсорubisin konsantrasyonundaki hücre canlılıkları karşılaştırıldığında F7 formülasyonunun dokсорubisin çözeltisine göre daha etkili olduğu görülmektedir ve iki formülasyon arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,0056$) bulunmuştur. F9, F12 ve F15 boş misel formülasyonları için hücre canlılığı değerleri 48 saatlik deney bulgularına yakın değerlerde bulunmuştur. F9 misel formülasyonu için 72 saatlik hücre canlılığı değerleri %28-33,2 arasında F12 formülasyonu için %33,9-40,8 arasında, F15 formülasyonu için ise hücre canlılığı % 34-38,9 arasındadır. Dokсорubisin yüklü F9, F12 ve F15 formülasyonları aynı polimerden hazırlanan boş misel formülasyonları ile karşılaştırıldıklarında daha yüksek bir canlılık yüzdesine sahip oldukları görülmüş ve

uygulanan tüm konsantrasyon seviyeleri için aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Doksorubisin çözeltisi ile 72 saat sonunda F9, F12 ve F15 formülasyonlarından daha düşük % hücre canlılığı değerleri elde edilmiştir ve aralarındaki fark tüm konsantrasyon değerleri için istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). 2 μM doksorubisin konsantrasyonunda misel formülasyonları arasında F7 formülasyonu ile en düşük hücre canlılığı elde edilmiştir ve F7 formülasyonunun F9, F12 ve F15 formülasyonları ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). 1 μM doksorubisin konsantrasyonunda da misel formülasyonları arasında F7 formülasyonu ile en düşük hücre canlılığı elde edilmiştir ve F12 ve F15 formülasyonları ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

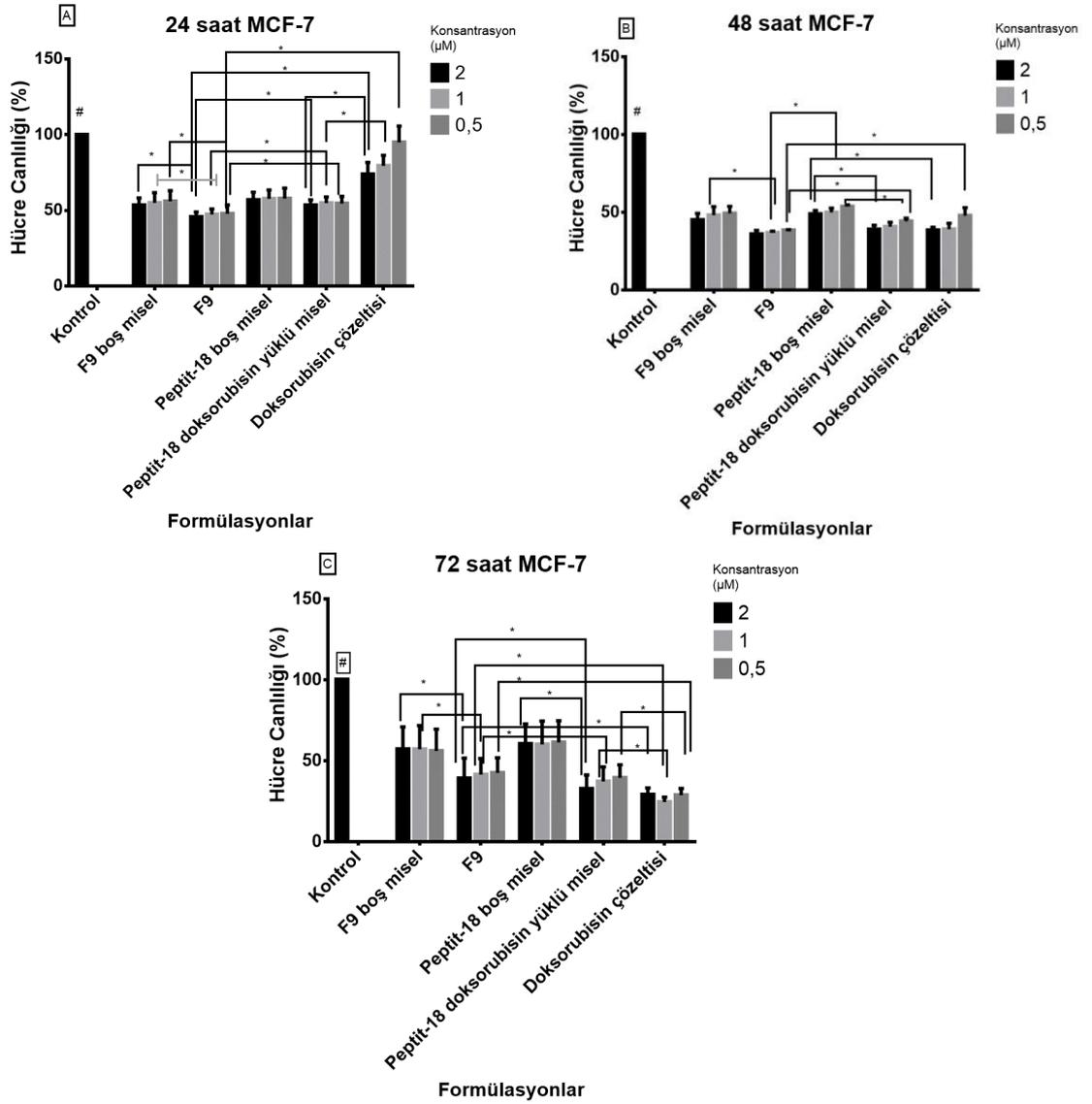


Şekil 4.32. Hedeflendirilmemiş misel formülasyonlarının MCF-7 hücre canlılığı üzerine 72 saatlik etkileri ($X\pm\text{SH}$, $n=3$). # işareti bulunan formülasyon ile tüm formülasyonlar ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. *, + ve \$ işaretleri bulunan gruplar aynı işareti taşıyan gruplardaki bütün konsantrasyonlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. x işareti bulunan iki formülasyon arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

Peptit-18 ile modifiye edilmiş misellerin hücre kültüründe değerlendirilmesi için iki hücre hattı kullanılmıştır. Bunlardan biri olan MCF-7 hücrelerini peptit-18'in hedeflediği daha önce bildirilmiştir (200). Deneilerin yapılacağı ikinci hücre hattı olarak seçilen SKBR-3 hücrelerini peptit-18'in hedeflediğine dair literatürde bir bilgi bulunmamaktadır. Peptit-18 ile hedeflendirilmiş misellerin hücre canlılığı üzerine etkisi incelenirken, karşılaştırma yapmak adına aynı polimer ile hazırlanan hedeflendirilmemiş F9 formülasyonu da kullanılmıştır.

MCF-7 hücreleri ile peptit-18 ile hedeflendirilmiş formülasyonların ve aynı polimer ile hazırlanmış hedeflendirilmemiş formülasyonun (F9) 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonları sonucu elde edilen bulgular Şekil 4.33.'de verilmiştir. 24 saatlik inkübasyonda hücre canlılıkları F9 boş misel formülasyonu için %53,4-56 arasında, F9 formülasyonu için %45,7-47,9 arasında, peptit-18 ile hedeflendirilmiş boş misel için %56,9-57,9 arasında ve peptit ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü misel için %53,4-54,9 arasında bulunmuştur. En düşük canlılık F9 ile elde edilmiştir ve uygulanan bütün formülasyonlar doksorubisin çözeltisinden daha düşük canlılık değerlerinin elde edilmesine neden olmuşlardır. Doksorubisin çözeltisi ile uygulanan bütün formülasyonlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$). Peptit-18 ile hedeflendirilmiş boş misel ile peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü misel arasında, üç doksorubisin konsantrasyonu düzeyinde de anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$) 48 saatlik sonuçlar incelendiğinde peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü miseller için % hücre canlılığı 38,8-44,1 olarak bulunmuştur. F9 formülasyonu için %35,8-38,3 arasında ve doksorubisin çözeltisi için canlılık değerleri % 38,3-47,7 arasında bulunmuştur. Doksorubisin çözeltisi ile peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü miseller karşılaştırıldığında üç doksorubisin konsantrasyonu düzeyinde de aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). 72 saatlik sonuçlar incelendiğinde doksorubisin çözeltisi ile en düşük hücre canlılıkları (%24,3-28,9) elde edilmiştir. F9 ve peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü miseller için elde edilen hücre canlılığı sonuçları (sırasıyla %39-42,4 ve %32,6-39,3), doksorubisine yakın olup doksorubisin çözeltisiyle aralarındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p < 0,0001$). F9 boş misel formülasyonu için % hücre canlılığı %55,9-57 arasında olup, F9 formülasyonu ile aralarındaki fark anlamlıdır ($p < 0,0001$). F9 formülasyonu ile peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü

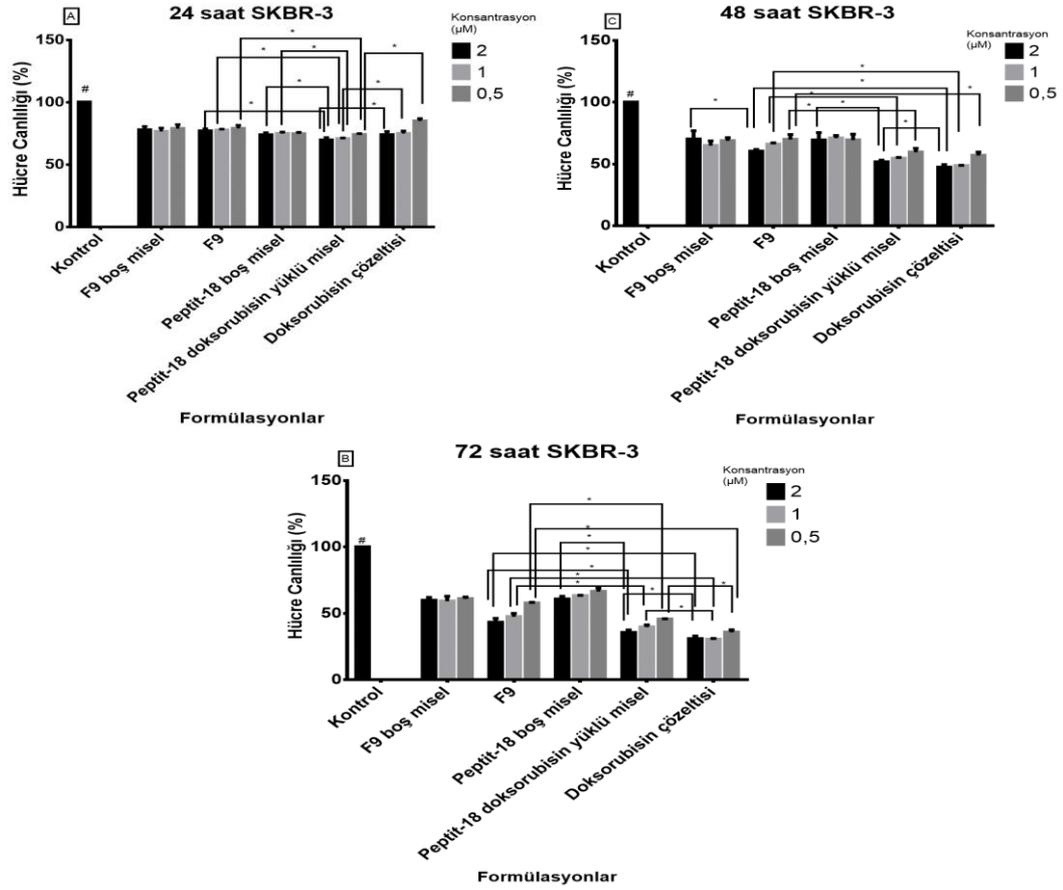
misellerin % hücre canlılıkları arasındaki fark 2 ve 1 μ M konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,0001$).



Şekil 4.33. Hedeflendirilmiş misel formülasyonlarının MCF-7 hücre canlılığı üzerine A:24, B:48, C:72 saatlik etkileri ($X \pm SH$, $n=3$). # işareti bulunan formülasyon ile tüm formülasyonlar ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. * işareti bulunan iki formülasyon arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).

SKBR-3 hücreleri ile peptit-18 ile hedeflendirilmiş formülasyonların 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonları sonucu elde edilen bulgular Şekil 4.34.'de verilmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda F9 için % hücre canlılığı değerleri %76,8-78,9 arasında, doksorubisin çözeltisi için %73,8-84,8 arasında ve peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü miseller için %69,6-73,9 arasında bulunmuştur.

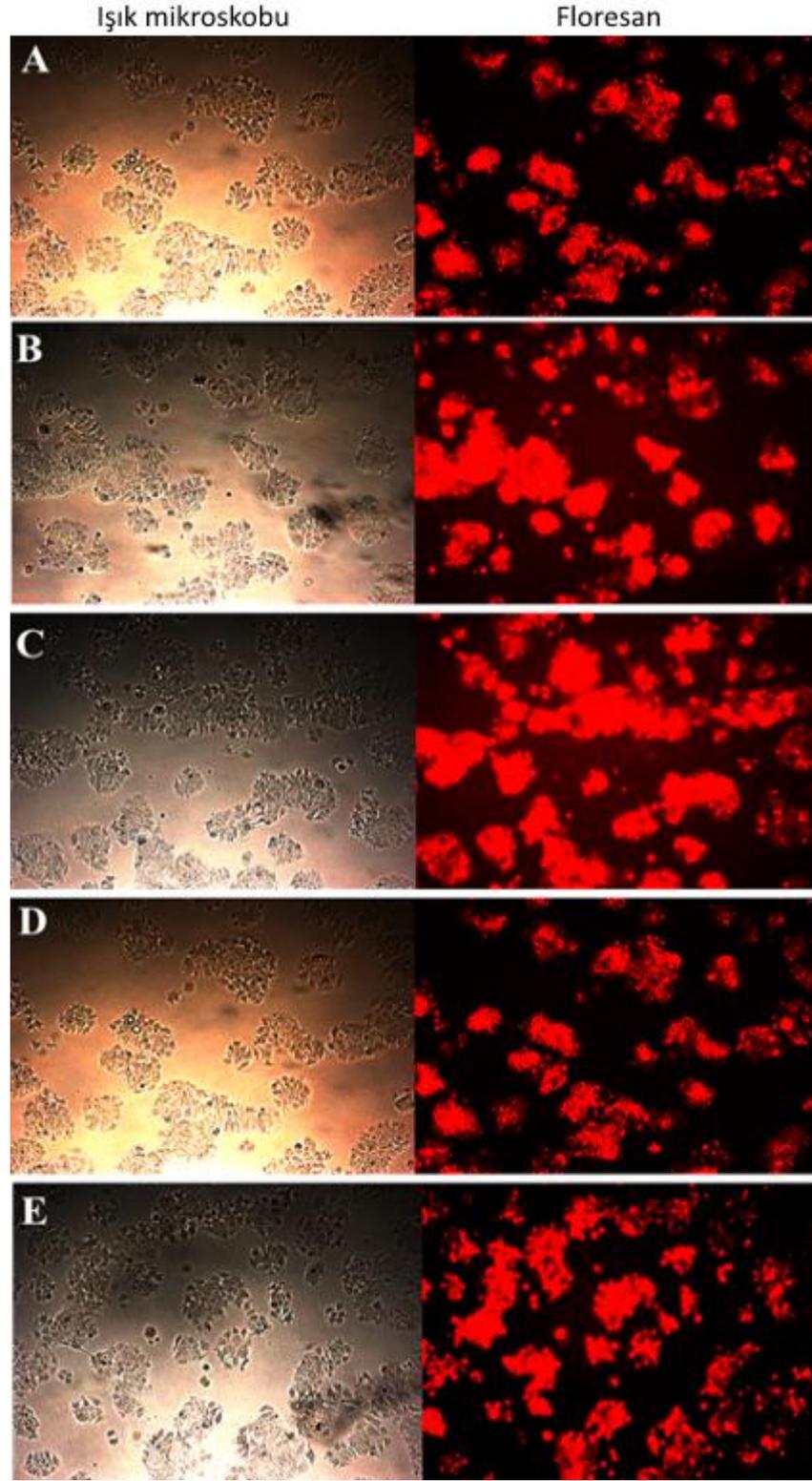
Peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü miseller ile hem doksorubisin çözültisi hem de F9 formülasyonu arasındaki fark tüm konsantrasyonlar için istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda en düşük canlılıklar doksorubisin çözültisi ile elde edilmiş olup (%47,3-56,9 arasında), peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü miseller ile arasındaki fark sadece 1 μM konsantrasyonunda anlamlı bulunmuştur ($p = 0,0116$). F9 formülasyonunun canlılık sonuçları her üç konsantrasyon için de peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü misellerden yüksek bulunmuştur ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Peptit-18 ile hedeflendirilmiş boş misellerin % hücre canlılığı sonuçları, peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü misellerden daha yüksek bulunmuş olup aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,0001$). 72 saatlik % hücre canlılığı sonuçları incelendiğinde en düşük % canlılık değerleri doksorubisin çözültisi ile elde edilmiştir (%30,3-35,7). F9 formülasyonu için % hücre canlılığı değerleri %43,1-57,7 arasında, peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü miseller için %35,5-45,5 arasında bulunmuştur. F9 ile peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü miseller arasındaki fark tüm konsantrasyonlar için istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,0001$).



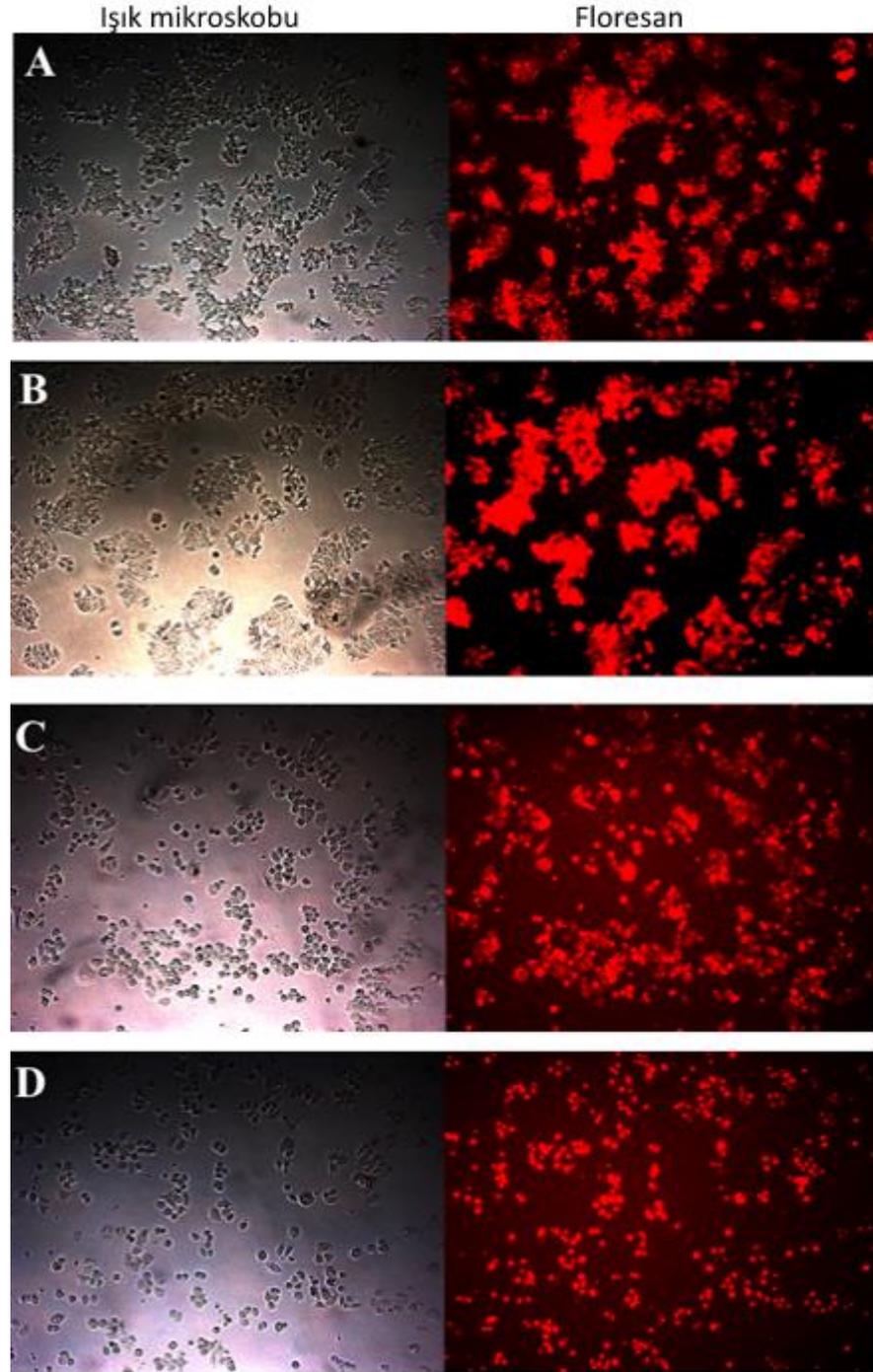
Şekil 4.34. Hedeflendirilmiş misel formülasyonlarının SKBR-3 hücre canlılığı üzerine A:24, B:48, C:72 saatlik etkileri ($X \pm SH$, $n=3$). # işareti bulunan formülasyon ile tüm formülasyonlar ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. * işareti bulunan iki formülasyon arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).

4.6.3. Doksorubisin Yüklü Misellerin Hücresel Alımının Floresan Mikroskop İle İncelenmesi

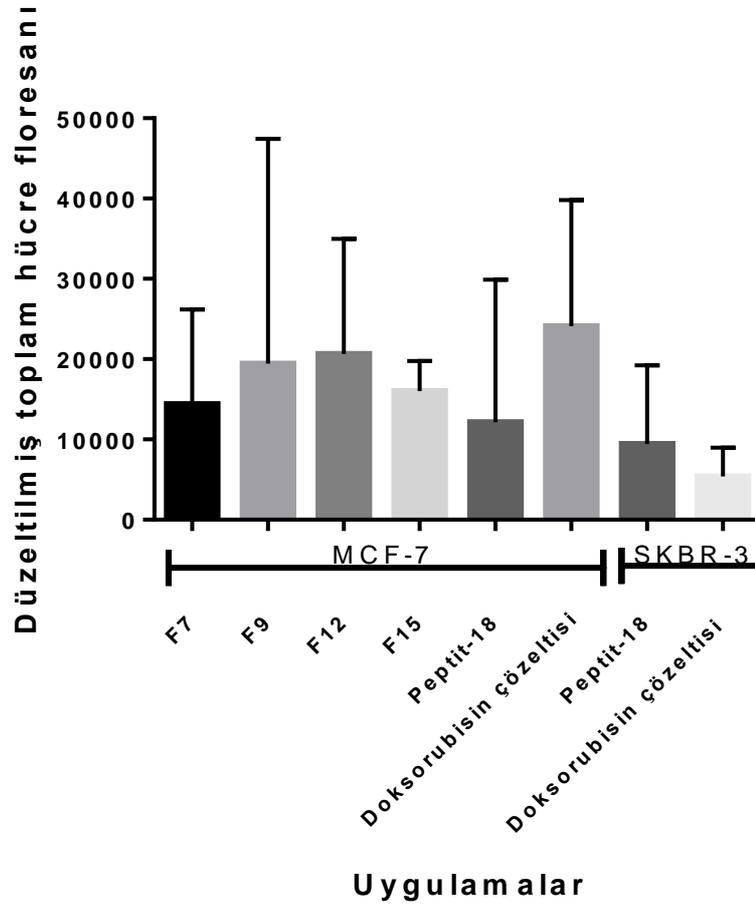
Misellere hapsedilmiş doksorubisinin hücre içine alımını görüntülemek için doksorubisinin floresan özelliğinden faydalanılmıştır. Bu amaçla F7, F9, F12, F15 formülasyonları ve peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü misel formülasyonu, hücrelerle bir saat inkübe edildikten sonra floresan mikroskobu ile görüntüleme çalışmaları yapılmıştır. Bir saatlik inkübasyon sonrası peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü misel formülasyonu ile F7, F9, F12, F15 formülasyonlarının doksorubisini başarılı bir şekilde hücrelerin içine taşıdığı görülmüştür. F7, F9, F12, F15 formülasyonları ve doksorubisin çözeltisi MCF-7 hücrelerine uygulanmışlardır ve 1 saat inkübasyon sonunda aynı alan hem ışık mikroskobu ile hem de floresan ışık altında N2.1 filtresi kullanılarak görüntülenmiştir. F7, F9, F12, F15 formülasyonları ve doksorubisin çözeltisinin mikroskop ile alınan normal ışık ve floresan görüntüleri Şekil 4.35.'te verilmiştir. Görüntüler incelendiğinde hücrelerin tamamının doksorubisinden kaynaklanan kırmızı floresan ışımayı gösterdiği görülmektedir. Peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü misel formülasyonu MCF-7 ve SKBR-3 hücrelerine uygulanmıştır ve kontrol olarak doksorubisin çözeltisi de hücrelere uygulanmıştır. Peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü misel formülasyonunun MCF-7 ve SKBR-3 hücreleri ile bir saat inkübasyonu sonrası elde edilen görüntüler Şekil 4.36.'da verilmiştir. Bu görüntüler de hedeflendirilmiş misel formülasyonu ile doksorubisinin başarılı bir şekilde hücre içine taşındığı görülmüştür. Elde edilen floresan mikroskop görüntüleri Image J programı kullanılarak analiz edilmiş ve her bir görüntü karesi için düzeltilmiş toplam hücre floresanı değerleri hesaplanmıştır. Formülasyonların düzeltilmiş toplam hücre floresanı değerleri Şekil 4.37.'de verilmiştir. Grafik incelendiğinde en yüksek hücre floresanının MCF-7 hücresi için doksorubisin çözeltisi ile elde edildiği görülmektedir. Peptit-18 ile hedeflendirilmiş formülasyonun MCF-7 hücrelerinde, hedeflendirilmemiş formülasyonlardan daha düşük bir floresana neden olduğu görülmektedir ancak SKBR-3 hücrelerine uygulandığında doksorubisin çözeltisine göre daha yüksek bir floresan elde edilmiştir. Grafikteki uygulamalar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir sonuç bulunmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 4.35. F7 (A), F9 (B), F12 (C), F15 (D) formülasyonlarının ve doksorubisin çözeltisinin (E) hücresel alımının floresan mikroskobu ile gösterilmesi.



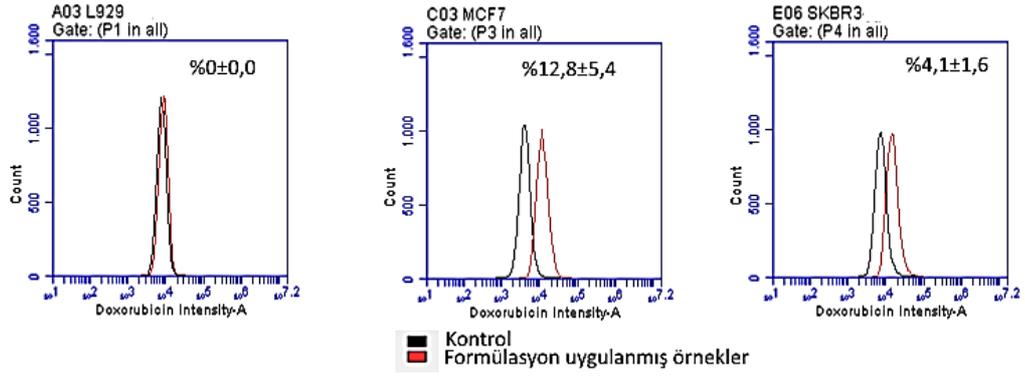
Şekil 4.36. Peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü misel formülasyonu ile doksorubisin çözeltisinin hücresel alımının MCF-7 ve SKBR-3 hücrelerinde floresan mikroskobu ile gösterimi. MCF-7 hücresi ile alınan görüntüler A: peptit-18 ile hedeflendirilmiş misel B: doksorubisin çözeltisi, SKBR-3 hücresi ile alınan görüntüler C: peptit-18 ile hedeflendirilmiş misel D: doksorubisin çözeltisi.



Şekil 4.37. Misel formülasyonları ve dokсорubisin çözeltisinin MCF-7 ve SKBR-3 hücrelerindeki düzeltilmiş toplam hücre floresanı.

4.6.4. Peptit İle Hedeflendirilmiş Dokсорubisin Yüklü Misellerin Hücresel Alımının Akış Sitometrisi İle İncelenmesi

Peptit-18 ile hedeflendirilmiş misellerin hücresel alımını nicel olarak değerlendirmek için akım sitometrisi cihazı kullanılmıştır. Dokсорubisin yüklü peptit-18 ile hedeflendirilmiş miseller hücrelere uygulandıklarında floresan açıdan pozitif hücre miktarı L929 hücreleri için $0 \pm 0,0$, MCF-7 hücreleri için $12,8 \pm 5,4$ ve SKBR-3 hücreleri için $4,1 \pm 1,6$ oranlarında bulunmuştur. MCF-7 hücrelerinin peptit-18 tarafından hedeflendiği daha önce bildirilmiştir (200). Bulgular bu bilgiyi destekler niteliktedir. Floresan pozitif hücre yüzdesi MCF-7 hücreleri için SKBR-3 hücrelerinden daha yüksek bulunmuştur. SKBR-3 hücrelerinin de MCF-7 kadar yüksek olmasa da peptit-18 tarafından hedeflendiği görülmektedir.



Şekil 4.38. Peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü misellerin L929, MCF-7 ve SKBR-3 hücrelerinin içine alınış yüzdeleri.

5. TARTIŞMA

5.1. Misel Hazırlanmasında Kullanılan Polimerlerin $^1\text{H-NMR}$ ile Karakterizasyonu

Doksohubisin hapsedilmiş miselleri hazırlamak için kullanılan polimerlerin (P7, P7-30, P-60, P-70) başarılı bir şekilde sentezlendiği Bölüm 4.1.'de $^1\text{H-NMR}$ analizleri ile doğrulanmıştır. PEtOx-b-PCL (P7 kodlu polimer) polimerine ait spektrumda (Şekil 4.1.) görülen pikler literatür bulguları ile karşılaştırıldığında PEtOx ve PCL bloklarına ait karakteristik piklerin spektrumda yer aldığı görülmektedir. Şekil 4.1. incelendiğinde PEtOx bloğunda yer alan $-\text{CH}_3$ (d) gruplarından kaynaklı hidrojenlere ilişkin pik 1,14 ppm'de, PCL bloğunda yer alan $-\text{CH}_2\text{OCO}$ (n) grubundaki hidrojenler ise 4 ppm'de yer almaktadır. Lee ve arkadaşlarının (141) 2003 yılında yayınladıkları çalışmalarında, sentezledikleri PEtOx-b-PCL polimerinin dötero kloroform içindeki $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda, elde ettiğimiz spektrumdaki piklere benzer şekilde PEtOx bloğunda yer alan $-\text{CH}_3$ piki 1,10 ppm'de, PCL bloğunda yer alan $-\text{CH}_2\text{OCO}$ piki 4,02 ppm'de görülmektedir.

PEtOx₁₀₇₀₀ polimerinin farklı oranlarda (%30, 60 ve 70) hidrolizi ile elde edilen PEtOx-ko-PEI polimerlerinin PCL₂₁₀₀ ile bloklanması sonucu sentezlenen PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerlerine (P7-30, P7-60, P7-70) ilişkin $^1\text{H-NMR}$ spektrumları incelendiğinde (Şekil 4.2.) PEtOx polimerinin hidrolizi sonucu elde edilen PEI polimerine ait NH-CH_2 grubundaki protonların (e) 2,8 ppm civarında ortaya çıktığı görülmektedir. PEtOx polimerine ait $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}-$ grubundaki protonların (d) 3,5 ppm civarında ortaya çıktığı görülmektedir. PEtOx polimerinin hidroliz derecesi arttıkça, polimerdeki PEI miktarı artıp, PEtOx miktarı azalacağından PEI polimerine ait NH-CH_2 protonlarının (e) 2,8 ppm'deki pik şiddetinin, PEtOx polimerine ait $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}-$ grubundaki protonların (d) 3,5 ppm'deki pikinin şiddetine göre arttığı spektrumlarda görülmektedir. Fernandes ve arkadaşlarının (249) lineer PEI elde etmek için PEtOx polimerinin asit hidrolizi ile elde ettikleri PEtOx-ko-PEI polimerlerinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumları incelendiğinde, elde ettiğimiz bulgulara benzer sonuçlar buldukları görülmektedir. PEtOx-ko-PEI polimerlerinin spektrumlarında PEI polimerine ait NH-CH_2 protonlarının 2,9 ppm'de ve PEtOx polimerine ait $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}-$ protonlarının 3,45 ppm'de ortaya çıktığını ve PEtOx polimerinin hidroliz derecesi

arttikça 2,9 ppm'deki PEI kaynaklı pikin şiddetinin ve 3,45 ppm'deki PEtOx kaynaklı pikin şiddetine göre arttığını bildirmişlerdir (249).

Hedeflendirilmiş misel formülasyonlarını hazırlamak için kullanılacak peptit-18 bağlanmış P7-30 polimerinin Şekil 4.3.'de verilen ¹H-NMR spektrumunda, polimere peptit konjugasyonu peptit yapısında bulunan amit grubundaki –NH hidrojenin 8 ppm civarında ve fenil gruplarında yer alan hidrojenlerin 7,4 ppm civarında ortaya çıkması ile doğrulanmıştır. Soudy ve arkadaşları (202) trifluoroetanol:su karışımında NMR analizini yaptıkları peptit-18'in fenilalanin kaynaklı fenil grubundaki protonların spektrumunda 7,28 ve 7,21 ppm'de çıktığını, peptit-18'deki NH gruplarının protonlarının 7,5-8,97 ppm arasında çıktığını bildirmişlerdir. Bu sonuçlar bulgularımızla örtüşmektedir ve polimere peptit-18 konjugasyonunu doğrulamaktadır.

5.2. Doksorubisinin Fizikokimyasal Özellikleri

Doksorubisinin formülasyon çalışmalarında kullanılmadan önce, fizikokimyasal özellikleri incelenerek ve elde edilen bulgular literatür bulguları ile karşılaştırılarak maddenin saflığı ve formülasyon çalışmalarında kullanılmak üzere uygunluğu gösterilmiştir. Bu amaçla doksorubisinin FT-IR spektrumu ve UV spektrumu alınmış ve DSC analizi yapılmıştır.

IR spektroskopisinin temel prensibi dalga boyunun bir fonksiyonu olarak bir numune tarafından emilen (veya yayılan) IR radyasyon miktarının ölçülmesidir. Çok atomlu bir bileşiğin IR spektrumu, atomik kütlelere, bağ kuvvetlerine, molekül içi ve moleküller arası etkileşimlere bağlı olan moleküler titreşimlere dayanmaktadır. Bu nedenle bir bileşiğin IR spektrumu, diğer bileşiklerin IR spektumundan ayırt edilebilen benzersiz bir parmak izi niteliğindedir. FT-IR spektrumunda moleküldeki belli alt gruplar karakteristik bir spektral bölgede bantlar oluştururlar. Spektrumdaki bu karakteristik bantlar bileşiğin tanınması için kullanılabilirler (249). Doksorubisinin Şekil 4.4.'de verilen FT-IR spektrumunda, O-H gerilme bandının 3525 cm⁻¹ dalgasayısında, C-H gerilme bandının 2900 cm⁻¹ dalgasayısında, C=O (keton) gerilme bandını 1731 cm⁻¹ dalgasayısında, C-O-C (eter) gerilme bandının 1071 cm⁻¹ dalgasayısında bulunduğu görülmektedir. Bu bulgular literatür (246) ile uyumludur ve molekülün doksorubisin olduğunu doğrulamaktadır.

DSC termal bir analizdir, kristal organik bileşiklerin saflığını belirlemek için kullanılabilen bir yöntemdir. DSC analizinin safsızlıkları tespit etmek için dayandığı temel prensip eriyikte çözünmüş durumdayken, katı halde çözünmeyen (yani katı çözeltiler oluşturmayan) safsızlıkların maddenin erime noktasını düşürmesidir (250). DSC kullanılarak doksorubisinin erime noktasının tayin edilmesiyle saflığının gösterilmesi hedeflenmiştir. Şekil 4.5.'te verilen DSC termogramı doksorubisinin erime pikinin başlangıç noktasının yaklaşık 205 °C olduğunu ve erime pikinin sıcaklığının 221,65°C olduğunu göstermiş olup bu bulgular literatür ile uyumludur ve etkin maddenin saflığını göstermektedir (251, 252).

Doksorubisin hidroklorürün sudaki çözeltilisinin UV spektrumu (Şekil 4.6.) incelendiğinde maksimum absorbansın gözlemlendiği dalga boyu 482 nm olarak tespit edilmiştir ve bu bulgunun literatür (253) ile uyumlu olduğu görülmüştür.

5.3. Doksorubisinin UV-Görünür Bölge Spektroskopisi ile Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonu

Çalışmamızda misel çekirdeğine yüksek miktarda etkin madde enkapsülasyonu sağlamak için suda çözünen doksorubisin hidroklorür, kloroform içinde trietilamin ile muamele edilerek hidrofobik hale getirilmiştir. Bu durum doksorubisinin glikozidik amin grubunun deprotonasyonu ile sağlanmaktadır (144). Righetti ve arkadaşları doksorubisinin glikozidik amin grubunun deprotonasyon davranışını inceledikleri çalışmalarında pH 7'nin üzerinde deprotonasyonun gerçekleştiğini bildirmişlerdir (254). Kataoka ve arkadaşları (144) ise pH'nın daha fazla arttırılmasının antrasiklin halkasında fenolik OH gruplarının ayrışması nedeniyle doksorubisinin kloroforma ekstraksiyon etkinliğini azaltacağını ve doksorubisin dekompozisyonunu hızlandıracağını bu nedenle yağ/su emülsiyonu yönteminde pH'nın dikkatli bir kontrolünün gerektiğini bildirmişlerdir. Yaklaşık 3 molar ekivalan trietilamin ile muamele edilen doksorubisin hidroklorürün neredeyse tamamının kloroforma ekstrakte edilebildiğini ve pH'nın 7 civarında sabit kaldığını bildirmişlerdir (144). Bu bağlamda çalışmamızda antrasiklin halkasında fenolik OH gruplarının etkilenmemesi için doksorubisin hidroklorür 3 molar ekivalan trietilamin ile muamele edilerek glikozidik amin grubunun deprotonasyonu ve hidrofobik doksorubisin eldesi sağlanmıştır.

Dokso rubisinin miktar tayini için dokso rubisin hidroklorürün DMSO içinde standart çözeltileri hazırlanmış ve UV-görünür bölge spektrofotometresi kullanılarak kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Hidrofobik baz dokso rubisinin kullandığımız yöntem ile tayin edilebileceğini göstermek için dokso rubisin hidroklorür ile hidrofobik dokso rubisinin spektrumları alınarak spektrumlar karşılaştırılmıştır. Dokso rubisinin kromofor grubu dihidroksiantrakinon grubundaki fenollerin deprotonasyonunun absorpsiyon spektrumunda değişikliklere neden olduğu, ancak kromofor gruba olan uzaklığı nedeniyle glikozidik amin grubunun deprotonasyonunun absorpsiyon spektrumunda bir değişikliği neden olmadığı Fiallo ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (255). Dokso rubisin HCl ile dokso rubisinin spektrumu karşılaştırıldığında (Şekil 4.7.) Fiallo ve arkadaşlarını (255) doğrulayacak şekilde spektrumda bir değişiklik olmadığı görülmüş ve yöntemin hidrofobik dokso rubisini tayin etmek için kullanılabilirliği gösterilmiştir.

5.3.1. Analitik Validasyon

Dokso rubisinin miktar tayini için kolay uygulanabilir bir yöntem olan UV-görünür bölge spektroskopisi kullanılmıştır. Kullanılan yöntemin amaçlanan uygulama için kabul edilebilirliğini göstermek için doğrusallık, doğruluk, kesinlik, teşhis sınırı, tayin alt sınırı, uygulama aralığı ve özgüllük validasyon parametreleri incelenmiştir.

Kullanılan miktar tayini yönteminin doğrusallığı, belirli bir aralıkta madde konsantrasyonu ile alınan cevap arasında orantısal bir ilişki olduğunun gösterilmesi ile ortaya konulmaktadır. 8-32 µg/mL konsantrasyon aralığında konsantrasyon ile absorbans arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu gösterilmiştir ($R^2=0.999$; y-intersept= 0,0001; eğim=0,0242). Korelasyon katsayısının 0,999'dan büyük olması doğrusallığın sağlandığını göstermektedir (235). Doğruluk parametresi, kullanılan yöntem ile elde edilen bulguların gerçek değerlere yakınlığı ifade eder ve geri kazanım çalışmaları ile gösterilmiştir. Kesinlik ise belirli koşullar altında aynı homojen örneğin çoklu örneklemesinden elde edilen bir dizi ölçüm arasındaki uyumun yakınlığını ifade eder. Yöntemin kesinliğini göstermek adına gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmıştır ve kesinlik % varyasyon katsayısı ile ifade edilmiştir. Tablo 4.1. ve 4.2. incelendiğinde yöntemin kesinlik ve doğruluk parametreleri açısından

uygunluğu, varyasyon katsayısının %2'den küçük olması (236) ve geri kazanımın %97-103 arasında olması ile gösterilmiştir (236, 237). Analitik yöntemin belirtilen uygulama aralığı (8-32 µg/mL) içindeki konsantrasyonlarda kabul edilebilir bir düzeyde doğrusallığı, doğruluğu ve kesinliği sağladığı gösterilmiştir. Yöntemin teşhis alt sınırı 0,3 µg / mL olarak, tayin alt sınırı ise 1 µg / mL olarak hesaplanmıştır. Özgüllük parametresinin sağlandığını göstermek için analiz ortamında bulunan polimerlerin spektrumları alınarak doksorubisinin aynı koşullardaki spektrumu ile karşılaştırılmıştır. Spektrumlar incelendiğinde (Şekil 4.9.) analiz dalga boyunda (482,5 nm) polimerin absorpsiyonunun baseline çizgisinde olduğu ve doksorubisin ile girişim yapmadığı görülmüştür.

5.4. PEtOx-b-PCL Polimerleri ile Yapılan Ön Çalışmalar

Misel hazırlamak için en uygun polimerin belirlenmesi amacıyla farklı molekül ağırlıklarına ve farklı blok uzunluklarına sahip PEtOx-b-PCL polimerleri kullanılarak ve farklı hazırlama yöntemleri kullanılarak miseller hazırlanmış ve partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümleri yapılmıştır.

Öncelikle sentezlenen polimerlerin diyaliz ile saflaştırmasının partikül büyüklüğüne etkisini incelemek için polimerler saflaştırılmadan ve saflaştırıldıktan sonra kullanılarak aynı yöntemlerle misel hazırlanmıştır. Diyaliz ve çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlanan misellerin partikül büyüklüklerindeki değişim sebebiyle (Tablo 4.3.) ve polimerlerin diyalizle saflaştırılarak kullanılmasının ileriki çalışmalar (doksorubisin yükleme çalışmaları, hücre kültürü gibi) için de daha yararlı olacağı düşünüldüğünden polimerler formülasyon çalışmaları için kullanılmadan önce suya karşı diyalizle saflaştırılmışlardır.

Tablo 4.4.'te verilen misel büyüklükleri incelendiğinde genellikle çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan misellerin daha büyük bir partikül büyüklüğüne sahip oldukları görülmektedir. Diyaliz ve ince film hidrasyonu yöntemi ile genel olarak daha küçük partikül büyüklüğüne sahip miseller elde edildiği görülebilmektedir. Tablo 4.4.'te ağırlıkça hidrofilik:hidrofobik blok oranı birbirinden farklı olan veya aynı hidrofilik:hidrofobik blok oranına sahip olup farklı zincir uzunluklarına sahip polimerlerle hazırlanan misellere ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri yer almaktadır. Partikül büyüklükleri incelendiğinde 50 nm altına

P7 polimeri ve ince film hidratasyonu yöntemiyle düşülmüştür. P7 polimerin hidrofilik:hidrofobik blok oranı 5:1 olup ve Lee ve arkadaşları (141) tarafından da benzer şekilde hidrofilik:hidrofobik blok oranı yaklaşık 5:1 olan PEtOx-b-PCL polimeri ile küçük partikül büyüklüğüne (20,8 nm) sahip miseller elde edilmiştir.

5.5. Misel Formülasyonlarının Hazırlanışı ve Misellere Doksorubisin Yüklenmesi

Misel formülasyonlarının hazırlanması için ön çalışmalarda literatürde sıklıkla kullanılan diyaliz, çözücü buharlaştırma ve ince film hidratasyonu (59, 141, 146, 230) yöntemleri kullanılmıştır. Genel olarak her üç yöntemle birbirine büyüklük açısından yakın miseller elde edilse de ince film hidratasyonu yöntemi ile polimerlerin çoğu ile daha küçük büyüklükte miseller elde edilebildiği (Tablo 4.4.) görülmüştür. Ayrıca ince film hidratasyonu yönteminin diğer yöntemlere göre daha hızlı ve kolay oluşu etkin madde içermeyen miselleri hazırlamak için en uygun yöntem olarak belirlenmesini sağlamıştır.

Etkin madde içeren miselleri hazırlamak için öncelikle ince film hidratasyonu yöntemi denenmiştir. Ancak bu yöntem ile elde edilen miseller 0,22 µm'lik filtreden süzülmesine rağmen elde edilen misel büyüklükleri açısından P7-30, P7-60 ve P7-70 polimeri ile hazırlanan miselerde 200 nm altına düşülememiştir. İnce film hidratasyonu yöntemi kullanılarak P7 polimeri ile hazırlanan miseller ile ise oldukça düşük bir doksorubisin yükleme kapasitesine (%5) ulaşılmıştır. Ayrıca ince film hidratasyonu yöntemi ile etkin madde hapsedilmiş miseller hazırlanırken son aşamada yapılan 0,22 µm'lik şırınga ucu filtreden süzme işleminin güçlükle gerçekleştirilmesi ve süzme işlemi ile agregate haldeki/büyük misellerin filtre üzerinde kalması ile etkin madde kaybının yüksek olması bu yöntemin kullanımını sınırlamaktadır. Bu nedenlerle Kataoka ve arkadaşları (144) tarafından doksorubisinin misellere yüksek oranda hapsedilmesini sağladığı bildirilen yağ/su emülsiyonu yönteminin denenmesine karar verilmiştir. Bu yöntemde öncelikle etkin madde içermeyen su içindeki misel dispersiyonu ince film hidratasyonu yöntemi ile hazırlanmaktadır ve ardından kloroform içerisindeki doksorubisin çözeltisi misellere eklenerek, doksorubisinin misellere hapsedilmesi sağlanmaktadır. Kloroformun oda sıcaklığında zamanla buharlaşması ile etkin maddenin misel çekirdeğine hapsolmesi

gerçekleşmektedir. Yağ/su emülsiyonu yönteminde P7-30, P7-60 ve P7-70 polimerleri için farklı etkin madde polimer oranlarında 200 nm altında miseller elde edilmiştir ve yaklaşık % 48'e varan doksorubisin yükleme etkinlikleri elde edilmiştir. P7 polimeri ile ise yağ/su emülsiyonu yönteminde çubuk şekilli miseller elde edildiği için misel büyüklükleri ölçüldüğünde oldukça yüksek partikül büyüklükleri veya yüksek polidispersite indeksleri elde edilmiştir.

Peptit-18 ile hedeflendirilmiş miseller misel büyüklüğü ve doksorubisin yükleme kapasitesi açısından daha iyi sonuçların elde edildiği yağ/su emülsiyonu yöntemi ile hazırlanmıştır. Peptit-18 bağlı polimerin % 20 (a/a) oranında misel formülasyonuna katılması ile hazırlanan misellerin misel büyüklüğü peptit-18 ile modifiye edilmemiş misellere göre daha yüksek bulunmuştur ancak enkapsülasyon etkinliği modifiye edilmemiş misellere yakın bulunmuştur.

5.6. Misel Formülasyonlarının Karakterizasyonu

5.6.1. Kritik Misel Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Miseller ilaç taşıyıcı sistemler olarak intravenöz yolla verildiklerinde aşırı bir seyreltmeye maruz kalırlar. Bu nedenle misellerin termodinamik stabilitesini belirleyen CMC değerlerinin bilinmesi oldukça önemlidir. CMC değerinin üstündeki bir konsantrasyonda miseller termodinamik olarak dayanıklıdır dolayısıyla in vivo misel dayanıklılığının sağlanması için polimer konsantrasyonunun CMC değerinin altına düşmemesi önemlidir. Bazı durumlarda daha konsantre veya daha yüksek bir hacimdeki bir misel çözeltisinin intravenöz olarak verilmesi ile enjeksiyondan hemen sonra kopolimer konsantrasyonunun CMC değerinin altına düşülmesi önlenemez. Ancak düşük bir CMC değerine sahip bir kopolimer ile ilaç taşıyıcı sistem tasarlanması seyreltmeye karşı daha dayanıklı bir sistem elde etmek için daha yararlıdır (135).

CMC değerleri P7 için 2×10^{-5} , P7-30 için $1,6 \times 10^{-3}$, P7-60 için $0,8 \times 10^{-3}$ ve P7-70 $0,5 \times 10^{-3}$ mg/mL olarak hesaplanmıştır. Lee ve arkadaşları (256) P7 polimeri ile benzer yapıdaki blok kopolimerlerin (PEtOx-b-PCL), CMC değerlerinin $1-6,2 \times 10^{-3}$ mg/mL arasında bulmuşlardır. Blok kopolimerlerde PEtOx polimerinin miktarı sabit tutulup ağırlıkça PCL miktarı arttıkça daha düşük CMC değerleri elde ettiklerini bildirmişlerdir. Diğer bir çalışmada sentezlenen PEtOx-b-PCL polimerlerinin CMC

değerleri $1,8-3,9 \times 10^{-3}$ mg/mL arasında bulunmuş olup, hidrofobik bloğun uzunluğu arttıkça CMC değerinin düştüğü bildirilmiştir (141). Kim ve arkadaşları (257) ise kopolimerin ağırlıkça PCL yüzdesinin %0,09-30 arasında değiştiği PEtOx-b-PCL polimerlerinin CMC değerlerini $4,6-35 \times 10^{-3}$ mg/mL arasında bulmuşlardır. Qui ve arkadaşları (228) ise sentezledikleri PEtOx-b-PCL polimerinin CMC değerini 12×10^{-3} mg/mL olarak bildirmişlerdir. Literatür bulguları değerlendirildiğinde hidrofobik bloğun ağırlıkça oranının daha yüksek olduğu polimerlerin CMC değerinin daha düşük olduğu görülmüştür. P7 polimerinin hidrofobik bloğu toplam polimerin ağırlıkça yaklaşık %19'unu oluşturmaktadır ve CMC değeri literatür ile karşılaştırıldığında daha düşük bulunmuştur. P7 polimerinin CMC değerinin düşük olması tasarlanan polimerin hidrofobik bloğunun hidrofilik bloğa oranının istenen CMC değerlerini elde etmek için uygun olduğunu göstermektedir. P7-30, P7-60 ve P7-70 polimerlerinin CMC değerleri literatürdeki çeşitli blok polimerlerin bulguları (141, 256) ile karşılaştırılabilir seviyede olup PEtOx-ko-PEI-b-PCL yapısı ile aynı yapıda polimerlere literatürde henüz rastlanmamıştır. PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerine benzer blokları içeren fakat farklı bir yapıda olan PEtOx-PLA-g-PEI polimeri için ise CMC değeri $1,63 \times 10^{-2}$ mg/mL olarak bildirilmiştir (151). P7-30, P7-60 ve P7-70 polimerlerinin CMC değerleri kendi aralarında karşılaştırıldığında, CMC değerleri arasında büyük bir fark görülmemekle birlikte polimerdeki PEI miktarı arttıkça daha düşük bir CMC değerinin elde edildiği görülmektedir. Bu durum PEtOx polimerine göre daha hidrofobik olan PEI polimerinin toplam polimerdeki miktarının artarken, hidrofilik PEtOx polimerinin miktarının azalması sonucu polimerin hidrofobikliğinin artması ile açıklanabilir.

Kullanılan polimerlerin düşük CMC değerleri misellerin intavenöz olarak verilmesi durumunda kan dolaşımındayken aşırı seyreltmeye rağmen misel yapısını koruyacaklarının göstergesidir. Düşük CMC değerlerine sahip miseller kan dolaşımındayken misel yapılarını koruyacakları için hedef bölgeye varmadan erken etkin madde salımı önlenebilecektir. Ayrıca seyreltmeye dayanıklı miseller ünimerlerine ayrılmadıkları için böbreklerden atılmaları gecikecek ve dolayısıyla kanda kalış süresi uzatılmış sistemlerin eldesi mümkün olabilecektir.

5.6.2. Misel Oluşumunun ¹H-NMR ile Doğrulanması

Blok kopolimerlerin farklı çözücülerdeki davranışları ¹H-NMR spektroskopisi ile misel oluşumunun doğrulanmasına olanak sağlamaktadır. Polimerler organik çözücü (CDCl₃) içindeyken alınan spektrumlarda polimerin tüm bloklarına ilişkin pikler görülebilirken, polimer D₂O içindeyken misel oluşumu nedeniyle polimerlerin hidrofobik bloklarına ilişkin pikler kaybolmakta ya da şiddetleri azalmaktadır. Şekil 4.12.-4.15. incelendiğinde hidrofobik PCL bloğuna ilişkin piklerin D₂O içindeki spektrumlarda kaybolduğu ya da şiddetinin azaldığı görülmektedir. Lee ve arkadaşları (141) PEtOx-b-PCL polimerinin ¹H-NMR ile analizinde D₂O içindeki spektrumlarda, bulgularımıza benzer şekilde PCL polimerine ait piklerin kaybolduğunu bildirmişlerdir. Bu durum D₂O içinde blok kopolimerlerin misel oluşturması nedeniyle PCL polimerinin sınırlı hareket kabiliyetine bağlanmıştır. P7, P7-30, P7-60 ve P7-70 polimerlerinin çekirdek-kabuk yapısına sahip miseller oluşturduğu ¹H-NMR analizi ile doğrulanmıştır.

5.6.3. Misellerin Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

P7, P7-30, P7-60 ve P7-70 polimerleri ile hazırlanan etkin madde içermeyen misellerin partikül büyüklükleri 200 nm altında elde edilmiştir (Tablo 4.5.). En düşük misel büyüklüğü (39,7±0,5 nm) P7 polimeri ile elde edilmiş olup, polimerlerdeki PEI oranı arttıkça partikül büyüklüğünün de arttığı görülmektedir. PEtOx₁₀₇₀₀ polimerinin %30 hidrolizi ile elde edilen P7-30 polimeri ile 100 nm'nin altında miseller (59,5±0,4 nm) elde edilebilirken daha yüksek PEI oranları misel büyüklüğünün 100 nm'nin üzerine çıkmasına neden olmuştur. Partikül büyüklükleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,0001). Misellerin polidispersite indeksleri dört polimer için de kabul edilebilir bir değer olan 0,3 ve altında (258) bulunmuştur. Zeta potansiyel değerleri PEtOx-b-PCL yapısındaki P7 polimeri ile hazırlanan misel için negatifken, polimer yapısına katyonik PEI grubunun katılması ile pozitif değerlere ulaşmıştır. En yüksek PEI oranına sahip P7-70 polimeri için 48,7±2,5 mV gibi yüksek bir pozitif zeta potansiyel değeri elde edilmiştir.

P7 polimeri için literatürde daha önce benzer yapıda polimerlerle yapılan çalışmalar mevcuttur. Lee ve arkadaşları (256) PEtOx-b-PCL polimerleri ile çözücü buharlaştırma yöntemini kullanarak 149-192 nm (PDI=0,13-0,36) arasında

büyükliklere sahip miseller elde etmişlerdir. Polimerdeki PCL yüzdesi arttıkça daha yüksek partikül büyüklükleri elde edilmiştir (256). Diğer bir çalışmada (141) PEtOx-b-PCL yapısındaki polimerlerle diyaliz yöntemi kullanarak 19,4-22,5 nm arasında (PDI= 0,08-0,16) miseller elde edilmiştir. Bu çalışmada polimerlerin bloklarının birbirine oranı bir önceki çalışma ile benzer olup blok zincirlerinin uzunlukları farklıdır. Ayrıca polimer yapısındaki PCL oranının değişmesinin misel büyüklüğünü önemli derecede etkilemediği görülmüştür (141). P7 polimeri ile de ince film hidrasyonu yöntemiyle misel büyüklüğü açısından literatürdeki bulgulara yakın sonuçlar elde edilmiştir. Literatür bulgularıyla birlikte sonuçlar değerlendirildiğinde polimerin yapısının, blokların birbirine oranının ve molekül ağırlıklarının ve hazırlama yönteminin misel büyüklüğüne etkili olabileceği görülmektedir.

İnce film hidrasyonu ile hazırlanan doksorubisin yüklü misel formülasyonlarının partikül büyüklükleri F1 formülasyonu için $99,7 \pm 0,7$ (PDI=0,4), F2 için $170,4 \pm 5,7$ (PDI=0,5), F3 için $328,4 \pm 9,0$ (PDI=0,4) ve F4 için $396,0 \pm 43,8$ (PDI=0,6) nm olarak bulunmuştur. Partikül büyüklükleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). En küçük partikül büyüklüğü yapısında PEI içermeyen P7 polimeri ile elde edilmiştir. Farklı oranlarda PEI içeren polimerlerle hazırlanan F2-F4 formülasyonları için partikül büyüklüğü polimerdeki PEI oranı arttıkça artmıştır. Zeta potansiyel değerleri etkin madde içermeyen misellerle karşılaştırıldığında doksorubisin yüklü miseller için daha yüksek bulunmuştur. Bu durum misellerin yüzeyine adsorbe olmuş pozitif yüklü doksorubisinin varlığı ile açıklanabilmiştir (259). Doksorubisinin antrasiklin halkası hidrofobik çekirdekte yerleşmiş şekilde ve amin grubu yüzeyde açığa çıkmış şekilde, çekirdek-kabuk arayüzeyinde dağıldığı daha önce gösterilmiştir (260). Bu durumda ince film hidrasyonu yöntemi ile hazırlanan doksorubisin yüklü misellerde, doksorubisinin misel yüzeyinde bulunan amin grubunun pozitif yükünden dolayı, etkin madde içermeyen misellerden daha yüksek bir zeta potansiyel değeri elde edildiği yorumu yapılabilmektedir.

Yağ/su emülsiyonu yöntemi ile hazırlanan misellerin partikül büyüklükleri incelendiğinde (Tablo 4.7.) P7 polimeri ile hazırlanan F5-F6 formülasyonlarının misel büyüklüklerinin 1000 nm'in üstünde olduğu F7 formülasyonunun ise misel büyüklüğünün 156,8 nm olup PDI değerinin 1 olduğu görülmektedir. Bu partikül

büyüklikleri ve partikül büyüklüğü dağılımı ilk olarak akla agregasyonu getirmiştir ancak TEM analizi sonucu F7 formülasyonunun çubuk şeklinde morfolojiye sahip miseller olduğunu göstermiştir. Zeta potansiyel F5-F7 formülasyonları için aynı polimerle hazırlanmış etkin madde içermeyen misele göre daha yüksek ve pozitif değerlerde bulunmuştur. Bu durum doksorubisinin misel kabuk-çekirdek arayüzeyine yerleşmesi ve doksorubisinin NH₂ grubunun yüzeyde pozitif yüklenmesi ile açıklanabilir (259).

PEtOx-b-PCL polimerleri ile doksorubisin yüklü miseller hazırlamak için Qiu ve arkadaşları (228) diyaliz yöntemini kullanmışlardır. Elde ettikleri misel büyüklükleri 159-187 nm (PDI=0,134-0,175) arasında olup zeta potansiyel değerleri -5,1-2,1 arasındadır. Hsiue ve arkadaşları (215) ise benzer yapıda bir polimer olan PEtOx-b-PLA ile doksorubisin yüklü miselleri diyaliz yöntemi ile hazırlamışlardır ve 170-210 nm arasında bir partikül büyüklüğü elde etmişlerdir. Zhao ve arkadaşları (230) da PEtOx-b-PLA ile doksorubisin yüklü miselleri diyaliz yöntemi ile hazırlamışlardır ve partikül büyüklüğünü 41,7 nm (PDI=0,28) olarak bildirmişlerdir. Literatür bulguları farklı yöntem ve benzer polimerlerle farklı büyüklüklerde miseller elde edildiğini ortaya koymaktadır ancak etkin madde yüklenmesi ile morfoloji değişimi PEtOx-b-PCL polimeri için henüz bildirilmemiştir.

P7 polimeri ile hazırlanan etkin madde içermeyen miseller küresel bir yapıdayken, bu misellere yağ/su emülsiyonu yöntemi ile doksorubisin hapsedilmesi sonucu çubuk şekilli miseller oluşmuştur. Partikül şeklinin hücre alımı ve in vivo dağılımı etkilediği bilinmektedir (261). Geng ve arkadaşları (262) filament şekilli polimerik misellerin küresel misellerle karşılaştırıldığında kanda kalış sürelerinin 10 kat daha uzun olduğunu bildirmişlerdir. Champion ve Mitragotri (263) ise makrofajlar tarafından hücre içine alımın partikülün ilk temas noktasında teğet açılarla ölçülen lokal partikül şekli ile belirlendiğini bildirmişlerdir. Küresel partiküller makrofajlar tarafından hızlı bir şekilde fagosite edilirken, eliptik disklerin uzun ekseninden makrofajlarla ilk temasını gerçekleştirmesi durumunda fagosite edildiklerini, eğer ilk temas düz yüzeyi ya da kısa ekseninden olursa fagositozun gerçekleşmediğini bildirmişlerdir (263). Poli(etiloksazolin) türevi polimerler ile hazırlanan misellerin etkin madde hapsedilmesi sonucu morfoloji değişimine uğradığı daha önce de araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (227, 264). Schulz ve arkadaşları (227)

hidrofilik blok olarak PMeOx ve hidrofobik blok olarak poli(2-n-bütül-2-oxazoline) ya da poli(2-n-nonil-2-oksazolin) kullanarak sentezledikleri triblok kopolimerlerle hazırladıkları misellere paklitaksel yüklenmesinin misellerin morfolojisinin çubuktan küresele dönüştürdüğünü bildirmişlerdir. Wan ve arkadaşları (264) poli(2-metil-2-oksazolin-blok-2-bütül-2-oksazolin-blok-2-metil-2-oksazolin) polimerini kullanarak hazırladıkları misellere etopozid yüklediklerinde veya etopozid ve sisplatin birlikte yüklediklerinde misellerin küreselden çubuk şekline dönüştüğünü bildirmişlerdir. Etopozid ve sisplatin birlikte hapsetmiş misellerin, etkin maddeleri tek başına içeren miseller, bunların kombinasyonu ya da serbest etkin madde kombinasyonuna göre küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hayvan modellerinde üstün antitümör etki gösterdiğini bildirmişlerdir (264). Literatür bulguları değerlendirildiğinde çubuk şekilli misellerin yüksek etkin madde yükleme kapasitesi sağlaması, makrofajlarla etkileşimlerinin daha az olması ve bu misellerle daha iyi bir farmakokinetik ve artmış bir tümör dağılımının elde edilebilmesi, çubuk şekilli miselleri kanser tedavisi için araştırmaya değer kılmaktadır. Bu nedenle F7 formülasyonunun hücre kültüründe de değerlendirilmesine karar verilmiştir.

PEI içeren polimerlerle yağ/su emülsiyonu yöntemi kullanılarak hazırlanan misellerin büyüklükleri incelendiğinde (Tablo 4.7.) F11-F13 formülasyonları dışında 100 nm altında partikül büyüklükleri elde edilmiştir. Partikül büyüklükleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Her polimer için denenen üç farklı polimer:etkin madde oranında en düşük partikül büyüklüğü 10:2,5 (mg/mg) polimer etkin madde oranında elde edilmiştir. P7-60 ve P7-70 polimerleri ile hazırlanan doksorubisin hapsedilmiş miseller aynı polimerlerle hazırlanan etkin madde içermeyen misellere göre daha küçük partikül büyüklüklerine sahiptirler. Zeta potansiyel değerleri ise etkin madde yüklü miseller için aynı polimerlerle hazırlanan etkin madde içermeyen misellerden daha düşük (P7-30ve P7-70) veya aynı seviyede (P7-60) elde edilmiştir. Bu durum misellerin etkin madde yüklenmesi ile daha iyi paketlenmesini ve PEI polimerinin –NH gruplarının bir kısmının sulu ortamla temas etmediğini ve doksorubisin molekülünün de miselin hem kabuk hem de çekirdek kısımları arasında dağılmak yerine tamamen misel çekirdeğine hapsolarak sulu ortamla bağlantısının olmadığını ya da çok azaldığını düşündürmektedir. Misel stabilitesinin etkin madde yüklenmesi ile artabildiği bilinmektedir (87).

Doksohubisinin antrasiklin grupları arasındaki π - π etkileşimlerinin doksohubisinin misel çekirdeğine yüklenmesinin stabilizasyonunu ve miselin kendisinin stabilizasyonu sağladığı düşünülmektedir (144). Ayrıca PEI grubundaki sekonder amin grupları ile doksohubisinin karbonil, hidroksil ve amin gruplarının arasında moleküller arası hidrojen bağlarının oluşması ile misel stabilitesinin arttığı düşünülmektedir.

PEI içeren polimerlerle hazırlanan formülasyonlardan polimer:etkin madde oranı 10:2,5 (mg/mg) olan F9, F12 ve F15 formülasyonları düşük partikül büyüklükleri (F9:66,4 nm, F12:105,7 nm, F15:71,8 nm) ve dar partikül büyüklüğü dağılımları (PDI<0,3) nedeniyle hücre kültürü çalışmalarında değerlendirilmek üzere seçilmişlerdir. Bu formülasyonlar kullanılarak farklı oranlarda pozitif yük taşıyan misellerin hücreler üzerindeki etkisini değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

Peptit-18 ile hedeflendirilmiş misellerin hazırlanması için kullanılacak polimer partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyel ve etkin madde yükleme etkinliği, in vitro salım ve etkin madde içermeyen misellerin L929 hücreleri üzerindeki etkileri gibi bulgular değerlendirilerek seçilmiştir. En küçük partikül büyüklüğü (66,4 nm) ve yüksek bir etkin madde yükleme etkinliği (%18,3±4,2) F9 formülasyonu ile elde edilmiştir. F9 formülasyonu zeta potansiyel değeri açısından F12 ve F15 formülasyonlarından daha düşük, F7 formülasyonundan daha yüksek bir pozitif değere sahiptir. F9 formülasyonunun pozitif yükünün kaynağı PEI polimeri katyonik bir polimer olup PEI daha çok gen tranfeksiyonu çalışmalarında kullanılmaktadır fakat PEI pH duyarlı sistemlerde de kullanılabilir bir polimerdir (265). PEI yapısında bulunan amin grupları sayesinde asidik ortamlarda pozitif yüklenebilmektedir ve protonlanmış aminlerin birbirini itmesi sonucu misel yapısı şişerek bozulmaktadır. PEI aynı zamanda nanopartikül endositoz ile hücre içine alındığında ve endozomdan asidik lizozom kompartmanına geçildiğinde, doyurulmamış amino grupları ile, v-ATPaz proton pompası tarafından sağlanan protonları tutabilme kabiliyetine sahiptir. Bu durum proton pompasının çalışmasını devam ettirmesini sağlar ve her proton başına bir Cl⁻ ve bir su molekülü tutulur. Devamında meydana gelen lizozom şişmesi ve parçalanması nanopartikülün sitoplazmaya bırakılmasını sağlar. PEI'nin bu etkisi proton-sünger adı ile anılmaktadır ve bu etki endositoz ile alınan nanopartikülün lizozomda degradasyonunu önlemektedir (266).

PEI polimerinin PEtOx polimerinin hidrolizi ile kolayca elde edilebilmesi misel hazırlanacak blok kopolimerler tasarlanırken PEI yapısını içeren polimerlerin de sentezlenmesiyle PEI'nin katyonik özelliğinden faydalanmayı düşündürmüştür. Her ne kadar pozitif yük misellerin hücrelerle etkileşimini sağlayıp etkinliğini arttırsa da katyonik yük aynı zamanda polimerin toksisitesini de arttırmaktadır (267). Ayrıca yüzey yükünün misellerin in vivo kaderini etkileyebileceği de göz önüne alınmalıdır (261). Pozitif yüklü nanopartiküllerin akciğer, karaciğer ve dalak makrofajları tarafından tutuluma nötr ve hafif negatif yüklü partiküllere göre daha yatkın oldukları ve nötr ve hafif negatif yüklü (≤ -10 mV) partiküllerin daha uzun bir kan dolaşım süresine sahip oldukları bildirilmiştir (268). Fagositik alımdan kaçmak için zeta potansiyelin 15 mV altında tutulması gerektiği He ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (269). F9 formülasyonunun zeta potansiyelinin yaklaşık 16 mV olduğu düşünüldüğünde, olası biri intravenöz uygulamada makrofajlar tarafından tutulma yatkınlığı düşük, ancak aynı zamanda doksorubisinin hapsedilmesine ve pH duyarlı salıma katkıda bulunabilecek ve negatif hücre zarı ile etkileşimi sağlayabilecek miktarda PEI içeren bir formülasyon elde edildiği görülebilir. Bütün bunlar göz önüne alındığında P7-30 polimerine peptit-18 konjuge edilmiş ve elde edilen polimer, P7-30 polimeri ile %20 oranında karıştırılarak peptit ile hedeflendirilmiş miseller hazırlanmıştır.

Peptit-18 ile konjuge polimerin yapıya katılması ile elde edilen boş misel formülasyonunun partikül büyüklüğünün P7-30 polimeri ile hazırlanan etkin madde içermeyen miselden daha yüksek olduğu, zeta potansiyel değerinin ise daha düşük olduğu görülmektedir. Qiu ve arkadaşları (228) da folik asit konjuge ettikleri PEtOx-b-PCL polimeri ile hazırlanan misel büyüklüğünü (175 nm), folik asit konjuge etmedikleri polimerle hazırlanan misele (162 nm) göre daha yüksek bulmuşlardır.

Doksorubisin yüklü peptit-18 ile hedeflendirilmiş miseller hazırlandığında partikül büyüklüğünün 148,2 nm (PDI: 0,5) ve zeta potansiyel değerinin 32,1 mV olduğu görülmektedir. İlaç yüklenmesi ile partikül büyüklüğü küçülmüştür ancak PDI 0,3'ün üzerinde bulunmuştur. Zeta potansiyel değerinin ise doksorubisinin moleküler olarak tamamen miselin çekirdek kısmında bulunmayıp, kabuk-çekirdek yapısında dağılmış bir vaziyette yer alması ve miselin kabuk kısmında yer alan doksorubisinin

amino gruplarının protonlanması nedeniyle etkin madde içermeyen miselle göre daha pozitif olduğunu göstermiştir.

5.6.4. Doksorubisinin Misellere Yükleme Etkinliği

Bölüm 4.5.4’te verilen Tablo 4.9. incelendiğinde ince film hidrasyonu yöntemi ile hazırlanmış doksorubisin hapsedilmiş misellerin enkapsülasyon etkinliği ve etkin madde yükleme kapasiteleri görülmektedir. İnce film hidrasyonu yöntemi ile hazırlanan misellerin enkapsülasyon etkinliği F1, F3 ve F4 formülasyonları için %22,9’un altında bulunmuştur. F2 formülasyonu içinse enkapsülasyon etkinliği %58,3 olarak bulunmuştur. Miseller hazırlanırken film hidrasyonu sonrası 0,22’lik filtreden süzme aşaması güçlükle gerçekleştirilmiştir. Bu durum oluşan doksorubisin yüklü misellerin partikül büyüklüğünün oldukça yüksek olduğunu ya da agregasyon meydana geldiğini ve süzme ile etkin maddenin büyük bir kısmının kaybedildiğini düşündürmektedir. Ayrıca serbest doksorubisini uzaklaştırmak için yapılan amicon santrifüj filtreleri ile yıkama işlemi sırasında misel yüzeyine adsorbe olan doksorubisinin uzaklaştırılması ya da bu işlem sırasında yeterince stabil olmayan misellerin dağılıp doksorubisini açığa çıkarmaları ve açığa çıkan doksorubisinin filtrasyon ile uzaklaştırılması sonucu etkin madde kaybı yaşandığı düşünülmektedir. F2 formülasyonu ile diğer formülasyonlara göre daha yüksek bir miktarda doksorubisin hapsedilebilmiştir. Bu durum daha stabil miseller oluşması ve hazırlama aşamasında çeşitli aşamalarda daha az madde kaybı yaşanması ile açıklanabilir. Gaspar ve arkadaşları (151) ince film hidrasyonu yöntemi ile PEtOx-PLA-g-PEI polimerini kullanarak doksorubisin yüklü miseller hazırlamışlardır. Enkapsülasyon etkinliğini %63 civarında etkin madde yükleme etkinliğini ise mg polimer başına yaklaşık 36 µg olarak bildirmişlerdir. Gaspar ve arkadaşları (229) diğer bir çalışmada PEtOx-PLA-g-PEI-SS polimerini kullanarak ince film hidrasyonu yöntemi ile %74 civarında doksorubisin enkapsülasyonunu sağladıklarını bildirmişlerdir. Qiu ve arkadaşları (228) ise diyaliz yöntemi ile PEtOx-b-PCL polimerini ve folat hedeflendirilmiş PEtOx-b-PCL polimerlerini kullanarak hazırladıkları doksorubisin yüklü miseller için enkapsülasyon etkinliğini %61,8-77,4 arasında etkin madde yükleme kapasitesini %10,2-12,9 arasında bulmuşlardır.

Tablo 4.10. incelendiğinde yağ/su emülsiyonu yöntemi ile hazırlanan misellerin enkapsülasyon etkinliği ve etkin madde yükleme kapasiteleri görülmektedir. Bu yöntem ile başlangıçta kullanılan etkin madde miktarı arttıkça daha çok etkin madde hapsedilebilmiştir. Polimer etkin madde oranı 10:1,25 (mg/mg) olarak hazırlanan formülasyonlarda enkapsülasyon etkinliği diğer formülasyonlara göre daha düşük bulunmuştur. Bu durum misellerin çekirdeğine hapsolan doksorubisin miktarı azaldıkça misellerin daha kararsız bir hale geldiğine işaret etmektedir. Misellerin kararlılığının serbest doksorubisini uzaklaştırmak için amicon tüpleri ile yapılan santrifüj işlemi sırasında misellerden ayrılan doksorubisin miktarını etkilediği ve bu nedenle polimer:etkin madde oranı 10:1,25(mg/mg) olan formülasyonlarda daha kararsız miseller elde edildiği için enkapsülasyon etkinliğinin düşük bulunduğu düşünülmektedir. Ayrıca partikül büyüklüklerinin verildiği Tablo 4.7. incelendiğinde çubuk şekilli miseller oluşturan P7 polimeri ile hazırlanan formülasyonlar dışında yüklenen etkin madde miktarı arttıkça misel büyüklüklerinde önemli bir değişim olmadığı görülmektedir. Bu yöntem ile daha stabil miseller elde edilmiştir. Hazırlama işlemi sırasında yapılan amicon santrifüj filtreleri ile yıkama işlemi ile filtrasyon ile uzaklaşan serbest doksorubisin miktarının az olduğu filtrelenen çözeltinin rengi takip edilerek görsel olarak da teyit edilmiştir. Bu yöntemde kloroform damlacıkları içinde bulunan doksorubisinin karıştırma esnasında hidrofobik misel çekirdeklerine geçişi ve sonrasında kloroformun zamanla buharlaşması ile iyi paketlenmiş miseller elde edilmiştir. Misel çekirdeğine hapsolan etkin madde miktarı arttıkça dış faktörlere karşı daha dayanıklı miseller elde edilmiştir. Doksorubisin misel çekirdeği ile arasındaki hidrofobik etkileşimler ve kendi antrasiklin halkaları arasındaki π - π etkileşimleri misel çekirdeklerine başarı ile yüklendiğini düşündürmektedir. Ortamdaki etkin madde miktarı arttıkça π - π etkileşimleri sayesinde misel çekirdeğine daha fazla etkin madde hapsedilmesi sağlanmıştır. Kataoka ve arkadaşları (144) yağ/su emülsiyonu yöntemini kullanarak doksorubisini benzer şekilde yüksek oranlarda misellere yüklemeyi başarmışlardır. Doksorubisinin misel çekirdeğinde geri dönüşebilir bir reaksiyonla dimer oluşturduğunu, bu dimerlerin de misel stabilitesini arttırdığını bildirmişlerdir.

5.6.5. Doksorubisinin Misellerden In Vitro Salımı

Doksorubisinin pH 5 ve pH 7,4 tamponlarında salım profilleri incelendiğinde (Şekil 4.16.-4.21.) tüm formülasyonlar için pH'ya duyarlı bir salım olduğu görülmektedir. F7 formülasyonu için 24 saatte pH 7,4'te salım %30 civarındayken ve pH 5'te salım %80'e ulaşmıştır. F9 formülasyonu için 24 saatte pH 7,4 tamponu için salım %33 civarındayken ve pH 5'te salım %47'ye ulaşmıştır. F9 formülasyonunun pH 5 tamponundaki salımı F7 ortamındaki ile karşılaştırıldığında, F7 formülasyonunun aynı süre zarfında daha çok doksorubisin salımı gerçekleştiği görülmektedir. F9 formülasyonu F7 formülasyonuna kıyasla etkin madde yükleme kapasitesi yüksek bir formülasyondur. Misel çekirdeğinde yüksek oranda doksorubisin bulunmasının π - π etkileşimleri ile miselin kararlılığını arttırdığı düşünüldüğünde, F9 formülasyonundan salımın daha yavaş olması bu misellerin daha kararlı olması ile açıklanabilir. F12 ve F15 içinse salınan doksorubisin miktarı açısından iki ortam arasındaki fark ilk 24 ve 48 saatte belirginken daha sonra birbirine yaklaşmıştır. F12 ve F15 misel formülasyonları PEtOx polimerinin %60 ve 70 hidrolizi ile elde edilen PEtOx-ko-PEI polimerini içermektedir. Bu miselerde PEtOx polimerinin miktarı F7 ve F9'a göre daha azdır ve PEI grubunun miktarı daha fazladır. Misellerin pH 7,4 ortamında belli bir süre sonunda kararlılığını koruyamaması ve pH 5 ortamındaki salıma yaklaşması polimerlerin kimyasal yapısındaki bu farklılık ile açıklanabilir. Bulgular PEI polimerinin pH 7,4'te dahi kısmen protonlanmasının (270) zamanla misel stabilitesini bozup, pH 7,4 ortamındaki salımın artmasına neden olduğunu düşündürmüştür.

Hsiue ve arkadaşları (215) doksorubisin yüklü PEtOx-b-PLA misellerinin salım profillerini pH 7,4 ve pH 5 tampon çözeltilerinde incelediklerinde, PH 7,4'te %20'lik salımın ilk aşamada elde edildiğini ve 8 günlük deney süresince salımın yaklaşık %40 civarında bir platoda seyrettiğini, pH 5 tamponunda ise ilk 24 saat içinde % 65'in üzerinde bir salım gerçekleştiği, 8 günlük deney sonunda ise %100 salıma ulaştığını bildirmişlerdir. PEtOx yapısında bulunan tersiyer amin yapısının protonlanması sonucu molekül içi ve moleküller arası etkileşimler meydana gelmesi ve bunun sonucunda büyük agregatlar meydana gelmesi nedeniyle misellerin dağılıp deforme olmasının PEtOx polimerinin pH'ya duyarlı olmasını sağladığı şeklinde bir yorum yapmışlardır (248). Qiu ve arkadaşları (228) da doksorubisin yüklü folat

hedeflendirilmiş PEtOx-b-PCL misellerinin salımının pH'ya duyarlı olduğunu, pH 7,4'te 60 saat sonunda salım %31'e ulaşırken pH 5'te 60 saat sonunda %64,8'e ulaştığını bildirmişlerdir. PEI polimerini pH duyarlı bir polimer olarak misel yapısında kullanan araştırmacılar 6 gün sonunda pH 7,4'te %32 doksorubisin salımı elde ederek pH 5'te %65 salım elde ettiklerini bildirmişlerdir (265). PEI polimerinin amin gruplarının asidik ortamda protonlanması sonucu meydana gelen konformasyonel değişikliklerin misellerin şişmesine neden olduğunu ve bunun sonucu olarak pH 5 ortamında daha hızlı bir salım gerçekleştiğini bildirmişlerdir (265).

5.6.6. Misellerin TEM ile Görüntülenmesi

F7, F9, F12 ve F15 formülasyonları ile peptit-18 ile hedeflendirilmiş misel formülasyonlarının Şekil 4.21.-4.23.'te verilen TEM görüntüleri incelendiğinde genel olarak grid üzerine damlatılan örnek kururken misellerin büzüşmesi ya da çökmesi gibi sebeplerden hidrodinamik çaplarından daha küçük misel büyüklükleri görülmüştür (265). F7 formülasyonunun doksorubisin yüklenmesi sonucu küresel morfolojiden çubuk şekline geçişi TEM görüntüleri ile net bir şekilde ortaya konmuştur. Qiu ve arkadaşlarının (228) PEtOx-b-PCL polimeri ile hazırladığı doksorubisin yüklü misellerin F7 formülasyonundan farklı olarak küresel bir morfolojide oldukları görülmüştür. İlaç yüklü misellerin kururken boş misellere göre daha çok büzüşükleri ve bu nedenle boş misellerden daha küçük büyüklüklerde görüntülandıkları düşünülmektedir. F15 formülasyonunun görüntüleri incelendiğinde (Şekil 4.22.) agrege olmuş miseller görülmektedir. Misel dispersiyonu grid üzerine bırakıldıktan sonra, kururken suyun ortadan kalkması ile diğer polimerlerden daha hidrofobik olan P7-70 polimerinin misellerinin birleşip birbirlerine yapışmaları sonucu bu görüntülerin ortaya çıktığı düşünülmektedir. F7 dışındaki bütün formülasyonlar ile küresel benzeri şekillere sahip miseller görüntülenmiştir.

5.6.7. Misel Formülasyonlarının Stabilitesi

Miseller ile serum proteinleri arasında bir etkileşim olup olmadığı %10 FBS ile muamele sonrası partikül büyüklüğündeki değişimin izlenmesi ile (Şekil 4.24.) tespit edilmeye çalışılmıştır. F7 formülasyonu çubuk şekilli misellerden oluştuğu için sağlıklı bir ölçüm yapılamamıştır. F12 ve F15 formülasyonlarının serumla

muameleden kısa bir süre sonra çökmeye başladığı bu nedenle partikül büyüklüğünde büyük bir değişim olmadığı saptanmıştır. FBS ile etkileşiminin daha yüksek olması beklenen katyonik PEI oranı yüksek bu formülasyonların misel büyüklüğünün ilk zaman noktalarında yükselip daha sonra düşmesi, agregate olan partiküllerin çökmesi ve boyut ölçümünün sağlıklı yapılamamasına bağlanmıştır. F9 formülasyonunun ve peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü misellerin ise başlangıçtaki partikül büyüklüğü ilk 10 saat içinde kademeli olarak artmış ve ilerleyen zaman noktalarında büyük bir değişiklik görülmemiştir. F9 ve peptit hedeflendirilmiş misellerin %10 FBS içeren PBS ortamında göreceli olarak daha kararlı oldukları görülmektedir. Hsiue ve arkadaşları (215) doksorubisin yüklü PEtOx-b-PLA misellerini %5 BSA (sığır serum albümini) ile inkübe ettiklerinde, miseller ilk 30 saat daha kararlı iken 30 saat sonrası agregatların oluşmaya başladığını bildirmişlerdir.

Peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü misellerin kolloidal stabilitesi incelendiğinde 25°C’de ilk bir ay sonunda gözle görülür agregasyonlar olduğu görülmüştür ve partikül büyüklüğü ölçümleri agregate olarak çöken miseller yüzünden zamanla daha düşük sonuçlar vermiştir (Şekil 4.25.). 4°C’de ise misellerin partikül büyüklüğünde 6 ay süresince anlamlı bir değişme olmamıştır (Şekil 4.25.). Misellerin kolloidal stabilitesini koruması için 4°C’de saklanması uygun olduğu görülmüştür.

5.7. Hücre Kültürü Çalışmaları

5.7.1. Etkin Madde İçermeyen Misellerin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Araştırılması

L929 hücre canlılığı üzerine, P7, P7-30, P7-60 ve P7-70 polimerleri ile hazırlanan etkin madde içermeyen misellerin etkisi genel olarak yüksek ve düşük konsantrasyonlarda birbirine yakın bulunmuştur (Şekil 4.27-4.29.). Katyonik PEI polimerinin toksisitesinin molekül ağırlığına, yük yoğunluğuna ve lineer veya dallı PEI yapısına olmasına göre değiştiği daha önce bildirilmiştir (271). Fernandes ve arkadaşları (272) PEtOx₁₀₀₀₀ polimerini %30, %70 ve %96 oranda hidroliz ederek elde ettikleri lineer PEI polimerlerinin toksisitesini HeLa hücreleri üzerinde araştırmışlardır. 1 mg/mL polimer konsantrasyonu ve 24 saatlik inkübasyon sonunda %30 ve %70 oranında hidroliz ile elde edilen polimerlerin toksik olmadıklarını ve

%96 oranda hidroliz olan polimerin ise canlılığı %8,7'ye kadar düşürdüğünü bildirmişlerdir. PEI oranının en yüksek olduğu polimer olan P7-70 polimeri ile hazırlanan miseller, diğer misellerden daha fazla % canlılık değerlerini düşürmüştür. Katyonik PEI polimerini en yüksek oranda içeren P7-70 polimeri ile hazırlanan misellerin diğer misellere göre daha düşük canlılık sonuçları vermesi polimerin kimyasal yapısı ile uyumlu olarak değerlendirilmiştir

24, 48 ve 72 saatlik canlılık sonuçları birarada değerlendirildiğinde, P7, P7-30, P7-60 polimerleri ile hazırlanan misellerin % hücre canlılıklarını inkübasyon süresine bağlı olarak önemli bir derecede düşürmediği görülmüştür. Hücre canlılığı P7, P7-30, P7-60 miselleri için her üç inkübasyon süresinde yaklaşık %50 ve üzerinde bulunmuştur. Hücre canlılığı sağlıklı hücrelerin mitokondrilerinin metabolik aktivitesinin ölçülmesine dayanan MTT testi ile değerlendirilmiştir. Bu nedenle kopolimerlerin sitotoksik etkisinin, hücre proliferasyonunu durdurmalarından mı yoksa hücre ölümüne sebep olmalarından mı kaynaklandığı net olarak belirlenememiştir. Farklı molekül ağırlıklara sahip ve farklı mol oranlarında PEI içeren PEtOx-PEI polimerlerinin sitotoksitesini değerlendiren araştırmacılar propidyum iyodür ile boyanan ölü hücreler varlığında optik dansitenin 48 saat sonunda 24 saate göre artmasının polimerlerin sitotoksik etkisinin hücre proliferasyonunun inhibisyonundan ziyade hücre ölümü kaynaklı olduğunu bildirmişlerdir (273). Ayrıca 3T3 fare fibroblastları, pankreas β TC3 hücreleri ve fare lenfoid makrofajları P388.D1 hücrelerini kullanarak PEtOx-PEI polimerlerinin sitotoksitesini değerlendiren araştırmacılar hidroliz derecesinin artırılması ile bütün hücre tiplerinde canlılığın düştüğünü bildirmişlerdir. Farklı molekül ağırlıklarına sahip PEtOx-PEI polimerlerinin 24 saatlik inkübasyonda ve 5 mg/mL konsantrasyonda 3T3 hücre canlılıkları üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı ve % 33 ve 60 mol oranında PEI içeren PETOx-co-PEI (9,6 kDa) polimerleri 20 mg/mL konsantrasyonda 3T3 hücreleri ile 24 ve 48 saat inkübe edildiğinde ise % 33 mol PEI içeren polimerin hücre canlılığını etkilemediği, %60 mol PEI içeren polimerin ise hücre canlılığını 24 saatte %64'ten 48 saatte %35'e düşürdüğünü bildirilmiştir (273). Gaspar ve arkadaşları ise (272) PEtOx-PLA-g-PEI₂₅₀₀ misellerinin insan fibroblast hücreleri (hFIBs) ve MCF-7 hücrelerinin canlılıkları üzerindeki etkisini 24, 48 ve 72 saat için araştırdıklarında 1 mg/mL konsantrasyonda dahi %90 ve üzeri canlılık görüldüğünü bildirmişlerdir. Literatür

bulguları çalışmamızda kullanılan polimerler ile kısmen benzer yapıda ve molekül ağırlıkta olan polimerler için farklı hücre hatlarında daha yüksek konsantrasyonlarda daha yüksek hücre canlılıkları elde edildiğini göstermektedir. Ancak bu çalışmalarda bildirilen artan PEI oranına bağlı olarak canlılığın düşmesi bulgularımızla uyumludur.

5.7.2. Doksorubisin Yüklü Misellerin Sitotoksitesinin Araştırılması

Hedeflendirilmemiş misellerin 24, 48, 72 saatlik hücre canlılığı sonuçları değerlendirildiğinde (Şekil 4.30.-4.32.) F7 boş misel formülasyonunun toksik bir etki göstermediği, F9, F12 ve F15 boş misel formülasyonları ile yaklaşık olarak %44-60 arasında hücre canlılığına sebep oldukları görülmüştür. F9, F12 ve F15 boş miselleri PEI içeren polimerlerle hazırlandıkları için toksik etki göstermeleri beklenmektedir. F9, F12 ve F15 boş misellerinin 48 saat ile 72 saat arasındaki bulgular birbirine çok yakın bulunmuştur. Bu durum ilk inkübasyon süresi boyunca belirli bir hücre sayısının ölümüne neden olduktan sonra canlılığı etkilemediklerini düşündürmektedir. F9, F12 ve F15 boş miselleri ile canlılık inkübasyon süresi arttıkça değişmezken doksorubisin yüklü F7, F9, F12 ve F15 miselleri için inkübasyon süresi arttıkça daha düşük canlılık değerleri elde edilmiştir. F7 formülasyonu için aynı inkübasyon süresinde uygulanan doksorubisin konsantrasyonu azaldıkça % hücre canlılığı değerleri artarken; F9, F12 ve F15 formülasyonları için aynı inkübasyon süresindeki farklı konsantrasyonlarda benzer canlılık sonuçları elde edilmiştir. Bu durum polimer kaynaklı toksisitenin doksorubisinin farklı konsantrasyonlarından kaynaklı sitotoksitesinin net bir şekilde görülmesini engellediğini düşündürmüştür. 24 ve 48 saatlik bulgularda doksorubisin yüklü tüm formülasyonlar için doksorubisin çözeltisinden daha düşük ya da aynı seviyede canlılıklar elde edilmiştir ancak 72 saat sonunda doksorubisin çözeltisi daha etkili bulunmuştur. Farklı derecelerde katyonik PEI içeren polimerlerin kullanılmasıyla hücre canlılıkları arasında büyük bir fark bulunmamıştır. Bu bulgular ışığında çubuk şekilli misel F7 formülasyonunun MCF-7 hücrelerinin büyümesini etkili bir şekilde inhibe ettiği, görülmüştür. F9, F12 ve F15 boş misellerinin PEI içermelerinin bir sonucu olarak hücreler üzerinde belirli bir düzeyde toksik etki gösterdikleri ancak bu toksik etkinin zamanla önemli derecede artmadığı ve doksorubisin yüklü F9, F12 ve F15 formülasyonlarının da MCF-7 hücrelerinin büyümesini etkili bir şekilde inhibe ettiği sonucuna varılmıştır.

Qiu ve arkadaşları (228) F7 formülasyonu ile benzer yapıda bir polimer kullanılan doksorubisin yüklü PEtOx-b-PCL miselleri ile folat hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü PEtOx-b-PCL misellerini, folat eksprese eden HeLa, KB ve MCF-7/ADR ve folat eksprese etmeyen A549 hücrelerine uygulamışlardır. Hedeflendirilmemiş doksorubisin yüklü PEtOx-b-PCL miselleri ile IC₅₀ (hücrelerin %50'sini inhibe eden konsantrasyon) değeri HeLa, KB hücrelerinde doksorubisin çözeltisinden yüksekken, folat hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü PEtOx-b-PCL miselleri ile IC₅₀ değerleri doksorubisin çözeltisiyle elde edilen değerlere yakın miktarlara düşmüştür. MCF-7/ADR hücrelerinde ise IC₅₀ değeri hedeflendirilmemiş misellerle doksorubisin çözeltisinden daha düşük elde edilmiştir ve folat hedeflendirilmiş misellerle bu değer yarı yarıya düşmüştür. A549 hücreleri için hedeflendirilmiş ve hedeflendirilmemiş misellerle elde edilen IC₅₀ değerleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (228).

Hedeflendirilmiş misellerin etkinliği MCF-7 ve SKBR-3 hücrelerinde araştırılmıştır. MCF-7 hücreleri üzerinde F9 ve peptit-18 ile hedeflendirilmiş misellerin 24 saatlik inkübasyonda doksorubisin çözeltisinden daha etkili olduğu görülmüştür (Şekil 4.33.). Ancak etkin madde içermeyen misellerin 24 saatlik inkübasyon süresince doksorubisin yüklü misellere yakın % hücre canlılığına sebep olduğu görülmüştür. Bu durum toksisitenin polimerden kaynaklandığını düşündürmektedir. MCF-7 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyon sonucunda doksorubisin çözeltisi, F9 ve peptit hedeflendirilmiş misel ile benzer canlılık sonuçlarına neden olmuştur. 72 saatlik inkübasyon süresinde ise MCF-7 hücresi üzerinde peptit 18 ile hedeflendirilmiş misellerin F9 formülasyonundan daha etkili olduğu net bir şekilde görülmektedir ve doksorubisin yüklü miseller, boş misellerden anlamlı derece daha düşük hücre canlılıklarına sebep olmuşlardır. Peptit-18 ile hedeflendirilmiş misellerin MCF-7 hücresi üzerindeki etkinliğinin inkübasyon süresi arttıkça belirgenleştiği gösterilmiştir. Bulgular değerlendirildiğinde MCF-7 hücresinin polimerden kaynaklı sitotoksositeye oldukça hassas olduğu sonucunu ortaya çıkarmıştır.

SKBR-3 hücreleri üzerinde hedeflendirilmiş misellerin etkinliği F9 formülasyonu ile karşılaştırılarak verilmiştir (Şekil 4.34.). Peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin hapsedilmiş misellerin, hedeflendirilmemiş F9 formülasyonuna göre SKBR-3 hücresinde daha etkili olduğu üç inkübasyon süresi için

de görülmektedir. Doksorubisin çözeltisi ile karşılaştırıldığında, peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin hapsedilmiş misellerin 24 saatlik inkübasyon süresinde daha etkili olduğu ve 48 ve 72 saatlik sürelerde ise doksorubisin çözeltisi ile benzer bir sitotoksosite gösterdiği görülmüştür. Boş misellerin hücre canlılığı bulguları incelendiğinde üç zaman noktası için de canlılıkların %50'nin üzerinde olması SKBR-3 hücrelerinin polimer toksisitesine MCF-7 hücresine göre daha az duyarlı olduğunu ortaya koymuştur.

5.7.3. Doksorubisin Yüklü Misellerin Hücresel Alımının Floresan Mikroskop İle İncelenmesi

Doksorubisin yüklü hedeflendirilmemiş formülasyonlar MCF-7 hücrelerine uygulanarak bir saat inkübasyon sonrası floresan mikroskop ile görüntüleri alınmıştır. Uygulanan bütün formülasyonların doksorubisini başarılı bir şekilde hücre içine taşıdığı görülmektedir. Hedeflendirilmiş misel formülasyonları MCF-7 ve SKBR-3 hücrelerine uygulanmışlardır. Doksorubisinin peptit-18 ile hedeflendirilmiş miseller tarafından da başarılı bir şekilde hücre içine taşındığı görülmektedir. MCF-7 hücresi için düzeltilmiş toplam hücre floresanı değerleri incelendiğinde en düşük floresan intensitesinin peptit-18 ile hedeflendirilmiş misel ile elde edildiği görülmektedir. Bu durum doksorubisin çözeltisi difüzyon ile hızlı bir şekilde hücre içine girerken hedeflendirilmiş misellerin doksorubisini difüzyondan daha yavaş endositoz gibi yöntemlerle hücre içine taşıdığını düşündürmüştür. SKBR-3 için ise peptit-18 ile hedeflendirilmiş misel ile hücre içine giren doksorubisinin floresan intensitesi doksorubisin çözeltisinden daha yüksek bulunmuştur. Doksorubisinin peptit-18 ile hedeflendirilmiş misel ile hücre içine daha çok girmesi, serbest doksorubisinin girişine karşı SKBR-3 hücrelerinin daha dirençli olduğunu göstermiştir.

5.7.4. Peptit İle Hedeflendirilmiş Doksorubisin Yüklü Misellerin Hücresel Alımının Akış Sitometrisi İle İncelenmesi

MCF-7 hücrelerinin peptit-18 tarafından hedeflendiği daha önce bildirilmiştir (200) ancak SKBR-3 hücresi için literatürde böyle bir bilgiye rastlanmamıştır. Doksorubisin yüklü peptit-18 ile hedeflendirilmiş miseller hücrelere uygulandıklarında floresan açıdan pozitif hücre miktarı L929 hücreleri için $0 \pm 0,0$,

MCF-7 hücreleri için $12,8 \pm 5,4$ ve SKBR-3 hücreleri için $4,1 \pm 1,6$ oranlarında bulunmuştur. Peptit-18 ile hedeflendirilmiş misellerin MCF-7 hücresine SKBR-3 hücresinden yaklaşık 3 kat daha fazla bir afinitesi olduğu görülmektedir. Bulgular daha önce literatürde belirtilen peptit-18'in MCF-7 hücrelerine olan afinitesini doğrulamaktadır. Mathews arkadaşları (200) peptit-18'i polimerik misellere konjuge ederek ya da polimerik misellerle fiziksel olarak karıştırarak hazırladıkları misellerin, çeşitli kanser hücreleri tarafından alınımı akış sitometrisi ile incelemiştir. Dil boyası yüklü ve peptit-18 içeren polimerik misellerin hücre alımı MDA-MB-435 melanoma hücresi, MDA-MB-231, ve MCF-7 meme kanseri hücreleri ile kontrol olarak HUVEC ve MCF10A hücreleri kullanılarak incelenmiştir ve misellerin peptit-18 ile modifikasyonunun kanser hücrelerinde hücre alımı, p160, c-RGD peptitleri ile modifiye edilmiş miseller ile modifiye edilmemiş misellere göre arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca peptit ile misellerin fiziksel karışımının, misellere kovalent olarak konjuge edilmiş peptitlere göre daha yüksek hücre alım sağladığı ancak hücre alımın kanser hücrelerine olan seçiciliğinin de fiziksel karışımlar için azaldığını bildirmişlerdir (200). Başka bir çalışmada altın nanopartiküllerine konjuge edilen peptit-18'in MCF-7 hücreleri tarafından alınımının konsantrasyona bağlı olduğu görülmüş olup, peptit-18 ile konjuge 8 nM altın partikülü uygulandığında floresan pozitif bölgede bulunan hücrelerin %10 civarında olduğu ve negatif kontrol olarak kullanılan 3T3 fibroblast hücrelerinde ise floresan pozitif bölgede bulunan hücrelerin yaklaşık %1 civarında olduğu bildirilmiştir (201).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Tez çalışması kapsamında ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarlanmasında “görünmezlik etkisi” nedeniyle altın standart olan PEG polimerine alternatif olarak sunulan PEtOx temelli kopolimerler ile yeni ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir.
- Bu amaçla PEtOx ve bir poliester olan PCL polimerleri kullanılarak sentezlenen PEtOx-b-PCL polimerleri ile misel formülasyonları hazırlanmış ve bu formülasyonların partikül büyüklükleri değerlendirilerek en küçük partikül büyüklüğüne sahip miseli oluşturan kopolimerin belirlenmesi sağlanmıştır.
- En uygun misel büyüklüğünün elde edildiği kopolimer temel alınarak, PEtOx polimerinin asit hidrolizi ile elde edilen PEtOx-ko-PEI polimerinin PCL polimeri ile konjugasyonu ile sentezlenen PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerleri ile misel formülasyonları hazırlanmıştır.
- PEtOx-b-PCL ve PEtOx-ko-PEI-b-PCL kopolimerleri kullanılarak doksorubisin enkapsüle edilmiş misel formülasyonları hazırlanmıştır ve karakterize edilmiştir.
- Doksorubisin hapsedilmiş miselleri hazırlamak için kullanılan polimerlerin CMC değerleri piren yöntemi ile belirlenerek, elde edilen düşük CMC değerleri ile misellerin in vivo koşullardaki seyreltmeye dayanıklılığı gösterilmiştir.
- PEtOx-b-PCL ve PEtOx-ko-PEI-b-PCL kopolimerleri ile ¹H-NMR spektroskopisi kullanılarak misel oluşumunun doğrulanması gerçekleştirilmiştir.
- Doksorubisinin PEtOx-b-PCL ve PEtOx-ko-PEI-b-PCL misellerine yüksek oranda enkapsülasyonu için yağ/su emülsiyonu yönteminin etkili bir yöntem olduğu gösterilmiştir.
- Farklı oranlarda polimer:doksorubisin kullanımının misel büyüklüğüne ve etkin madde yükleme kapasitesine etkisi araştırılmıştır. Kullanılan etkin madde miktarı arttıkça daha yüksek bir etkin madde yükleme kapasitesi elde edildiği ve daha stabil miseller elde edildiği gösterilmiştir.
- PEtOx-ko-PEI-b-PCL kopolimeri ile 100 nm'nin altında partikül büyüklüğüne sahip doksorubisin yüklü miseller hazırlanabildiği gösterilmiştir.
- PEtOx ve PEI polimerlerinin asidik pH'ya duyarlılık özelliklerinden yararlanarak nötr pH'da kararlı ancak tümör çevresinin asidik pH'sında salım yapan uyaran duyarlı taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir.

- PEtOx-b-PCL polimeri kullanılarak hazırlanan misellerin doksorubisin hapsedilmesi üzerine küresel morfolojiden çubuk şekline geçişi TEM analizi ile gösterilmiştir.
- Peptit-18 konjuge edilmiş PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerinin kullanımı ile doksorubisin yüklü peptit-18 ile hedeflendirilmiş miseller hazırlanmış ve karakterizasyonları yapılmıştır.
- Peptit-18 konjuge edilmiş PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerinin %20 (a/a) oranında misel formülasyonunda kullanılması ile misel büyüklüğünün arttığı gösterilmiştir.
- PEtOx-b-PCL, PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerleri hazırlanan doksorubisin hapsedilmiş misellerin ve doksorubisin hapsedilmiş peptit-18 ile hedeflendirilmiş misellerin %10 FBS ile etkileşimi incelenmiştir. PEtOx polimerinin %30 hidrolizi ile elde edilen PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimeri ile hazırlanan misellerin diğer polimerlere göre daha kararlı olduğu bulunmuştur.
- Doksorubisin hapsedilmiş peptit-18 ile hedeflendirilmiş misellerin 4 ve 25°C'deki kolloidal stabiliteleri incelenmiş ve 4°C'de stabil oldukları gösterilmiştir.
- PEtOx-b-PCL ve PEtOx-ko-PEI-b-PCL kopolimerleri kullanılarak hazırlanan etkin madde içermeyen misellerin biyouyumluluğu L929 fare fibroblast hücreleri ile değerlendirilmiştir. İlk 24 saatte hücre proliferasyonunda inhibisyonu takiben hücrelere toksik olmadığı saptanmıştır.
- Çubuk şekilli doksorubisin hapsedilmiş PEtOx-b-PCL miselleri ile küresel şekilli katyonik özellikte doksorubisin hapsedilmiş PEtOx-ko-PEI-b-PCL misellerinin MCF-7 hücresi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Farklı oranlarda katyonik PEI içeren misellerin hücre canlılıklarını benzer bir şekilde etkilediği ve düşürdüğü gösterilmiştir. Katyonik PEI içeren etkin madde hapsedilmemiş misellerin MCF-7 hücresi üzerinde toksik etki gösterdiği ancak bu toksik etkinin zamanla artmadığı gösterilmiştir. Katyonik misellerde, katyonik PEI'den kaynaklı toksisitenin doksorubisin konsantrasyonuna bağlı toksisitenin net bir şekilde görülmesini engellediği gösterilmiştir. Çubuk şekilli doksorubisin hapsedilmiş PEtOx-b-PCL misellerinin MCF-7 hücre canlılığını polimer kaynaklı bir sitotoksosite olmadan düşürdüğü gösterilmiştir.
- Peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin hapsedilmiş misellerin, MCF-7 hücresinde 24 ve 48 saatlik inübasyon sürelerinde hedeflendirilmemiş

doksorubisin hapsedilmiş misellerden anlamlı bir fark göstermediği ancak 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda hedeflendirilmiş misellerin, hedeflendirilmemiş doksorubisin hapsedilmiş misellerden daha etkin olduğu gösterilmiştir.

- Peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin hapsedilmiş misellerin SKBR-3 hücrelerinde hedeflendirilmemiş doksorubisin hapsedilmiş misellerden daha etkili olduğu, doksorubisin çözeltisinden ise 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda daha etkili olup, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde doksorubisin çözeltisine benzer bir etkilerinin olduğu gösterilmiştir.
- PEtOx-b-PCL, PEtOx-ko-PEI-b-PCL polimerleri hazırlanan doksorubisin hapsedilmiş misellerin ve doksorubisin hapsedilmiş peptit-18 ile hedeflendirilmiş misellerin MCF-7 hücresi ile bir saatlik inkübasyon sonrasında doksorubisinin hücre içine alımını sağladıkları floresan mikroskop ile gösterilmiştir.
- Peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü misellerin MCF-7 hücresine SKBR-3 hücresine göre yaklaşık 3 kat daha fazla afinitesi olduğu akış sitometrisi deneyleri ile gösterilmiştir.

İleriye dönük çalışmalarda farklı meme kanseri hücreleri kullanılarak peptit-18 ile hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü misellerin sitotoksik etkisinin ve hedefleme etkinliğinin daha geniş bir hücre popülasyonunda araştırılması yapılabilir. Peptit-18 ile hedeflendirilmiş misellerin hücre içine alım mekanizmaları araştırılabilir. Meme kanseri hayvan modellerinde *in vivo* etkinlik çalışması yapılarak Peptit-18 ile hedeflendirilmiş PEtOx-ko-PEI-b-PCL misellerinin *in vivo* biyodağılımı araştırılıp PEtOx polimerinin görünmezlik etkisini sağlayıp sağlamadığı incelenebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Vanneman M, Dranoff G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):237-51.
2. Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH, ve ark. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016;66(4):271-89.
3. Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Del Rev*. 2012;64:206-12.
4. Kobayashi H, Watanabe R, Choyke PL. Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; what is the appropriate target? *Theranostics*. 2014;4(1):81-9.
5. Nishiyama N, Kataoka K. Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery. *Pharmacol Ther*. 2006;112(3):630-48.
6. Ishida T, Kiwada H. Accelerated blood clearance (ABC) phenomenon upon repeated injection of PEGylated liposomes. *Int J Pharm*. 2008;354(1-2):56-62.
7. Lila ASA, Kiwada H, Ishida T. The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: clinical challenge and approaches to manage. *J Control Release*. 2013;172(1):38-47.
8. Bauer M, Lautenschlaeger C, Kempe K, Tauhardt L, Schubert US, Fischer D. Poly (2-ethyl-2-oxazoline) as alternative for the stealth polymer poly (ethylene glycol): comparison of in vitro cytotoxicity and hemocompatibility. *Macromol Biosci*. 2012;12(7):986-98.
9. Cancer [İnternet]. 2018 [Erişim Tarihi 28.11.2018]. Erişim adresi: <http://www.who.int/cancer/en/>.
10. Gelband H, Sloan FA. Cancer control opportunities in low-and middle-income countries. Washington (DC): National Academies Press; 2007.
11. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2016;25(1):16-27.
12. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, ve ark. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-E86.
13. Wang H, Naghavi M, Allen C, Barber RM, Bhutta ZA, Carter A, ve ark. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the global burden of disease study 2015. *The Lancet*. 2016;388(10053):1459-544.

14. Kamińska M, Ciszewski T, Łopacka-Szatan K, Miotła P, Starosławska E. Breast cancer risk factors. *Przegląd menopauzalny= Menopause review*. 2015;14(3):196-202.
15. Gradishar WJ, Anderson BO, Balassanian R, Blair SL, Burstein HJ, Cyr A, ve ark. Breast cancer version 2.2015. *J Natl Compr Canc Netw*. 2015;13(4):448-75.
16. Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. *J Control Release*. 2015;200:138-57.
17. Mitra AK, Agrahari V, Mandal A, Cholkar K, Natarajan C, Shah S, ve ark. Novel delivery approaches for cancer therapeutics. *J Control Release*. 2015;219:248-68.
18. Ventola CL. Progress in nanomedicine: approved and investigational nanodrugs. *P T*. 2017;42(12):742-55.
19. Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, ve ark. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. Peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng*. 1969;11(6):1101-10.
20. Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS, ve ark. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem*. 2009;16(25):3267-85.
21. Arcamone F, Cassinelli G, Franceschi G, Penco S, Pol C, Redaelli S, ve ark. Structure and physicochemical properties of adriamycin (doxorubicin). In: Carter SK, Di Marco A, Ghione M, Krakoff IH, Mathé G, editors. *International symposium on adriamycin; 9th-10th September, 1971; Milan: Springer, Berlin, Heidelberg; 1972*. p. 9-22.
22. Speth P, Van Hoesel Q, Haanen C. Clinical pharmacokinetics of doxorubicin. *Clin Pharmacokinet*. 1988;15(1):15-31.
23. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol*. 2013;65(2):157-70.
24. Foglesong PD, Reckord C, Swink S. Doxorubicin inhibits human DNA topoisomerase I. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1992;30(2):123-5.
25. Hilmer SN, Cogger VC, Muller M, Le Couteur DG. The hepatic pharmacokinetics of doxorubicin and liposomal doxorubicin. *Drug Metab Disposition*. 2004;32(8):794-9.
26. Gewirtz D. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*. 1999;57(7):727-41.
27. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*. 2004;56(2):185-229.

28. Ashley N, Poulton J. Mitochondrial DNA is a direct target of anti-cancer anthracycline drugs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;378(3):450-5.
29. Meredith AM, Dass CR. Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. *J Pharm Pharmacol.* 2016;68(6):729-41.
30. Kanwal U, Irfan Bukhari N, Ovais M, Abass N, Hussain K, Raza A. Advances in nano-delivery systems for doxorubicin: an updated insight. *J Drug Target.* 2018;26(4):296-310.
31. Danesi R, Fogli S, Gennari A, Conte P, Del Tacca M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(6):431-44.
32. Gabizon A, Catane R, Uziely B, Kaufman B, Safra T, Cohen R, ve ark. Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Res.* 1994;54(4):987-92.
33. Gabizon AA, Lyass O, Berry GJ, Wildgust M. Cardiac safety of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil®/Caelyx®) demonstrated by endomyocardial biopsy in patients with advanced malignancies. *Cancer Invest.* 2004;22(5):663-9.
34. Son YJ, Jang J-S, Cho YW, Chung H, Park R-W, Kwon IC, ve ark. Biodistribution and anti-tumor efficacy of doxorubicin loaded glycol-chitosan nanoaggregates by EPR effect. *J Control Release.* 2003;91(1-2):135-45.
35. Subedi RK, Kang KW, Choi H-K. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with doxorubicin. *Eur J Pharm Sci.* 2009;37(3-4):508-13.
36. Cao X, Luo J, Gong T, Zhang Z-R, Sun X, Fu Y. Coencapsulated doxorubicin and bromotetrandrine lipid nanoemulsions in reversing multidrug resistance in breast cancer in vitro and in vivo. *Mol Pharm.* 2014;12(1):274-86.
37. Banu H, Sethi DK, Edgar A, Sherif A, Rayees N, Renuka N, ve ark. Doxorubicin loaded polymeric gold nanoparticles targeted to human folate receptor upon laser photothermal therapy potentiates chemotherapy in breast cancer cell lines. *J Photochem Photobiol B.* 2015;149:116-28.
38. Dinan NM, Atyabi F, Rouini M-R, Amini M, Golabchifar A-A, Dinarvand R. Doxorubicin loaded folate-targeted carbon nanotubes: preparation, cellular internalization, in vitro cytotoxicity and disposition kinetic study in the isolated perfused rat liver. *Mater Sci Eng, C.* 2014;39:47-55.
39. Diao Y-Y, Li H-Y, Fu Y-H, Han M, Hu Y-L, Jiang H-L, ve ark. Doxorubicin-loaded PEG-PCL copolymer micelles enhance cytotoxicity and intracellular accumulation of doxorubicin in adriamycin-resistant tumor cells. *Int J Nanomed.* 2011;6:1955-62.
40. What is nanotechnology? [Internet]. 2018 [Erişim Tarihi 28.11.2018]. Erişim adresi: <https://www.nano.gov/nanotech-101/what/definition>.
41. Farokhzad OC, Langer R. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano.* 2009;3(1):16-20.

42. European Science Foundation. ESF Scientific Forward Look on Nanomedicine, European Science Foundation Policy Briefing 2005: 2018 [Erişim Tarihi 28.11.2018]. Erişim adresi: http://archives.esf.org/fileadmin/Public_documents/Publications/Nanomedicine_01.pdf.
43. Duncan R, Gaspar R. Nanomedicine (s) under the microscope. *Mol Pharm*. 2011;8(6):2101-41.
44. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol*. 2007;2(12):751-60.
45. Kataoka K, Harada A, Nagasaki Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv Drug Del Rev*. 2012;64:37-48.
46. Torchilin V. Targeted polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(19-20):2549-59.
47. Yokoyama M, Miyauchi M, Yamada N, Okano T, Sakurai Y, Kataoka K, ve ark. Polymer micelles as novel drug carrier: adriamycin-conjugated poly (ethylene glycol)-poly (aspartic acid) block copolymer. *J Control Release*. 1990;11(1-3):269-78.
48. Kabanov AV, Chekhonin V, Alakhov VY, Batrakova E, Lebedev A, Melik-Nubarov N, ve ark. The neuroleptic activity of haloperidol increases after its solubilization in surfactant micelles. *FEBS Lett*. 1989;258(2):343-5.
49. Yokoyama M, Miyauchi M, Yamada N, Okano T, Sakurai Y, Kataoka K, ve ark. Characterization and anticancer activity of the micelle-forming polymeric anticancer drug adriamycin-conjugated poly (ethylene glycol)-poly (aspartic acid) block copolymer. *Cancer Res*. 1990;50(6):1693-700.
50. Yokoyama M, Anazawa H, Takahashi A, Inoue S, Kataoka K, Yui N, ve ark. Synthesis and permeation behavior of membranes from segmented multiblock copolymers containing poly (ethylene oxide) and poly (β -benzyl L-aspartate) blocks. *Die makromolekulare chemie*. 1990;191(2):301-11.
51. Almeida M, Magalhães M, Veiga F, Figueiras A. Poloxamers, poloxamines and polymeric micelles: Definition, structure and therapeutic applications in cancer. *J Polym Res*. 2018;25(31).
52. Valle JW, Armstrong A, Newman C, Alakhov V, Pietrzynski G, Brewer J, ve ark. A phase 2 study of SP1049C, doxorubicin in P-glycoprotein-targeting pluronics, in patients with advanced adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Invest New Drugs*. 2011;29(5):1029-37.
53. Cabral H, Kataoka K. Progress of drug-loaded polymeric micelles into clinical studies. *J Control Release*. 2014;190:465-76.
54. Kato K, Chin K, Yoshikawa T, Yamaguchi K, Tsuji Y, Esaki T, ve ark. Phase II study of NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle, for previously treated advanced or recurrent gastric cancer. *Invest New Drugs*. 2012;30(4):1621-7.

55. Riess G. Micellization of block copolymers. *Prog Polym Sci.* 2003;28(7):1107-70.
56. Hamley IW. *The physics of block copolymers.* New York: Oxford University Press.; 1998.
57. Mai Y, Eisenberg A. Self-assembly of block copolymers. *Chem Soc Rev.* 2012;41(18):5969-85.
58. Zhang L, Eisenberg A. Multiple morphologies of " crew-cut" aggregates of polystyrene-b-poly (acrylic acid) block copolymers. *Science.* 1995;268(5218):1728-31.
59. Gaucher G, Dufresne M-H, Sant VP, Kang N, Maysinger D, Leroux J-C. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *J Control Release.* 2005;109(1-3):169-88.
60. Zhang S, Qing J, Xiong C, Peng Y. Synthesis of end-functionalized AB copolymers. II. Synthesis and characterization of carboxyl-terminated poly (ethylene glycol)-poly (amino acid) block copolymers. *J Polym Sci, Part A: Polym Chem.* 2004;42(14):3527-36.
61. Harada A, Kataoka K. Formation of polyion complex micelles in an aqueous milieu from a pair of oppositely-charged block copolymers with poly (ethylene glycol) segments. *Macromolecules.* 1995;28(15):5294-9.
62. Itaka K, Yamauchi K, Harada A, Nakamura K, Kawaguchi H, Kataoka K. Polyion complex micelles from plasmid DNA and poly (ethylene glycol)-poly (l-lysine) block copolymer as serum-tolerable polyplex system: physicochemical properties of micelles relevant to gene transfection efficiency. *Biomaterials.* 2003;24(24):4495-506.
63. Nishiyama N, Yokoyama M, Aoyagi T, Okano T, Sakurai Y, Kataoka K. Preparation and characterization of self-assembled polymer- metal complex micelle from cis-dichlorodiammineplatinum (II) and poly (ethylene glycol)-poly (α , β -aspartic acid) block copolymer in an aqueous medium. *Langmuir.* 1999;15(2):377-83.
64. Plummer R, Wilson R, Calvert H, Boddy A, Griffin M, Sludden J, ve ark. A Phase I clinical study of cisplatin-incorporated polymeric micelles (NC-6004) in patients with solid tumours. *Br J Cancer.* 2011;104(4):593-8.
65. Yokoyama M. Polymeric micelles as drug carriers: their lights and shadows. *J Drug Target.* 2014;22(7):576-83.
66. Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Ipe BI, ve ark. Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotechnol.* 2007;25(10):1165-70.
67. Zapotoczny B, Szafranska K, Kus E, Chlopicki S, Szymonski M. Quantification of fenestrations in liver sinusoidal endothelial cells by atomic force microscopy. *Micron.* 2017;101:48-53.
68. Braet F, Wisse E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp Hepatol.* 2002;1(1).

69. Horn T, Christoffersen P, Henriksen JH. Alcoholic liver injury: defenestration in noncirrhotic livers—a scanning electron microscopic study. *Hepatology*. 1987;7(1):77-82.
70. Zhang Y-N, Poon W, Tavares AJ, McGilvray ID, Chan WC. Nanoparticle–liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination. *J Control Release*. 2016;240:332-48.
71. Moghimi SM. Mechanisms of splenic clearance of blood cells and particles: towards development of new splenotropic agents. *Adv Drug Del Rev*. 1995;17(1):103-15.
72. Chen L-T, Weiss L. The role of the sinus wall in the passage of erythrocytes through the spleen. *Blood*. 1973;41(4):529-37.
73. Deplaine G, Safeukui I, Jeddi F, Lacoste F, Brousse V, Perrot S, et al. The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro. *Blood*. 2011;117(8):e88-e95.
74. Moghimi SM, Porter C, Muir I, Illum L, Davis S. Non-phagocytic uptake of intravenously injected microspheres in rat spleen: influence of particle size and hydrophilic coating. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;177(2):861-6.
75. Anraku Y, Kishimura A, Kobayashi A, Oba M, Kataoka K. Size-controlled long-circulating PICsome as a ruler to measure critical cut-off disposition size into normal and tumor tissues. *Chem Commun*. 2011;47(21):6054-6.
76. Yuan F, Dellian M, Fukumura D, Leunig M, Berk DA, Torchilin VP, et al. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res*. 1995;55(17):3752-6.
77. Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP, et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(8):4607-12.
78. Patil YP, Jadhav S. Novel methods for liposome preparation. *Chem Phys Lipids*. 2014;177:8-18.
79. Jahn A, Vreeland WN, DeVoe DL, Locascio LE, Gaitan M. Microfluidic directed formation of liposomes of controlled size. *Langmuir*. 2007;23(11):6289-93.
80. Cabral H, Matsumoto Y, Mizuno K, Chen Q, Murakami M, Kimura M, et al. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nat Nanotechnol*. 2011;6(12):815-23.
81. Glavas L, Olsén P, Odelius K, Albertsson A-C. Achieving micelle control through core crystallinity. *Biomacromolecules*. 2013;14(11):4150-6.
82. Garofalo C, Capuano G, Sottile R, Talerico R, Adami R, Reverchon E, et al. Different insight into amphiphilic PEG-PLA copolymers: influence of macromolecular architecture on the micelle formation and cellular uptake. *Biomacromolecules*. 2013;15(1):403-15.

83. Somekawa S, Masutani K, Hsu Y-I, Mahara A, Kimura Y, Yamaoka T. Size-controlled nanomicelles of poly (lactic acid)–poly (ethylene glycol) copolymers with a multiblock configuration. *Polymers*. 2015;7(6):1177-91.
84. Nishiyama N, Matsumura Y, Kataoka K. Development of polymeric micelles for targeting intractable cancers. *Cancer Sci*. 2016;107(7):867-74.
85. Bae Y, Fukushima S, Harada A, Kataoka K. Design of environment-sensitive supramolecular assemblies for intracellular drug delivery: Polymeric micelles that are responsive to intracellular pH change. *Angew Chem*. 2003;115(38):4788-91.
86. Kim KS, Park W, Hu J, Bae YH, Na K. A cancer-recognizable MRI contrast agents using pH-responsive polymeric micelle. *Biomaterials*. 2014;35(1):337-43.
87. Shi Y, Lammers T, Storm G, Hennink WE. Physico-Chemical Strategies to Enhance Stability and Drug Retention of Polymeric Micelles for Tumor-Targeted Drug Delivery. *Macromol Biosci*. 2017;17(1):1600160.
88. Gillies ER, Fréchet JM. A new approach towards acid sensitive copolymer micelles for drug delivery. *Chem Commun*. 2003(14):1640-1.
89. Li Y, Kwon GS. Methotrexate esters of poly (ethylene oxide)-block-poly (2-hydroxyethyl-L-aspartamide). Part I: Effects of the level of methotrexate conjugation on the stability of micelles and on drug release. *Pharm Res*. 2000;17(5):607-11.
90. Alani AW, Bae Y, Rao DA, Kwon GS. Polymeric micelles for the pH-dependent controlled, continuous low dose release of paclitaxel. *Biomaterials*. 2010;31(7):1765-72.
91. Hu Q, Rijcken CJ, Bansal R, Hennink WE, Storm G, Prakash J. Complete regression of breast tumour with a single dose of docetaxel-entrapped core-cross-linked polymeric micelles. *Biomaterials*. 2015;53:370-8.
92. McRae Page S, Martorella M, Parelkar S, Kosif I, Emrick T. Disulfide cross-linked phosphorylcholine micelles for triggered release of camptothecin. *Mol Pharm*. 2013;10(7):2684-92.
93. Lim Soo P, Luo L, Maysinger D, Eisenberg A. Incorporation and release of hydrophobic probes in biocompatible polycaprolactone-block-poly (ethylene oxide) micelles: implications for drug delivery. *Langmuir*. 2002;18(25):9996-10004.
94. Samarajeewa S, Shrestha R, Li Y, Wooley KL. Degradability of poly (lactic acid)-containing nanoparticles: enzymatic access through a cross-linked shell barrier. *J Am Chem Soc*. 2011;134(2):1235-42.
95. Yan J, Ye Z, Chen M, Liu Z, Xiao Y, Zhang Y, et al. Fine tuning micellar core-forming block of poly (ethylene glycol)-block-poly (ϵ -caprolactone) amphiphilic copolymers based on chemical modification for the solubilization and delivery of doxorubicin. *Biomacromolecules*. 2011;12(7):2562-72.

96. Jones M-C, Leroux J-C. Polymeric micelles—a new generation of colloidal drug carriers. *Eur J Pharm Biopharm.* 1999;48(2):101-11.
97. Yu B, Okano T, Kataoka K, Kwon G. Polymeric micelles for drug delivery: solubilization and haemolytic activity of amphotericin B. *J Control Release.* 1998;53(1-3):131-6.
98. Aliabadi HM, Mahmud A, Sharifabadi AD, Lavasanifar A. Micelles of methoxy poly (ethylene oxide)-b-poly (ϵ -caprolactone) as vehicles for the solubilization and controlled delivery of cyclosporine A. *J Control Release.* 2005;104(2):301-11.
99. Chen H, Kim S, He W, Wang H, Low PS, Park K, ve ark. Fast release of lipophilic agents from circulating PEG-PDLLA micelles revealed by in vivo forster resonance energy transfer imaging. *Langmuir.* 2008;24(10):5213-7.
100. Letchford K, Burt HM. Copolymer micelles and nanospheres with different in vitro stability demonstrate similar paclitaxel pharmacokinetics. *Mol Pharm.* 2012;9(2):248-60.
101. Nakanishi T, Fukushima S, Okamoto K, Suzuki M, Matsumura Y, Yokoyama M, ve ark. Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin. *J Control Release.* 2001;74(1-3):295-302.
102. Hamaguchi T, Matsumura Y, Suzuki M, Shimizu K, Goda R, Nakamura I, ve ark. NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation, can extend in vivo antitumour activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel. *Br J Cancer.* 2005;92(7):1240–6.
103. Harada M, Bobe I, Saito H, Shibata N, Tanaka R, Hayashi T, ve ark. Improved anti-tumor activity of stabilized anthracycline polymeric micelle formulation, NC-6300. *Cancer Sci.* 2011;102(1):192-9.
104. Nishiyama N, Okazaki S, Cabral H, Miyamoto M, Kato Y, Sugiyama Y, ve ark. Novel cisplatin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice. *Cancer Res.* 2003;63(24):8977-83.
105. Desale SS, Cohen SM, Zhao Y, Kabanov AV, Bronich TK. Biodegradable hybrid polymer micelles for combination drug therapy in ovarian cancer. *J Control Release.* 2013;171(3):339-48.
106. Kim SH, Tan JP, Nederberg F, Fukushima K, Colson J, Yang C, ve ark. Hydrogen bonding-enhanced micelle assemblies for drug delivery. *Biomaterials.* 2010;31(31):8063-71.
107. Maeda H. Macromolecular therapeutics in cancer treatment: the EPR effect and beyond. *J Control Release.* 2012;164(2):138-44.
108. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 1986;46(12 Part 1):6387-92.
109. Liu M, Du H, Zhang W, Zhai G. Internal stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery: design strategies and applications. *Mater Sci Eng, C.* 2017;71:1267-80.

110. Zhou Q, Zhang L, Yang T, Wu H. Stimuli-responsive polymeric micelles for drug delivery and cancer therapy. *Int J Nanomed.* 2018;13:2921–42.
111. Wang C-H, Wang C-H, Hsiue G-H. Polymeric micelles with a pH-responsive structure as intracellular drug carriers. *J Control Release.* 2005;108(1):140-9.
112. Wu H, Zhu L, Torchilin VP. pH-sensitive poly (histidine)-PEG/DSPE-PEG copolymer micelles for cytosolic drug delivery. *Biomaterials.* 2013;34(4):1213-22.
113. Li Y, Leng M, Cai M, Huang L, Chen Y, Luo X. pH responsive micelles based on copolymers mPEG-PCL-PDEA: The relationship between composition and properties. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2017;154:397-407.
114. Zhang CY, Yang YQ, Huang TX, Zhao B, Guo XD, Wang JF, ve ark. Self-assembled pH-responsive MPEG-b-(PLA-co-PAE) block copolymer micelles for anticancer drug delivery. *Biomaterials.* 2012;33(26):6273-83.
115. Car A, Baumann P, Duskey JT, Chami M, Bruns N, Meier W. pH-responsive PDMS-b-PDMAEMA micelles for intracellular anticancer drug delivery. *Biomacromolecules.* 2014;15(9):3235-45.
116. Zhang H, Wang K, Zhang P, He W, Song A, Luan Y. Redox-sensitive micelles assembled from amphiphilic mPEG-PCL-SS-DTX conjugates for the delivery of docetaxel. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2016;142:89-97.
117. Huo M, Liu Y, Wang L, Yin T, Qin C, Xiao Y, ve ark. Redox-sensitive micelles based on O, N-hydroxyethyl chitosan–octylamine conjugates for triggered intracellular delivery of paclitaxel. *Mol Pharm.* 2016;13(6):1750-62.
118. Chen W-H, Luo G-F, Lei Q, Jia H-Z, Hong S, Wang Q-R, ve ark. MMP-2 responsive polymeric micelles for cancer-targeted intracellular drug delivery. *Chem Commun.* 2015;51(3):465-8.
119. Zhang X, Wang X, Zhong W, Ren X, Sha X, Fang X. Matrix metalloproteinases-2/9-sensitive peptide-conjugated polymer micelles for site-specific release of drugs and enhancing tumor accumulation: preparation and in vitro and in vivo evaluation. *Int J Nanomed.* 2016;11: 1643–61.
120. Chen CJ, Liu GY, Shi YT, Zhu CS, Pang SP, Liu XS, ve ark. Biocompatible micelles based on comb-like PEG derivatives: formation, characterization, and photo-responsiveness. *Macromol Rapid Commun.* 2011;32(14):1077-81.
121. Jin Q, Mitschang F, Agarwal S. Biocompatible drug delivery system for photo-triggered controlled release of 5-fluorouracil. *Biomacromolecules.* 2011;12(10):3684-91.
122. Rezaei SJT, Nabid MR, Niknejad H, Entezami AA. Folate-decorated thermoresponsive micelles based on star-shaped amphiphilic block copolymers for efficient intracellular release of anticancer drugs. *Int J Pharm.* 2012;437(1-2):70-9.
123. Glover AL, Bennett JB, Pritchett JS, Nikles SM, Nikles DE, Nikles JA, ve ark. Magnetic heating of iron oxide nanoparticles and magnetic micelles for cancer therapy. *IEEE Trans Magn.* 2013;49(1):231–5.

124. Marin A, Muniruzzaman M, Rapoport N. Acoustic activation of drug delivery from polymeric micelles: effect of pulsed ultrasound. *J Control Release*. 2001;71(3):239-49.
125. Zhang H, Xia H, Wang J, Li Y. High intensity focused ultrasound-responsive release behavior of PLA-b-PEG copolymer micelles. *J Control Release*. 2009;139(1):31-9.
126. Cai M, Zhu K, Qiu Y, Liu X, Chen Y, Luo X. pH and redox-responsive mixed micelles for enhanced intracellular drug release. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014;116:424-31.
127. Yu H, Cui Z, Yu P, Guo C, Feng B, Jiang T, et al. pH-and NIR light-responsive micelles with hyperthermia-triggered tumor penetration and cytoplasm drug release to reverse doxorubicin resistance in breast cancer. *Adv Funct Mater*. 2015;25(17):2489-500.
128. Zhang H, Fan X, Li F, Suo R, Li H, Yang Z, et al. Thermo and pH dual-controlled charge reversal amphiphilic graft copolymer micelles for overcoming drug resistance in cancer cells. *J Mater Chem B*. 2015;3(22):4585-96.
129. Lin Y-K, Yu Y-C, Wang S-W, Lee R-S. Temperature, ultrasound and redox triple-responsive poly (N-isopropylacrylamide) block copolymer: synthesis, characterization and controlled release. *RSC Adv*. 2017;7(68):43212-26.
130. Owen SC, Chan DP, Shoichet MS. Polymeric micelle stability. *Nano today*. 2012;7(1):53-65.
131. Adams ML, Kwon GS. The effects of acyl chain length on the micelle properties of poly (ethylene oxide)-block-poly (N-hexyl-L-aspartamide)-acyl conjugates. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2002;13(9):991-1006.
132. Ranger M, Jones MC, Yessine MA, Leroux JC. From well-defined diblock copolymers prepared by a versatile atom transfer radical polymerization method to supramolecular assemblies. *J Polym Sci, Part A: Polym Chem*. 2001;39(22):3861-74.
133. Lee J, Cho EC, Cho K. Incorporation and release behavior of hydrophobic drug in functionalized poly (D, L-lactide)-block-poly (ethylene oxide) micelles. *J Control Release*. 2004;94(2-3):323-35.
134. Yokoyama M, Sugiyama T, Okano T, Sakurai Y, Naito M, Kataoka K. Analysis of micelle formation of an adriamycin-conjugated poly (ethylene glycol)-poly (aspartic acid) block copolymer by gel permeation chromatography. *Pharm Res*. 1993;10(6):895-9.
135. Allen C, Maysinger D, Eisenberg A. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 1999;16(1-4):3-27.
136. Van Domeselaar GH, Kwon GS, Andrew LC, Wishart DS. Application of solid phase peptide synthesis to engineering PEO-peptide block copolymers for drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2003;30(4):323-34.

137. Creutz S, Van Stam J, De Schryver FC, Jérôme R. Dynamics of poly ((dimethylamino) alkyl methacrylate-block-sodium methacrylate) micelles. Influence of hydrophobicity and molecular architecture on the exchange rate of copolymer molecules. *Macromolecules*. 1998;31(3):681-9.
138. Yokoyama M, Fukushima S, Uehara R, Okamoto K, Kataoka K, Sakurai Y, ve ark. Characterization of physical entrapment and chemical conjugation of adriamycin in polymeric micelles and their design for in vivo delivery to a solid tumor. *J Control Release*. 1998;50(1-3):79-92.
139. Azagarsamy MA, Yesilyurt V, Thayumanavan S. Disassembly of dendritic micellar containers due to protein binding. *J Am Chem Soc*. 2010;132(13):4550-1.
140. Gou M, Zheng X, Men K, Zhang J, Wang B, Lv L, ve ark. Self-assembled hydrophobic honokiol loaded MPEG-PCL diblock copolymer micelles. *Pharm Res*. 2009;26(9):2164-73.
141. Lee SC, Kim C, Kwon IC, Chung H, Jeong SY. Polymeric micelles of poly (2-ethyl-2-oxazoline)-block-poly (ϵ -caprolactone) copolymer as a carrier for paclitaxel. *J Control Release*. 2003;89(3):437-46.
142. Vangeyte P, Gautier S, Jérôme R. About the methods of preparation of poly (ethylene oxide)-b-poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles in water: Analysis by dynamic light scattering. *Colloids Surf Physicochem Eng Aspects*. 2004;242(1-3):203-11.
143. Elhasi S, Astaneh R, Lavasanifar A. Solubilization of an amphiphilic drug by poly (ethylene oxide)-block-poly (ester) micelles. *Eur J Pharm Biopharm*. 2007;65(3):406-13.
144. Kataoka K, Matsumoto T, Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, Fukushima S, ve ark. Doxorubicin-loaded poly (ethylene glycol)-poly (β -benzyl-L-aspartate) copolymer micelles: their pharmaceutical characteristics and biological significance. *J Control Release*. 2000;64(1-3):143-53.
145. Tyrrell ZL, Shen Y, Radosz M. Fabrication of micellar nanoparticles for drug delivery through the self-assembly of block copolymers. *Prog Polym Sci*. 2010;35(9):1128-43.
146. Aliabadi HM, Elhasi S, Mahmud A, Gulamhusein R, Mahdipoor P, Lavasanifar A. Encapsulation of hydrophobic drugs in polymeric micelles through co-solvent evaporation: the effect of solvent composition on micellar properties and drug loading. *Int J Pharm*. 2007;329(1-2):158-65.
147. Zhao L, Du J, Duan Y, Zhang H, Yang C, Cao F, ve ark. Curcumin loaded mixed micelles composed of Pluronic P123 and F68: preparation, optimization and in vitro characterization. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2012;97:101-8.
148. Fournier E, Dufresne M-H, Smith DC, Ranger M, Leroux J-C. A novel one-step drug-loading procedure for water-soluble amphiphilic nanocarriers. *Pharm Res*. 2004;21(6):962-8.
149. Abouzeid AH, Patel NR, Torchilin VP. Polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine (PEG-PE)/vitamin E micelles for co-delivery of

- paclitaxel and curcumin to overcome multi-drug resistance in ovarian cancer. *Int J Pharm.* 2014;464(1-2):178-84.
150. Zhang C, Ding Y, Yu LL, Ping Q. Polymeric micelle systems of hydroxycamptothecin based on amphiphilic N-alkyl-N-trimethyl chitosan derivatives. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2007;55(2):192-9.
 151. Gaspar VM, Gonçalves C, de Melo-Diogo D, Costa EC, Queiroz JA, Pichon C, ve ark. Poly (2-ethyl-2-oxazoline)-PLA-g-PEI amphiphilic triblock micelles for co-delivery of minicircle DNA and chemotherapeutics. *J Control Release.* 2014;189:90-104.
 152. Hadjichristidis N, Pispas S, Floudas G. Block copolymers: synthetic strategies, physical properties, and applications. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2003.
 153. Khougaz K, Gao Z, Eisenberg A. Determination of the critical micelle concentration of block copolymer micelles by static light scattering. *Macromolecules.* 1994;27(22):6341-6.
 154. Gohy J-F. Block copolymer micelles. In: Abetz V, editor. Block copolymers II. *Advances in Polymer Science.* Berlin, Heidelberg: Springer; 2005. p. 65-136.
 155. Gohy J-F, Willet N, Varshney SK, Zhang J-X, Jérôme R. pH Dependence of the morphology of aqueous micelles formed by polystyrene-block-poly (2-vinylpyridine)-blockpoly (ethylene oxide) copolymers. *e-Polym.* 2002;2(1).
 156. Goldraich M, Talmon Y. Direct-imaging cryo-transmission electron microscopy in the study of colloids and polymer solutions. In: Alexandridis PL, Björn editor. *Amphiphilic block copolymers.* Amsterdam: Elsevier Science; 2000. p. 253-80.
 157. Connell SD, Collins S, Fundin J, Yang Z, Hamley IW. In situ atomic force microscopy imaging of block copolymer micelles adsorbed on a solid substrate. *Langmuir.* 2003;19(24):10449-53.
 158. Erhardt R, Zhang M, Böker A, Zettl H, Abetz C, Frederik P, ve ark. Amphiphilic Janus micelles with polystyrene and poly (methacrylic acid) hemispheres. *J Am Chem Soc.* 2003;125(11):3260-7.
 159. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev.* 2001;53(2):283-318.
 160. Nie S. Understanding and overcoming major barriers in cancer nanomedicine. *Nanomedicine.* 2010;5(4):523-8.
 161. Cabral H, Miyata K, Osada K, Kataoka K. Block copolymer micelles in nanomedicine applications. *Chem Rev.* 2018;118(14):6844-92.
 162. Torchilin V. Polymer-coated long-circulating microparticulate pharmaceuticals. *J Microencapsul.* 1998;15(1):1-19.
 163. Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Benoit J-P. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials.* 2006;27(24):4356-73.

164. Yamamoto Y, Nagasaki Y, Kato Y, Sugiyama Y, Kataoka K. Long-circulating poly (ethylene glycol)–poly (d, l-lactide) block copolymer micelles with modulated surface charge. *J Control Release*. 2001;77(1-2):27-38.
165. Knop K, Hoogenboom R, Fischer D, Schubert US. Poly (ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. *Angew Chem Int Ed*. 2010;49(36):6288-308.
166. Savitz JA, Durning SJ. A rare case of anaphylaxis to bowel prep: a case report and review of the literature. *Mil Med*. 2011;176(8):944-5.
167. Hoogenboom R. Poly (2-oxazoline) s: a polymer class with numerous potential applications. *Angew Chem Int Ed*. 2009;48(43):7978-94.
168. Kainthan RK, Hester SR, Levin E, Devine DV, Brooks DE. In vitro biological evaluation of high molecular weight hyperbranched polyglycerols. *Biomaterials*. 2007;28(31):4581-90.
169. Takeuchi H, Kojima H, Yamamoto H, Kawashima Y. Evaluation of circulation profiles of liposomes coated with hydrophilic polymers having different molecular weights in rats. *J Control Release*. 2001;75(1-2):83-91.
170. Torchilin VP, Shtilman MI, Trubetskoy VS, Whiteman K, Milstein AM. Amphiphilic vinyl polymers effectively prolong liposome circulation time in vivo. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1195(1):181-4.
171. Han Y, He Z, Schulz A, Bronich TK, Jordan R, Luxenhofer R, et al. Synergistic combinations of multiple chemotherapeutic agents in high capacity poly (2-oxazoline) micelles. *Mol Pharm*. 2012;9(8):2302-13.
172. Poly(2-ethyl-2-oxazoline): 2018 [Erişim Tarihi 28.11.2018]. Erişim adresi: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=IndirectAdditives&id=POLYETHYLOXAZOLINE>.
173. Fang J, Sawa T, Maeda H. Factors and mechanism of “EPR” effect and the enhanced antitumor effects of macromolecular drugs including SMANCS. In: Maeda H, Kabanov A, Kataoka K, Okano T, editors. *Polymer drugs in the clinical stage. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Boston, MA: Springer; 2004. p. 29-49.
174. Maeda H. SMANCS and polymer-conjugated macromolecular drugs: advantages in cancer chemotherapy. *Adv Drug Del Rev*. 2001;46(1-3):169-85.
175. Maeda H, Bharate G, Daruwalla J. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009;71(3):409-19.
176. Maeda H, Greish K, Fang J. The EPR effect and polymeric drugs: a paradigm shift for cancer chemotherapy in the 21st century. In: Satchi-Fainaro R, Duncan R, editors. *Polymer therapeutics II. Advances in Polymer Science*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2006. p. 103-21.
177. Seki T, Fang J, Maeda H. Tumor-targeted macromolecular drug delivery based on the enhanced permeability and retention effect in solid tumor. In: Lu Y, Mahato R, editors. *Pharmaceutical perspectives of cancer therapeutics*. New York, NY: Springer; 2009. p. 93-120.

178. Torchilin V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Adv Drug Del Rev.* 2011;63(3):131-5.
179. Maeda H, Sawa T, Konno T. Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS. *J Control Release.* 2001;74(1-3):47-61.
180. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995;146(5):1029-39.
181. Matsumoto Y, Nichols JW, Toh K, Nomoto T, Cabral H, Miura Y, ve ark. Vascular bursts enhance permeability of tumour blood vessels and improve nanoparticle delivery. *Nat Nanotechnol.* 2016;11(6):533-8
182. Tang L, Yang X, Yin Q, Cai K, Wang H, Chaudhury I, ve ark. Investigating the optimal size of anticancer nanomedicine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111(43):15344-9.
183. Wang J, Mao W, Lock LL, Tang J, Sui M, Sun W, ve ark. The role of micelle size in tumor accumulation, penetration, and treatment. *ACS Nano.* 2015;9(7):7195-206.
184. Danhier F, Feron O, Pr at V. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J Control Release.* 2010;148(2):135-46.
185. Trapani G, Denora N, Trapani A, Laquintana V. Recent advances in ligand targeted therapy. *J Drug Target.* 2012;20(1):1-22.
186. Hatakeyama H, Akita H, Harashima H. A multifunctional envelope type nano device (MEND) for gene delivery to tumours based on the EPR effect: a strategy for overcoming the PEG dilemma. *Adv Drug Del Rev.* 2011;63(3):152-60.
187. Yu M, Huang S, Yu KJ, Clyne AM. Dextran and polymer polyethylene glycol (PEG) coating reduce both 5 and 30 nm iron oxide nanoparticle cytotoxicity in 2D and 3D cell culture. *Int J Mol Sci.* 2012;13(5):5554-70.
188. Torchilin VP. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(11):813-27.
189. Ishii T, Miyata K, Anraku Y, Naito M, Yi Y, Jinbo T, ve ark. Enhanced target recognition of nanoparticles by cocktail PEGylation with chains of varying lengths. *Chem Commun.* 2016;52(7):1517-9.
190. Gao J, Zhong W, He J, Li H, Zhang H, Zhou G, ve ark. Tumor-targeted PE38KDEL delivery via PEGylated anti-HER2 immunoliposomes. *Int J Pharm.* 2009;374(1-2):145-52.
191. Ahn J, Miura Y, Yamada N, Chida T, Liu X, Kim A, ve ark. Antibody fragment-conjugated polymeric micelles incorporating platinum drugs for targeted therapy of pancreatic cancer. *Biomaterials.* 2015;39:23-30.

192. Farokhzad OC, Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Jon S, Kantoff PW, ve ark. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(16):6315-20.
193. Zhu D, Wu S, Hu C, Chen Z, Wang H, Fan F, ve ark. Folate-targeted polymersomes loaded with both paclitaxel and doxorubicin for the combination chemotherapy of hepatocellular carcinoma. *Acta Biomater*. 2017;58:399-412.
194. Kirpotin DB, Drummond DC, Shao Y, Shalaby MR, Hong K, Nielsen UB, ve ark. Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. *Cancer Res*. 2006;66(13):6732-40.
195. Makino J, Cabral H, Miura Y, Matsumoto Y, Wang M, Kinoh H, ve ark. cRGD-installed polymeric micelles loading platinum anticancer drugs enable cooperative treatment against lymph node metastasis. *J Control Release*. 2015;220:783-91.
196. Miura Y, Takenaka T, Toh K, Wu S, Nishihara H, Kano MR, ve ark. Cyclic RGD-linked polymeric micelles for targeted delivery of platinum anticancer drugs to glioblastoma through the blood-brain tumor barrier. *ACS Nano*. 2013;7(10):8583-92.
197. Quader S, Liu X, Chen Y, Mi P, Chida T, Ishii T, ve ark. cRGD peptide-installed epirubicin-loaded polymeric micelles for effective targeted therapy against brain tumors. *J Control Release*. 2017;258:56-66.
198. Aina OH, Sroka TC, Chen ML, Lam KS. Therapeutic cancer targeting peptides. *Pept Sci (Hoboken)*. 2002;66(3):184-99.
199. Ahmed S, Mathews AS, Byeon N, Lavasanifar A, Kaur K. Peptide arrays for screening cancer specific peptides. *Anal Chem*. 2010;82(18):7533-41.
200. Mathews AS, Ahmed S, Shahin M, Lavasanifar A, Kaur K. Peptide modified polymeric micelles specific for breast cancer cells. *Bioconjug Chem*. 2013;24(4):560-70.
201. Galbiati E, Gambini L, Civitarese V, Bellini M, Ambrosini D, Allevi R, ve ark. "Blind" targeting in action: From phage display to breast cancer cell targeting with peptide-gold nanoconjugates. *Pharmacol Res*. 2016;111:155-62.
202. Soudy R, Gill A, Sprules T, Lavasanifar A, Kaur K. Proteolytically stable cancer targeting peptides with high affinity for breast cancer cells. *J Med Chem*. 2011;54(21):7523-34.
203. Soudy R, Etayash H, Bahadorani K, Lavasanifar A, Kaur K. Breast cancer targeting peptide binds keratin 1: a new molecular marker for targeted drug delivery to breast cancer. *Mol Pharm*. 2017;14(3):593-604.
204. Maysinger D, Berezovska O, Savic R, Soo PL, Eisenberg A. Block copolymers modify the internalization of micelle-incorporated probes into neural cells. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1539(3):205-17.

205. Allen C, Yu Y, Eisenberg A, Maysinger D. Cellular internalization of PCL 20-b-PEO 44 block copolymer micelles. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1421(1):32-8.
206. Luo L, Tam J, Maysinger D, Eisenberg A. Cellular internalization of poly (ethylene oxide)-b-poly (ϵ -caprolactone) diblock copolymer micelles. *Bioconjug Chem*. 2002;13(6):1259-65.
207. Zhang Z, Xiong X, Wan J, Xiao L, Gan L, Feng Y, ve ark. Cellular uptake and intracellular trafficking of PEG-b-PLA polymeric micelles. *Biomaterials*. 2012;33(29):7233-40.
208. Chen H, Kim S, Li L, Wang S, Park K, Cheng J-X. Release of hydrophobic molecules from polymer micelles into cell membranes revealed by Förster resonance energy transfer imaging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(18):6596-601.
209. Hu X, Guan X, Li J, Pei Q, Liu M, Xie Z, ve ark. Hybrid polymer micelles capable of cRGD targeting and pH-triggered surface charge conversion for tumor selective accumulation and promoted uptake. *Chem Commun*. 2014;50(65):9188-91.
210. Luxenhofer R, Han Y, Schulz A, Tong J, He Z, Kabanov AV, ve ark. Poly (2-oxazoline) s as Polymer Therapeutics. *Macromol Rapid Commun*. 2012;33(19):1613-31.
211. Donev R, Koseva N, Petrov P, Kowalczyk A, Thome J. Characterisation of different nanoparticles with a potential use for drug delivery in neuropsychiatric disorders. *World J Biol Psychiatry*. 2011;12(sup1):44-51.
212. Luxenhofer R, Sahay G, Schulz A, Alakhova D, Bronich TK, Jordan R, ve ark. Structure-property relationship in cytotoxicity and cell uptake of poly (2-oxazoline) amphiphiles. *J Control Release*. 2011;153(1):73-82.
213. Tong J, Zimmerman MC, Li S, Yi X, Luxenhofer R, Jordan R, ve ark. Neuronal uptake and intracellular superoxide scavenging of a fullerene (C 60)-poly (2-oxazoline) s nanoformulation. *Biomaterials*. 2011;32(14):3654-65.
214. Waschinski CJ, Herdes V, Schueler F, Tiller JC. Influence of satellite groups on telechelic antimicrobial functions of polyoxazolines. *Macromol Biosci*. 2005;5(2):149-56.
215. Hsiue G-H, Wang C-H, Lo C-L, Wang C-H, Li J-P, Yang J-L. Environmental-sensitive micelles based on poly (2-ethyl-2-oxazoline)-b-poly (L-lactide) diblock copolymer for application in drug delivery. *Int J Pharm*. 2006;317(1):69-75.
216. Wang X, Li X, Li Y, Zhou Y, Fan C, Li W, ve ark. Synthesis, characterization and biocompatibility of poly (2-ethyl-2-oxazoline)-poly (d, l-lactide)-poly (2-ethyl-2-oxazoline) hydrogels. *Acta Biomater*. 2011;7(12):4149-59.
217. Viegas TX, Bentley MD, Harris JM, Fang Z, Yoon K, Dizman B, ve ark. Polyoxazoline: chemistry, properties, and applications in drug delivery. *Bioconjug Chem*. 2011;22(5):976-86.

218. Zhang N, Pompe T, Amin I, Luxenhofer R, Werner C, Jordan R. Tailored Poly (2-oxazoline) Polymer Brushes to Control Protein Adsorption and Cell Adhesion. *Macromol Biosci.* 2012;12(7):926-36.
219. Wang H, Li L, Tong Q, Yan M. Evaluation of photochemically immobilized poly (2-ethyl-2-oxazoline) thin films as protein-resistant surfaces. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2011;3(9):3463-71.
220. Woodle MC, Engbers CM, Zalipsky S. New amphipatic polymer-lipid conjugates forming long-circulating reticuloendothelial system-evading liposomes. *Bioconjug Chem.* 1994;5(6):493-6.
221. Zalipsky S, Hansen CB, Oaks JM, Allen TM. Evaluation of blood clearance rates and biodistribution of poly (2-oxazoline)-grafted liposomes. *J Pharm Sci.* 1996;85(2):133-7.
222. Luxenhofer R, Schulz A, Roques C, Li S, Bronich TK, Batrakova EV, ve ark. Doubly amphiphilic poly (2-oxazoline) s as high-capacity delivery systems for hydrophobic drugs. *Biomaterials.* 2010;31(18):4972-9.
223. Tavano R, Gabrielli L, Lubian E, Fedeli C, Visentin S, Polverino de Laureto P, ve ark. C1q-Mediated Complement Activation and C3 Opsonization Trigger Recognition of Stealth Poly (2-methyl-2-oxazoline)-Coated Silica Nanoparticles by Human Phagocytes. *ACS Nano.* 2018;12(6):5834-47.
224. Sedlacek O, Monnery BD, Filippov SK, Hoogenboom R, Hruby M. Poly (2-Oxazoline) s—Are They More Advantageous for Biomedical Applications Than Other Polymers? *Macromol Rapid Commun.* 2012;33(19):1648-62.
225. Shieh M-J, Peng C-L, Chiang W-L, Wang C-H, Hsu C-Y, Wang S-JJ, ve ark. Reduced skin photosensitivity with meta-tetra (hydroxyphenyl) chlorin-loaded micelles based on a poly (2-ethyl-2-oxazoline)-b-poly (d, l-lactide) diblock copolymer in vivo. *Mol Pharm.* 2010;7(4):1244-53.
226. Peng KY, Wang SW, Lee RS. Amphiphilic diblock copolymers based on poly (2-ethyl-2-oxazoline) and poly (4-substituted- ϵ -caprolactone): Synthesis, characterization, and cellular uptake. *J Polym Sci, Part A: Polym Chem.* 2013;51(13):2769-81.
227. Schulz A, Jaksch S, Schubel R, Wegener E, Di Z, Han Y, ve ark. Drug-induced morphology switch in drug delivery systems based on poly (2-oxazoline) s. *ACS Nano.* 2014;8(3):2686-96.
228. Qiu L-Y, Yan L, Zhang L, Jin Y-M, Zhao Q-H. Folate-modified poly (2-ethyl-2-oxazoline) as hydrophilic corona in polymeric micelles for enhanced intracellular doxorubicin delivery. *Int J Pharm.* 2013;456(2):315-24.
229. Gaspar VM, Baril P, Costa EC, de Melo-Diogo D, Foucher F, Queiroz JA, ve ark. Bioreducible poly (2-ethyl-2-oxazoline)—PLA—PEI-SS triblock copolymer micelles for co-delivery of DNA minicircles and Doxorubicin. *J Control Release.* 2015;213:175-91.
230. Zhao Y, Zhou Y, Wang D, Gao Y, Li J, Ma S, ve ark. pH-responsive polymeric micelles based on poly (2-ethyl-2-oxazoline)-poly (D, L-lactide) for tumor-

- targeting and controlled delivery of doxorubicin and P-glycoprotein inhibitor. *Acta Biomater.* 2015;17:182-92.
231. Raveendran R, Mullen KM, Wellard RM, Sharma CP, Hoogenboom R, Dargaville TR. Poly (2-oxazoline) block copolymer nanoparticles for curcumin loading and delivery to cancer cells. *Eur Polym J.* 2017;93:682-94.
232. Gulyuz S, Ozkose U, Kocak P, Telci D, Yilmaz O, Tasdelen M. In-vitro cytotoxic activities of poly (2-ethyl-2-oxazoline)-based amphiphilic block copolymers prepared by CuAAC click chemistry. *Express Polym Lett.* 2018;12(2):146-58.
233. Kara A, Ozturk N, Esendagli G, Ozkose UU, Gulyuz S, Yilmaz O, ve ark. Development of novel self-assembled polymeric micelles from partially hydrolysed poly (2-ethyl-2-oxazoline)-co-PEI-b-PCL block copolymer as non-viral vectors for plasmid DNA in vitro transfection. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* (in press). 2018. 10.1080/21691401.2018.1491478
234. ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1): 2005 [Erişim Tarihi 05.12.2018]. Erişim adresi: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf.
235. Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J Chromatogr A.* 2003;987(1-2):57-66.
236. González AG, Herrador MÁ. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC, Trends Anal Chem.* 2007;26(3):227-38.
237. APPENDIX 1 – ORA Validation and Verification Guidance for Human Drug Analytical Methods: 2018 [Erişim Tarihi 28.12.2018]. Erişim adresi: <https://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/FieldScience/UCM173090.pdf>.
238. Lee KY, Kwon IC, Jeong SY. Physicochemical characteristics of poly (2-ethyl-2-oxazoline)/poly (ϵ -caprolactone) block copolymer micelles in water. *Polym Bull.* 2006;56(4-5):385-93.
239. Gao Y, Li Y, Li Y, Yuan L, Zhou Y, Li J, ve ark. PSMA-mediated endosome escape-accelerating polymeric micelles for targeted therapy of prostate cancer and the real time tracing of their intracellular trafficking. *Nanoscale.* 2015;7(2):597-612.
240. Kwon G, Naito M, Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, Kataoka K. Micelles based on AB block copolymers of poly (ethylene oxide) and poly (β -benzyl L-aspartate). *Langmuir.* 1993;9(4):945-9.

241. Wilhelm M, Zhao CL, Wang Y, Xu R, Winnik MA, Mura JL, ve ark. Poly (styrene-ethylene oxide) block copolymer micelle formation in water: a fluorescence probe study. *Macromolecules*. 1991;24(5):1033-40.
242. Ponta A, Bae Y. PEG-poly (amino acid) block copolymer micelles for tunable drug release. *Pharm Res*. 2010;27(11):2330-42.
243. Zange R, Kissel T. Comparative in vitro biocompatibility testing of polycyanoacrylates and poly (D, L-lactide-co-glycolide) using different mouse fibroblast (L929) biocompatibility test models. *Eur J Pharm Biopharm*. 1997;44(2):149-57.
244. Etayash H, Jiang K, Azmi S, Thundat T, Kaur K. Real-time detection of breast cancer cells using peptide-functionalized microcantilever arrays. *Sci Rep*. 2015;5:13967.
245. Liu L, Tian X, Ma Y, Duan Y, Zhao X, Pan G. A Versatile Dynamic Mussel-Inspired Biointerface: From Specific Cell Behavior Modulation to Selective Cell Isolation. *Angew Chem Int Ed*. 2018;57(26):7878-82.
246. Das G, Nicastrì A, Coluccio ML, Gentile F, Candeloro P, Cojoc G, ve ark. FT-IR, Raman, RRS measurements and DFT calculation for doxorubicin. *Microsc Res Tech*. 2010;73(10):991-5.
247. Li F, Zheng C, Xin J, Chen F, Ling H, Sun L, ve ark. Enhanced tumor delivery and antitumor response of doxorubicin-loaded albumin nanoparticles formulated based on a Schiff base. *International journal of nanomedicine*. 2016;11:3875-90.
248. Kim S, Shi Y, Kim JY, Park K, Cheng J-X. Overcoming the barriers in micellar drug delivery: loading efficiency, in vivo stability, and micelle–cell interaction. *Expert Opin Drug Deliv*. 2010;7(1):49-62.
249. Fernandes JC, Qiu X, Winnik FM, Benderdour M, Zhang X, Dai K, ve ark. Linear polyethylenimine produced by partial acid hydrolysis of poly (2-ethyl-2-oxazoline) for DNA and siRNA delivery in vitro. *Int J Nanomed*. 2013;8:4091–102.
250. Mathkar S, Kumar S, Bystol A, Olawoore K, Min D, Markovich R, ve ark. The use of differential scanning calorimetry for the purity verification of pharmaceutical reference standards. *J Pharm Biomed Anal*. 2009;49(3):627-31.
251. Doustgani A. Doxorubicin release from optimized electrospun polylactic acid nanofibers. *J Ind Text*. 2017;47(1):71-88.
252. Vigevani A, Williamson MJ. Doxorubicin. In: Florey K, editor. *Analytical Profiles of Drug Substances*. 9: Academic Press; 1981. p. 245-74.
253. Huang D, Zhou Y, Xiang Y, Shu M, Chen H, Yang B, ve ark. Polyurethane/doxorubicin nanoparticles based on electrostatic interactions as pH-sensitive drug delivery carriers. *Polym Int*. 2018;67(9):1186-93.

254. Righetti PG, Menozzi M, Gianazza E, Valentini L. Protolytic equilibria of doxorubicin as determined by isoelectric focusing and 'electrophoretic titration curves'. *FEBS Lett.* 1979;101(1):51-5.
255. Fiallo MML, Garnier-Suillerot A, Matzanke B, Kozlowski H. How Fe³⁺ binds anthracycline antitumour compounds: The myth and the reality of a chemical sphinx. *J Inorg Biochem.* 1999;75(2):105-15.
256. Lee SC, Chang Y, Yoon J-S, Kim C, Kwon IC, Kim Y-H, ve ark. Synthesis and micellar characterization of amphiphilic diblock copolymers based on poly (2-ethyl-2-oxazoline) and aliphatic polyesters. *Macromolecules.* 1999;32(6):1847-52.
257. Kim C, Lee SC, Kang SW, Kwon IC, Jeong SY. Phase-transition characteristics of amphiphilic poly (2-ethyl-2-oxazoline)/poly (ϵ -caprolactone) block copolymers in aqueous solutions. *J Polym Sci, Part B: Polym Phys.* 2000;38(18):2400-8.
258. Heydenreich AV, Westmeier R, Pedersen N, Poulsen HS, Kristensen HG. Preparation and purification of cationic solid lipid nanospheres—effects on particle size, physical stability and cell toxicity. *Int J Pharm.* 2003;254(1):83-7.
259. Cunningham AJ, Robinson M, Banquy X, Leblond J, Zhu X. Bile acid-based drug delivery systems for enhanced doxorubicin encapsulation: Comparing hydrophobic and ionic interactions in drug loading and release. *Mol Pharm.* 2018;15(3):1266-76.
260. Wang J, Xing X, Fang X, Zhou C, Huang F, Wu Z, ve ark. Cationic amphiphilic drugs self-assemble to the core-shell interface of PEGylated phospholipid micelles and stabilize micellar structure. *Phil Trans R Soc A.* 2013;371(2000):20120309.
261. Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat Biotechnol.* 2015;33(9):941-51.
262. Geng Y, Dalhaimer P, Cai S, Tsai R, Tewari M, Minko T, ve ark. Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nat Nanotechnol.* 2007;2(4):249-55.
263. Champion JA, Mitragotri S. Role of target geometry in phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(13):4930-4.
264. Wan X, Min Y, Bludau H, Keith A, Sheiko SS, Jordan R, ve ark. Drug combination synergy in worm-like polymeric micelles improves treatment outcome for small cell and non-small cell lung cancer. *ACS Nano.* 2018;12(3):2426-39.
265. Ng KE, Amin MCIM, Katas H, Amjad MW, Butt AM, Kesharwani P, ve ark. pH-Responsive Triblock Copolymeric Micelles Decorated with a Cell-Penetrating Peptide Provide Efficient Doxorubicin Delivery. *Nanoscale Res Lett.* 2016;11(1):539.

266. Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EMV, Somasundaran P, ve ark. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nat Mater*. 2009;8:543–57.
267. Fröhlich E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomed*. 2012;7:5577–91.
268. Xiao K, Li Y, Luo J, Lee JS, Xiao W, Gonik AM, ve ark. The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholeic acid based micellar nanoparticles. *Biomaterials*. 2011;32(13):3435-46.
269. He C, Hu Y, Yin L, Tang C, Yin C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*. 2010;31(13):3657-66.
270. Curtis KA, Miller D, Millard P, Basu S, Horkay F, Chandran PL. Unusual salt and pH induced changes in polyethylenimine solutions. *PLoS One*. 2016;11(9):e0158147.
271. Jeong JH, Song SH, Lim DW, Lee H, Park TG. DNA transfection using linear poly(ethylenimine) prepared by controlled acid hydrolysis of poly(2-ethyl-2-oxazoline). *J Control Release*. 2001;73(2):391-9.
272. Fernandes JC, Qiu X, Winnik FM, Benderdour M, Zhang X, Dai K, ve ark. Linear polyethylenimine produced by partial acid hydrolysis of poly(2-ethyl-2-oxazoline) for DNA and siRNA delivery in vitro. *International journal of nanomedicine*. 2013;8:4091-102.
273. Shah R, Kronekova Z, Zahoranová A, Roller L, Saha N, Saha P, ve ark. In vitro study of partially hydrolyzed poly(2-ethyl-2-oxazolines) as materials for biomedical applications. *J Mater Sci Mater Med*. 2015;26(4):157.

8. EKLER

EK-1: Turnitin Dijital Makbuz



Digital Receipt

This receipt acknowledges that **Turnitin** received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author:	Naile Öztürk
Assignment title:	HEDEFLENDİRİLMİŞ ANTİKANSER ...
Submission title:	HEDEFLENDİRİLMİŞ ANTİKANSER ...
File name:	TEZ--kapak_ve_ana_metin.docx
File size:	25.58M
Page count:	151
Word count:	31,647
Character count:	237,176
Submission date:	08-Feb-2019 07:15AM (UTC+0300)
Submission ID:	1074831373



Copyright 2019 Turnitin. All rights reserved.

EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu

08.02.2019

Tümün

Turnitin Originality Report

Processed on: 08-Feb-2019 07:25 +03
 ID: 1074831373
 Word Count: 31647
 Submitted: 1

HEDEFLENDİRİLMİŞ ANTİKANSER İLAÇ YÜKLÜ POLİMERİK NANOTAŞIYICILARIN FORMÜLASYONLARI VE KARAKTERİZASYONLARI By Naile Öztürk

< 1% match (Internet from 03-Nov-2017)

Similarity Index	Similarity by Source
1%	Internet Sources: 0%
	Publications: 0%
	Student Papers: 0%

<http://nardus.mon.gov.rs/bitstream/handle/123456789/4593/Doktora%20disertacija.pdf?isAllowed=y&sequence=1>

< 1% match (student papers from 18-Feb-2016)
[Submitted to Dumlupınar University on 2016-02-18](#)

< 1% match (publications)
[AYHAN, Hakan and AYHAN, Fatma. "Kontrollü ilaç salımı için fotoçapraz bağlı polifetilen glikol\) hidrojel", Türk Biyokimya Derneği, 2014.](#)

T.C. HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
 HEDEFLENDİRİLMİŞ ANTİKANSER İLAÇ YÜKLÜ POLİMERİK NANOTAŞIYICILARIN FORMÜLASYONLARI VE KARAKTERİZASYONLARI Ecz. Naile ÖZTÜRK Farmasötik Teknoloji Programı DOKTORA TEZİ ANKARA 2019

1.1. GİRİŞ Kansere tüm dünyada önde gelen ölüm sebeplerinden biridir. Kansere tedavisinde kullanılan yöntemler genel olarak cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi olarak sınıflandırılabilir. Bu üç yöntem kadar geniş ölçüde olmasa da hormonal tedaviler, kök hücre nakli, immünoterapi ve hedefe yönelik tedaviler (küçük moleküller ve monoklonal antikorlar) de kansere tedavisinde kullanılmaktadır (1, 2). Kemoterapi ve radyoterapi ile amaçlanan, sağlıklı hücrelere göre çok daha hızlı büyümeleri nedeniyle ilaçlara ve radyasyona karşı daha duyarlı olan tümör hücrelerinin öldürülmesidir. Etkili bir tedavi için, tedavi yönteminin kanser hücrelerini hedefleyip öldürmesi ve mümkün olduğunca az sağlıklı hücreyi etkilemesi gerekmektedir (3). Kansere kemoterapisinde kullanılan konvansiyonel ilaçların, sağlıklı dokularda toksisite göstermeleri, düşük stabiliteye sahip olmaları ve ilaç direnci gelişmesi gibi kullanımlarını sınırlayıcı özelliklere sahip olmaları yeni tedavi yöntemlerinin araştırılmasını gerekli kılmaktadır. Nanometre boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler (nanotaşıyıcılar) kullanılarak pasif ve aktif hedeflendirme yoluyla kemoterapötik ilaçların tümör bölgesinde birikmesi sağlanıp, sağlıklı dokulardaki miktardan azaltılabilir. İlaçlar bu sistemlere yüklenerek degradasyondan korunabilir ve stabiliteyi

file:///C:/Users/.../Downloads/Tumun_Originality_Report_1074831373.html

1/63

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Naile Öztürk

Yazışma Adresi: İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji
Anabilim Dalı Malatya

e-mail: naileozturk@gmail.com, naile.ozturk@hacettepe.edu.tr,
naile.ozturk@inonu.edu.tr

Eğitim:

Lisans: 2006-2011

İnönü Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Malatya

Doktora: 2013-...

Hacettepe Üniversitesi, Farmasötik Teknoloji Doktora Programı, Ankara

Akademik ve Mesleki Deneyim:

(2013-...)

Araştırma Görevlisi (ÖYP)

İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji A.D.

(2014-2018)

Araştırma Görevlisi (ÖYP)

Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji A.D.

Yayınlar

SCI ve SCI-E indekslerine giren makaleler

1. Ünal, H, Öztürk, N, Bilensoy, E. Formulation development, stability and anticancer efficacy of core-shell cyclodextrin nanocapsules for oral chemotherapy with camptothecin. (2015) Beilstein Journal of Organic Chemistry, 11, pp. 204-212.
2. Ozturk, N, Kaynak, M.S, Sahin, S. Comparison of dissolution profiles of commercially available Lamivudine tablets. (2015) Dissolution Technologies, 22 (4), pp. 38-43.
3. Gulsun, T, Ozturk, N, Kaynak, M.S, Vural, I, Sahin, S. Preparation and evaluation of furosemide containing orally disintegrating tablets by direct compression. (2017) Pharmazie, 72 (7), pp. 389-394.
4. Ozturk, N, Kara, A, Vural, I. Evaluation of antitumor activity of a non-steroidal anti-inflammatory drug, ibuprofen, by a targeted nanoparticulate system. (2017) Latin American Journal of Pharmacy, 36 (1), pp. 44-52.
5. Sekerdag, E, Lüle, S, Bozdağ Pehlivan, S, Öztürk, N, Kara, A, Kaffashi, A, Vural, I, Işııkay, I, Yavuz, B, Oguz, K.K, Söylemezoğlu, F, Gürsoy-Özdemir, Y, Mut, M. A potential non-invasive glioblastoma treatment: Nose-to-brain delivery of farnesylthiosalicylic acid incorporated hybrid nanoparticles. (2017) Journal of Controlled Release, 261, pp. 187-198.
6. Timur, S.S, Şahin, A, Aytekin, E, Öztürk, N, Polat, K.H, Tezel, N, Gürsoy, R.N, Çalış, S. Design and in vitro evaluation of tenofovir-loaded vaginal gels for the prevention of HIV infections. (2018) Pharmaceutical Development and Technology, 23 (3), pp. 301-310.
7. Kara, A, Ozturk, N, Esendagli, G, Ozkose, U.U, Gulyuz, S, Yilmaz, O, Telci, D, Bozkir, A, Vural, I. Development of novel self-assembled polymeric micelles from partially hydrolysed poly(2-ethyl-2-oxazoline)-co-PEI-b-PCL block copolymer as non-viral vectors for plasmid DNA in vitro transfection. (2018) Artificial Cells,

Kitap Bölümü

1. Kara, A, Ozturk, N, & Vural, I. In Vitro CNS Models. (2017) In Nanotechnology Methods for Neurological Diseases and Brain Tumors (pp. 151-185).

Bildiriler

Poster Bildirileri (Uluslararası)

1. Genç M, Öztürk N, Kaynak M.S, Sahin S. “Comparison of Dissolution Profiles of Two Commercially Available Furosemide Tablets” MAGUM-DRD 2011, International Symposium on Drug Research and Development “From Chemistry to Medicine”, 27-29 May, 2011, Antalya-Turkey.
2. Öztürk N, Kaynak M.S, Şener M, Erdemoğlu M, Şahin S. “ Investigation Of Dissolution Characteristics Of Amorphous Furosemide Prepared By Ball Milling Technique” International Multidisciplinary Symposium on Drug Research & Development 28-30 November 2013, Kervansaray Hotel Lara, Antalya, Turkey
3. Öztürk N, Kaynak M.S, Büyüktuncel S.E, Sahin S. “Development And Validation Of A Rp-Hplc Method For Determination Of Lamivudine From Drug Dissolution Studies” International Multidisciplinary Symposium on Drug Research & Development 28-30 November 2013, Kervansaray Hotel Lara, Antalya, Turkey
4. Ozturk N, Kara A, Vural I. “Preparation And Cytotoxic Evaluation Of Antibody Targeted Ibuprofen Loaded-Plga Nanoparticles”, 17th International Pharmaceutical Technology Symposium, 8-10 September 2014, Antalya, Turkey
5. Kara A, Anuta V, Barbuceanu S.F, Nitulescu G.M, Ozturk N, Pehlivan S, Sahin S, Sarisozen C, Uivarosi V, Velescu B.S, Vural I. “Cytotoxicity Of Some New Ruthenium (III) Complexes With Improved Solubility Conjugated With Quinolone”, 17th International Pharmaceutical Technology Symposium, 8-10 September 2014, Antalya, Turkey
6. Ozturk N, Kara A, Vural I. “Investigate the Effect Of Ibuprofen And Paclitaxel Combination To Determine The Cytotoxicity In L929 Fibroblast Cells”, 17th International Pharmaceutical Technology Symposium, 8-10 September 2014, Antalya, Turkey
7. Ozturk N, Gulsun Inal T, Sahin S, Vural I. “Comparison Of Furosemide Nanocrystals And Nanosuspensions In Terms Of Solubility And Permeability”, 17th International Pharmaceutical Technology Symposium, 8-10 September 2014, Antalya, Turkey
8. Ozturk N, Kara A, Vural I. “Ibuprofen Loaded Nanoparticles as an Anticancer Agent: Cytotoxicity on MCF-7 Cell Line” AAPS Annual Meeting and Exposition, 2-6 November 2014, San Diego, CA, USA
9. Ozturk N, Kara A, Vural I. “ The combined treatment of nonsteroidal anti-inflammatory drug ibuprofen and paclitaxel to suppress the viability of mcf-7 breast cancer cell line”, AAPS Annual Meeting and Exposition, 2-6 November 2014, San Diego, CA, USA
10. Gulsun Inal T, Ozturk N, Pehlivan S, Sahin S, Vural I. “ Effect of Milling Time on the Formulation Parameters of Nanosuspensions”, AAPS Annual Meeting and Exposition, 2-6 November 2014, San Diego, CA, USA

11. Gulsun Inal T, Ozturk N, Kaynak M.S, Sahin S, Vural I. “ Preparation and Evaluation of Furosemide Containing Orally Disintegrating Tablets by Direct Compression”, AAPS Annual Meeting and Exposition, 2-6 November 2014, San Diego, CA, USA
12. Ozturk N, Kara A, Gulsun Inal T, Pehlivan S, Vural I, Sahin S. “ Effect of Precipitation Inhibitors on Supersaturation and Solubility of Furosemide”, AAPS Annual Meeting and Exposition, 2-6 November 2014, San Diego, CA, USA
13. Ozturk N, Gulsun Inal T, Kaynak M.S, Vural I, Sahin S. “ Development of Orally Disintegrating Tablets Containing Olmesartan Medoxomil and Amlodipine Besylate”, AAPS Annual Meeting and Exposition, 2-6 November 2014, San Diego, CA, USA
14. Ozturk N, Kara A, Vural I. “In Vitro Characterization And Evaluation Of PLA Nanoparticles Loaded With Telmisartan” GPSS 2015, Antalya, Turkey, 12-15 November 2015.
15. Kara A, Ozturk N, Vural I. “Determination Of Cytotoxicity Of Dexamethasone Sodium Phosphate On MCF-7 And L929 Cell Lines” GPSS 2015, 12-15 November 2015, Antalya, Turkey.
16. Ozturk N, Kara A, Ozkose UU, Yilmaz O, Bozkır A, Vural I. “Polymeric Micelles Based On Poly (2-Ethyl-2-Oxazoline) As Drug Carriers” GPSS 2015, 12-15 November 2015, Antalya, Turkey.
17. Kara A, Ozturk N, Gulyuz S, Yilmaz O, Bozkır A, Vural I. “The Effect Of Preparation Method On Size Of Poly (2-Ethyl-2-Oxazoline)(PetoX)-B-Polycaprolactone (PCL) Polymeric Micelles” GPSS 2015, 12-15 November 2015, Antalya, Turkey.
18. Sahin G, Ozturk N, Vural I. “Development and Evaluation Of Orally Disintegrating Tablets Of Fosinopril Sodium By Direct Compression Method” GPSS 2015, 12-15 November 2015, Antalya, Turkey.
19. Ozturk N, Kara A, Vural I. “Telmisartan loaded nanoparticles prepared by emulsion solvent evaporation technique”, 18th IPTS, 18-21 September 2016, Antalya, Turkey.
20. Ozturk N, Kara A, Vural I. “Investigation of anti-tumor effect of telmisartan loaded poly(D,L-lactide) nanoparticles on mcf-7 cells”, 18th IPTS, 18-21 September 2016, Antalya, Turkey.
21. Kara A, Ozturk N, Vural I. “In vitro evaluation of dexamethasone sodium phosphate (dex-np) loaded chitosan nanoparticles as an antitumor agent on mcf-7 cell line”, 18th IPTS, 18-21 September 2016, Antalya, Turkey.
22. Kara A, Ozturk N, Gulyuz S, Ozkose U. U, Vural I, Yılmaz O, Bozkır A. “Micellar characteristics of poly-(2-ethyl-2-oxazoline)-co-poly(ethylenimine)- block-poly(ϵ -caprolactone) (petox-co-pe ϵ -b-pcl) block copolymers of different hydrolysis degrees of PEtOx”, 18th IPTS, 18-21 September 2016, Antalya, Turkey.
23. Sahin G, Ozturk N, Vural I. “Dissolution profiles of fosinopril sodium orodispersible tablets and orodispersible films”, 18th IPTS, 18-21 September 2016, Antalya, Turkey.
24. Kara A, Ozturk N, Ozkose UU, Bolat ZB, Yilmaz O, Telci D, Bozkır A, Vural I. “Evaluation Of Morphological And Physical Characteristics Of Poly (2-Ethyl-2-Oxazoline)-Co-Poly(Ethylenimine)-Block-Poly(ϵ -Caprolactone)(PetoX-Co-Pe ϵ -

- B-Pcl) Polymeric Micelle As A Gene Delivery Agent”, AAPS National Biotechnology Conference, 1-3 May 2017, San Diego, USA.
25. Kara A, Ozturk N, Esendagli G, Bolat ZB, Gulyuz S, Telci D, Yilmaz O, Bozkir A, Vural I. “Novel Polymeric Micelles Based On Poly-(2-Ethyl-2-Oxazoline)-Co-Poly(Ethylenimine)-Block-Poly(ϵ -Caprolactone) Petox-Co-Pei-B-Pcl Block Copolymer With Various Hydrolysis Degree To Evaluate The Effect Of Transfection Efficiency On MCF-7 Cells”, AAPS National Biotechnology Conference, 1-3 May 2017, San Diego, USA.
 26. Kara A, Ozturk N, Vural I. “Development And Characterization Of Novel Co-Delivery System Based On Dexamethasone Sodium Phosphate (Dex-Np) Loaded Chitosan With Plasmid DNA”, GPSS2017: 2nd Gazi Pharma Symposium Series, 11-13 October 2017, Ankara, Turkey.
 27. Al-Heibshy FNS, Basaran E, Ozturk N, Demirel M, "Enhancement Of Solubility Of Rosuvastatin Calcium By Complexation With Methyl-Betacyclodextrin", GPSS2017: 2nd Gazi Pharma Symposium Series, 11-13 October 2017, Ankara, Turkey.
 28. Al-Heibshy FNS, Basaran E, Ozturk N, Demirel M. "Inclusion Complexes Of Rosuvastatin Calcium With Sulfobutylether-Beta-Cyclodextrin (Captisol®)", GPSS2017: 2nd Gazi Pharma Symposium Series, 11-13 October 2017, Ankara, Turkey.
 29. Ozturk N, Pezik E, Kara A, Vural I. “Pullulan Based Orally Disintegrating Films Of Telmisartan”, GPSS2017: 2nd Gazi Pharma Symposium Series, 11-13 October 2017, Ankara, Turkey.
 30. Pezik E, Ozturk N, Vural I. “Orally Disintegrating Tablets Of Telmisartan; Formulation Development And Evaluation”, GPSS2017: 2nd Gazi Pharma Symposium Series, 11-13 October 2017, Ankara, Turkey.
 31. Sekerdag E, Lüle S, Bozdağ Pehlivan S, Öztürk N, Kara A, Kaffashi A, Vural I, Işıkkay I, Yavuz B, Oguz K.K, Söylemezoğlu F, Gürsoy-Özdemir Y, Mut M. “The Biodistribution Of Farnesylthiosalicylic Acid Incorporated Hybrid Nanoparticles Following Intranasal Administration In Rats”, GPSS2017: 2nd Gazi Pharma Symposium Series, 11-13 October 2017, Ankara, Turkey.
 32. Ozturk N, Kara A, Ozkose U.U Gulyuz S, Yilmaz O, Bozkir A, Vural I. “Preparation and Characterization of Docetaxel Loaded Polymeric Micelles” 19th IPTS, 17-19 September 2018, Antalya, Turkey.
 33. Ozturk N, Kara A, Ozkose U.U Gulyuz S, Yilmaz O, Bozkir A, Vural I. “In Vitro Evaluation of pH Sensitive Doxorubicin Loaded Micelles” 19th IPTS, 17-19 September 2018, Antalya, Turkey.
 34. Ozturk N, Uğur A.B, Vural I. Çetin M. “Investigation of Cytotoxic Effects of Daidzein and Levetiracetam on RG2 Glioma Cell Line” 19th IPTS, 17-19 September 2018, Antalya, Turkey.
 35. Kara A, Ozturk N, Esendagli G, Ozkose U.U, Gulyuz S, Bolat Z, Yilmaz O, Telci D, Bozkir A, Vural I. “Apoptic Gene Therapy by Novel Developed Partially Hydrolysed PEtOx Based Micellar Nanocarriers on MCF-7 Breast Cancer Cells” 19th IPTS, 17-19 September 2018, Antalya, Turkey.
 36. Kara A, Ozturk N, Gulyuz S, Ozkose U.U, Bolat Z, Yilmaz O, Telci D, Bozkir A, Vural I. “Evaluation of Stealth Properties of PEtOx Based Micelle/Gene

Complexes by Stability Studies” 19th IPTS, 17-19 September 2018, Antalya, Turkey.

37. Pezik E, Ozturk N, Celiker A, Sahin S, Vural I, “Effect of Lamotrigine on Viability of MCF-7 and RG-2 Cells” 19th IPTS, 17-19 September 2018, Antalya, Turkey.
38. Tashan E, Karakucuk A, Ozturk N, Celebi N, “In Vitro Caco-2 Permeability Studies of Ziprasidone Hydrochloride Monohydrate Nanosuspensions” 19th IPTS, 17-19 September 2018, Antalya, Turkey.

Sözlü Bildiriler (Uluslararası)

1. Öztürk N, Kaynak M.S, Sahin S. “Comparison Of Dissolution Profiles Of Lamivudine Tablets Marketed In Turkey”, International Multidisciplinary Symposium on Drug Research & Development 28-30 November 2013, Kervansaray Hotel Lara, Antalya, Turkey

Katıldığı Bilimsel Toplantılar

1. MAGUM-DRD 2011, International Symposium on Drug Research and Development “From Chemistry to Medicine”, 27-29 May, 2011, Antalya, Turkey.
2. International Multidisciplinary Symposium on Drug Research & Development, 28-30 November 2013, Kervansaray Hotel Lara, Antalya, Turkey
3. 17th International Pharmaceutical Technology Symposium, 8-10 September 2014, Antalya, Turkey
4. AAPS Annual Meeting and Exposition, 2-6 November 2014, San Diego, CA, USA
5. GPSS 2015, 12-15 November 2015, Antalya, Turkey,
6. 18th International Pharmaceutical Technology Symposium, 18-21 September 2016, Antalya, Turkey.
7. AAPS National Biotechnology Conference, 1-3 May 2017, San Diego, USA.
8. GPSS 2017: 2nd Gazi Pharma Symposium Series, 11-13 October 2017, Ankara, Turkey.
9. 19th International Pharmaceutical Technology Symposium, 17-19 September 2018, Antalya, Turkey.