

**PAKLİTAKSEL İÇEREN BİYOPARÇALANIR
POLİMERİK NANOPARTİKÜL
FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ
VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Özge ATASOY KOCA

Eskişehir 2019

**PAKLİTAKSEL İÇEREN BİYOPARÇALANIR POLİMERİK
NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE İN
VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Özge ATASOY KOCA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ebru BAŞARAN

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Temmuz 2019

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1403S065 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Özge ATASOY KOCA'nın "Paklitaksel İçeren Biyoparçalanır Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve *In Vitro* Değerlendirilmesi" başlıklı tezi 30./07./2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı): Doç. Dr. Ebru BAŞARAN

Üye : Doç. Dr. Evrim YENİLMEZ

Üye : Dr. Öğretim. Üyesi. Umay Merve GÜVEN

Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN

Enstitü Müdürü



ÖZET

PAKLİTAKSEL İÇEREN BİYOPARÇALANIR POLİMERİK NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Özge ATASOY KOCA

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temmuz 2019

Danışman: Doç.Dr. Ebru BAŞARAN

Paklitaksel (PTX) son yıllarda geliştirilmiş etkili antineoplastik ajanlardan biri olarak tanımlanmaktadır. Tek başına veya diğer kemoterapi ajanlarıyla kombine olarak over, meme, akciğer, baş ve boyun kanserleri de dahil solid tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Genel olarak intravenöz yolla uygulanmakta olup, sudaki ve pek çok farmasötik çözünürlükteki düşük çözünürlüğü ve dar terapötik indeksi klinik kullanımını sınırlamaktadır. Belirtilen sakıncaların üstesinden gelmek amacıyla PTX'in pek çok modern ilaç taşıyıcı sistemler ile formülasyonları gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen bu yeni sistemler arasında doğal veya sentetik kaynaklı biyoparçalanır polimerik sistemlerin kullanıldığı, kontrollü salımdaki etkinlikleri nedeni ile, tez çalışmamız kapsamında üstün özellikleri ile etkinliği ve güvenilirliği kanıtlanmış, daha çok tablet formülasyonlarında kullanılan bir polimer olan Kollidon® SR ve özellikle biyolojik olarak parçalanabilen, vücutta toksik olmayan monomerlere bozunabilmesi nedeni ile sıklıkla tercih edilen polimerlerden kitosan kullanılarak PTX içeren polimerik nanopartiküller, püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlanmıştır. Hazırlanan sistemlerin karakteristik özellikleri *in vitro* yöntemler ile detaylı olarak incelenmiştir. Analiz sonuçları değerlendirildiğinde, nanopartiküllerin başarı ile hazırlandığı ve saklama süresi boyunca kararlı sistemler oldukları ortaya konmuştur. Sonuç olarak formülasyonların kanser tedavisinde kullanılabilecek umut vaat eden sistemler oldukları görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Paklitaksel, Polimerik nanopartiküller, Kanser tedavisi, Kollidon® SR, Kitosan.

ABSTRACT

FORMULATION AND *IN VITRO* EVALUATION OF BIODEGRADABLE POLYMERIC NANOPARTICLE FORMULATIONS CONTAINING PACLITAXEL

Özge ATASOY KOCA

Department of Pharmaceutical Technology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, July 2019

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ebru BAŞARAN

Paclitaxel (PTX) has been described as one of the effective antineoplastic agents developed in recent years. It is used alone or in combination with other chemotherapy agents for the treatment of solid tumors including ovarian, breast, lung, head and neck cancers. It is generally administered intravenously, and its low solubility and narrow therapeutic index in water and many pharmaceutical solvents limit its clinical use. In order to overcome the drawbacks mentioned, PTX has been formulated with many modern drug delivery systems. Among these new systems, natural or synthetic origin biodegradable polymeric systems are used due to their efficacy in controlled release. Polymeric nanoparticles containing PTX were formulated with Kollidon[®] SR; is a polymer which is mostly used in tablet formulations and chitosan; which is one of the most preferred polymers because of its degradability to non-toxic monomers, by spray-drying method and the characteristics of the prepared systems were examined in detail by *in vitro* methods. Analyses results revealed that nanoparticles were prepared successfully and were stable during the storage period. As a result of the study, it can be regarded as the formulations are promising systems that can be used in cancer treatment.

Keywords: Paclitaxel, Polymeric nanoparticles, Cancer treatment, Kollidon[®] SR,

Kitosan

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, her zaman bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olan, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen, iş hayatı ile birlikte sürdürdüğüm çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren ve mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden her daim faydalanacağımı düşündüğüm kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Ebru BAŞARAN'a teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Teşekkürlerin az kalacağı diğer üniversite hocalarım Prof.Dr. Emine Yasemin YAZAN'a, Prof.Dr. Müzeyyen DEMİREL'e, Doç.Dr. Evrim YENİLMEZ'e, Doç.Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na, Doktor Öğretim Üyesi Murat Sami BERKMAN'a da bana yüksek lisans eğitimim boyunca kazandırdıkları her şey için ve beni gelecekte söz sahibi yapacak bilgilerle donattıkları için hepsine teker teker teşekkürlerimi sunuyorum.

Yüksek lisans programına başlamamda, eğitim sürecim ve mesleki hayatımda da bana destek olan değerli ablam Duygu ATASOY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ve son olarak çalışmamda desteğini ve bana olan güvenini benden esirgemeyen eşim Yasin KOCA'ya ve beni bu günlere sevgi ve saygı ile yetiştirerek getiren ve bana maddi manevi her türlü desteği sağlayan fedakar aileme sonsuz teşekkürler.

Özge ATASOY KOCA

30/07/2019

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

||
ÖZGE ATASOY KOCA

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	2
2.1. Kanser Oluşumu ve Tedavi Yöntemleri	2
2.1.1. Kanser oluşumu	2
2.1.2. Kanser Genetiği	3
2.1.2.1. <i>Onkogen</i>	3
2.1.2.2. <i>Tümör baskılayıcı genler</i>	4
2.1.2.3. <i>DNA tamir genleri</i>	4
2.1.3. Kanser insidansı.....	5
2.1.4. Kanser tanısı ve sınıflandırılması.....	5
2.1.5. Kanser tedavi yöntemleri	6
2.1.6. Kanser tedavisinde yeni ilaç taşıyıcı sistemler	8
2.2. Polimerik Nanopartiküller.....	9
2.2.1. Polimerik nanopartikül hazırlama yöntemleri	11

2.2.2. Polimerik nanopartikülerin karakterizasyonu	12
2.2.3. Polimerik nanopartikül formülasyonlarının toksisitesi	13
2.3. Paklitaksel	13
2.3.1. Paklitaksel'in farmakolojik özellikleri	14
2.3.2. Paklitaksel'in farmakokinetik özellikleri	15
2.3.3. Paklitaksel'in yan etkileri ve toksisitesi.....	17
2.3.4. Paklitaksel'in miktar tayin yöntemleri.....	18
2.3.5. Paklitaksel içeren ticari preparatlar	18
3. GEREÇLER.....	20
3.1. Kullanılan Maddeler.....	20
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	21
4. YÖNTEMLER	22
4.1. <i>İn Vitro</i> Çalışmalar.....	22
4.1.1. Çalışılacak maddeler ile yapılan çalışmalar	22
4.1.1.1. <i>Paklitaksel ile yapılan çalışmalar</i>	22
4.1.1.1.1. <i>Termal analiz</i>	22
4.1.1.1.2. <i>X-ışını kırınım analizi</i>	22
4.1.1.1.3. <i>Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi</i>	22
4.1.1.1.4. <i>Nükleer manyetik rezonans analizi</i>	22
4.1.1.1.5. <i>Paklitaksel'in HPLC ile analitik miktar tayini</i>	22
Doğrusallık.....	23
Kesinlik.....	23
Doğruluk.....	23
Duyarlılık.....	24

Seçicilik.....	24
4.1.1.2. <i>Kollidon® SR ile yapılan çalışmalar</i>	24
4.1.1.2.1. <i>Termal analiz</i>	24
4.1.1.2.2. <i>X-Işını kırınım analizi</i>	24
4.1.1.2.3. <i>Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi</i>	24
4.1.1.2.4. <i>Nükleer manyetik rezonans analizi</i>	25
4.1.1.3. <i>Kitosan ile yapılan çalışmalar</i>	25
4.1.1.3.1. <i>Termal analiz</i>	25
4.1.1.3.2. <i>X-ışını kırınım analizi</i>	25
4.1.1.3.3. <i>Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi</i>	25
4.1.1.3.4. <i>Nükleer manyetik rezonans analizi</i>	25
4.1.2. <i>Nanopartikül formülasyonlarına ait çalışmalar</i>	25
4.1.2.1. <i>Formülasyonların hazırlanışı</i>	25
4.1.2.2. <i>Nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyon</i>	
<i>çalışmaları</i>	26
4.1.2.2.1. <i>Parçacık şekli analizleri</i>	26
4.1.2.2.2. <i>Parçacık büyüklüğü ve dağılımı analizleri</i>	26
4.1.2.2.3. <i>Zeta potansiyel analizleri</i>	26
4.1.2.2.4. <i>pH analizleri</i>	26
4.1.2.2.5. <i>Termal analizler</i>	26
4.1.2.2.6. <i>X-ışını kırınım analizleri</i>	27
4.1.2.2.7. <i>Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi</i>	27
4.1.2.2.8. <i>Nükleer manyetik rezonans analizleri</i>	27
4.1.2.2.9. <i>Nanopartikül formülasyonlarında etkin madde miktar</i> <i>tayini</i>	27

4.1.2.2.10. Nanopartikül formülasyonlarına ait in vitro salım çalışmaları.....	28
4.1.2.2.11. Nanopartikül formülasyonlarının in vitro salım. kinetiklerinin belirlenmesi	28
4.1.2.2.12. Nanopartikül formülasyonlarına ait sitotoksite çalışmaları	28
4.1.3. Nanopartikül formülasyonlarına ait kararlılık çalışmaları	29
4.1.4. İstatistiksel değerlendirme	30
5. BULGULAR ve TARTIŞMA	31
5.1. Çalışılacak Maddeler ile Yapılan Çalışmalar	31
5.1.1. Paklitaksel ile yapılan çalışmalar	31
5.1.1.1. Termal analiz	31
5.1.1.2. X-ışını kırınım analizi.....	31
5.1.1.3. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi	32
5.1.1.4. Nükleer manyetik rezonans analizi.....	32
5.1.1.5. Paklitaksel'in yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile analitik miktar tayini	33
5.1.1.5.1. Doğrusallık.....	33
5.1.1.5.2. Kesinlik.....	33
5.1.1.5.3. Doğruluk	33
5.1.1.5.4. Duyarlılık	34
5.1.1.5.5. Seçicilik	34
5.1.2. Kollidon® SR ile yapılan çalışmalar	34
5.1.2.1. Termal analiz	34
5.1.2.2. X-ışını kırınım analizi.....	35
5.1.2.3. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi.....	36

5.1.2.4. Nükleer manyetik rezonans analizi	37
5.1.3. Kitosan ile yapılan çalışmalar	37
5.1.3.1. Termal analiz	37
5.1.3.2. X-ışını kırınım analizi.....	37
5.1.3.3. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi	37
5.1.3.4. Nükleer manyetik rezonans analizi.....	38
5.2. Polimerik nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyon çalışmaları. .	40
5.2.1. Formülasyonlarının hazırlanışı	40
5.2.2. Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyon çalışmaları	40
5.2.2.1. Parçacık şekli analizleri	40
5.2.2.2. Parçacık büyüklüğü ve dağılımı analizleri	41
5.2.2.3. Zeta potansiyel analizleri.....	42
5.2.2.4. pH analizleri	42
5.2.2.5. Termal analizler.....	43
5.2.2.6. X-ışını kırınım analizleri	43
5.2.2.7. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi	47
5.2.2.8. Nükleer manyetik rezonans analizleri	48
5.2.2.9. Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin etkin madde miktar tayini	51
5.2.3. Kitosan ile kaplanmış Kollidon® SR nanopartiküllerine..... ait çalışmalar	54
5.2.3.1. Parçacık şekli analizleri	54
5.2.3.2. Parçacık büyüklüğü ve dağılımı analizleri	55
5.2.3.3. Zeta potansiyel analizleri.....	56

	<u>Sayfa</u>
5.2.3.4. <i>pH analizleri</i>	56
5.2.3.5. <i>Termal analizler</i>	57
5.2.3.6. <i>X-ışını kırınım analizleri</i>	57
5.2.3.7. <i>Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizleri</i>	57
5.2.3.8. <i>Nükleer manyetik rezonans analizleri</i>	61
5.2.4. <i>Kitosan nanopartikül formülasyonlarının</i>	
<i>karakterizasyon çalışmaları</i>	63
5.2.4.1. <i>Parçacık şekli analizleri</i>	63
5.2.4.2. <i>Parçacık büyüklüğü ve dağılımı analizleri</i>	64
5.2.4.3. <i>Zeta potansiyel analizleri</i>	65
5.2.4.4. <i>pH analizleri</i>	65
5.2.4.5. <i>Termal analizler</i>	66
5.2.4.6. <i>X-ışını kırınım analizleri</i>	66
5.2.4.7. <i>Fourier dönüşümlü kızılötesi analizleri</i>	70
5.2.4.8. <i>Nükleer manyetik rezonans analizleri</i>	71
5.2.4.9. <i>Kitosan ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında etkin</i> <i>madde miktar tayini</i>	76
5.2.4.10. <i>Polimerik nanopartikül in vitro salım çalışmaları</i>	77
5.2.4.11. <i>Polimerik nanopartikül formülasyonlarında in vitro salım</i> <i>çalışmalarının kinetik modellere uyumu</i>	79
5.2.4.12. <i>Hazırlanan formülasyonların sitotoksitesi</i>	81
5.3. <i>Nanopartikül Formülasyonlarına Ait Kararlılık Çalışmaları</i>	86
6. SONUÇ	93
KAYNAKÇA	98
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 4.1. Paklitaksel'in analitik miktar tayininde kullanılan yüksek basınçlı sıvı kromatografisi çalışma koşulları	23
Çizelge 5.1. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yönteminin gün-içi ve günler-arası kesinlik sonuçları	34
Çizelge 5.2. Paklitaksel'in yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi ile elde edilen doğruluk değerleri	34
Çizelge 5.3. Hazırlanan polimerik nanopartiküllerin formülasyon bileşenleri	40
Çizelge 5.4. Kollidon® SR nanopartiküllerinin parçacık büyüklüğü (PB), polidisperslik indisi (PdI), zeta potansiyel (ZP) ve pH analiz sonuçları...	41
Çizelge 5.5. Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllere yüklenen ve hapsedilen paklitaxel miktarları	51
Çizelge 5.6. Kitosan ile kaplanmış Kollidon® SR nanopartikül formülasyonlarının parçacık büyüklüğü (PB), polidisperslik indisi (PdI), zeta potansiyel (ZP) ve pH analiz bulguları	56
Çizelge 5.7. Kitosan nanopartikül formülasyonlarının parçacık büyüklüğü (PB), polidisperslik indisi (PdI), zeta potansiyel (ZP) ve pH analiz bulguları....	65
Çizelge 5.8. Kitosan ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına yüklenen ve hapsedilen paklitaxel miktarları	76
Çizelge 5.9. Hazırlanan formülasyonların <i>in vitro</i> salım kinetik modelleri	82
Çizelge 5.10. Hazırlanan formülasyonların uzun süreli kararlılık çalışmaları sonucunda elde edilen parçacık büyüklüğü (PB), polidisperslik indisi (PdI), Zeta Potansiyel (ZP), pH ve etkin madde miktar tayini analiz sonuçları	87
Çizelge 5.11. Hazırlanan formülasyonların hızlandırılmış kararlılık çalışmaları sonucunda elde edilen parçacık büyüklüğü (PB), polidisperslik indisi (PdI), zeta potansiyel (ZP), pH ve etkin madde miktar tayini analiz sonuçları	89

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Kanser tedavisinde kullanılan kontrollü salım sağlayan nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemlere örnekler	10
Şekil 2.2. Paklitaxelin kimyasal yapısı	14
Şekil 5.1. Paklitaksel'in termal analizine ait termogram	31
Şekil 5.2. Paklitaksel'in X-ışını kırınım analizine ait difraktogram	31
Şekil 5.3. Paklitaksel'in Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analiz spektrumu	32
Şekil 5.4. Paklitaksel'in nükleer manyetik rezonans analiz spektrumu	32
Şekil 5.5. Paklitaksel'in miktar tayininde kullanılan standart eğri	33
Şekil 5.6. Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının yüksek basınçlı sıvı kromatografisi seçicilik analizi kromatogramları	35
Şekil 5.7. Kollidon® SR'nin termal analizine ait termogram	35
Şekil 5.8. Kollidon® SR'nin X-ışını kırınım analizine ait difraktogram	36
Şekil 5.9. Kollidon® SR'nin Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analiz spektrumu	36
Şekil 5.10. Kollidon® SR'nin nükleer manyetik rezonans analiz spektrumu	37
Şekil 5.11. Kitosan'ın termal analizine ait termogram	38
Şekil 5.12. Kitosan'ın X-ışını kırınım analizine ait difraktogram	38
Şekil 5.13. Kitosan'ın Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analiz spektrumu	39
Şekil 5.14. Kitosan'ın nükleer manyetik rezonans analiz spektrumu	39
Şekil 5.15. Kollidon® SR nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskopu görüntüleri	41
Şekil 5.16. Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin ve kullanılan saf maddelerin termal analizlerine ait termogramlar	44
Şekil 5.17. Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin ve kullanılan saf maddelerin x-ışını kırınım analiz difraktogramları	46
Şekil 5.18. Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin ve kullanılan saf maddelerin Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analiz spektrumları	49
Şekil 5.19. Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin ve kullanılan	

saf maddelerin nükleer manyetik rezonans analiz spektrumları	52
Şekil 5.20. Kitosan ile kaplanmış Kollidon® SR nanopartiküllerinin taramalı	
elektron mikroskobu analiz sonuçları	55
Şekil 5.21. Kitosan ile kaplanmış Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin	
termal analizlerine ait termogramlar	58
Şekil 5.22. Kitosan ile kaplanmış Kollidon® SR nanopartiküllerinin X-ışını	
kırınım analiz difraktogramları	59
Şekil 5.23. Kitosan ile kaplanmış Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin	
Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analiz spektrumları	60
Şekil 5.24. Kitosan ile kaplanmış Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin	
nükleer manyetik rezonans analiz spektrumları	62
Şekil 5.25. Kitosan nanopartikül formülasyonlarının taramalı elektron	
mikroskobu görüntüleri	64
Şekil 5.26. Kitosan ile hazırlanan nanopartiküllerin ve saf maddelerin termal	
analizlerine ait termogramlar	67
Şekil 5.27. Kitosan ile hazırlanan nanopartiküllerin ve saf maddelerin X-ışını	
kırınım analiz difraktogramları	69
Şekil 5.28. Kitosan ile hazırlanan nanopartiküllerin ve saf maddelerin	
Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analiz spektrumları	71
Şekil 5.29. Kitosan ile hazırlanan nanopartiküllerin ve saf maddelerin nükleer	
manyetik rezonans analiz spektrumları	74
Şekil 5.30. Hazırlanan nanopartiküllere yüklenen paklitaksel'in	
<i>in vitro</i> salım çalışmaları	78
Şekil 5.31. Hazırlanan nanopartiküllerin HT-29 hücreleri üzerindeki	
sitotoksosite değerleri	84
Şekil 5.32. Hazırlanan nanopartiküllerin HTC-15 hücreleri üzerindeki	
sitotoksosite değerleri	85

Şekil 5.33. Hazırlanan nanopartiküllerin 6. ay termal analiz sonuçları	94
Şekil 5.34. Hazırlanan nanopartiküllerin 6. ay X-ışını kırınım analiz sonuçları	96

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABL	: Abelson Protoonkogeni
AIC	: Akaike Bilgi Kriteri
AIDS	: Edinilmiş Bağışıklık Yetmezliği Sendromu
AST	: Aspartat Aminotransferaz
BCL2	: B-Hücre Lenfoma 2 Geni
BCR	: 22 Numaralı Kromozom Üzerindeki 22q11.2 Bölgesi
CCKPTX-PL	: Kollidon® SR İle Hazırlanan Ve Kitosan İle Kaplanan Etkin Madde İçermeyen Plasebo Nanopartikül Formülasyonları
CCKPTX-05	: Kollidon® SR İle Hazırlanan Ve Kitosan İle Kaplanan % 0.5 Paklitaksel İçeren Nanopartikül Formülasyonları
CCKPTX-10	: Kollidon® SR İle Hazırlanan Ve Kitosan İle Kaplanan % 10 Paklitaksel İçeren Nanopartikül Formülasyonları
CPTX-PL	: Kitosan İle Hazırlanan Etkin Madde İçermeyen Plasebo Nanopartikül Formülasyonları
CPTX-05	: Kitosan İle Hazırlanan Ve % 0.5 Paklitaksel İçeren Nanopartikül Formülasyonları
CPTX-10	: Kitosan İle Hazırlanan Ve % 10 Paklitaksel İçeren Nanopartikül Formülasyonları
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Analizi
¹ H-NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans Analizleri
HER2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
K _m	: Plazma Konsantrasyonlarının Eliminasyon Sabiti
KPTX-PL	: Kollidon® SR İle Hazırlanan Etkin Madde İçermeyen Plasebo Nanopartikül Formülasyonları

KPTX-05	: Kollidon® SR İle Hazırlanan Ve % 0.5 Paklitaksel İçeren Nanopartikül Formülasyonları
KPTX-10	: Kollidon® SR İle Hazırlanan Ve % 10 Paklitaksel İçeren Nanopartikül Formülasyonları
LOD	: Saptama Sınırı
LOQ	: Tayin Sınırı
MYC	: MYC Onkogeni
PB	: Parçaçık Büyüklüğü
PCL	: Poli-ε-kaprolakton
PdI	: Polidisperslik İndisi
PGA	: Poliglikolik Asit
PLA	: Polilaktik Asit
PLGA	: Poli(laktik asit-ko-glikolik asit)
PTX	: Paklitaksel
RAS	: Onkogenik Protein
RSD	: Rölatif Standart Sapma
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SGOT	: Serum Glutamik-Okaloasetik Transaminaz
XRD	: X-Işını Kırınım Analizi
ZP	: Zeta Potansiyeli

1. GİRİŞ

Kanser, genlerde meydana gelen değişiklikler sonucunda hücrelerin kontrolsüz çoğalması sonucunda başlayan ve “tümör” olarak adlandırılan yapıların oluşmasına neden olan bir hastalıktır. İlerleyen aşamalarda başka dokulara da yayılabilen ve ölüm ile sonuçlanabilen ciddi sorunlara neden olmaktadır. Günümüzde 200’den fazla kanser türü tanımlanmıştır.

Kanser tedavisinde cerrahi işlemler ve ilaçlar ile tedavi en sık başvuru olan yaklaşımlar arasındadır. İlaçlar ile tedavide kullanılan etkin maddelerin ciddi yan etkileri ve düşük biyoyararlanımları nedeni ile yeni ve etkin ilaç taşıyıcı sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Pek çok araştırma grubu kanser tedavisine yönelik ilaç taşıyıcı sistemleri geliştirmek amacı ile çalışmalar yapmaktadır. Bu tez çalışmasında da sudaki düşük çözünürlüğüne bağlı olarak düşük biyoyararlanıma sahip Paklitaksel içeren polimerik nanopartikül formülasyonları geliştirilmiş ve hazırlanan formülasyonların karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen analiz sonuçları değerlendirildiğinde vücuda pek çok uygulama yolu ile verilebilecek özellikte etkin ve güvenilir formülasyonlar başarı ile oluşturulmuştur. Gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmaları ile nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri detaylı olarak incelenmiş ve altı ay süre ile kararlı kaldıkları belirlenmiştir. Sitotoksitesite çalışmaları sonucunda etkili olan konsantrasyon da belirlenmiştir.

Sonuç olarak çalışmamız kapsamında hazırlanan Paklitaksel içeren polimerik nanopartikül formülasyonlarının kanser tedavisinde kullanılabilecek umut vaat eden sistemler geliştirilmiştir.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Kanser Oluşumu ve Tedavi Yöntemleri

2.1.1. Kanser oluşumu

Bilinen tarih boyunca kanser insan ve hayvanlarda sık görülen bir problem olmuştur. Kanser hakkında bilinen en eski kayıtlar MÖ 3000 yılına kadar uzanmaktadır. Kanser kelimesi Latince yengeç anlamına gelen “*canker*” veya “*carcinos*” kelimelerinden türemiştir. Kanser, bir organizmadaki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesi, çoğalması ve birikmesidir. Tek bir organı etkileyebildiği gibi uzaktaki organlara da yayılarak etkisini gösterebilir (Baykara, 2016).

Tüm kanserler, DNA dizisindeki birtakım anormalliklerle oluşmaktadır. Kanserlerin %10 – 15’inin, kalıtsal olduğu yani ebeveynlerden gelen genlerle aktarıldığı, geriye kalan %85-90’ lık kısmını ise yaşam boyunca canlı hücrelerdeki DNA’nın, mutajenlere maruz kalması, hücre DNA sıdındaki hafif progressif değişiklikler ve replikasyonda hatalar oluşması ile şekillendiği düşünülmektedir. Bazen oluşan bu mutasyonlardan biri, içinde bulunduğu hücrenin büyümesini ve bu hücreden türeyen bir kanser klonunun oluşmasını sağlar (Yokuş vd., 2012).

Kanser süreçleri, temel olarak hücre çoğalmasının ve farklılaşmasının azaltılmasında rol oynayan proteinleri kodlayan proto-onkogenlerin hasar görmesi veya mutasyona uğraması ve/ veya hücre büyümesinin önleyici sinyalini üreten ve/veya uyarıcı apoptozu uyarıcı proteinleri kodlayan tümör supresör genlerinden kaynaklanmaktadır (Pérez-Herrero vd., 2015).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, tümörlerin; vücudun immün sistemini aktive etmeden proliferen olan, kendi enerji metabolizmasını oluşturduğu, bir tümör mikroortamı yaratarak normal görünen bir hücre repertuarı oluşturduğu belirlenmiştir. Tedaviye yönelik atılacak adımlar öncesinde tümörün davranış paterninin anlaşılması için ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Hanahan vd., 2011).

Morfolojik değişiklikler, bir hastalığın özelliği olan veya etyolojik bir sürecin tanısı olan hücreler veya dokulardaki yapısal değişikliklere atıfta bulunur. Örneğin, morfolojik olarak özdeş lezyonlar, farklı moleküler mekanizmalar ile ortaya çıkabilir. Hiçbir yerde bu, tümörlerin çalışmasından daha çarpıcı değildir; Morfolojik olarak ayırt edilemeyen meme kanserleri, oldukça farklı yollara, terapötik tepkilere ve prognoza sahip olabilir (Kumar vd., 2014).

2.1.2. Kanser genetiği

Tüm tümörlerin iki temel bileşeni vardır: biri tümör parankimini oluşturan neoplastik hücreler ve diğeri bağ dokusundan oluşan reaktif stroma, kan damarları ve adaptif ve doğal immün sistemin değişken sayıdaki hücreleri (Kumar vd., 2014).

Tümörlerin sınıflandırılması ve biyolojik davranışları temel olarak parankimal bileşene dayanmaktadır, ancak büyümeleri ve yayılmaları kritik olarak stromalarına bağlıdır. Tümörün, brüt ve mikroskopik görünümüne göre iyi huylu kabul edildiğinde, lokalize kalacağını, diğer bölgelere yayılmayacağını ve lokal cerrahi çıkarmaya elverişli olduğu düşünülür. Kötü huylu tümörlerde ise, bitişik yapıları istila ve tahrip edebilir, uzak bölgelere (metastaz) yayılımı nedeniyle ölüme sebebiyet verebilirler (Kumar vd., 2014).

Kanser hücreleri sıklıkla boyut ve şekilde olarak pleomorfizma çeşitliliği gösterir. Dolayısıyla, aynı tümör içindeki hücreler tek tip değildir, ancak farklılaşmamış bir görünüme sahip küçük hücrelerden, komşularından birçok kez daha büyük olan tümör dev hücrelerine kadar uzanabilir (Kumar vd., 2014).

Kanserin oluşumunda en büyük role sahip olan 3 gen grubu bulunmaktadır. Bunlar onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genleridir. Kanser hücreleri kendi metabolizmaları olan hücrelerdir. Normal şartlar altında, hücreler dış membrandan sinyal aldıklarında büyür ve bölünerek çoğalırlar. Dışarıdan gelen sinyaller hücre içine girip nükleusa aktarılır ve süreç başlar. Hücre bölünmeden önce çevresini kontrol eder ve yeterli miktarda besin olup olmadığını, büyüyecek yer olup olmadığını kontrol eder ve şartlar uygunsa büyümeye başlar (Baykara, 2016).

2.1.2.1. Onkogen

Bu kavramın tipik örneği, ABL proto-onkogeni BCR genine aktaran karşılıklı bir t (9; 22) kromozomal translokasyonu ile başlatılan kronik miyeloid lösemidir. Kanserin somatik genetik değişikliklerden kaynaklandığının ilk kanıtı, Burkitt'in lenfoma çalışmalarından gelmiştir. Bir dizi değişiklik sonucu MYC onkogenini aktive edilmiş olup deregülasyonu başlangıç olayıdır. İkinci olarak, RAS onkogenik proteinin transforme özelliğini aktive eden mutasyonlar taşıdığı gözlenmiştir. Üçüncü olarak, kromozomal sınır değerlerin klonlanması ve BCL 2 onkogeninin immünoglobülin ağır zincir lokusundaki güçlendirici elementlerin bir araya gelmesiyle sonuçlandığı görülmüştür. Dördüncüsü, bir insan tümöründen aktive edilmiş bir onkogen taşıyan transgenik farelerde, insan tümörüne benzeyen kanserler gelişmiştir. Bu kanserlerin

sadece gizli bir süre sonra ortaya çıktıkları, diğer genlerde değişikliklerin neoplaziye ilerlemeden önce gerçekleşmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Onkogenik proteinleri hedef alan transtuzumab, cetuximab, bevacizumab gibi monoklonal antikolar ve imatinib, gefitinib, erlotinib, sorafenib gibi moleküller bulunmaktadır (Croce, 2008).

2.1.2.2. Tümör baskılayıcı genler

Kanser genlerinin diğer grubu, kanserleşmeyi engelleyerek onkogenlere zıt bir şekilde aktivite gösteren tümör baskılayıcı genlerdir. Tümör baskılayıcı genler, hücre büyümesini baskılayıcı etkileri ile kanserin gelişmesini önleyen oldukça önemli muhafızlardır. Bu genlerde meydana gelen inaktivasyon kanser patogenezinde önemli rol oynar. Aslında, tümör baskılayıcı genlerin kaybı kanserin oluşumu için gerekli olan onkogen aktivasyonundan daha önemlidir. Çoğu tümör baskılayıcı gen, hücre döngüsünü inhibe ederek, hücreyi farklılaşmaya iterek veya apoptozu tetikleyerek hücrelerin kontrolsüz çoğalmasını engelleyici bir karaktere sahiptir. Bazı tümör baskılayıcı genler ise hücre proliferasyonunu tetikleyen birçok onkogenik sinyal yollarının aşırı aktivasyonlarının inhibisyonundan sorumludur. Tümör baskılayıcı genlerde meydana gelebilecek somatik mutasyonlar (nokta mutasyon, kayıp (missense) mutasyon, delesyon vb), translokasyonlar, epigenetik değişimler ve kromozomal delesyonlar aracılığıyla gerçekleşen fonksiyon kayıpları, hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına, apoptoza karşı direnç kazanmalarına ve neoplastik farklılaşmaların tetiklenmesine yol açarak kanserleşmeyi başlatabilmektedir (Akgün vd., 2018).

Tümör baskılayıcı genin hem maternal hem de baba alellerindeki mutasyonların, genel olarak hücreye seçici bir avantaj kazandırması için gereklidir. Bu durum genellikle, bir allelin, diğer allelin intragenik bir mutasyonuyla birleştiğinde, bütün bir kromozomun veya kromozom kolunun kaybı gibi, brüt bir kromozomal olayla silinmesi sonucu ortaya çıkar (Vogelstein vd., 2004).

2.1.2.3. DNA tamir genleri

Hatalı DNA tamir genlerinin (mismatch repair) kritik önem taşıdığına ve disfonksiyonunun malign durum ile ilişkili olduğuna dair güçlü kanıtlar vardır. Onarım yapan bu genler; bilinen onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde mutasyonlara yol açan önemli bir mekanizma olmasının yanında, diğer önemli büyüme düzenleyici genlerde de mutasyonlara yol açabilir (Chung vd. 1995).

2.1.3. Kanser insidansı

Kanser bulaşıcı olmayan ve tüm insan ölümlerinin ~%14,6'sından sorumlu olan dört ana hastalıktan biridir. Şu anda bilinen 200 den fazla farklı kanser türü vardır (Pavlopoulou vd., 2015).

2012'de dünya genelinde 14.1 milyon yeni kanser vakası ve 8,2 milyon kanseri ölümünün gerçekleştiği görülmüştür. Akciğer kanseri, hem yüksek oranda görülmesi (%12,9) hem de yüksek ölüm oranı nedeniyle (%19,4) dünyadaki en yaygın kanser olmaya devam etmektedir. Meme kanseri, genel olarak en yaygın ikinci kanser (%11,9) olmakla birlikte olumlu prognoz nedeniyle ölüm nedeni (%6,4) olarak 5. sıradadır. Mortalite yönünden kolorektal kanserler 2. , karaciğer kanserleri 3., mide kanseri 4. sıradadır. Yine mortalitesi düşük olan ancak sık görülen prostat kanseri ile beraber bu 6 kanser türü tüm kanserlerin %55'ini temsil etmektedir (Ferlay vd., 2012).

Türkiye kanser insidansı dünyadaki diğer ülkeler ile karşılaştırıldığında, ülkemizin halen kanser açısından hem kadınlarda hem de erkeklerde daha düşük bir hızda olduğu görülmektedir. Ülkemizde görülen ilk 5 kanser türünün dünyadaki ve diğer gelişmiş ülkelerdeki görüntü ile benzerlikler gösterdiği görülmektedir. Erkeklerde trakea, bronş ve akciğer kanseri (66,0/100000 kişide), kadınlarda ise meme kanseri (40,6/100000 kişide) en sık görülen kanser türleridir. Her iki cinsiyette de en ölümcül kanser türü akciğer kanseridir. Çocukluk çağı kanserlerinde ise çocukluk çağı lösemileri en sık görülen kanser türüdür. Çocukluk çağında her iki cinsiyette de lenfomalar, merkezi sinir sistemi tümörleri ve nöroblastomalar lösemileri takip etmektedir. Gençlerde ise (15-24 yaş grubu) erkeklerde testis kanseri ve kemik kanserlerinin, kadınlarda ise tiroid ve Hodgkin Hastalığının ön planda olduğu görülmektedir (Gültekin vd.,2014).

2.1.4. Kanser tanısı ve sınıflandırılması

Farklı yöntemlerle gösterileceği gibi, kanserin kesin tanısı veya evrelemesi için evrensel olarak kullanılabilecek tek bir test yoktur. Normal olarak, kanser semptomlarını taklit edebilecek farklı durumlar (örneğin enfeksiyon) arasında ayırım yapmak için birkaç test yapılır. Bu yöntemler teşhis araçlarını içerir, tümör gelişiminin ilerlemesini izler ve kanserin etkili tedavisi için planlar içerir. Teşhis prosedürleri laboratuvar testleri (kan testleri, tümör belirteçleri) genetik testleri, görüntüleme teknikleri, tümör biyopsisi, endoskopik incelemeler ve ameliyatı içerebilir (Banfalvi, 2014).

Medikal uygulamadaki kanser sınıflandırılması;

- Primer görüldüğü organa göre (Meme, akciğer, prostat, karaciğer, böbrek, oral, beyin kanseri, vb.)
- Histolojik tipine göre (karsinom, sarkom, miyelom, lösemi, lenfoma, karışık tipler)
- Klinik evrelemeye göre
- Derece (1-4) - çevredeki dokulara göre hücrelerin anormalliği ile ilgilidir;
 - ✓ Derece 1- hafif anormallik, iyi farklılaşmış hücreler,
 - ✓ Derece 2- biraz daha fazla anormallik, orta derecede farklılaşmış hücreler,
 - ✓ Derece 3- anormal, zayıf farklılaşmış hücreler,
 - ✓ Derece 4- farklılaşmamış, olgunlaşmamış ve ilkel hücreler (Banfalvi, 2014).

2.1.5. Kanser tedavi yöntemleri

Günümüzde insanlığın önemli sağlık sorunlarından çözümü bekleyen hastalıkların başında kanser gelmektedir. Her yıl binlerce insanın yakalandığı kanserle ilgili oldukça yoğun çalışmalar halen yürütülüyor olmakla birlikte tam olarak tedavisi de yapılamamaktadır (Yalçın, 2018).

Kanser tedavisi, hastaların sağkalımlarını uzatmayı ve yaşam kalitelerini yükseltmeyi amaçlar. Kanser tedavisi ile ilgili kararlar, kanser semptomlarını geciktirmenin veya azaltmanın olası yararları ve tedaviyle ilişkili toksisite ile ilgili olası zararlar arasındaki dengeyi göz önünde bulundurmaya içerir (Blinman vd., 2012).

Tedaviyi seçerken göz önünde bulundurulacak faktörler arasında kanserin tipi ve evresi, tümörün rezektabilitesi ve yeri, komorbiditeleri, hastanın yaşı, performans durumu ve tercihleri bulunur. Bazı durumlarda, doktor tedavi vermek yerine hastayı izlemeyi seçebilir (Perry, 2012).

Kanser tedavisi için kullanılan yöntemler 2 ana kategoride toplanabilir;

- Lokal tedavi yöntemleri
 - ✓ Cerrahi
 - ✓ Radyoterapi
- Sistemik tedavi yöntemleri
 - ✓ Kemoterapi
 - ✓ Hedeflenmiş tedavi yöntemleri
 - ✓ Hormon terapisi
 - ✓ İmmünoterapi (Bu vd., 2019).

Kanser, tek bir terapi yöntemi (monoterapi) ile tedavi edilebilir, ancak genellikle birkaç yöntem, belirli bir sırayla birbirine yakın şekilde birleştirilir veya uygulanır. Buna multimodal veya kombinasyon tedavisi denir. Kombinasyon tedavisinin bazı yaygın örnekleri neoadjuvan tedavi, adjuvan tedavi ve kombinasyon kemoterapisidir (Swan vd., 2003)

Kanserin tedavisinde kemoterapi, radyoterapi, cerrahi yöntemleri en sık başvurulacak yöntemler olmakla birlikte, hormon terapisi ve biyolojik yöntemlerin kullanılması gibi farklı yaklaşımlar da diğer yöntemlere destek olacak şekilde birlikte veya tek başına kullanılabilir. Her yöntemin kendine özgü avantaj ve dezavantajlarının bulunması, kanserin kişiye özgü bir hastalık olması, tedavilerin kişiden kişiye farklılık gösterebilmesi nedeniyle tek bir kesin tedavi yönteminin varlığından bahsetmek imkansızdır (Baykara, 2016).

Cerrahi ve radyoterapi, lokal ve metastatik olmayan kanserler için en etkili ve değerli tedavilerdir, ancak kanser vücutta yayıldığı zaman etkililikleri sınırlıdır. Kanser ilaçlarının kullanımı (kemoterapi, hormon ve biyolojik tedaviler), vücuttaki her organa kan akımı yoluyla ulaşabildikleri için metastatik kanserlerin tedavisinde günümüzde bilinen en iyi yöntemdir (Pérez-Herrero vd., 2015).

Cerrahi tekniklerdeki ilerlemelere rağmen, tümör hücreleri cerrahi sınırlarda veya ameliyattan sonra dolaşımda kalabilir ve bu durum kanserin tekrarlanması ve metastaz riskini artırır. Rezidüel tümör hücrelerinin neden olduğu nüks oranını azaltmak için, kemoterapi ve radyoterapi cerrahi sonrası kanser tedavisi için geleneksel standart tedavilerdir. Bununla birlikte, bu tedavilere sıklıkla komplikasyonlar ve yan etkiler eşlik eder (Bu vd., 2019).

Kemoterapi; Lösemi ve lenfoma gibi kanser türlerinde etkili bir tedavi yöntemi olmanın yanı sıra tümör boyutunu cerrahi öncesi neoadjuvan amaçlı kullanıldığı da bilinmektedir (Bismuth vd.,1996).

Hormon terapisi, genellikle prostat, meme ve endometriyum kanserlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Hormon tedavisinde hormon üretiminin engellenmesi, hormonun hedef organa girişinin engellenmesi veya feedback mekanizmalarla seviyesinin düzenlenmesi amaçlanmaktadır (Sakai vd., 2015).

2.1.6. Kanser tedavisinde yeni ilaç taşıyıcı sistemler

Son 25 yılda kanser biyolojisinin temellerinin tanımlanmasında önemli ilerlemeler olmasına rağmen, bu, kanser terapötiklerinde benzer klinik ilerlemelere dönüşmemiştir. Bu gibi ilerlemeler için büyük umut vaat eden alanlardan biri, mühendislik, malzeme bilimi, kimya ve fizik gibi birçok disiplinin kesişimini içeren kanser nanoteknolojisi olarak tanımlanan alandır (Amiji, 2006).

Teknolojinin ilerlemesi ile birlikte günümüzde var olan tedavilere ek olarak yeni tedavi yöntemleri geliştirilmektedir.

Nanoteknoloji bazlı dağıtım sistemleri, kanser dağıtımında kayda değer bir etki yaratmıştır. Biyomateryal ve biyo-mühendislik bilimindeki gelişmeler, kanser hastalarına yeni güven uyandırabilecek yeni nanopatik bileşik yaklaşımlara katkıda bulunmuştur. Kanserli hücrelerin seçici olarak tanınması, hedeflenen ilaç dağıtımı ve konvansiyonel kemoterapilerin sınırlamalarının aşılmasında büyük etki yaratmıştır (Jain vd., 2015).

Nanoteknoloji, moleküler ve biyolojik görüntüleme yeteneğine sahip, tümörlerin seçici terapisi yapabilen ve nispeten düşük toksiklik kapasitesine sahip hassas ve spesifik anatomik sistemleri sağlamak için oldukça başarılı sonuçları doğurmuştur. Nanoyapıların fiziksel özellikleri, belli hedeflere ulaşılabilirliği ve mevcut standartlara kıyasla belirgin bir iyileşme sağlayabileceği imkanları son yıllarda yapılan çalışmalarla etkin bir şekilde gösterilmektedir (Yalçın, 2018).

Nanopartiküller, arttırılmış geçirgenlik ve tutunma etkisi nedeniyle ilaç dozunu kesin olarak tümör bölgesine verebilmektedir. Tümörlerin genel özellikleri arasında sızdıran kan damarları ve son derece zayıf lenfatik drenaj bulunur. Serbest ilaçların spesifik olmayan şekilde yayıldığı bilinmektedir; Bununla birlikte, nanoparçacıklar, yukarıda belirtilen arttırılmış geçirgenlik ve tutma etkisi ile spesifik hedef bölgede birikir (Wakaskar, 2017).

Yeni ilaç dağıtım teknolojileri, ameliyat sonrası kanser tedavisinde heyecan verici bir ilerleme sağlamıştır. Bu tekniklerin klinik ortama başarılı bir şekilde çevrilmesi, cerrahi sonrası tümör nüksünü, metastazı azaltarak ve hastanın sağ kalımını artırarak cerrahi onkoloji uygulamasını derinlemesine etkileme potansiyeline sahiptir. Cerrahlar, klinisyenler, biyo-mühendisler ve farmakologların bu alandaki iyileşmeyi hızlandırmak için birlikte çalışması büyük fırsatlar doğuracaktır (Bu vd., 2019).

Polimer bazlı ilaç dağıtım sistemleri; son yıllarda, tümör hedeflemesinin ve intravenöz kemoterapi tedavileriyle bağlantılı ciddi sistemik morbiditeler eksikliğini kanıtlamak için bir araç olarak araştırılmıştır. Bu lokalize tedaviler, hedef dışı doku toksisitelerini koruyarak ilacın doğrudan hastalık bölgesine kontrollü bir şekilde dağıtımını kolaylaştırır. Bu depoların birçoğu biyolojik olarak parçalanabilir ve tümör bölgesinde terapötik ilaç konsantrasyonlarını uzun süre muhafaza edecek şekilde tasarlanmıştır (Wolinsky vd., 2012).

Yapılan çalışmalarda; bir akciğer kanseri metastazı ortotopik sıçan modelinde ön havalandırma lenfatik metastazında jelatin matrikse gömülü paklitaksel (PTX) yüklü mikrokürelerin etkinliği araştırılmıştır. İlaç yüklü parçacıklar, çevredeki lokal lenf düğümlerinde yüksek terapötik konsantrasyonlara yol açtı ve lenfatik metastazda kontrollere kıyasla %80'lik bir düşüşle ilişkilendirildi. (Liu vd., 2009) Bu veri, orta evre kanser hastalarında lokalize tedaviler için bir yer olduğunu göstermektedir (Wolinsky vd., 2012).

Hedeflendirilmiş ilaç dağıtım sistemi; ilacı, önceden seçilmiş bir biyositte kontrollü bir şekilde serbest bırakan bir sistemdir. Nanoteknoloji tabanlı dağıtım sistemleri, kanser tedavisi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Polimerler, kanser tedavisi için nanopartiküler taşıyıcılarının geliştirilmesinde kilit rol oynar. Nanoterapötik ilaç sistemlerinin bazı önemli teknolojik avantajları arasında uzun süreli yarı ömür, gelişmiş biyo-dağılım, ilacın dolaşım süresi, ilacın kontrollü ve sürekli salınımı, uygulama yolunun çok yönlülüğü, artan ilacın hücre içi konsantrasyonu ve daha fazlası bulunmaktadır (Jain vd., 2015).

Hedeflendirilmiş ilaç dağıtım sistemlerinin amacı aşağıda sıralanmıştır;

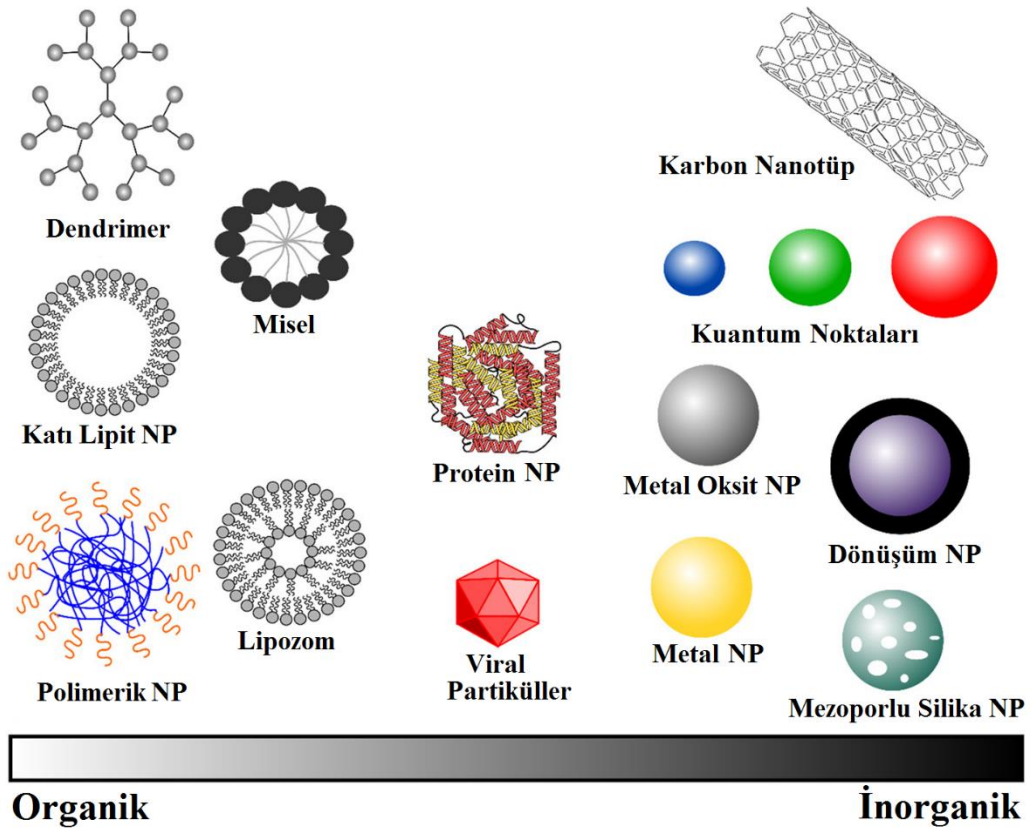
- İlacın ihtiyaç duyulmadığında hücrelere / dokulara / organlara girmesini önlemek.
- Kan, karaciğer ve böbrekteki opsoninler gibi vücut savunma sistemi tarafından yapılan ilacın bozulmasını ve yok edilmesini önlemek.
- Biyoyararlanımı ve hedef bölgedeki ilaç birikimini artırmak (Jain vd., 2015).

2.2. Polimerik Nanopartiküller

Geleneksel ilaç taşıyıcı sistemler ile yapılan kanser tedavileri çoğunlukla sağlıklı hücreler üzerinde de ölümcül hasara yol açmakta ve uzun süreli kullanım gerektiren bu tedavi şeklinde hasta ciddi yan etkilere maruz kalmaktadır. Bu nedenle ilacın doğrudan

kanser hücrelerine hedeflendiği, daha az toksisiteye sahip etkin ve güvenilir yeni ilaç taşıyıcı sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır (Jain vd., 2015).

Pek çok araştırmacı kanser tedavisinde kullanılmak üzere yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesini amaçlayan çalışmalar yapmaktadır (Ezrahi vd., 2019). Bu amaca yönelik hazırlanan formülasyonlar arasında kendi kendine emülsifye olabilen sistemler (Ding vd., 2020), mikroemülsiyonlar (Theochari vd., 2017), miseller (Choi vd., 2019; Shu vd., 2018), lipozomlar (Xia vd., 2019; Wang vd., 2019), inklüzyon bileşikler (Yan vd., 2019), dendrimerler (Liu vd., 2015), hidrojel (Sun vd., 2016; Zhao vd., 2019), metalik nanopartiküller (Nguyen vd., 2019), katı lipid nanopartiküller (Büyükköroğlu vd., 2016a; Büyükköroğlu vd., 2016b) ve polimerik nanopartiküller (Choudhury vd., 2019; Choudhury vd., 2019) formülasyon geliştirme aşamasında en fazla çalışılan sistemler olarak karşımıza çıkmaktadır (Şekil 2.1.) (Prasanna vd., 2018; Senapati vd., 2018).



Şekil 2.1. Kanser tedavisinde kullanılan kontrollü salım sağlayan nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemlere örnekler (Cryer ve Thorley vd., 2019).

Yapılan çalışmalarda polimerik nanopartiküller (1-1000 nm) ile hazırlanan formülasyonlar en sık çalışılan sistemlerden biri olarak değerlendirilmektedir (Kommareddy vd., 2007; Petros ve DeSimone; 2010; Mehta vd., 2019; Mottaghitalab vd., 2019; Massey vd., 2020).

Çalışmaların amacına bağlı olarak polimerik nanopartiküller çoğunlukla biyobozunur ve biyo-uyumlu polimerler (polilaktik asit (PLA), poliglolik asit (PGA) ve poli-ε-kaprolakton (PCL) vb) ile hazırlanabilirler. Yüklenen etkin madde salımını kontrol ederek ve biyoyararlanımda artış sağlayarak tedavi etkinliğini arttırmaktadırlar (Abriata vd., 2019).

Massey ve arkadaşları (2020) pankreas kanseri tedavisine yönelik yaptıkları çalışmalarında poli(laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA) ile hazırladıkları polimerik nanopartiküllere PTX yüklemişler ve *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile pankreas kanseri üzerinde oldukça etkin formülasyonlarının elde edildiğini göstermişlerdir.

Yapılan bir başka çalışmada kolon kanseri kaynaklı metastazik akciğer kanseri tedavisine yönelik geliştirilen polimerik nanopartiküller ile oldukça etkili formülasyonlar akciğer kanseri tedavisinde umut vaat eden sistemler olarak tanımlanmışlardır (Rychahou vd., 2018).

2.2.1. Polimerik nanopartikül hazırlama yöntemleri

Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında başlıca iki yaklaşımdan bahsedilmektedir, monomerden hareketle polimerlerin sentezlenmesi ve bu aşamada etkin maddelerin yüklenmesi ve hazırlanmış polimerlere farklı yöntemler ile etkin maddelerin yüklenmesi (Gharieh vd., 2019).

Monomer sentezi ile hazırlanan sistemlerde nanopartikül oluşum mekanizması emülsiyon oluşturma (mini emülsiyon, mikroemülsiyon yöntemleri) yüzeylerarası polimerizasyon ve kontrollü radikal oluşumu şeklinde gerçekleştirilmektedir (Crucho vd., 2017; Gharieh vd., 2019).

Önceden hazırlanmış olan polimerlere etkin madde yüklenmesi ise çoğunlukla emülsifikasyon-solvent evaporasyon (Chowdhury vd., 2019), tuzla çöktürme (Sarcen vd., 2018), nanoçöktürme (Rivas vd., 2017), diyaliz, süperkritik sıvı teknolojisi gibi çoğunlukla kimyasal yöntemler kullanılmaktadır (Crucho vd., 2017). Ayrıca polimer çözeltilerinin liyofilizasyon (Fonte vd., 2016; Dong vd., 2018) veya püskürterek kurutma yöntemleri (Başaran vd., 2017; Başaran, 2017; Yenilmez vd., 2017) ile çözücülerinin

ortandan uzaklaştırılması ile kuru haldeki polimerik partiküller kolaylıkla elde edilebilmektedir.

Püskürterek kurutma yöntemi, ısıya duyarlı biyofarmasötik bileşiklere uygun sıcaklık koşullarının da sağlanmasına izin veren sıcaklık kontrollü, basit, hızlı, tekrarlanabilir ve ölçeklenebilir bir kurutma teknolojisi olması nedeni ile farmasötik alanda sıklıkla kullanılan bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (Arpagaus ve Schwartzbach, 2008; Arpagaus vd., 2018).

Farmasötik uygulamalarında kullanılan diğer kurutma teknolojilerine kıyasla, püskürterek kurutma yöntemi; çözelti, emülsiyon, dispersiyonları doğrudan ayarlanabilir boyutlu belli bir şekle, yoğunluğa, gözenekliliğe ve kimyasal bileşime sahip katı parçacıklara dönüştürmek için sıklıkla tercih edilen bir sistem olarak değerlendirilmektedir (Learoyd vd., 2008; Başaran vd., 2017; Arpagaus vd., 2018).

2.2.2. Polimerik nanopartiküllerin karakterizasyonu

Polimerik nanopartiküllerin farmasötik ve biyomedikal uygulamalar için kullanılması, hastalıkların teşhisinde ve tedavisinde oldukça etkin formülasyonların geliştirilmesini sağlamıştır. Nanomalzemeler ile geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesindeki en önemli ön koşul olan kapsamlı karakterizasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi yer almaktadır (Crucho vd., 2017).

Polimerik nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmalarında morfolojik analizler, parçacık büyüklüğü, parçacık büyüklüğü dağılımı, zeta potansiyel analizleri, Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC), X-Işını Kırınım Analizi (XRD), Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Analizi (FT-IR) ve Nükleer Manyetik rezonans (^1H -NMR) analizleri ile elde edilen polimerik sistemdeki olası fiziksel ve kimyasal değişiklikler belirlenmektedir (Başaran vd., 2010; Başaran vd., 2011; Cho vd., 2013; Mourdikoudis vd., 2018).

Nanopartikül sistemlerin hazırlanmasının en önemli nedenlerinden biri yüklenen etkin maddenin salımının uzatılması hatta kontrol edilebilmesidir (Misra vd., 2019)

Kontrollü salım sağlayan sistemler ile etki bölgesindeki etkin madde seviyesinin terapötik pencere içinde daha uzun süre kalması sağlanmakta ve bu sayede artan biyoyararlanım ile etkin bir tedavi elde edilebilmektedir (Davoodi vd., 2018). Bu nedenle partiküler sistemlerin salım özelliklerinin ve kinetiklerinin belirlenmesi önemli karakteristik özellikleri arasında yer almaktadır (Davoodi vd., 2018).

2.2.3. Polimerik nanopartikül formülasyonlarının toksisitesi

Polimerik ilaç taşıyıcı sistemlerin başlıca görevi yüklenen etkin maddenin özelliklerini koruyarak etki bölgesine taşınmasını sağlamaktır ancak bu amaca yönelik hazırlanan sistemlerin etkinliklerini belirleyen karakteristik özelliklerinin yanı sıra toksikolojik açıdan değerlendirilmeleri ile güvenilirliklerinin de ortaya konması gerekmektedir (Bhavsar vd., 2006; Vilar vd., 2012).

Nano-formülasyonlar, polimerik yapının toksisitesinin yanı sıra yardımcı maddelerin de toksisiteye etkisi değerlendirilmelidir (Bhavsar vd., 2006). Ayrıca parçacık boyutundaki azalmanın sistemik dolaşıma ve hücreye geçişteki üstünlüğüne bağlı olarak daha toksik formülasyonlar oluşturup oluşturmadığının detaylı olarak belirlenmesi gerekmektedir (Bhavsar vd., 2006).

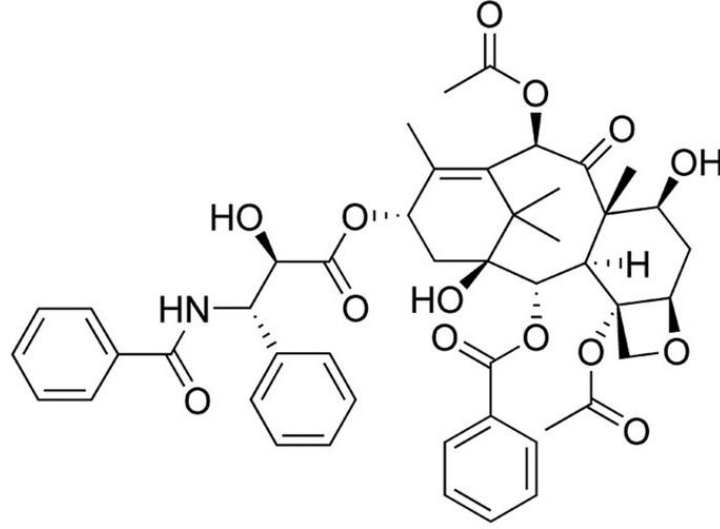
Formülasyonların hazırlanmasında sıklıkla kullanılan lipitler, karbonhidratlar ve proteinler doğal polimerik malzemeler olarak tanımlanmaktadır (Ogaji vd., 2011).

İlaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında kullanılacak polimerin moleküler özellikleri, doğal, sentetik veya yarı sentetik yapıda olması, çözünürlük özellikleri, biyouyumlu ve biyobozunur özelliğe sahip olması ve kararlılığı polimer seçiminde dikkate alınan özellikler arasındadır. Özellikle biyolojik olarak parçalanabilen polimerler vücutta toksik olmayan monomerlere bozunabilmeleri nedeni ile sıklıkla tercih edilmektedir (Pillai ve Panchagnula, 2001).

Bu polimerler arasında; poliestерler (PLA, PGA, PLGA), poliortoesterler, poliaminoasitler, polifosfoesterler ve kitosan kanser tedavisinde en sık kullanılan polimerler arasında yer almaktadır (El-Saya, ve El-Sawy, 2017; Song vd., 2019; Kefayat ve Vaezifar, 2019; Domínguez-Ríos vd., 2019; Cosco vd., 2019; Zhang vd., 2019).

2.3. Paklitaksel

PTX ilk kez 1971 yılında Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü (National Cancer Institute, NCI) tarafından doğal sitotoksik kaynaklardan antikanser ilaç tarama programında keşfedilmiş, *Taxus Brewifolia*, Pasifik porsuk denilen ağacın kabuklarından elde edilen bir taksan türevi olup yarı sentetik antineoplastik bir ajandır (Şekil 2.2.) (Weiluan vd., 2012).



Şekil 2.2. Paklitaksel'in kimyasal yapısı (http-1)

Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 854 g/mol' dür. Çok lipofilik bir maddedir. Beyaz veya kirli beyaz renkte kristalize bir tozudur. Pratik olarak suda çözünmez ancak dimetil sülfoksit (DMSO), metanol, asetonitril ve %50 Cremophor® EL ve %50 dehidrate alkol karışımında çözünebilir. Hava geçirmeyen ambalaj içinde 20-25 C° de ışıktan ve güneşten korunarak saklanmalıdır. Antimikrotübül aktivitesi gösteren bir kemoterapi ajanıdır. Tek başına veya diğer kemoterapi ajanlarıyla kombine olarak over, meme, akciğer, baş ve boyun kanserleri de dahil solid tümörlerin tedavisinde kemoterapi ajanı olarak kullanılmaktadır. Mikrotübül yapımını teşvik eder ve depolimerizasyonu inhibe ederek yapımlarını stabilize olmalarını sağlar. Oluşan mikrotübüller stabil ve işlevsizdir. PTX, esas olarak etkisini mitoz sırasında hücre döngüsünü inhibe ederek gösterir. Hücre içi konsantrasyonuna ve hücre tipine göre değişen farklı intraselüler etkiler yapar (Gupte ve Çiftçi, 2004).

2.3.1. Paklitaksel'in farmakolojik özellikleri

PTX, over, meme, akciğer ve diğer başka kanser çeşitlerinde de birinci aşama tedavi ve daha sonrasında terapi olarak kullanılan taksoid antineoplastik bir ajandır. Tübülün dimerlerinden mikrotübül toplanmasını artıran ve depolimerizasyonu önleyerek mikrotübülleri stabilize eden antimikrotübül ajandır (Gupte ve Çiftçi, 2004; Tomoya vd., 2012). Bu stabilizasyon sonucu, hayati interfaz ve mitotik hücre fonksiyonları için önemi olan mikrotübül ağının normal dinamik reorganizasyonunu inhibe eder. Ayrıca hücre siklusu boyunca anormal mikrotübül demetlerinin oluşumunu ve mitoz esnasında

mikrotübül multipl asterlerini indükler. Sisplatin ile kombinasyonu, III. ve IV. dönem over kanserli kadınlarda ilk sıra kemoterapi rejimi olarak düşünülmektedir. Doksorubisin esaslı kombinasyon kemoterapisini izleyen node-pozitif meme kanserinin adjuvan tedavisi için kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalarda 50 yaşın altındaki hastalarda nüksetme oranını %47,6, 50-69 yaş arasındaki hastalarda %43,6 oranında azaltmıştır (Eleftherios vd., 2005). HER2 pozitif metastatik meme kanserlerinde transtuzumab içeren kemoterapi ile kombine PTX veya antrasiklin ve siklofosfamid kullanımının, istatistiksel olarak anlamlı sağkalım oranı sağladığı ve tekrarlama oranının azaldığı görülmüştür. Transtuzumab ın antrasiklinlerle yapılan kombinasyonlarında kardiyotoksisite %16 iken PTX ile yapılan kombinasyonlarında bu oran %2 bulunmuştur (Küçükzeybek vd., 2010; Matthias vd., 2012). PTX günümüzde küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin kısmi ilk sıra tedavisi veya adjuvan tedavisinde kullanılmaktadır. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastalarda yapılan araştırmaların sonuçlarına göre, karboplatin-PTX kombinasyonu yaşamda kalma süresini uzatmıştır. Tamamlanan bir araştırmada, standart doksorubisin-siklofosfamid kombinasyon kemoterapisinden sonra ardışık PTX tedavisinin uygulanması, sadece kombinasyon tedavisinin uygulanmasına göre, mortaliteyi %26 ve nükseden meme kanseri riskini %22 oranında azaltmıştır. Aynı zamanda AIDS'e bağlı kaposi sarkomunun ikinci basamak tedavisinde endike olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında psoriyazis tedavisi için kullanılan topikal jel formülasyonu ve lipozom kaplı intravenöz formülasyonu için klinik araştırmaları devam etmektedir (Gary vd., 2008).

2.3.2. Paklitaksel'in farmakokinetik özellikleri

PTX genel olarak intravenöz yolla uygulanır. İntravenöz uygulandıktan sonra PTX'in plazma konsantrasyonları bifazik düşüş gösterir. Başlangıçtaki hızlı düşüş, periferik bölümlere dağılımı ve ilacın eliminasyonunu gösterir. Doyurulabilir özellikteki dağılımı ve metabolizması nedeniyle farmakokinetiği doğrusal değildir. İlacın doğrusal özellik taşımayan bu farmakokinetiği, özellikle ilk zamanlardaki 24 saat veya daha uzun süreli infüzyon çalışmaları, kısa süreli (örneğin 3 saat) uygulamalarla karşılaştırıldığında net olarak ortaya çıkar (http-2). 24 saatlik infüzyonla 135 – 175 mg/m²'lik dozların uygulandığı hastalarda görülen total vücut klirensi, sırasıyla 21,7 – 23,8 L/saat/m², doruk plazma konsantrasyonu 195 ya da 365 ng.mL⁻¹, eğri altı alanı ise 6300 ve 7993 ng/saat/mL'ken, 3 saatlik infüzyonla görülen total vücut klirensi, sırasıyla 17,7 – 12,2

L/saat/m², doruk plazma konsantrasyonu 2,17 ya da 3,65 µg.mL⁻¹ ve eğri altı alanı (EAA) ise 7952 ve 15,007 ng/saat/mL'dir (http-2).

PTX, başta tübülün olmak üzere, doku proteinlerine büyük ölçüde bağlanır (%95-98). Vücutta beyin ve testisler dışında geniş bir dağılım gösterir. 3 saatlik infüzyonla uygulanmasının ardından, alfa-yarı-ömrü 16 dakika, beta-yarı-ömrü 140 dakika ve final eliminasyon yarı-ömrü 19 saattir (http-2).

Yetişkinler üzerinde uygulanan ve PTX'in damar yoluyla 1-96 saat arası tatbik edildiği çalışmalarda, yüksek oranda plazma proteinlerine bağlanma, geniş doku dağılımı, değişken sistemik klirens ve <%10 oranında bozulmamış esas ilacın renal atılımı gözlenmiştir. İlk raporlar, PTX'in daha güçlü bir farmakokinetiğe sahip olduğunu öne sürmesine rağmen, çocuklarda ve yetişkinlerde yapılan bazı yeni denemeler, elemenin doyurulabilir olduğunu göstermektedir. Doygunluğun ortadan kaldırılmasının klinik önemi, büyük dozajlar uygulandığında ve / veya ilaç daha kısa bir sürede verildiğinde en büyük olacaktır. Bu gibi durumlarda, ulaşılabilir plazma konsantrasyonlarının eliminasyon sabitini (K_m) aşması muhtemeldir. Bu nedenle, dozaj veya infüzyon süresindeki küçük değişiklikler, PTX sistemik maruziyette orantısız şekilde büyük değişikliklere neden olabilir ve bu da hasta yanıtını potansiyel olarak etkiler (Sonnichsen ve Relling, 1994)

Karaciğer metabolizması, safra atılımı ve fekal atılım PTX'in primer eliminasyon yolları olarak belirlenmiştir. Sitokrom P-450 2C8 (CYP2C8) ve CYP3A4/5 enzimi ile 6α-hidroksipaklitaksel, 3-p-hidroksipaklitaksel ve dihidroksipaklitaksel'e metabolize edilir. Bunun yanında PTX akışına aracılık eden p-glikoprotein de saptanmıştır (Rodríguez-Antona, 2010).

Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, PTX enjeksiyon solüsyonu ve PTX nanosüspansiyon formülasyonunun intravenöz uygulanması farmakokinetik açıdan karşılaştırılmış ve enjeksiyonluk solüsyonda (20,343 ± 9,119 µg.h.mL⁻¹) plazma konsantrasyonunun nanosüspansiyona (5,196 ± 1,426 µg.h.mL⁻¹) göre yaklaşık 4 kat daha fazla olduğu fakat nanosüspansiyon formülasyonunda (3,199 ± 3,718 saat) vücutta kalış süresinin solüsyona (2,753 ± 0,943 saat) göre daha uzun süre olduğu saptanmıştır. Bu nedenle, enjeksiyonluk solüsyon ile karşılaştırıldığında PTX nanosüspansiyon formülasyonunda düşük plazma konsantrasyonunda uzun süreli PTX kalımı açıkça gözlenmiştir (Yonglu vd., 2011)

2.3.3. Paklitaksel'in yan etkileri ve toksisitesi

PTX'in hematolojik olarak önemli yan etkisi kemik iliği baskılanmasına bağlı olarak gelişen nötropenidir. Nötropeni doz sınırlayıcı toksisite olarak değerlendirilir (http-3: Erdemoğlu ve Şener, 2000). Yüksek dozlar uygulanmadığı sürece şiddetli nöropati meydana getirmemektedir (Erdemoğlu ve Şener,2000). Uygulanan bütün hastaların %78'inde anemi gözlenmiştir ancak görülme sıklığının PTX'in dozu veya uygulanma planı ile bağlantısı bulunmamıştır. Ayrıca idrar yolu enfeksiyonları ve üst solunum yolu enfeksiyonları en sık bildirilen enfeksiyöz komplikasyonlar olmuştur. (http-3)

Faz II aşamasındaki hastaların %29'unda asemptomatik sinüs bradikardi gözlenmiş ve yaklaşık %3'lük bölümünde ise atriyoventriküler iletim blokları, ventriküler taşikardi, iskemik belirtiler de dahil olmak üzere diğer kalp rahatsızlıkları meydana gelmiştir (Rowinsky vd., 1993). İnfüzyonun ilk üç saati içinde hipotansiyon görülmüştür. Oluşan bradikardi ve hipotansiyon herhangi bir semptoma sebep olmamış ve tedavinin kesilmesi gerekmemiştir (http-2). PTX alan hastalarda nadiren miyokardiyal enfarktüs de dahil olmak üzere vasküler toksisite rapor edilmiştir. Bir vakada, aterosklerotik kardiyavasküler hastalığı olan bir hastada ölümcül miyokardiyal enfarktüs gözlenmiştir, kardiyak hastalık geçmişi olmayan bir hastada PTX tedavisi sırasında akut miyokardiyal enfarktüs gelişmiştir (http-4).

Ön ilaç tedavisi uygulanmayan hastaların %30 unda taksan kaynaklı aşırı duyarlılık gözlenmiştir ve ön tedavide antihistaminik ve steroid uygulandığında bu oran %4 ün altına düşmüştür. Aşırı duyarlılık reaksiyonlarının %95 inde taksan dozuna bağlı olarak reaksiyon gözlenir ve genellikle ilk yada ikinci infüzyon anında ve ilk dakikalarda, belirtiler nefes darlığı, bronkospazm, ürtiker ve eritematöz döküntüler şeklinde görülebilir (Joerger, 2012). Atopi öyküsü olan hastalarda aşırı duyarlılık reaksiyonları daha sık görülür (Joerger, 2012; Boulanger vd., 2014).

PTX kullanımında, başlangıç karaciğer fonksiyonları normal olan hastaların %7, %22 ve %19'unda sırasıyla bilirubin, alkalın fosfataz ve AST (SGOT) artışları görülmüştür. Karaciğer fonksiyonlarında hafif bir anormallik olan hastalara 3-saatlik infüzyonla verilen PTX'in anormal karaciğer fonksiyonlarının alevlenmesine neden olduğunu gösteren bir kanıt yoktur (http-3).

Yumurtalık ve meme kanseri tedavilerinde sadece PTX kullanan hastaların %1 inde asemptomatik ventriküler taşikardi, senkop, hipertansiyon, venöz tromboz gibi şiddetli kardiyovasküler yan etkiler gözlenmiştir (http-4).

Sırasıyla hastaların %52, %38 ve %31'inde bulantı, kusma, diyare ve mukozit görülmüştür. Bu belirtiler genellikle hafif ve orta şiddette olmuştur. Mukozit tedavi şemasına bağlı olmuş ve 24 saatlik infüzyonla 3-saatlik infüzyonla olduğundan daha sık görülmüştür. PTX alan hastalarda barsak tıkanıklığı/perforasyon, pankreatit, iskemik kolit ve dehidratasyon nadiren görülmüştür (http-3).

Uygulanan hastaların çoğunluğunda (%87) alopesi gözlenmiştir (Joerger, 2012; http-3), bir kısmında (%21) ödem oluşumu bildirilmiş (http-3) ve tırnak değişikliği (kalınlaşma, renk değişikliği, tırnak kaybı) nadiren (%2) rastlanmıştır (Erdemoğlu ve Şener, 2000; http-2).

2.3.4. Paklitaksel'in miktar tayin yöntemleri

PTX ile yapılan çalışmalarda en çok tercih edilen miktar tayin yöntemi olarak karşımıza Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) çıkmaktadır (Mu ve Feng, 2001; Badea vd., 2004; Jin vd., 2007; Liu vd., 2007).

Gupte ve Çiftçi (2004) yaptığı PTX ve 5-florourasil ile mikroküre çalışmasında, PTX miktar tayini için 20°C de ve 227 nm de analizler gerçekleştirilmiştir.

HPLC yöntemiyle yapılan başka bir çalışmada, PTX-kolestrol kompleksi yüklü intravenöz emülsiyonda sıcaklık 40°C ye ayarlanmış, mobil faz olarak asetonitril-su karışımı kullanılmış ve 227 nm de analiz çalışması yapılmıştır (Xia vd.,2013).

Kim ve arkadaşlarının (2005) fareler üzerinde yaptığı çalışmada, PTX'in farelerin plazma, doku ve tümörlerinde miktar tayini için yine yüksek HPLC yöntemi kullanılmıştır. İnternal standart olarak dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylene dioxy biphenyl-2',2' dicarboxylate kullanılan çalışmalar 227 nm'de gerçekleştirilmiştir.

2.3.5. Paklitaksel içeren ticari preparatlar

PTX içeren ticari preparatlar arasında, Orna Firmasının Anzatax® (100 mg/16,7 mL, 150 mg/25 mL, 30 mg/5 mL ve 300 mg/50 mL flakon), Deva Firmasının Ataxil® (100 mg/16,7 mL, 30 mg/5 mL ve 300 mg/50 mL flakon), Sandoz Firmasının Ebetaxil® (100 mg/16,6 mL, 150 mg/25 mL, 30 mg/5 mL, 300 mg/50 mL ve 600 mg/100 mL flakon), Actavis İlaç Firmasının Sindaxel® (100 mg/16,7 mL, 150 mg/25 mL, 30 mg/5 mL ve 300 mg/50 mL flakon), Koçak Farma Firmasının Taksen® (100 mg/17 mL, 150

mg/25 mL, 30 mg/5 mL ve 300 mg/50 mL flakon), Bristol Myers Squibb Firmasının Taxol® (100 mg/17 mL ve 30 mg/5 mL flakon) ve Dem İlaç Firmasının Vitax® (100 mg/16,7 mL, 30 mg/5 mL ve 300 mg/50 mL flakon) adlı ürünleri sayılabilir (<http-5>).

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Maddeler

Asetik asit	: Sigma-Aldrich, Almanya
Asetonitril	: Merck, Almanya
Dötorokloroform	: Merck, Almanya
Etanol	: Merck, Almanya
Kitosan (MMW)	: Sigma-Aldrich, Almanya
Kollidon® SR	: Basf Pharmaceuticals, Almanya
Metanol	: Merck, Almanya
Paklitaksel	: Actavis, Türkiye
Sodyum klorür	: Riedel de Haën, Seelze, Almanya

3.2. Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı	: Arçelik No Frost, Türkiye
Diferansiyel Taramalı Kalorimetri	: Shimadzu DSC-60, Japonya
Etüv	: Elektro-mag M 5040BD, Türkiye
Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektrofotometresi	: Perkin Elmer Spektrum 2000, İngiltere
Hassas Terazı	: Ohaus, İsviçre
Manyetik Isıtıcı	: Heidolph MR 3001K, Almanya IKA®-Werke, Almanya
Mekanik Karıştırıcı	: Heidolph RZR2051 Electronic, Almanya
Nükleer Manyetik Rezonans Spektrofotometresi	: Ultra Shield CP MAS NMR, Brucker, Almanya
Parçacık Büyüklüğü Analiz Cihazı	: Zetasizer Nano Series, İngiltere
pH Metre	: WTW Profi Lab pH 597, Weilheim, Almanya
Püskürterek Kurutma Cihazı	: Büchi B-190, İsviçre
Taramalı Elektron Mikroskobu	: Carl Zeiss SUPRA 50VP, Almanya
Ultrasonik Banyo	: Elma T470/H, Almanya
X Işını Kırınım Cihazı	: XRD-RIKAGU D/Max-3C, Japonya
Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi	: Shimadzu 20-A, Japonya
Zeta Potansiyel Analiz Cihazı	: Zetasizer Nano Series, İngiltere

4. YÖNTEMLER

4.1. *İn Vitro* Çalışmalar

4.1.1. Çalışılacak maddeler ile yapılan çalışmalar

4.1.1.1. *Paklitaksel ile yapılan çalışmalar*

4.1.1.1.1. *Termal analiz*

PTX'in (~5 mg ağırlığında) termal analizi DSC cihazı (DSC-60, Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MI, ABD) kullanılarak, basınç yardımıyla kapatılmış alüminyum örnek kabında, 50 mL.dk⁻¹ azot gazı akış hızı, 10°C.dk⁻¹ sıcaklık artışı ile 30-300°C aralığında alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiş ve maddenin termogramı elde edilmiştir.

4.1.1.1.2. *X-ışını kırınım analizi*

PTX'in XRD analizi, 2-40° aralığında, 40 kV voltaj, 20 mA akım şiddeti ve 2°.dk⁻¹ ilerleme hızında XRD - D/Max-3C (Rikagu Corporation; Tokyo, Japonya) yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

4.1.1.1.3. *Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi*

PTX'in FT-IR analizi IR Prestige- 21 (Shimadzu, Tokyo, Japonya) cihazında 4000-400 cm⁻¹ dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir.

4.1.1.1.4. *Nükleer manyetik rezonans analizi*

PTX'in yapısal özellikleri, ¹H-NMR analiz cihazında (Ultra-Shield™ CPMAS NMR, Bruker, Rheinstetten, Almanya) 25°C'de, çözücü olarak dötorokloroform kullanılarak araştırılmıştır.

4.1.1.1.5. *Paklitaksel'in yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile analitik miktar tayini*

İn vitro çalışmalarda, PTX'in analitik miktar tayini HPLC (Shimadzu 20 A, Tokyo, Japonya) yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Jin vd., 2007). Analizlerde kullanılan çalışma şartları Çizelge 4.1.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. *Paklitaksel'in analitik miktar tayininde kullanılan yüksek basınçlı sıvı kromatografisi çalışma koşulları*

Cihaz	Shimadzu-20 A
Kolon	Shimadzu Shim-Pack CLC-ODS (Kolon Çapı: 6,0 mm, Kolon Uzunluğu: 15,0 cm) (Parçacık Çapı: 5 µm, Parçacık Boyutu: 100Å)
Kolon Sıcaklığı	30°C
Çözücü Sistemi	Asetonitril:Distile Su [50:50, h/h]
Dedektör	Shimadzu Fotodiyot Dizisi
Çalışılan Dalga Boyu	227 nm
Akış Hızı	1,5 mL.dk ⁻¹
Enjeksiyon Hacmi	20 µL

Doğrusallık

PTX'in HPLC yönteminde kullanılacak standart eğrilerinin belirlenmesi amacıyla, 50 µg.mL⁻¹ konsantrasyonda stok çözeltilerinden 1-10 µg.mL⁻¹ konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır. PTX'in konsantrasyonuna karşılık gelen alan değerleri bulunarak kullanılacak kalibrasyon eşitlikleri oluşturulmuş ve korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Deney 6 kez tekrarlanmıştır.

Keskinlik

PTX'in 3 farklı konsantrasyonda (2 µg.mL⁻¹, 6 µg.mL⁻¹, 10 µg.mL⁻¹) çözeltileri hazırlanmış ve HPLC ile analiz edilmiştir. Her bir konsantrasyon için, analizler, 6 kez tekrarlanmıştır. 1. gün içinde yapılan tüm çalışmalar 3. ve 5. günde de tekrarlanmıştır (k=3). Üç günde elde edilen değerler ile yöntemin gün-içi ve günler-arası tekraredilebilirlik değerleri hesaplanmıştır.

Doğruluk

PTX'in 3 farklı konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmış, HPLC yöntemi ile analizler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçların doğru denklemi yardımı ile hesaplamaları yapılarak, eklenen PTX konsantrasyonları ile bulunan değerler karşılaştırılmış ve yöntemin doğruluğu yüzde geri kazanım olarak hesaplanmıştır. Her deney 6 kez tekrarlanmıştır.

Duyarlılık

Duyarlılık çalışmalarında, sistemin kantitatif sınırlar içerisine girmeyen en düşük derişimi olan LOD değeri aşağıdaki **Eşitlik 4.1** yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\text{LOD} = \frac{[3.3 \times \text{SS}]}{m} \quad (4.1)$$

Burada, SS: y eksen kesim değerin standart sapması, m: korelasyon denkleminin eğimi'dir (ICH, 1996)

Analizi yapılan örneğin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının belirlenebildiği LOQ değeri ise **Eşitlik 4.2** kullanılarak belirlenmiştir.

$$\text{LOQ} = \frac{[10 \times \text{SS}]}{m} \quad (4.2)$$

Burada, SS: y eksen kesim değerin standart sapması, m: korelasyon denkleminin eğimi'dir (ICH, 1996)

Seçicilik

Seçicilik, karışım içersindeki tek bir maddenin, formülasyonda bulunan diğer maddelerin varlığında, derişiminin tam ve doğru olarak belirlenebileceğini gösteren en önemli analitik parametrelerden biridir. Çalışmada, PTX içermeyen plasebo formülasyonlar ile PTX içeren formülasyonlar analiz edilerek sistemin seçiciliği etkin madde içermeyen formülasyonlar bileşenleri kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır.

4.1.1.2. Kollidon® SR ile yapılan çalışmalar

4.1.1.2.1. Termal analiz

10⁻⁴ duyarlılıkta, ~5 mg Kollidon® SR tartılarak, alüminyum örnek kabında basınç yardımıyla sıkıca kapatılmış, 50 mL.dk⁻¹ azot gazı akış hızı, 10°C.dk⁻¹ sıcaklık artışı ile 30-300°C aralığında alüminyum referansa karşı analizi gerçekleştirilmiştir.

4.1.1.2.2. X-Işını kırınım analizi

Kollidon® SR'nin XRD analizi, 2-40° aralığında, 40 kV voltaj, 20 mA akım şiddeti ve 2°.dk⁻¹ ilerleme hızında Rikagu jeneratör yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

4.1.1.2.3. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi

Kollidon® SR'nin FT-IR analizi 4000-400 cm⁻¹ dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir.

4.1.1.2.4. Nükleer manyetik rezonans analizi

Kollidon® SR'nin yapısal özellikleri, ¹H-NMR analizi ile 25°C ± 2°C'de, çözücü olarak dötorokloroform kullanılarak araştırılmıştır.

4.1.1.3. Kitosan ile yapılan çalışmalar

4.1.1.3.1. Termal analiz

10⁻⁴ duyarlılıkta, ~5 mg Kitosan tartılarak, alüminyum örnek kabında basınç yardımıyla sıkıca kapatılmış, 50 mL.dk⁻¹ azot gazı akış hızı, 10°C.dk⁻¹ ısı artışı ile 30-300°C aralığında alüminyum referansa karşı analizi gerçekleştirilmiştir.

4.1.1.3.2. X-ışını kırınım analizi

Kitosan'ın XRD analizi, 2-40° aralığında, 40 kV voltaj, 20 mA akım şiddeti ve 2°.dk⁻¹ ilerleme hızında Rikagu jeneratör yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

4.1.1.3.3. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi

Kitosan'ın FT-IR analizi 4000-400 cm⁻¹ dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir.

4.1.1.3.4. Nükleer manyetik rezonans analizi

Kollidon® SR'nin yapısal özellikleri, ¹H-NMR analizi ile 25°C ± 2°C'de, çözücü olarak dötorokloroform kullanılarak araştırılmıştır.

4.1.2. Nanopartikül formülasyonlarına ait çalışmalar

4.1.2.1. Formülasyonların hazırlanışı

Formülasyonların hazırlanmasında püskürterek kurutma yöntemi kullanılmıştır (Asada vd., 2004; Yenilmez vd., 2011; Başaran vd., 2014; Başaran vd., 2015; Başaran vd., 2017; Yenilmez vd., 2017). Yöntemde kısaca çeper yapıyı oluşturacak polimerlerin uygun çözücülerde çözeltileri hazırlanmış ve hazırlanan çözeltilere önceden belirlenen konsantrasyonlarda PTX eklenmiştir. Oluşan homojen ve şeffaf karışımlar püskürterek kurutma cihazı (Büchi-B190, Mini Spray Dryer, İsviçre) yardımıyla kurutulmuş ve toz halde nanopartiküller elde edilmiştir. Elde edilen nanopartiküller amber renkli hermetik olarak kapalı kaplarda analiz edilinceye kadar ve kararlılık çalışmaları süresince saklanmıştır.

Çalışmada çözücü olarak metanolün kullanıldığı Kollidon® SR ile hazırlanan formülasyonlarda hava giriş sıcaklığı 130°C ± 5°C (hava çıkış sıcaklığı 70°C ± 5°C); Kitosan ile hazırlanan formülasyonlarda hava giriş sıcaklığı 160°C ± 5°C (hava çıkış sıcaklığı 90°C ± 5°C) olarak belirlenmiştir.

4.1.2.2. Nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyon çalışmaları

4.1.2.2.1. Parçacık şekli analizleri

Nanopartiküllerin yüzey özelliklerinin ve şekillerinin belirlenmesi amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM, Carl Zeiss SUPRA 50VP, Oberkochen, Almanya) kullanılmıştır.

4.1.2.2.2. Parçacık büyüklüğü ve dağılımı analizleri

Nanopartiküllerin parçacık büyüklük ve parçacık büyüklük dağılım ölçümleri, distile sudaki dispersiyonları kullanılarak zeta potansiyel analiz cihazı (Malvern Nano ZS; Zetasizer Nano Series, Worcestershire, Birleşik Krallık) ile elde edilmiştir. Analizler üç kez tekrarlanmıştır.

4.1.2.2.3. Zeta potansiyel analizleri

Nanopartiküllerin zeta potansiyel değerleri zeta potansiyel analiz cihazı (Malvern Nano ZS; Zetasizer Nano Series, Worcestershire, Birleşik Krallık) yardımıyla belirlenmiştir. Bu analizlerde, NaCl elektroliti kullanılarak, 50-100 μS iletkenlik aralığında sabit potansiyellerin oluşması sağlanabilmektedir. Elektrolit bazın eklenmesiyle, distile sudaki iletkenliğin neden olduğu küçük değişimlerin zeta potansiyel değerlerini etkilememesi sağlanarak çok daha güvenilir ölçümler gerçekleştirilebilmektedir (Müller ve Heinemann, 1993). Bu nedenle, formülasyonların iletkenliği NaCl ile 50 μS 'e ayarlanmış distile suda dağıtılmasının ardından analiz edilmiştir. Analizler üç kez tekrarlanmıştır.

4.1.2.2.4. pH analizleri

Hazırlanan nanopartiküllerin pH değerleri, karakterizasyon ve kararlılık çalışmaları süresince WTW Profi Lab (pH 597, Weilheim, Almanya) cihazı ile analiz edilmiştir. Analizler üç kez tekrarlanmıştır.

4.1.2.2.5. Termal analizler

Nanopartiküllerin termal analizleri, basınç yardımıyla sıkıca kapatılmış alüminyum örnek kabında, 50 mL.dk⁻¹ azot gazı akış hızı, 10°C.dk⁻¹ sıcaklık artışı ile, 30-300°C aralığında alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiştir. Saf maddenin ve polimerlerin termogramları analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde referans olarak kullanılmıştır.

4.1.2.2.6. X-ışını kırınım analizleri

Nanopartiküllerin XRD analizleri, 2-40° aralığında, 40 kV voltaj, 20 mA akım şiddeti ve 2°.dk⁻¹ ilerleme hızında gerçekleştirilmiştir. Saf maddenin ve polimerlerin XRD spektrumları analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde referans olarak kullanılmıştır.

4.1.2.2.7. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi

Nanopartiküllerin FT-IR analizleri, 4000-400 cm⁻¹ dalga boyu aralığında analiz edilmiştir. Saf maddenin ve polimerlerin FT-IR spektrumları analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde referans olarak kullanılmıştır.

4.1.2.2.8. Nükleer manyetik rezonans analizleri

Nanopartiküllerin yapısal özellikleri, moleküller arası veya molekül içi olası değişimleri, ¹H-NMR analizi ile, 25°C ± 2°C’de, çözücü olarak dötörokloroform kullanılarak analiz edilmiştir. Saf maddenin ve polimerlerin ¹H-NMR spektrumları analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde referans olarak kullanılmıştır.

4.1.2.2.9. Nanopartikül formülasyonlarında etkin madde miktar tayini

Nanopartiküllere yüklenen ve hapsedilen PTX miktarı **Çizelge 4.1.’de** anlatılan analiz şartlarında, HPLC yöntemi ile belirlenmiştir.

Yöntemde Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerde 5 mg tam tartımı alınan nanopartikül, 5 mL asetonitrilde ağzı sıkıca kapalı tüplerde çözündürülmüştür. Oluşan berrak çözelti gerekli seyreltmelerin yapılmasının ardından HPLC ile analiz edilerek partikülde bulunan toplam etkin madde miktarı belirlenmiştir.

Partikülün yüzeyinde bulunan PTX miktarının belirlenebilmesi için ise 5 mg tam tartımı alınan nanopartikül, 2-propanol (5 mL) içinde disperse edilereke 2 dakika süre ile vorteks ile karıştırılmıştır. Çeper maddenin çözünmeyip yalnızca PTX’in çözündüğü bu çözücüde hazırlanan dispersiyon santrifüj edilerek üstteki berrak kısım alınmış ve gerekli seyreltmelerin yapılmasının ardından HPLC ile analiz edilerek partikülün yüzeyinde bulunan PTX miktarı belirlenmiştir. Toplam etkin madde miktarı ile yüzeyde bulunan PTX miktarı arasındaki fark nanopartiküllere hapsedilen etkin madde miktarı olarak belirlenmiştir. Analizler 3 kez tekrarlanmıştır.

Kitosan ile hazırlanan nanopartiküllerde ise 5 mg tam tartımı alınan nanopartikül, 5 mL çözücüde (asetik asit çözeltisi (%2) ve etanol; 4:1, h/h) ağzı sıkıca kapalı tüplerde

çözündürülmüştür. Oluşan berrak çözelti gerekli seyreltmelerin yapılmasının ardından HPLC ile analiz edilerek partikülde bulunan toplam etkin madde miktarı belirlenmiştir.

Partikülün yüzeyinde bulunan PTX miktarının belirlenebilmesi için ise 5 mg tam tartımı alınan nanopartikül, asetonitril (5 mL) içinde disperse edilereke 2 dakika süre ile vorteks ile karıştırılmıştır. Çeper maddenin çözünmeyip yalnızca PTX'in çözündüğü bu çözücüde hazırlanan dispersiyon santrifüj edilerek üstteki berrak kısım alınmış ve gerekli seyreltmelerin yapılmasının ardından HPLC ile analiz edilerek partikülün yüzeyinde bulunan PTX miktarı belirlenmiştir. Toplam etkin madde miktarı ile yüzeyde bulunan PTX miktarı arasındaki fark nanopartiküllere hapsedilen etkin madde miktarı olarak belirlenmiştir. Analizler 3 kez tekrarlanmıştır.

4.1.2.2.10. Nanopartikül formülasyonlarına ait in vitro salım çalışmaları

Nanopartiküllere yüklenen PTX'in salım profilleri 37°C±2°C'de pH 7,4 fosfat tamponu (sink koşulları sağlamak için %1 Tween® 80 içeren; 25 mL) içerisinde 200 rpm karıştırma hızında diyaliz membran içinde gerçekleştirilmiştir. Önceden belirlenen zaman aralıklarında 24 saat süre ile örnekler alınıp HPLC ile analiz edilerek salım profilleri oluşturulmuştur. Analizler 3 kez tekrarlanmıştır.

4.1.2.2.11. Nanopartikül formülasyonlarının in vitro salım kinetiklerinin belirlenmesi

Nanopartiküllere yüklenen PTX'in salım verileri kullanılarak partiküllerden salımı en iyi ifade edecek kinetik modelin belirlenmesi amacı ile DDSolver programı kullanılarak değerlendirmeler yapılmıştır (Zhang vd., 2010).

4.1.2.2.12. Nanopartikül formülasyonlarına ait sitotoksisite çalışmaları

Bu çalışmada hazırlanan formülasyonların sitotoksitesi MTT (Metil-tiyazol-tetrazolyum) yöntemi ile incelenmiştir. Bu yöntemde hücreler, otoklavlanarak (121°C’de 20 dakika) sterilize edilmiş 7,5 mL %10 Fetal Bovine Serum (FBS), %1 penisilin-streptomisin, %1 L-glutamin içeren Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM) besiyeri içerisine aktarılmış ve 25 cm²’lik flask da 37°C’de %5 CO₂ ve %95 hava içeren atmosfer ortamı etüvde çoğalmaya bırakılmıştır. Hücreler çoğaldıktan sonra medium ortamdan çekilmiş, 3 mL PBS ile flask yıkanarak PBS atılmıştır. 0,2 mL Tripsin ilave edilerek 3 dakika etüvde bekletilmiş ve flaskın yanlarına vurularak hücreler flaskın tabanından kaldırılmıştır. Kaldırılan hücrelerin üzerine 15 mL DMEM (%10 FBS+ABS)

eklenmiş ve cm^2 'lik flaska aktarılarak 37°C 'de %5 CO_2 ve %95 hava içeren atmosfer ortamı etüvde 2 gün süreyle çoğalmaya bırakılmıştır.

Çoğalan hücreler üzerinden medium alınmış ve atılmıştır. Flask tabanına yapışmış hücreler üzerine 3 mL PBS eklenerek yıkama yapılmış ve PBS atılmıştır. 0,6 mL tripsin eklenerek 3 dakika etüvde bekletilmiş ve aynı yöntemle hücreler tabandan kaldırılmıştır.

Kaldırılmış hücreler üzerine 5mL DMEM eklenerek falkon tüpüne aktarılmış ve 4°C 'de 300G'de 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür. Süpernatant atılmış ve çökelti üzerine 10 mL medium eklenmiş ve pipetle karıştırılmıştır.

10 μL bu hücre süspansiyonundan alınarak mikrotübe aktarılmış üzerine 10 μL metilen mavisi çözeltisi eklenerek Thoma lamı ile hücre sayımı yapılmıştır.

Hücreler 96'lı kuyucuklu plakaya her bir kuyucuğa 100 μL 'de 6.000 hücre olacak şekilde DMEM (%10 FBS+ABS) ile seyreltilerek sitotoksikite çalışmaları için pasajlanmış ve hücrelerin bir günlük üreme periyodunu sağlamaları için 37°C 'de %5 CO_2 ve %95 hava içeren atmosfer ortamında sitotoksik çalışma için bekletilmiştir. Bir günlük üreme periyodunun ardından ikinci gün sitotoksik etkileri incelemek için hücre süspansiyonlarının üzerlerine farklı derişimlerde formülasyonlar eklenmiş, formülasyon ile muamele edilmeyen kontrol hücreleri ile birlikte 37°C 'de %5 CO_2 ve %95 hava içeren atmosfer ortamında 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 20 μL ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) MTT boyası eklenmiş ve MTT boyasının canlı hücreler tarafından formazan tuzu haline dönüştürülebilmesi için 37°C de 2 saat daha inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda MTT kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa 200 μL DMSO eklenerek plaka okuyucuda (ELISA) 570 nm dalga boyunda renk değişimi belirlenmiştir.

4.1.3. Nanopartikül formülasyonlarına ait kararlılık çalışmaları

Hazırlanan nanopartiküller, saf PTX'in kararlılık durumu değerlendirilerek uzun süreli kararlılık çalışmaları için $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ buzdolabında saklanması planlanmıştır. Hızlandırılmış kararlılık çalışmalarında ise nanopartiküller $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ve $\pm 5\%$ 'lik ortamlarda saklanmıştır. Nanopartiküller amber renkli sıkıca kapalı ambalajlara konulmuş ve kararlılıklarının incelenmesi amacıyla, 0, 3, ve 6 aylık sürelerin sonunda, parçacık büyüklüğü, parçacık büyüklüğü dağılımı, zeta potansiyel, pH ve PTX miktar tayinleri analizleri gerçekleştirilerek kararlılıkları değerlendirilmiştir.

Polimerik yapıdaki olası değişiklikler ise 6. Ay sonunda gerçekleştirilen DSC, XRD analizleri ile değerlendirilmiştir.

4.1.4. İstatistiksel değerlendirme

Analizler arasındaki önemli farkların belirlenebilmesi için sonuçlar istatistiksel olarak SPSS (SPSS 13.0, SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) programı kullanılarak tek yönlü ANOVA ile değerlendirilmiştir (Hu vd., 2019).

Sonuçlar arasındaki fark “ $p < 0,05$ ” olduğunda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

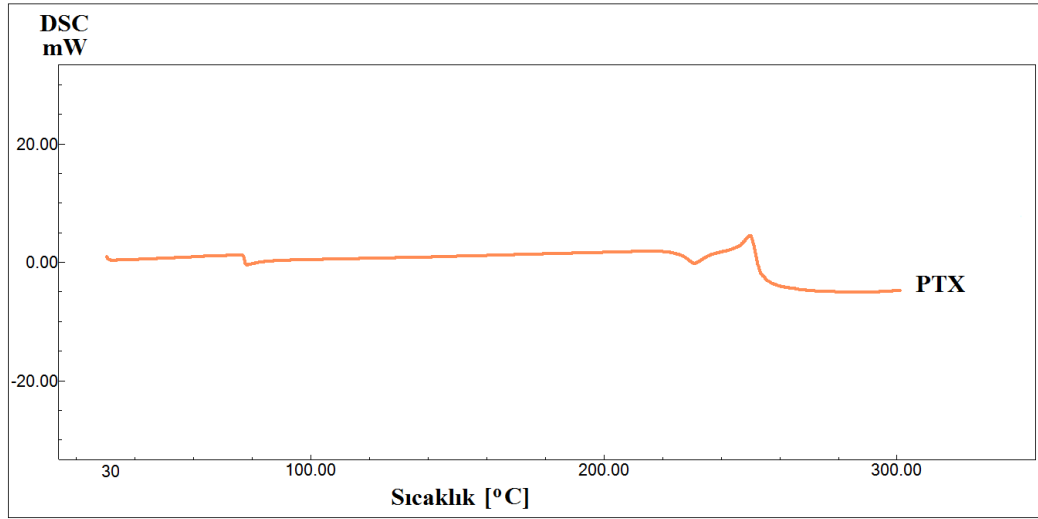
5. BULGULAR ve TARTIŞMA

5.1. Çalışılacak Maddeler ile Yapılan Çalışmalar

5.1.1. Paklitaksel ile yapılan çalışmalar

5.1.1.1. Termal analiz

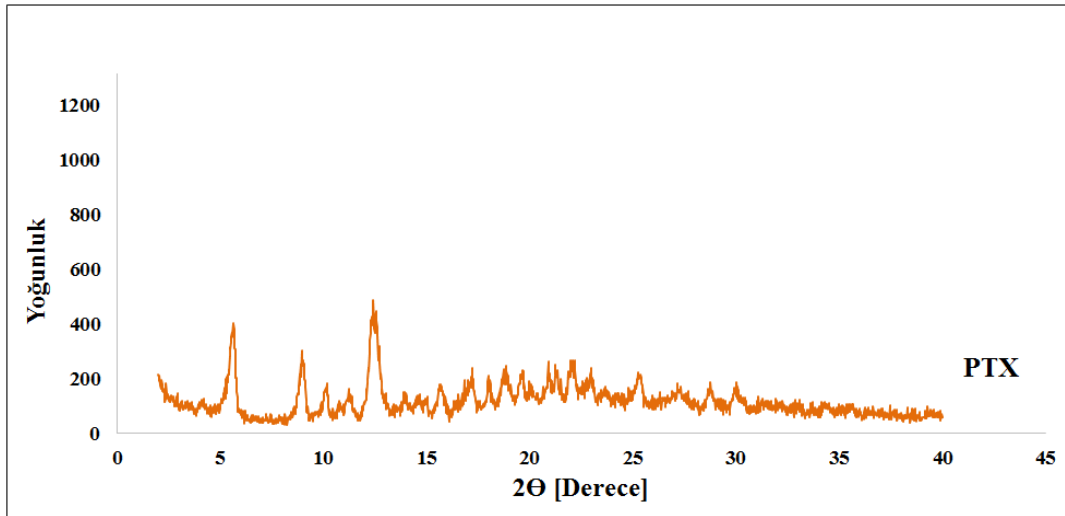
PTX'in, DSC cihazı ile 30-300°C aralığında yapılan termal analizinde, erime sıcaklığı 229,55°C olarak bulunmuş, PTX'e ait DSC termogramı Şekil 5.1.'de sunulmuştur.



Şekil 5.1. Paklitaksel'in termal analizine ait termogram

5.1.1.2. X-ışını kırınım analizi

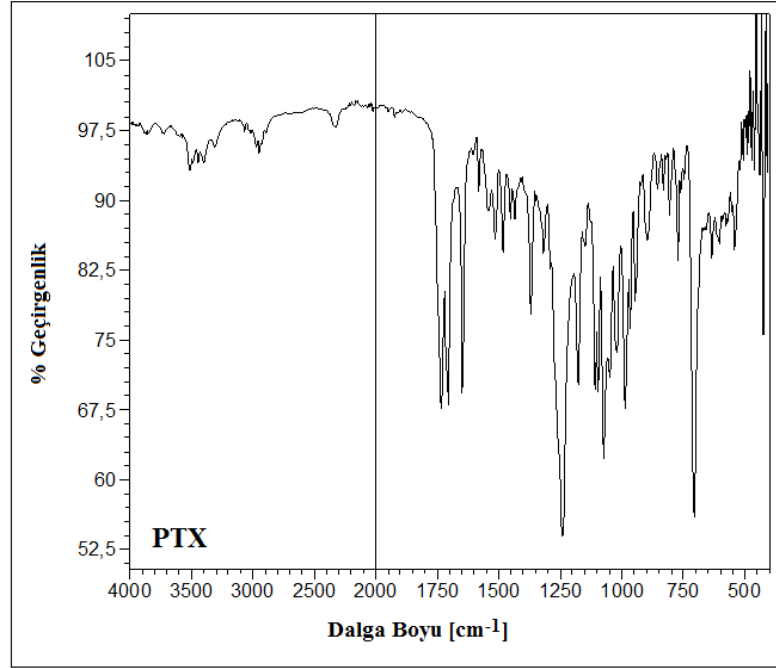
PTX'nin XRD Spektrumu Şekil 5.2.'de sunulmuştur.



Şekil 5.2. Paklitaksel'in X-ışını kırınım analizine ait difraktogram

5.1.1.3. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi

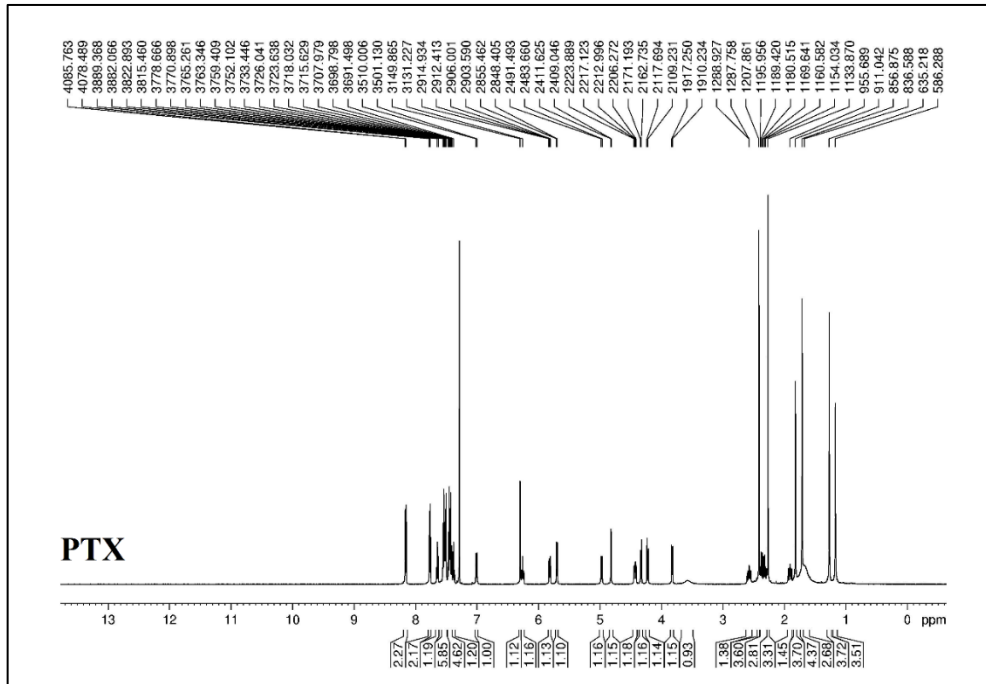
PTX'in FT-IR spektrumu Şekil 5.3.'te sunulmuştur.



Şekil 5.3. Paklitaksel'in Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analiz spektrumu

5.1.1.4. Nükleer manyetik rezonans analizi

PTX'in ¹H-NMR analizine ait spektrumu Şekil 5.4.'de sunulmuştur.



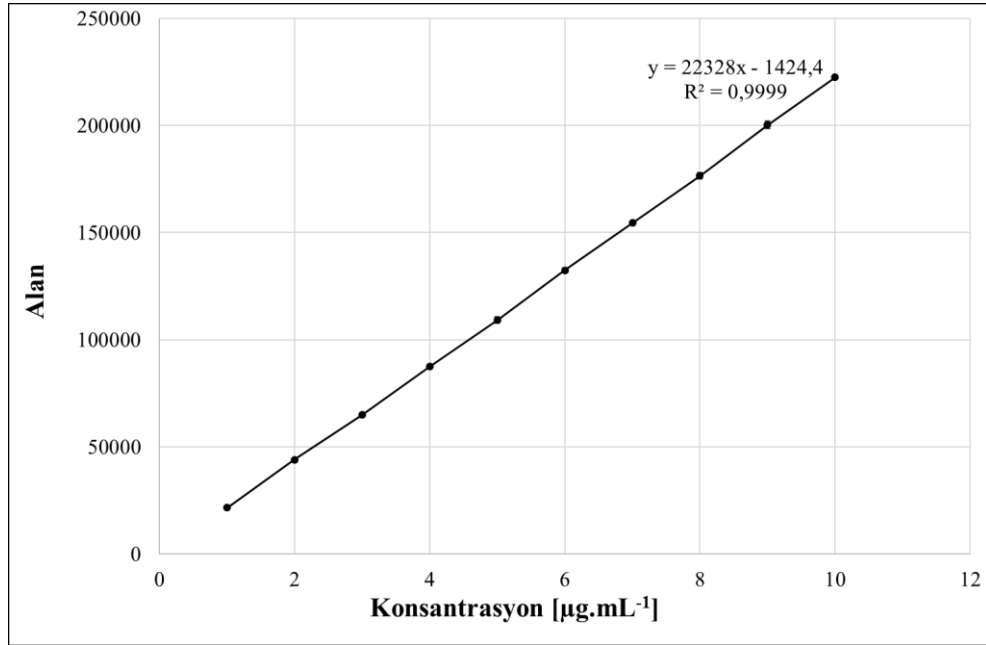
Şekil 5.4. Paklitaksel'in nükleer manyetik rezonans analiz spektrumu

Gerçekleştirilen DSC, XRD, FT-IR ve ¹H-NMR analizleri sonucunda elde edilen PTX'e ait veriler, hazırlanan nanopartiküllerin karakterizasyon analizlerinde ve nanopartiküllerin kararlılık çalışmalarında referans olarak kullanılmıştır.

5.1.1.5. Paklitaksel'in yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile analitik miktar tayini

5.1.1.5.1. Doğrusallık

PTX'nın etanolde hazırlanan 1-10 µg.mL⁻¹ konsantrasyonlarına karşılık gelen alan değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve eğri ile eğriye ait doğru denklemi Şekil 5.5.'de sunulmuştur (n=6; ort±SE).



Şekil 5.5. Paklitaksel'in miktar tayininde kullanılan standart eğri (n=6, Ort±SE)

5.1.1.5.2. Kesinlik

Yapılan analizler ile elde edilen sonuçlar formüller yardımıyla değerlendirilerek yöntemin RSD (Rölatif Standart Sapma) değerleri hesaplanmış ve sonuçları Çizelge 5.1.'de sunulmuştur.

5.1.1.5.3. Doğruluk

Doğruluk çalışmalarından elde edilen sonuçlar ve doğru denklemi yardımı ile PTX miktarları hesaplanmış, eklenen PTX miktarları ile bulunan değerler karşılaştırılarak Çizelge 5.2.'de sunulmuştur.

Çizelge 5.1. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yönteminin gün-içi ve günler-arası kesinlik sonuçları (RSD)

PTX Konsantrasyonu ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Gün-İçi $\pm$ SH	Günler-Arası $\pm$ SH
2	3,27 $\pm$ 0,07	10,24 $\pm$ 0,01
6	2,04 $\pm$ 0,03	8,12 $\pm$ 0,02
10	3,60 $\pm$ 0,01	7,02 $\pm$ 0,01

k=3, n=6, SH: Standart hata

Çizelge 5.2. Paklitaksel'in yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi ile elde edilen doğruluk değerleri

Eklenen PTX Konsantrasyonu ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Bulunan PTX Konsantrasyonu $\pm$ SH ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Geri Kazanılan PTX Konsantrasyonu [%]
6,00	5,98 $\pm$ 0,02	99,7 $\pm$ 0,01
6,00	5,95 $\pm$ 0,01	99,2 $\pm$ 0,01
6,00	5,97 $\pm$ 0,07	99,5 $\pm$ 0,03

n=6, SH: Standart hata

5.1.1.5.4. Duyarlılık

Eşitlik 2.1 kullanılarak hesaplanan LOD değeri $0,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$, Eşitlik 2.2 kullanılarak hesaplanan LOQ değeri ise $0,37 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

5.1.1.5.5. Seçicilik

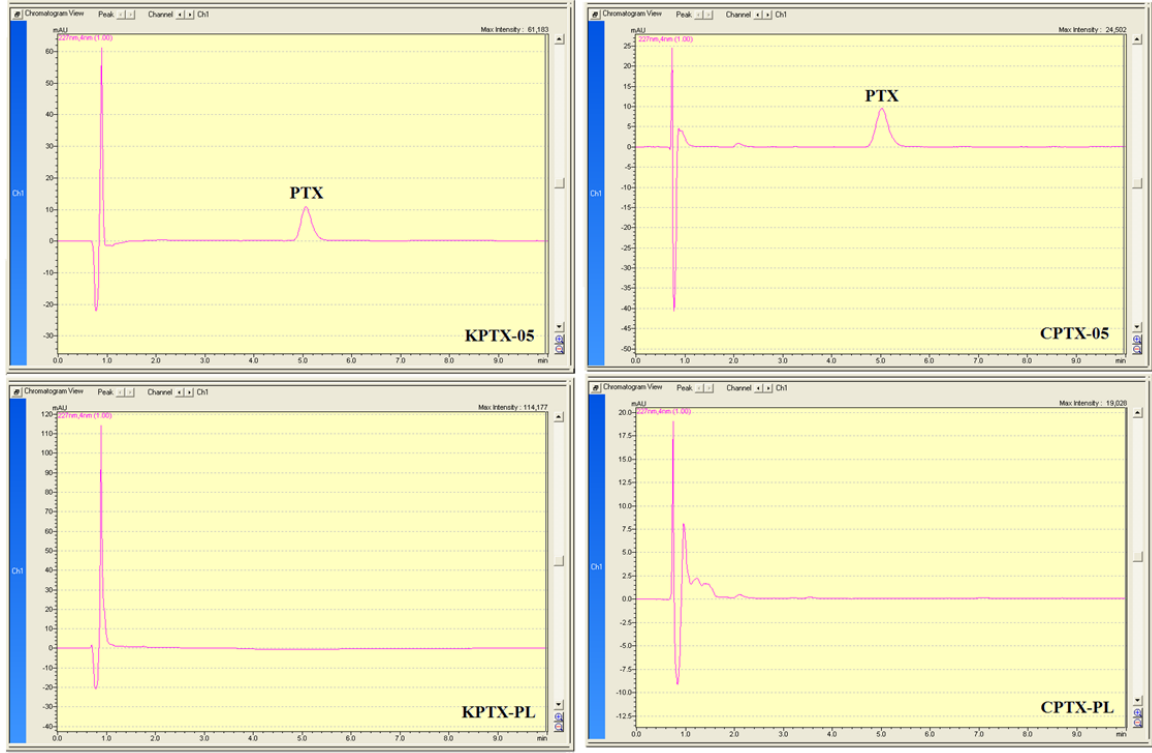
PTX'in miktar tayin analizi için belirlenen HPLC yöntemine ait seçicilik çalışması sonucunda; kullanılan yöntem ile PTX miktarının başarı ile analiz edileceği etkin madde içermeyen plasebo formülasyonlar ile karşılaştırmalı olarak çalışılarak ortaya konmuştur.

Hazırlanan formülasyonların HPLC seçicilik analiz kromatogramları Şekil 5.6.'da sunulmuştur.

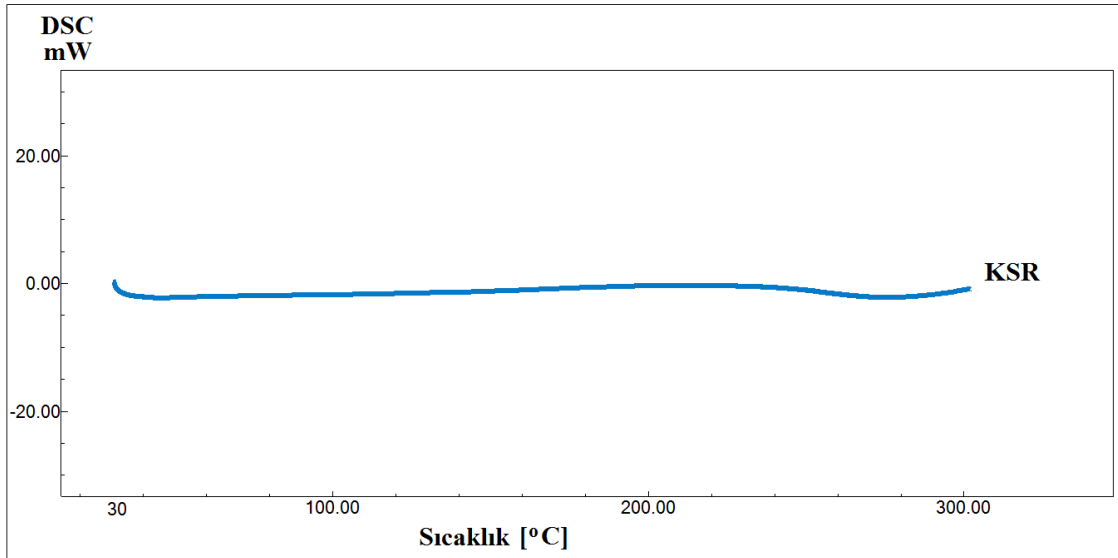
5.1.2. Kollidon® SR ile yapılan çalışmalar

5.1.2.1. Termal analiz

Kollidon® SR'nin DSC ile 30-300°C aralığında yapılan termal analizinde, polimerin amorf yapısına bağlı olarak herhangi bir erime piki gözlenmemiştir. Kollidon® SR'ye ait termogram Şekil 5.7.'de sunulmuştur.



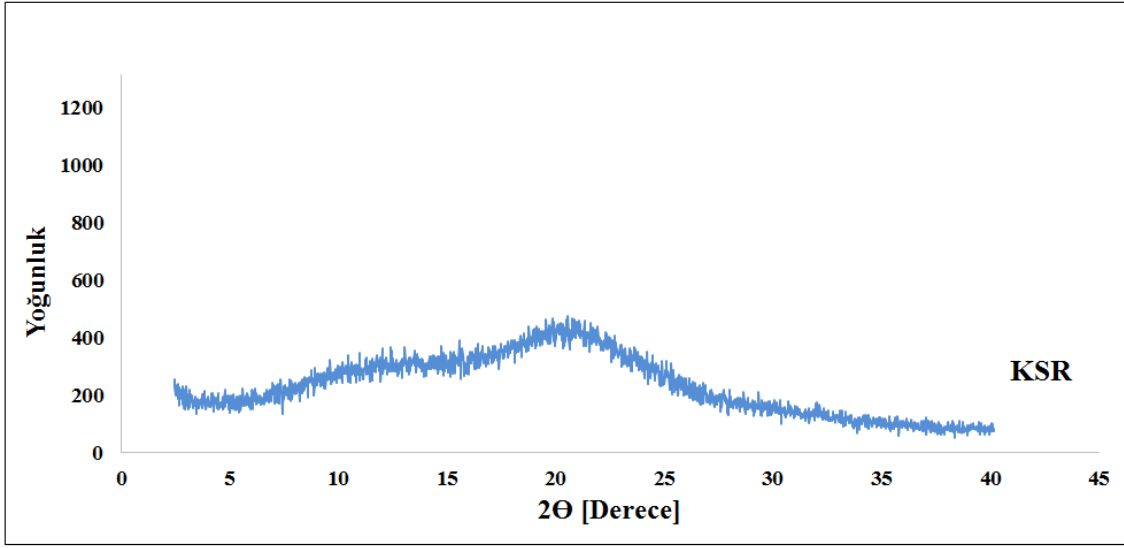
Şekil 5.6. Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının yüksek basınçlı sıvı kromatografisi seçicilik analizi kromatogramları



Şekil 5.7. Kollidon® SR'nin termal analizine ait termogram

5.1.2.2. X-ışını kırınım analizi

Kollidon® SR'nin XRD difraktogramı Şekil 5.8.'de sunulmuştur.

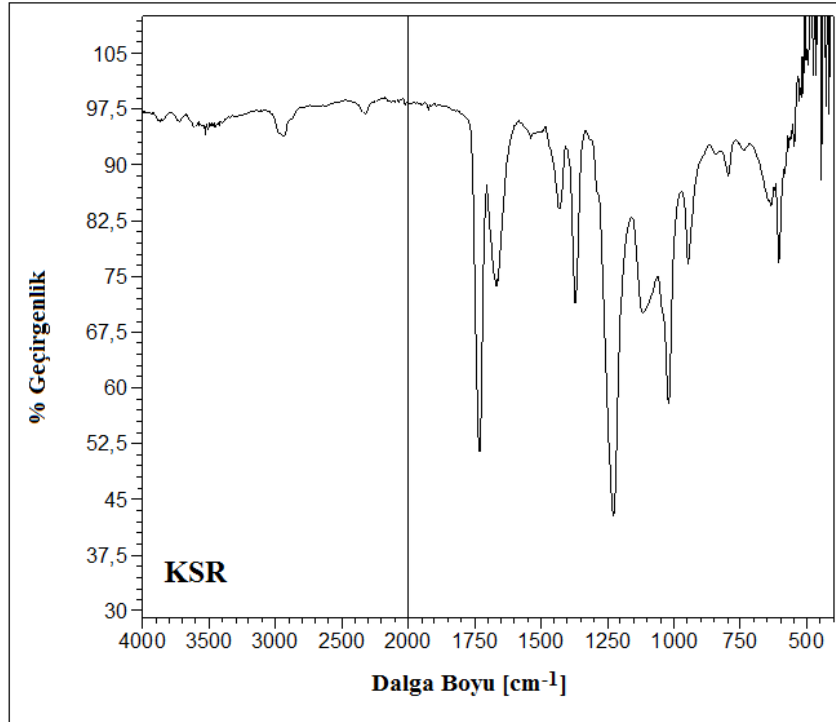


Şekil 5.8. Kollidon® SR'nin X-ışını kırınım analizine ait difraktogram

XRD analizi sonucunda kristal yapılara ait keskin sinyallerin spektrumda oluşmaması sonucunda DSC analizi sonucunu (Şekil 5.7.) da destekler nitelikte polimerin amorf yapıda olduğunu belirlenmiştir (Şekil 5.8.).

5.1.2.3. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi

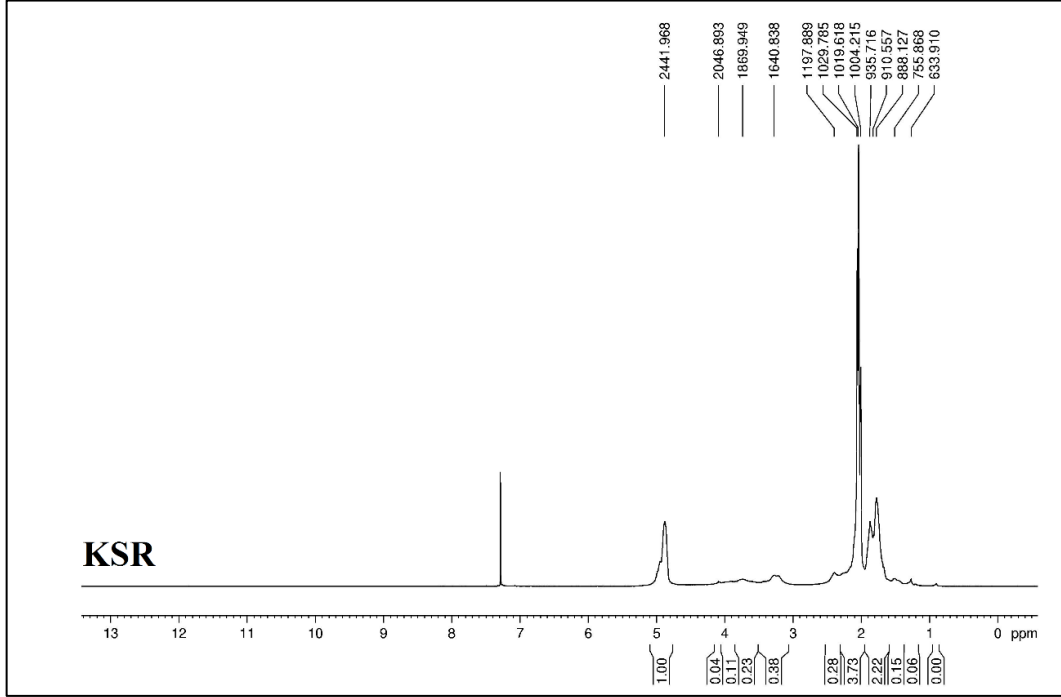
Kollidon® SR'nin FT-IR analizine ait spektrum Şekil 5.9.'da sunulmuştur.



Şekil 5.9. Kollidon® SR'nin Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analiz spektrumu

5.1.2.4. Nükleer manyetik rezonans analizi

Kollidon® SR'nin ^1H -NMR analizine ait spektrum Şekil 5.10.'da sunulmuştur.



Şekil 5.10. Kollidon® SR'nin nükleer manyetik rezonans analiz spektrumu

Polimerin DSC, XRD, FT-IR ve ^1H -NMR analiz spektrumları daha sonraki çalışmalarda yapısal değişikliklerin belirlenmesinde referans olarak kullanılmıştır.

5.1.3. Kitosan ile yapılan çalışmalar

5.1.3.1. Termal analiz

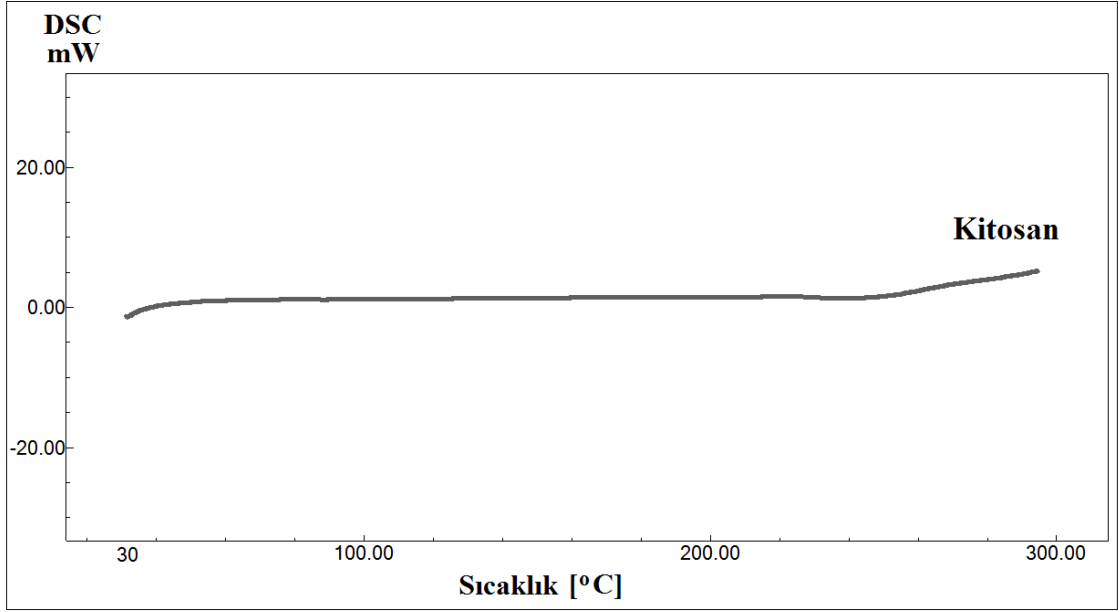
Kitosan'ın DSC ile 30-300°C aralığında yapılan termal analizinde, polimerin amorf yapısına bağlı olarak herhangi bir erime piki gözlenmemiştir. Kitosan'a ait termogram Şekil 5.11.'de sunulmuştur.

5.1.3.2. X-ışını kırınım analizi

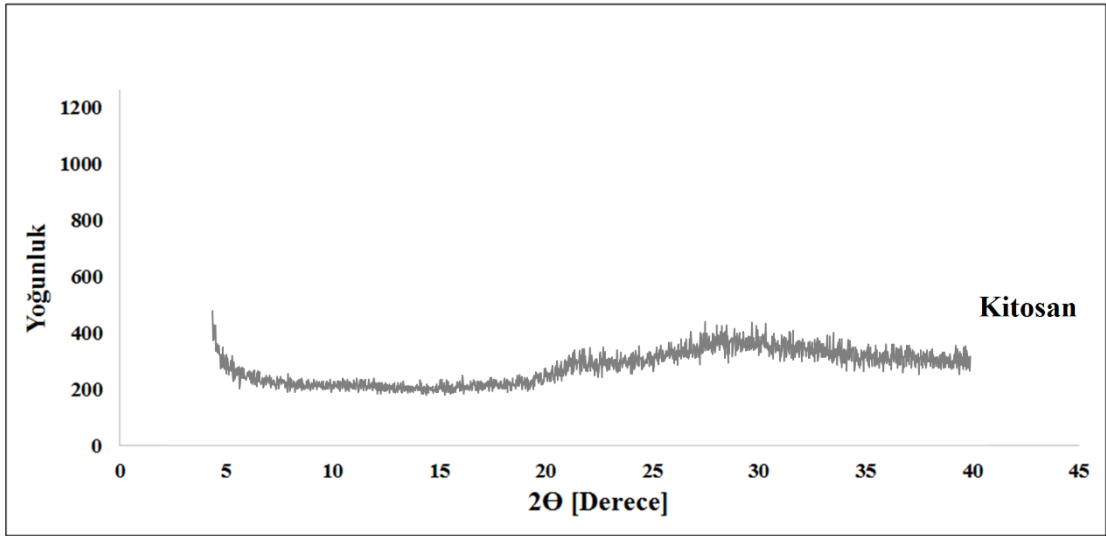
Kitosan'ın XRD analizi sonucunda DSC analizlerini de destekler nitelikte sonuç elde edilerek polimerin amorf yapıda olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.12).

5.1.3.3. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi

Kitosan'ın FT-IR analizine ait spektrum Şekil 5.13'de sunulmuştur.



Şekil 5.11. Kitosan'ın termal analizine ait termogram

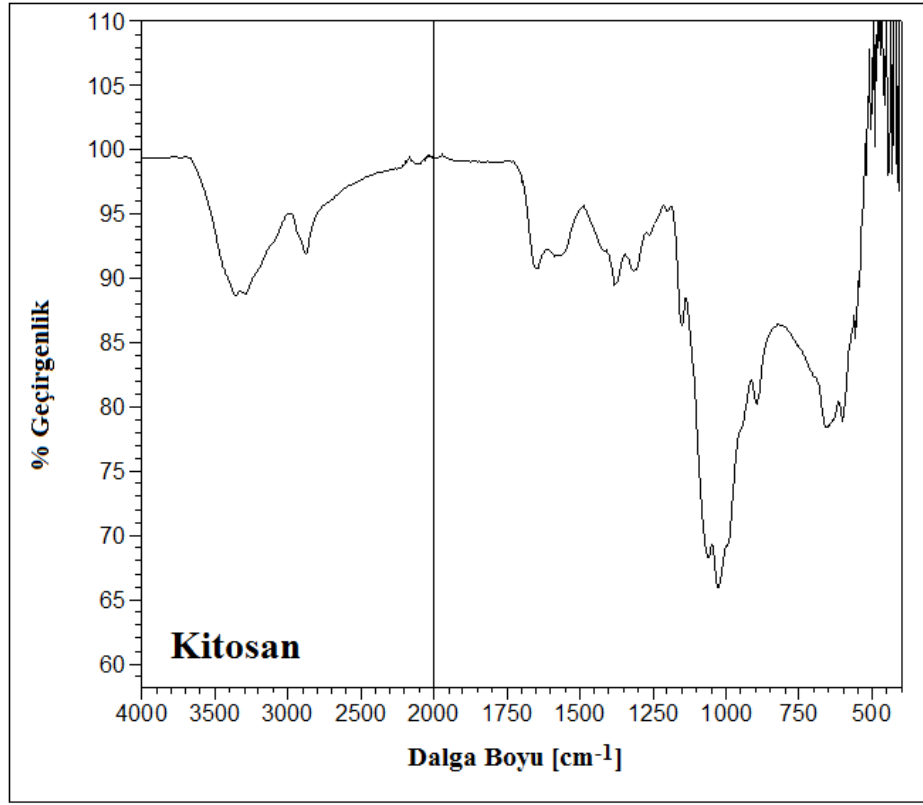


Şekil. 5.12. Kitosan'ın X-ışını kırınım analizine ait difraktogram

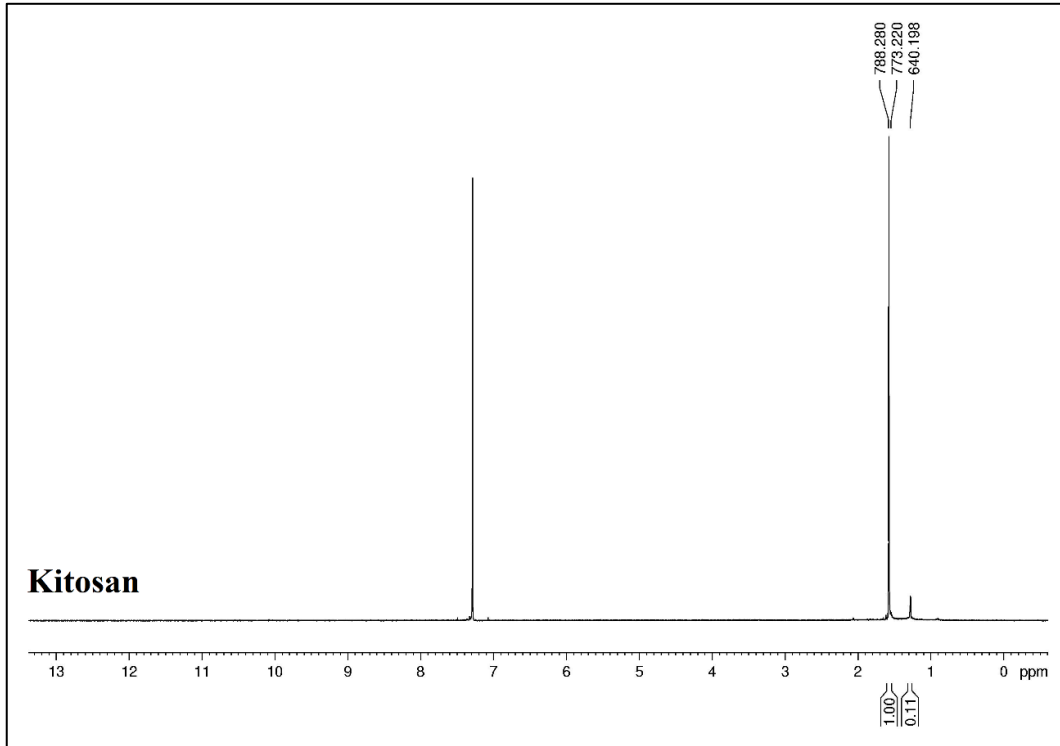
5.1.3.4. Nükleer manyetik rezonans analizi

Kitosan'ın ^1H -NMR analizine ait spektrumu Şekil 5.14'de sunulmuştur.

Polimerin DSC, XRD, FT-IR ve ^1H -NMR analiz spektrumları daha sonraki çalışmalarda yapısal değişikliklerin belirlenmesinde referans olarak kullanılmıştır.



Şekil 5.13. *Kitosan*’ın Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analiz spektrumu



Şekil 5.14. *Kitosan*’ın nükleer manyetik rezonans analiz spektrumu

5.2. Polimerik nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyon çalışmaları

5.2.1. Formülasyonlarının hazırlanışı

Formülasyon çalışmalarında Kollidon® SR ve Kitosan olmak üzere iki farklı polimer ile nanopartiküller püskürterek kurutma yöntemi (Muzzarelli vd., 2004; Learoyd vd., 2008; Arpagaus vd., 2018) kullanılarak başarı ile elde edilmiştir. Hazırlanan partiküllerin formülasyon bileşenleri Çizelge 5.3.'de sunulmuştur.

Çizelge 5.3. Hazırlanan polimerik nanopartiküllerin formülasyon bileşenleri

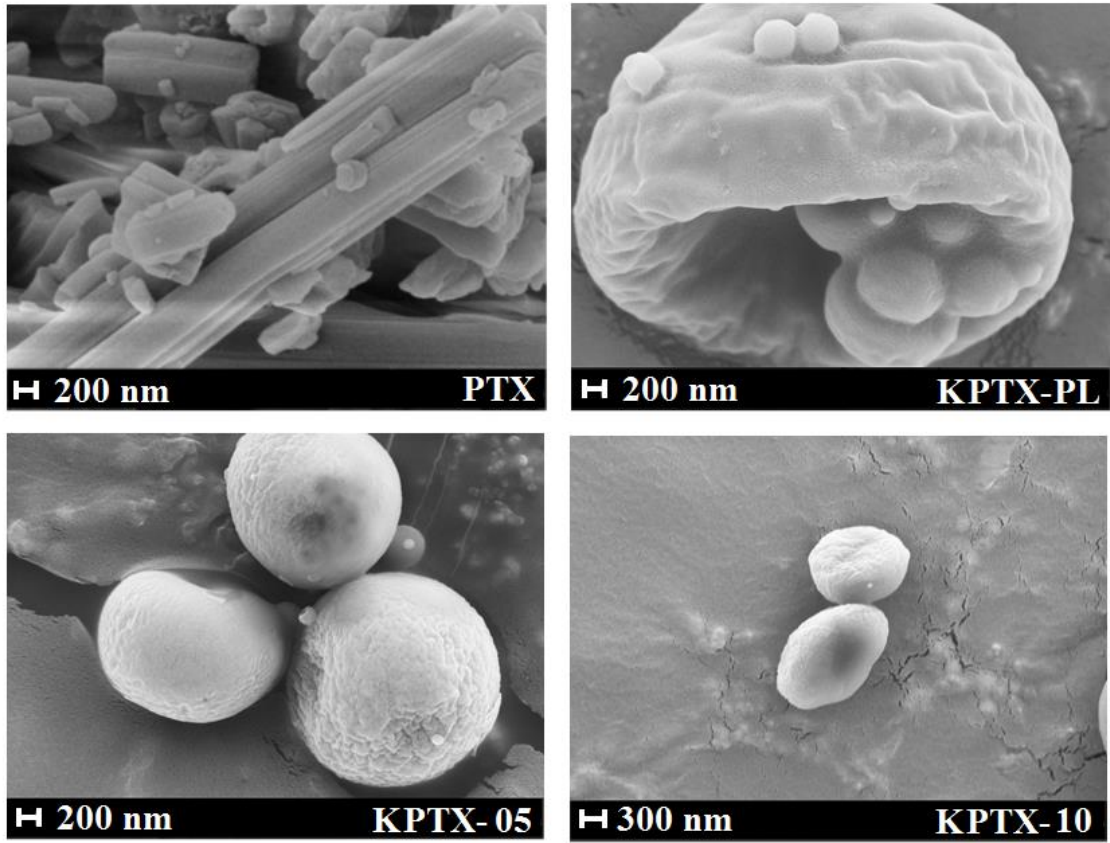
KOD	Kollidon® SR (g)	Kitosan HMW (g)	PTX (%)	AA (%2; mL)	Etanol (mL)	Metanol (mL)
KPTX-PL	2		-		-	150
KPTX-05	2		5		-	150
KPTX-10	2		10		-	150
CCKPTX-PL	2	0,04	-	5	-	150
CCKPTX-05	2	0,04	5	5	-	150
CCKPTX-10	2	0,04	10	5	-	150
CPTX-PL	-	2	-	400	300	200
CPTX-05	-	2	5	400	300	200
CPTX-10	-	2	10	400	300	200

5.2.2. Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyon çalışmaları

5.2.2.1. Parçacık şekli analizleri

Püskürterek kurutma yöntem parametreleri değiştirilerek parçacık büyüklük ve şekillerinde farklılıklar sağlanabilmektedir (Vicente vd., 2013). Bu nedenle belirlenen çalışma şartlarının hazırlanan parçacıkların morfolojik özellikleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacı ile SEM analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.15.).

SEM analizleri sonucunda elde edilen görüntüler değerlendirildiğinde etkin maddenin kristal yapıda olduğu ve hazırlanan nanopartiküllerin düzgün yüzeyli küresel parçacıklar oldukları açıkça görülmektedir. Formülasyonlara ait analizlerde herhangi bir kristal yapının gözlenmemiş olması yüklenmeden kalan etkin maddenin bulunmadığını ortaya koymaktadır (Şekil 5.15.).



Şekil 5.15. Kollidon® SR nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri

5.2.2.2. Parçacık büyüklüğü ve dağılımı analizleri

Nanopartiküllerin parçacık büyüklük ve dağılım ölçümleri, zeta potansiyel analiz cihazı ile analiz edilmiş ve sonuçlar Çizelge 5.4’de sunulmuştur.

Çizelge 5.4. Kollidon® SR nanopartiküllerinin parçacık büyüklüğü (PB), polidisperslik indisi (PdI), zeta potansiyel (ZP) ve pH analiz sonuçları ($n=3$, Ortalama $\pm$ SH)

KOD	PB (nm)	PdI	Zeta (mV)	pH
KPTX-PL	207,5 $\pm$ 3,8	0,50 $\pm$ 0,02	-16,9 $\pm$ 0,8	6,09 $\pm$ 0,19
KPTX-05	240,2 $\pm$ 22,9	0,50 $\pm$ 0,04	-19,5 $\pm$ 1,5	5,69 $\pm$ 0,01
KPTX-10	268,7 $\pm$ 3,9	0,60 $\pm$ 0,03	-20,2 $\pm$ 2,8	5,60 $\pm$ 0,02

Parçacık büyüklüğü ve parçacık büyüklüğü dağılımı analizleri nanopartiküllerin en önemli karakterizasyon çalışmaları arasında yer almaktadır (Ahlin vd., 1998; Dingler vd., 1999; Shekunov vd., 2007).

İlaç taşıyıcı sistemlerin fizikokimyasal ve biyofarmasötik özellikleri ile etkinlik ve güvenlikleri, ilaç üretiminde kritik bir proses parametresi olan parçacık büyüklüğünden önemli ölçüde etkilenmektedir (Shekunov vd., 2007). Bu nedenle çalışmamızda hazırlanan nanopartiküllerin parçacık büyüklükleri ve dağılımları üretimden hemen sonra ve kararlılık çalışmaları süresince analiz edilmiştir.

Elde ettiğimiz analiz sonuçları partiküllerin nanometre boyutunda (~210 - 270 nm) ve homojen parçacık büyüklüğü dağılımına (~0,5 – 0,6) sahip olduklarını ortaya koymuştur (Çizelge 5.4.). Elde edilen veriler, kararlılık çalışmalarında parçacık büyüklüğü ve dağılımındaki değişimlerin ortaya konabilmesi için önem taşımaktadır.

5.2.2.3. Zeta potansiyel analizleri

Nanopartiküllerin zeta potansiyel değerleri, zeta potansiyel analiz cihazı ile belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 5.4.'de sunulmuştur

Süspande haldeki parçacıklarda en sık gözlenen kararlılık problemi parçacıklar arasındaki itme kuvvetinin zayıflaması (ışık ve sıcaklığın etkisi ile) sonucunda agregatların oluşumudur. Ancak parçacıklar yeterli hıza ve kinetik enerjiye sahip olduklarında çarpışmaya devam ederek agregatların oluşumu engellenebilmektedir. Zeta potansiyel değerinin ± 25 mV'dan daha yüksek değerde olması yeterli itme gücünü oluşturarak süspansiyonun kararlı olduğunu göstermektedir (Freitas ve Müller, 1998).

Çalışmamızda ~ -17 - -20mV aralığında değerler alan formülasyonların süspande hallerinin oldukça kararlı oldukları görülmektedir. Anyonik özellikte oldukları belirlenen nanopartiküllerin zeta potansiyel verileri kararlılık çalışmalarında olası değişimlerin ortaya konabilmesi için önem taşımaktadır (Çizelge 5.4.).

5.2.2.4. pH analizleri

Kanser tedavisine yönelik hazırlanan pek çok sistemde kanserli bölgedeki pH değerinin (6,5 – 6,8) normal dokuların pH değerinden (7,2 – 7,4) daha düşük değerde olması nedeni ile etkin madde salımını pH değişimine bağlı olarak gerçekleştiren sistemlerin hazırlanması sıklıkla tercih edilmektedir (Peng vd., 2019). Bu nedenle çalışmamızda hazırlanan sistemlerin pH değerleri analiz edilmiştir (Çizelge 5.4.).

Elde edilen veriler 5,6 – 6,1 aralığında değerler almış ve asidik özellikte oldukları belirlenmiştir. Etki bölgesindeki pH değerlerine yakın değerler almalarına bağlı olarak pH değerlerinde herhangi bir ayarlama yapılmamıştır (Çizelge 5.4.).

Nanopartiküllerin kararlılık çalışmaları süresince pH değişimlerinin (kimyasal kararlılık problemi göstergesi) değerlendirilebilmesinde referans olarak kullanılmıştır.

5.2.2.5. Termal analizler

Formülasyonlarının, hazırlanmalarını takiben gerçekleştirilen DSC analizlerine ait termogramlar Şekil 5.16’da sunulmuştur.

DSC analizleri nanopartiküllere yüklenen etkin maddenin fizikokimyasal durumunu ve olası etkileşimlerini incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. DSC ile camsı geçiş sıcaklığı, kristallenme ve erime gibi faz geçişleri de kolaylıkla belirlenmektedir (Crucho vd., 2017).

Termogramlar değerlendirildiğinde Kollidon® SR ile hazırlanan plasebo formülasyona (KPTX-PL) ait termogram saf Kollidon® SR ile kıyaslanabilir bir termogram oluşturarak formülasyon basamaklarının polimerin amorf yapısı üzerinde herhangi bir etkiye neden olmadığını ortaya koymuştur (Şekil 5.16).

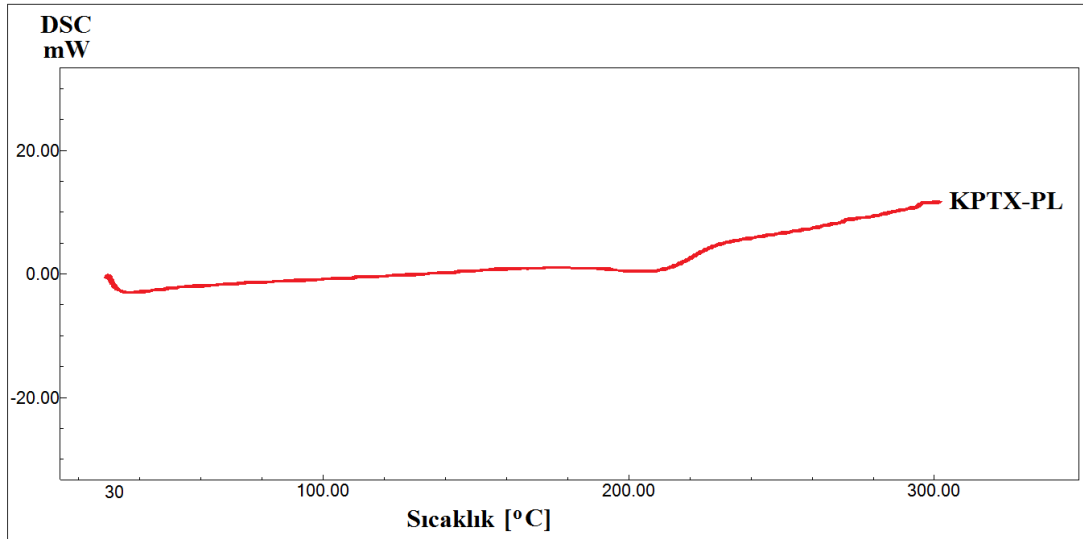
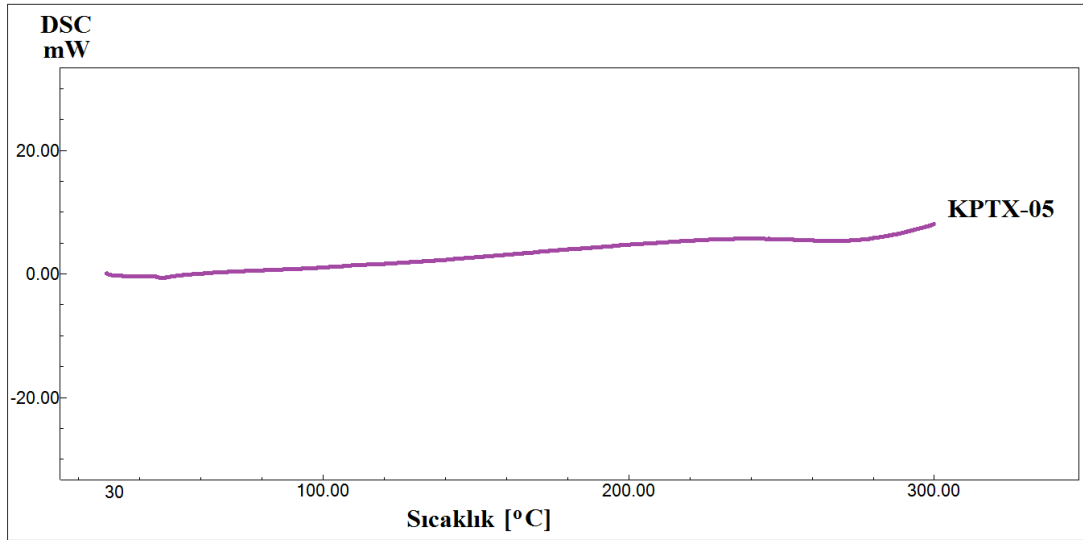
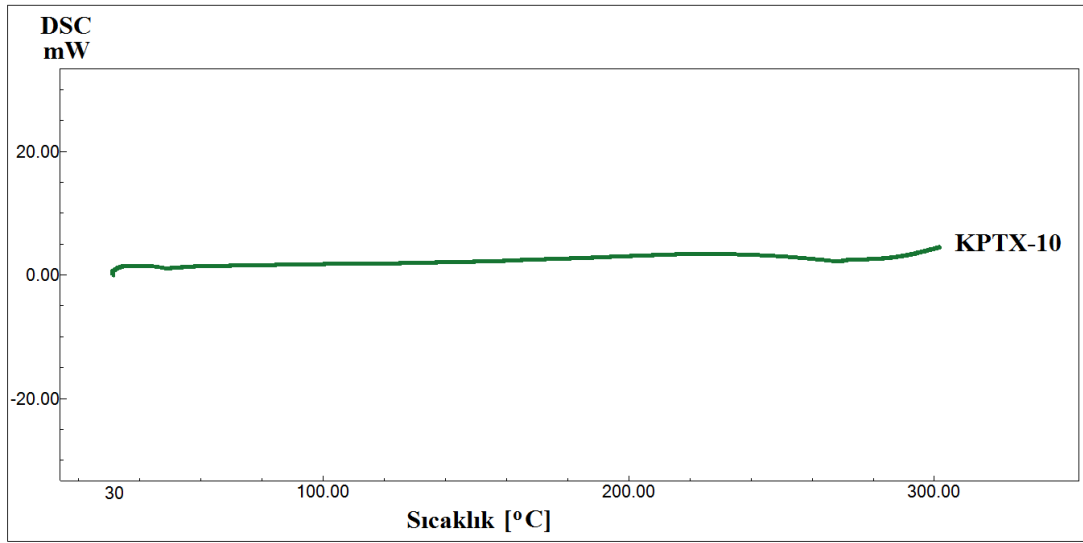
Ayrıca Kollidon® SR ile hazırlanan ve etkin madde içeren KPTX-05 ve KPTX-10 formülasyonların termogramlarında PTX’e ait bir pik tespit edilememiştir. PTX’e ait erime pikinin gözlenmemesi maddenin polimerik yapı içerisinde moleküler halde disperse olduğunu ve bu nedenle kristal yapısına bağlı olarak herhangi bir pik oluşturmadığını göstermektedir (Şekil 5.16) (Başaran, 2017; Escalona-Rayó vd., 2019).

5.2.2.6. X-ışını kırınım analizleri

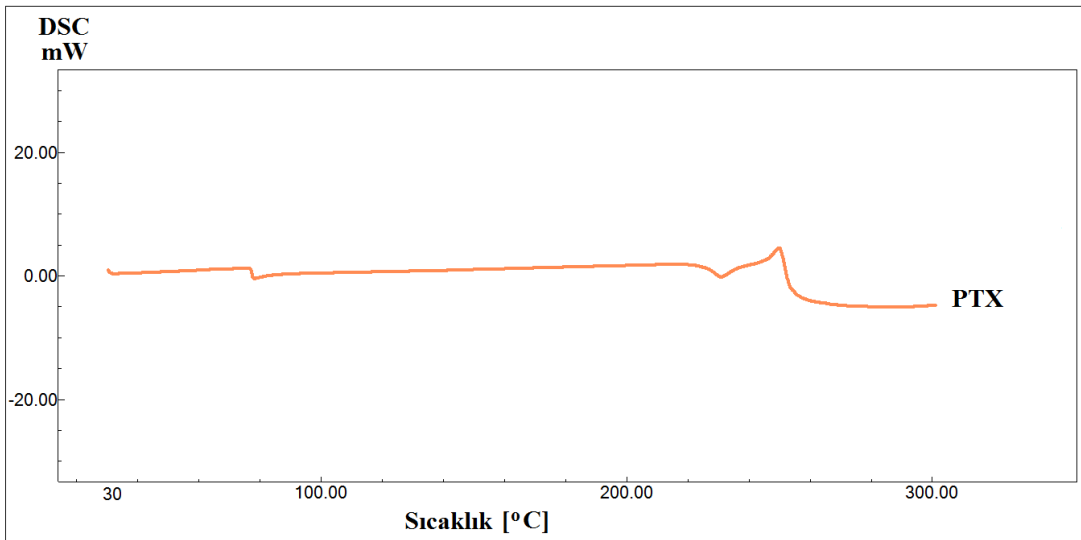
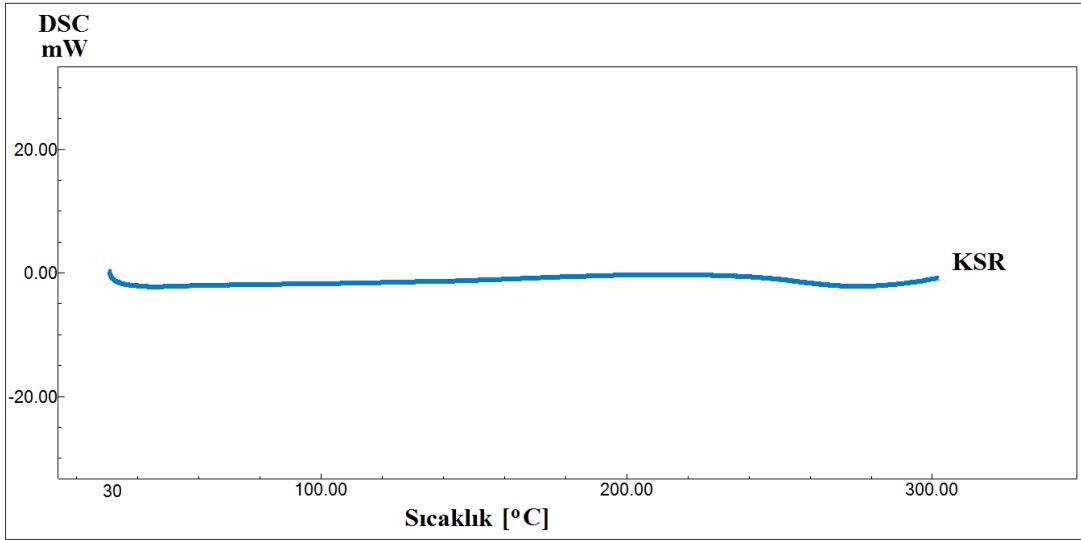
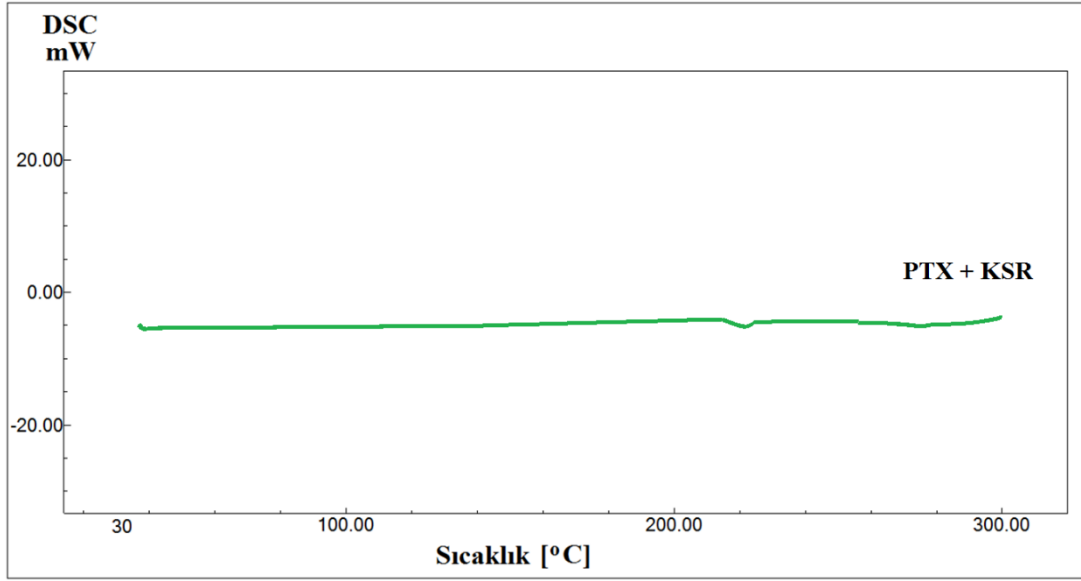
Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin XRD Spektrumları Şekil 5.17’de sunulmuştur.

XRD, nanomalzemelerin (1-100 nm aralığında en az bir boyutta yapısal özelliklere sahip malzemeler) incelenmesi için güçlü bir yöntem olarak tanımlanmaktadır. Katı haldeki malzemelerin kristal veya amorf yapıda olmaları XRD analizleri ile kolaylıkla belirlenebilmektedir (Sharma vd., 2012).

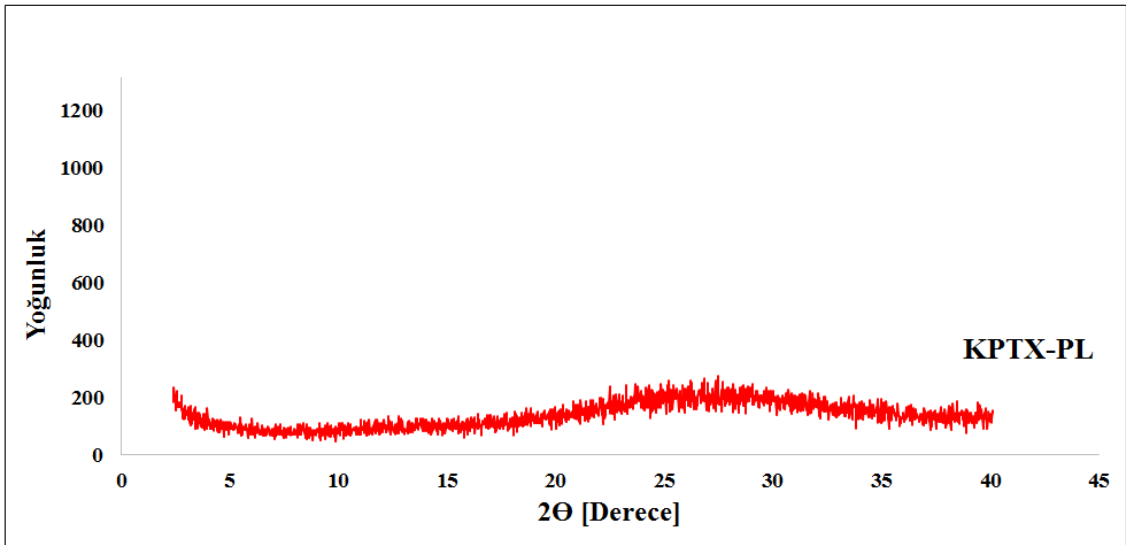
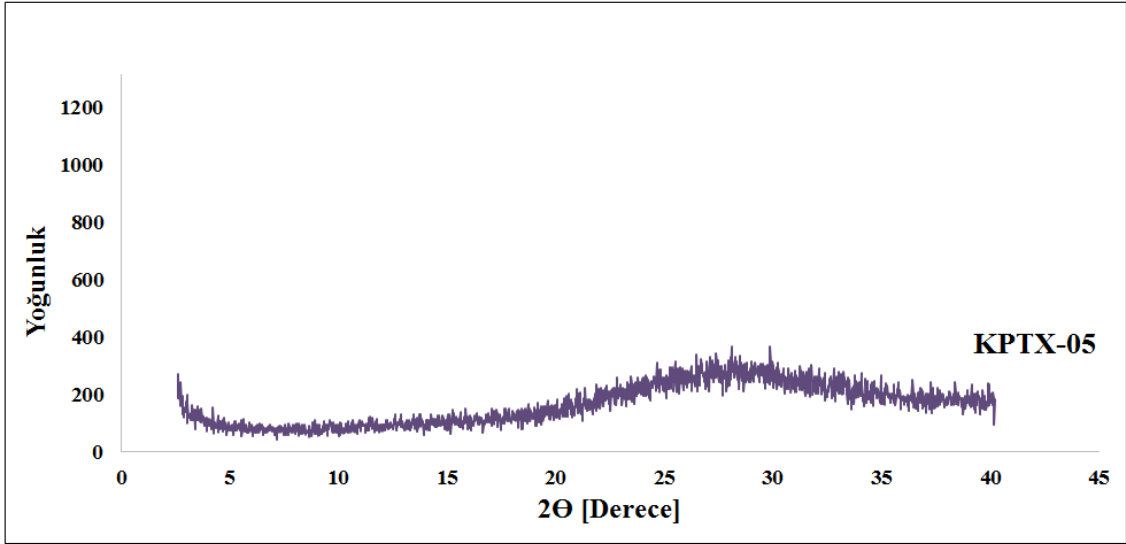
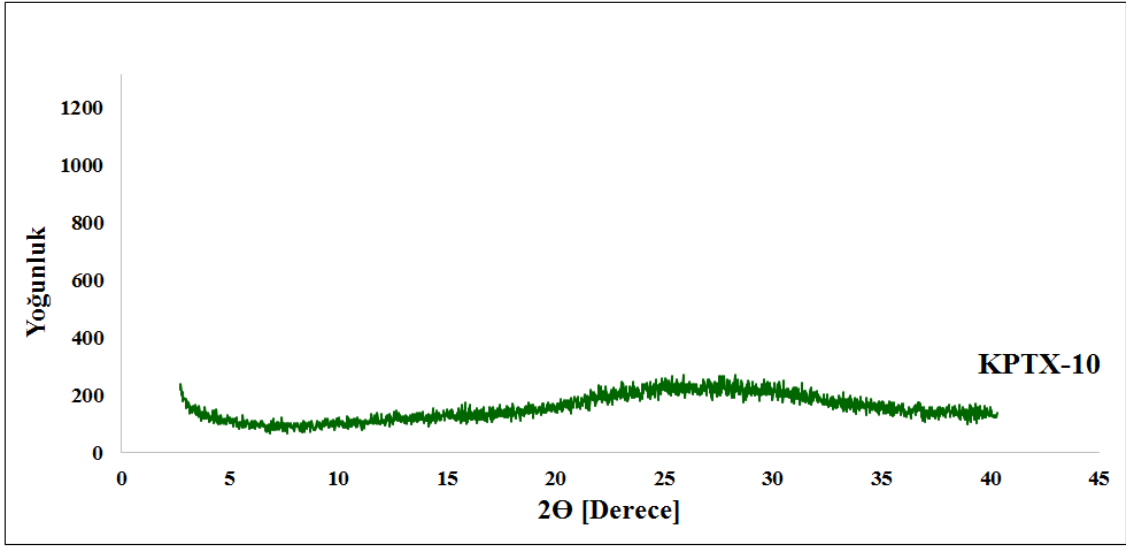
Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan polimerlerin amorf yapıda olmaları daha yüksek konsantrasyonda etkin madde yüklenmesine imkan sağlamaktadır. Ayrıca amorf yapı çözünürlük problemi olan etkin maddelerin çözünürlüklerinin artırılmasında önemli bir yapısal özellik olarak karşımıza çıkmaktadır (Jog ve Burgess, 2017).



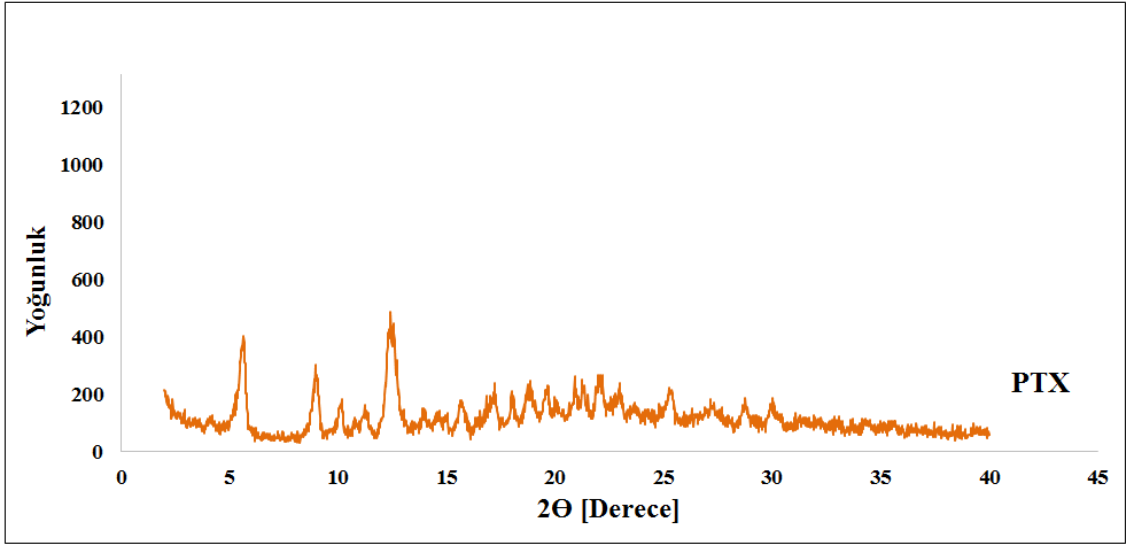
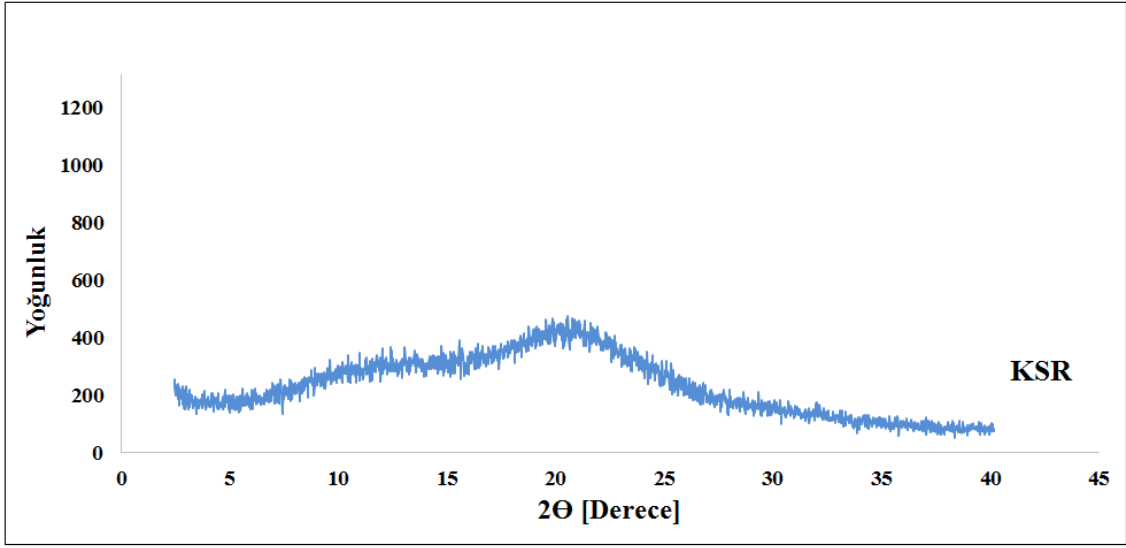
Şekil 5.16. Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin ve kullanılan saf maddelerin termal analizlerine ait termogramlar



Şekil 5.16. (Devam) Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin ve kullanılan saf maddelerin termal analizlerine ait termogramlar



Şekil 5.17. Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin ve kullanılan saf maddelerin x-ışını kırınım analiz difraktogramları



Şekil 5.17. (Devam) Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin ve kullanılan saf maddelerin x-ışını kırınım analiz difraktogramları

Elde edilen XRD analizleri değerlendirildiğinde formülasyonlara PTX yüklenmesinin polimerin amorf yapısı üzerinde herhangi bir etki oluşturmadığı ve KPTX-05 ve KPTX-10 formülasyonlarının da amorf yapıda oldukları belirlenmiştir (Şekil 5.17.).

Formülasyonların hazırlanmasını takiben gerçekleştirilen analiz verileri başlangıç verileri olarak kararlılık çalışmalarında referans olarak kullanılacaktır.

5.2.2.7. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi

FT-IR analizleri formülasyon bileşenleri arasında gerçekleşen olası etkileşimlerin ortaya konmasında sıklıkla kullanılan önemli bir analizdir (Das vd., 2015).

Hazırlanan nanopartiküllerin FT-IR analizleri 400-4000 cm^{-1} aralığında gerçekleştirilmiş ve fonksiyonel gruplara ait sinyaller belirlenerek, kararlılık çalışmalarında referans olarak kullanılmıştır (Şekil 5.18.).

KPTX-05 ve KPTX-10 formülasyonlara ait spektrumlarda 1750 cm^{-1} de C-H gerilme, 1250 cm^{-1} de C-O gerilme, 1000 cm^{-1} de C-N⁺ gerilme sinyalleri elde edilmiş ve sinyaller placebo formülasyon ve saf polimer ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ancak analizlerde PTX spektrumunda belirlenen karakteristik sinyaller (oklar ile işaretli) formülasyonlarının spektrumlarında belirlenememiştir. PTX'e ait sinyallerin formülasyonların spektrumlarında görülmemesi etkin maddenin polimerik yapı içinde dağılmış halde bulunduğunu ve PTX ile polimer arasında herhangi bir kimyasal etkileşimin olmadığını göstermektedir (Şekil 5.18.) (Mori vd., 2017).

Formülasyon spektrumlarının saf polimer ile benzer sinyal oluşturması formülasyon basamaklarının polimerik yapı üzerinde kaydadeğer bir etki oluşturmadığını göstermektedir (Şekil 5.18.).

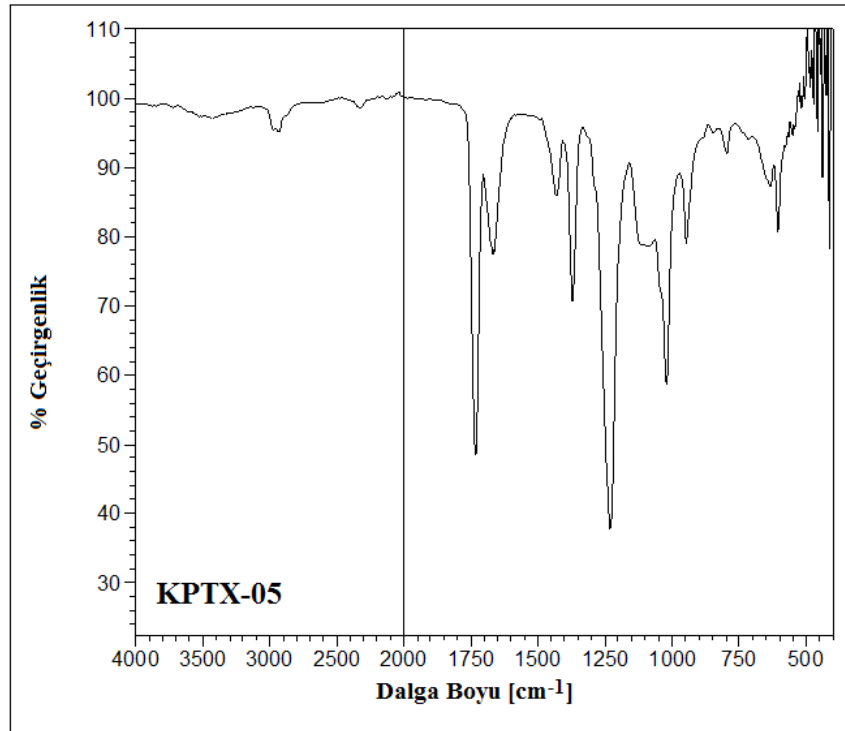
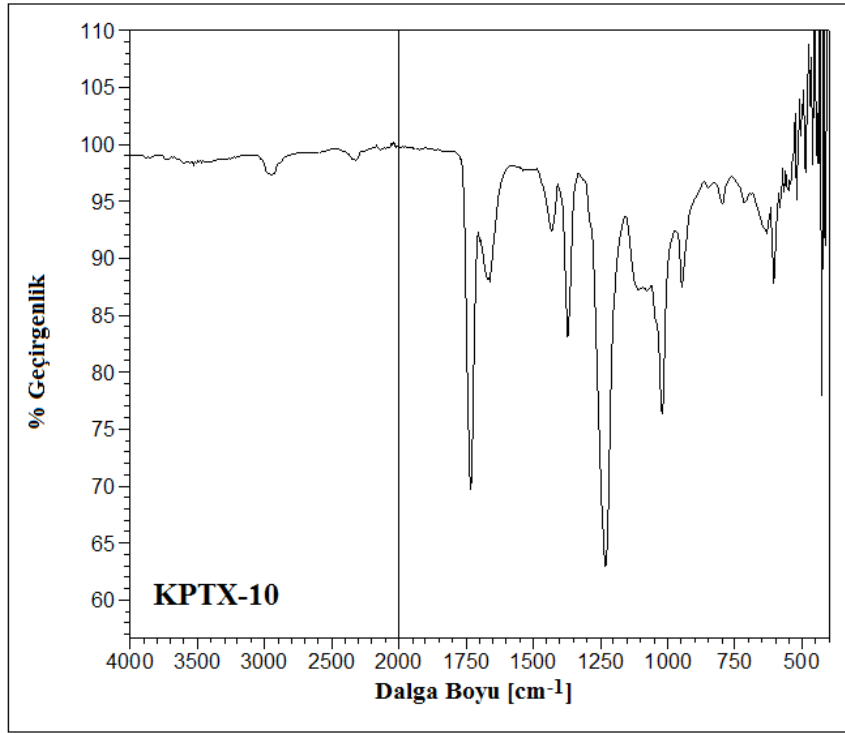
Elde edilen veriler DSC ve XRD analizleri ile de uyumlu olarak etkin madde ile polimerin fiziksel özelliklerini koruyarak herhangi bir kimyasal bağ oluşturmada birlikte bir ilaç taşıyıcı sistem oluşturduklarını ortaya koymaktadır (Şekil 5.18.).

5.2.2.8. Nükleer manyetik rezonans analizleri

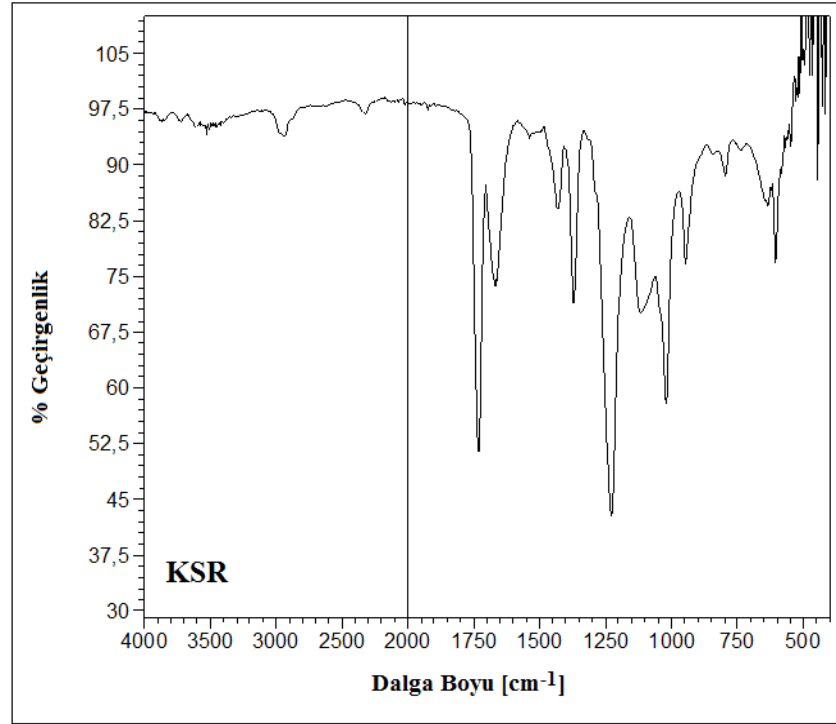
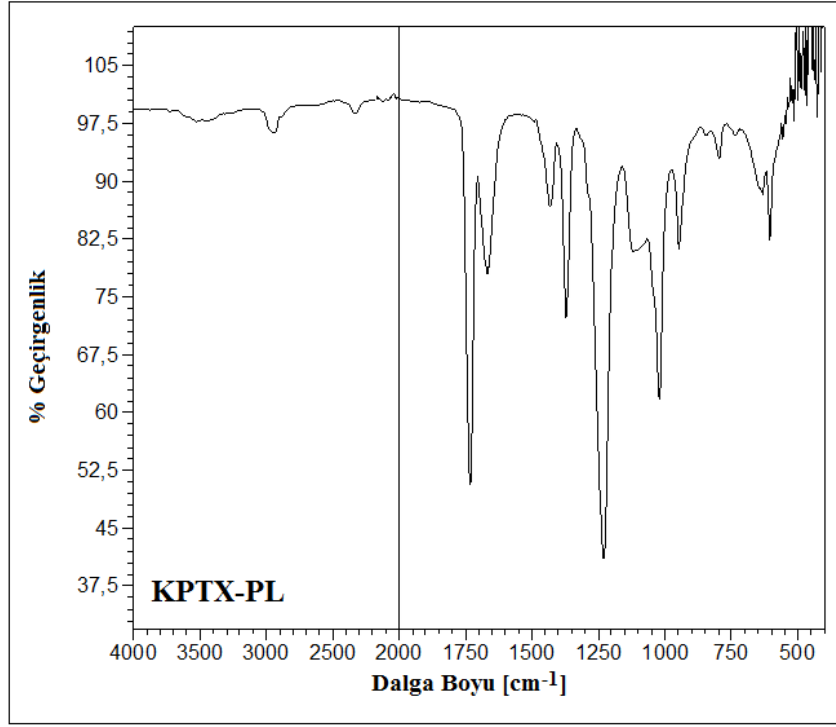
Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin ¹H-NMR analizlerine ait spektrumlar Şekil 5.19'da sunulmuştur.

NMR analizleri, bileşenlerin kimyasal yapılarını ve moleküler hareketliliğini aynı anda yansıtabilen ve nanopartiküllerin yapısal özelliklerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Mourdikoudis vd., 2018). Nanopartiküllere yüklenen etkin maddelerin NMR sinyallerinde oluşturdukları artış ve azalış yönündeki kayma miktarları değerlendirilerek oluşan yapı hakkında bilgi sahibi olunur (Mourdikoudis vd., 2018; Ha vd., 2019).

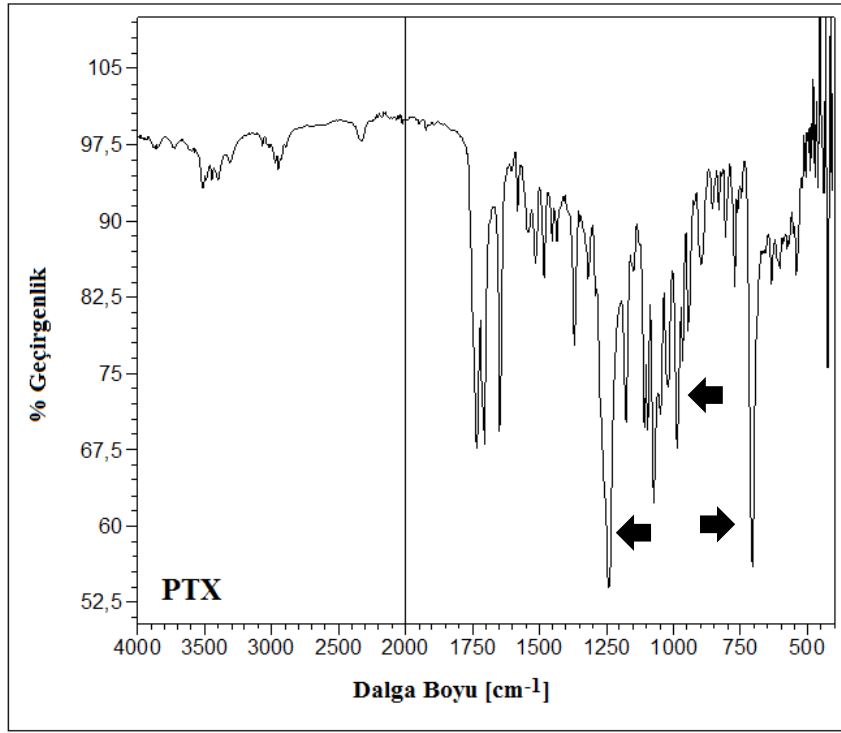
Gerçekleştirilen analizler sonucunda PTX'e ait sinyaller formülasyonlara ait spektrumlarda belirlenebilmiş (oklar ile işaretlenmiş) ve bu sayede etkin madde ile polimer arasında kimyasal bir etkileşim gözlenmeden PTX'in nanopartiküllere başarı ile yüklendiği belirlenmiştir (Şekil 5.19.).



Şekil 5.18. Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin ve kullanılan saf maddelerin Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analiz spektrumları



Şekil 5.18. (Devam) Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin ve kullanılan saf maddelerin Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analiz spektrumları



Şekil 5.18. (Devam) Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin ve kullanılan saf maddelerin Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analiz spektrumları

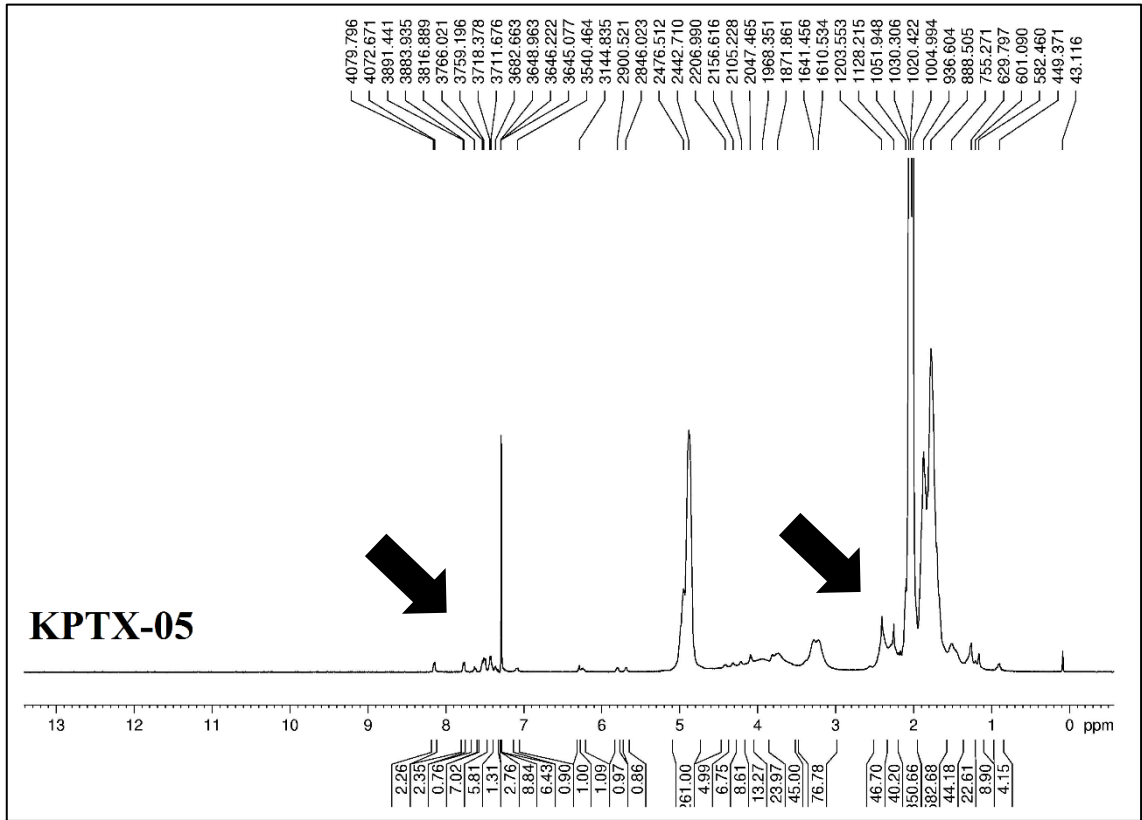
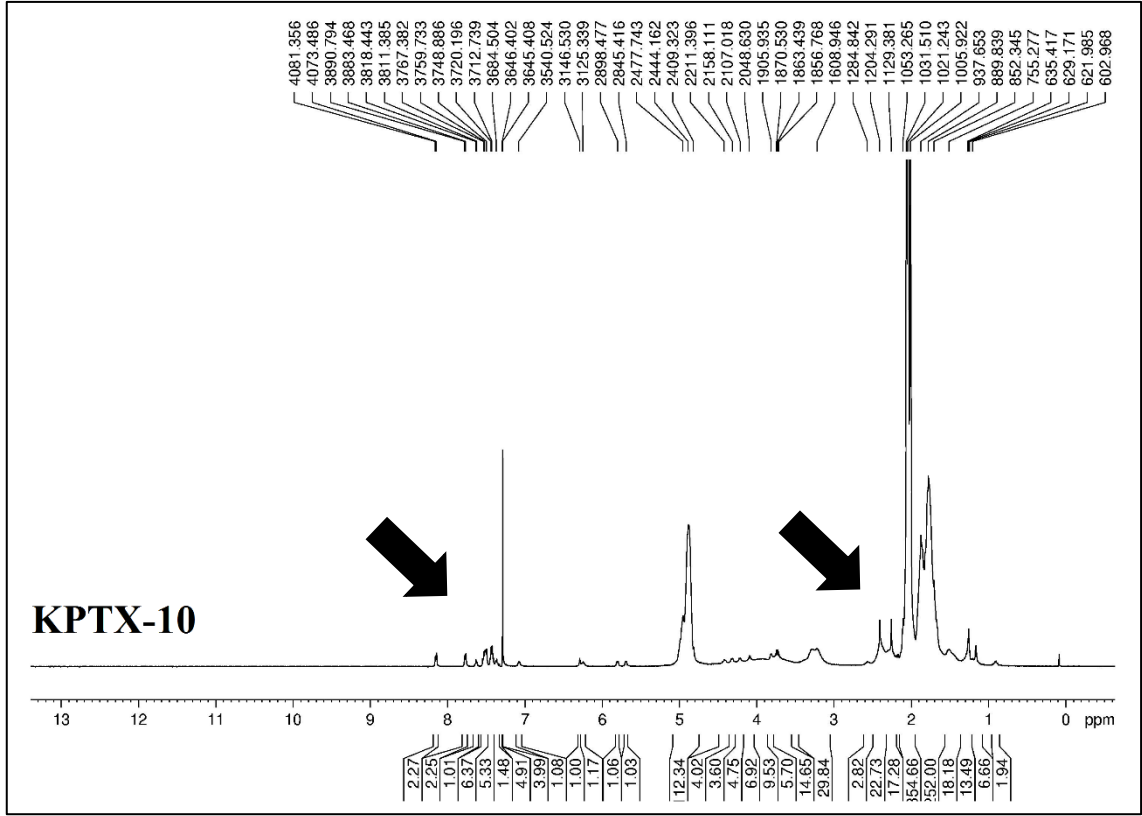
5.2.2.9. Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin etkin madde miktar tayini

Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllere yüklenen ve hapsedilen PTX miktarı Çizelge 4.1.'de belirtilen analiz şartlarında, HPLC yöntemi ile belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 5.5.'de sunulmuştur.

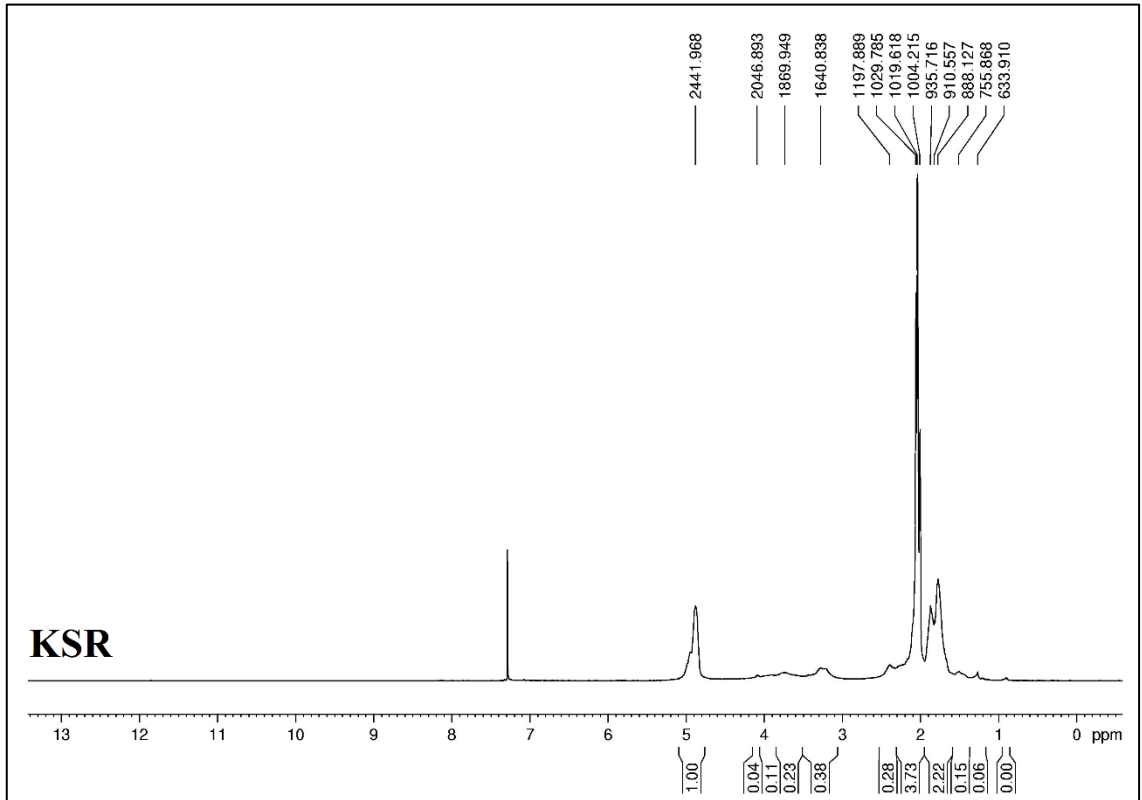
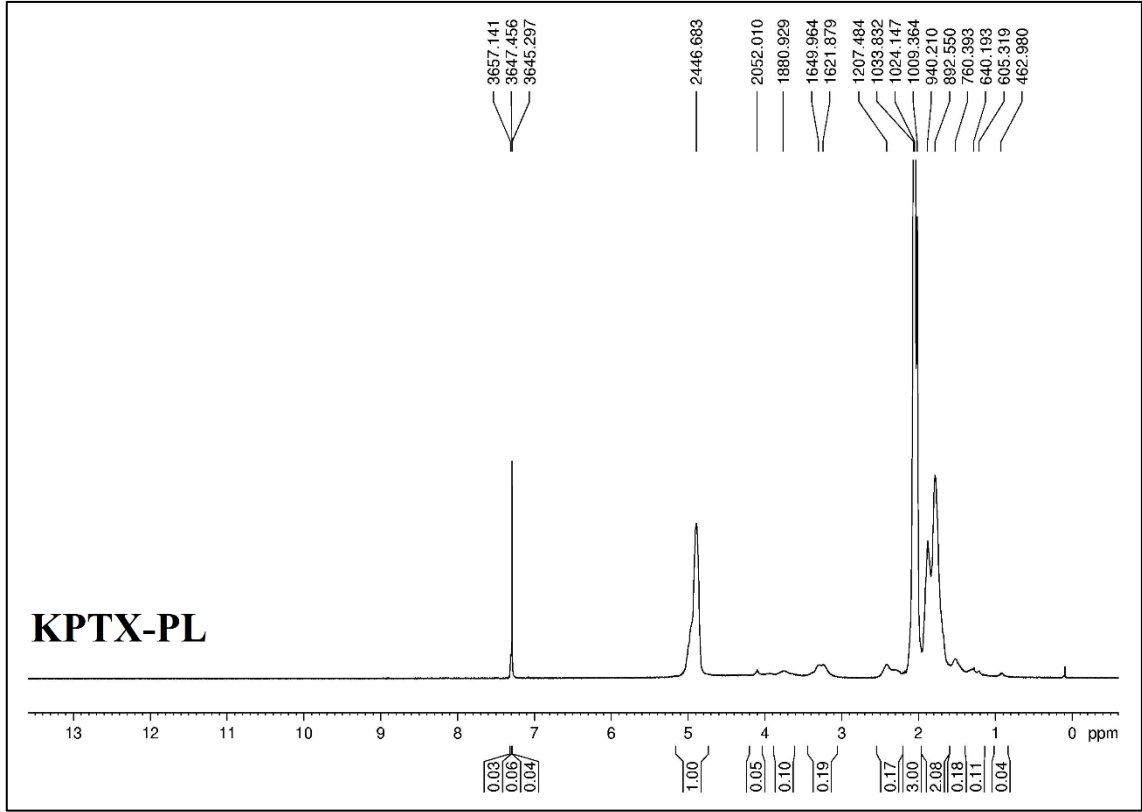
Etkin maddelerin büyük bir oranı nanopartiküllerin yükleme kapasitelerine bağlı olarak yüzeyde yerleşmiştir. Kanser tedavisi amacı ile hazırlanan bu sistemlerde yüzeydeki etkin maddeler ilk etkiyi oluşturacak ve hapsedilen etkin madde ile de uzun süreli etkin madde salımı gerçekleşecektir. Etkin bir tedavinin sağlanabilmesi için hapsedilen etkin madde miktarının mümkün olduğunca artırılması gerekmektedir (Chen vd., 2018).

Çizelge 5.5. Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllere yüklenen ve hapsedilen Paklitaksel miktarları (n=3, Ortalama±SH)

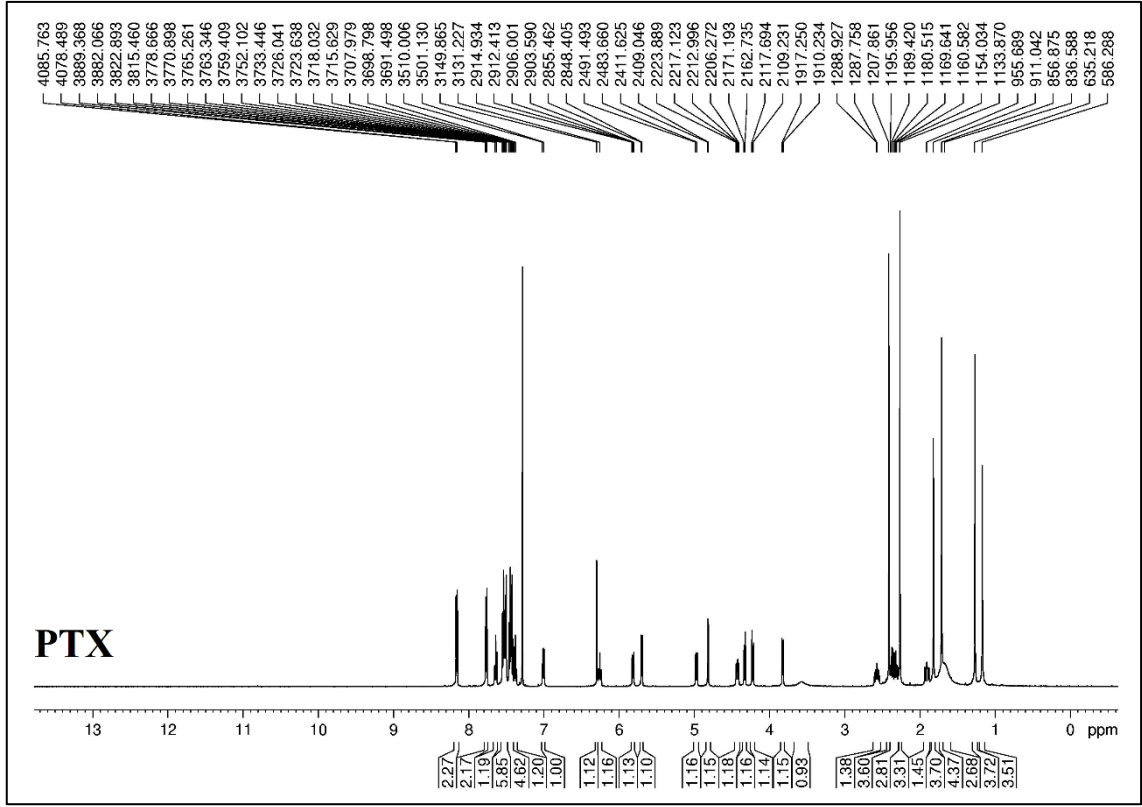
KOD	Toplam PTX (mg)	Yüzeyde Bulunan PTX (%)	Hapsedilen PTX (%)
KPTX-PL	-	-	-
KPTX-05	5,06±0,19	84,54±2,44	15,46±2,44
KPTX-10	9,63±0,25	75,84±2,69	24,16±2,69



Şekil 5.19. Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin ve kullanılan saf maddelerin nükleer manyetik rezonans analiz spektrumları



Şekil 5.19. (Devam) Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin ve kullanılan saf maddelerin nükleer manyetik rezonans analiz spektrumları

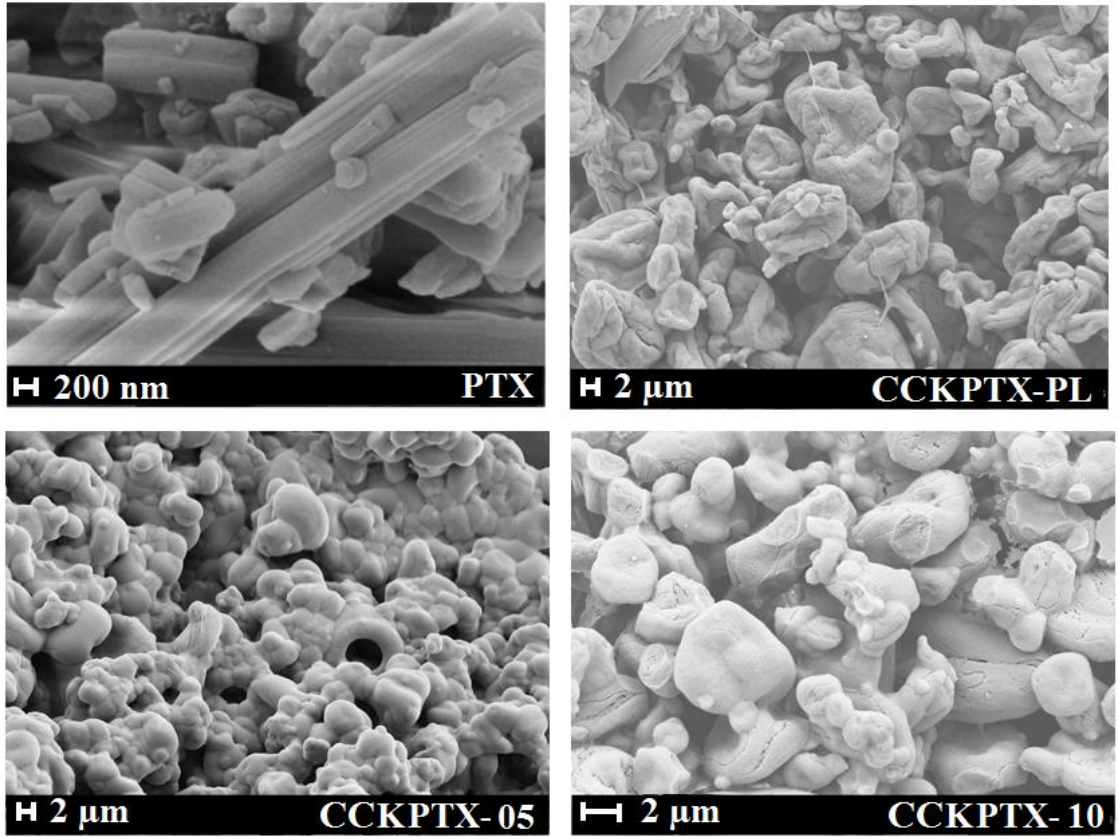


Şekil 5.19. (Devam) Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin ve kullanılan saf maddelerin nükleer manyetik rezonans analiz spektrumları

5.2.3. Kitosan ile kaplanmış Kollidon® SR nanopartiküllerine ait çalışmalar

5.2.3.1. Parçacık şekli analizleri

Kitosan ile kaplanarak hazırlanan nanopartiküllere ait SEM görüntüleri Şekil 5.20’de sunulmuştur.



Şekil 5.20. Kitosan ile kaplanmış Kollidon® SR nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskobu analiz sonuçları

SEM analiz sonuçları partiküllerin kaplama sonrasında yüzeylerinin daha düzgün olduğunu ancak kaplama sırasında agregatların oluştuğu göstermektedir. Bu nedenle parçacık büyüklüğü ve zeta potansiyel analizleri için analiz numuneleri agregatların ayrılması için 5 dakika süre ile ultrasonik banyoda tutulmasının ardından analiz edilmiştir.

5.2.3.2. Parçacık büyüklüğü ve dağılımı analizleri

Kitosan ile kaplanarak hazırlanan nanopartiküllerin parçacık büyüklük ölçümleri, zeta potansiyel analiz cihazı ile analiz edilmiş ve sonuçlar Çizelge 5.6.'da sunulmuştur.

SEM analiz sonuçları agregatların oluşumunu açıkça göstermiştir (Şekil 5.20.). Bu nedenle parçacık büyüklüğü ve zeta potansiyel analizleri için hazırlanan numuneler ultrasonik banyoda beş dakika süre ile tutulmuş ve agregatların ayrılmasının sağlanmasının ardından analizler gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları

değerlendirildiğinde beklendiği gibi parçacık büyüklüğünde bir miktar artış gözlenmiştir ($p > 0,05$) (Çizelge 5.6.).

Çizelge 5.6. *Kitosan ile kaplanmış Kollidon® SR nanopartikül formülasyonlarının parçacık büyüklüğü (PB), polidisperslik indisi (PdI), zeta potansiyel (ZP) ve pH analiz bulguları (n=3, Ortalama±SH)*

KOD	PB (nm)	PdI	Zeta (mV)	pH
CCKPTX-PL	225,0±6,1	0,50±0,06	+31,0±1,4	5,61±0,03
CCKPTX-05	267,0±12,4	0,50±0,06	+30,9±1,9	5,39±0,04
CCKPTX-10	354,2±2,62	0,60±0,03	+25,4±1,4	5,44±0,05

5.2.3.3. Zeta potansiyel analizleri

Kollidon® SR nanopartiküllerinin kitosan ile kaplama sonucunda anyonik özelliğe sahip zeta potansiyel değerleri oldukça yüksek katyonik özellik göstererek +25-31 mV aralığında değerler almışlardır (Çizelge 5.6.).

Zeta potansiyel hücrenin biyolojik aktivasyonunu, hücre aglütinasyonunu ve hücre tutunmasındaki etkin rolü nedeni ile hücresel etkileşimde en önemli parametreler arasında değerlendirilmektedir. Özellikle kanser tedavisinde kanserli hücreler ile etkileşimin artırılarak etkin maddenin kanserli bölgede daha uzun süre salınmasının sağlanması tedavi açısından oldukça önem taşımaktadır. Hücrelerin yüzeylerinin anyonik özellikte olması katyonik özellikte olan ilaç taşıyıcı sistemlerin hücre yüzeyi ile elektrostatik etkileşimler nedeni ile daha uzun süre temasta bulunmasını ve bu sayede etkinliklerinin kaydadeğer bir şekilde artırılmasını sağlamaktadır (Zhang vd., 2008).

Kollidon® SR nanopartiküllerinin katyonik özellik kazanmaları ile etkinliklerinin artırılması mümkün olabilecektir.

5.2.3.4. pH analizleri

Çözücü olarak kullanılan asetik asit varlığı nedeni ile nanopartiküllerin pH değerleri 5,39-5,61 arasında değerler almıştır (Çizelge 5.6.).

Kanserli dokuların pH değerinin (~6,5) sağlıklı dokulara kıyasla daha düşük değerler alması dikkate alınarak 5,39-5,61 aralığında değerler alan nanopartiküllerin pH değerleri fizyolojik pH aralığına ayarlanmamıştır (Peng vd., 2019).

5.2.3.5. Termal analizler

Kitosan ile kaplanarak hazırlanan nanopartiküllerin DSC analizlerine ait termogramlar Şekil 5.21.'de sunulmuştur.

Amorf yapıya sahip Kollidon® SR (Şekil 5.7.) ile hazırlanan nanopartiküllerin yine amorf yapıya sahip kitosan (Şekil 5.11.) ile kaplama sonucunda yapısal herhangi bir değişim gözlenmeyerek partiküllerin amorf yapıda oldukları, termogramlarda herhangi bir sinyalin alınmaması sonucunda belirlenmiştir (Şekil 5.21.).

5.2.3.6. X-ışını kırınım analizleri

Kitosan ile kaplanarak hazırlanan nanopartiküllerin XRD analizlerine ait spektrumlar Şekil 5.22.'de sunulmuştur.

Gerçekleştirilen ön formülasyon çalışmalarında Kollidon® SR nin ve kitosanın elde edilen DSC (sırası ile Şekil 5.7. ve Şekil 5.11.) ve XRD (sırası ile Şekil 5.8. ve Şekil 5.12.) verileri amorf yapıda olduklarını açıkça göstermiştir. Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin kitosan ile kaplanması ile elde edilen CCKPTX-05 ve CCKPTX-10 formülasyonlarının da amorf yapıda oldukları görülmektedir (Şekil 5.22.).

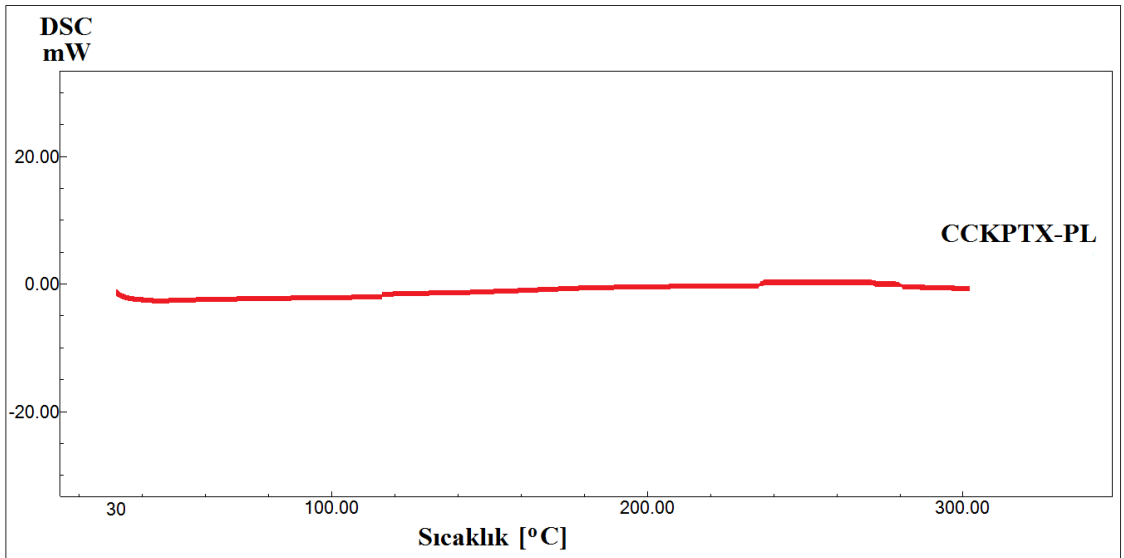
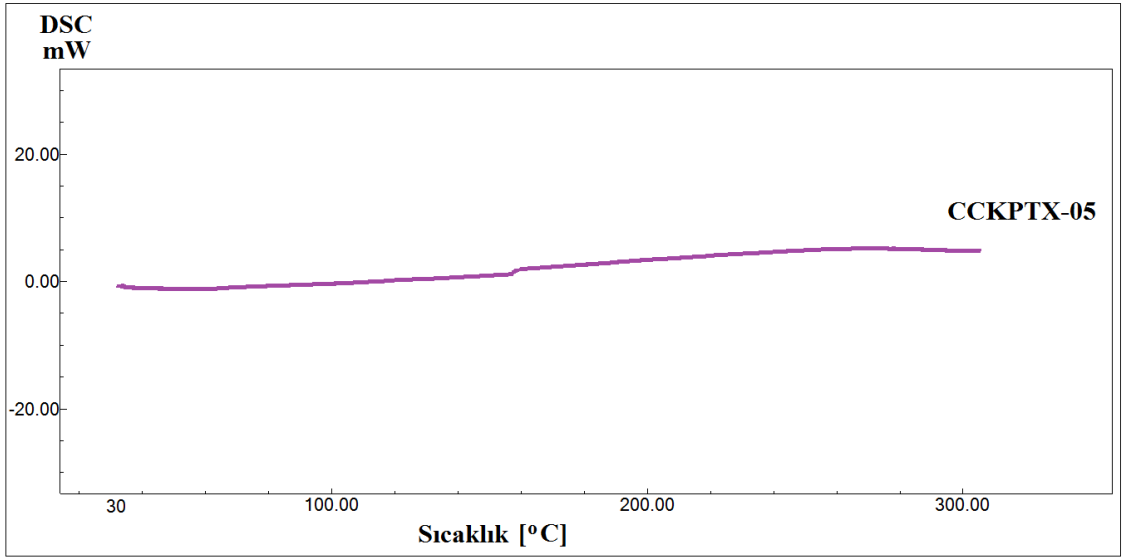
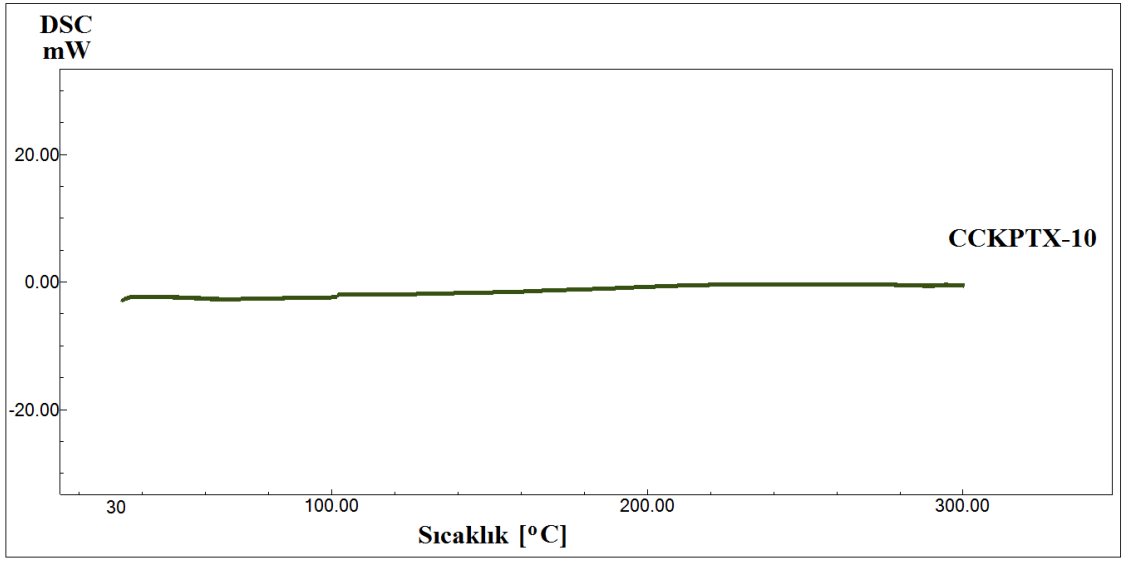
Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin kitosan ile kaplanmasının başlıca nedeni anyonik özellikte olan partiküllere kanser hücreleri ile temas süresini arttırmak amacı ile katyonik özellik kazandırmaktır. XRD analizleri sonuçları değerlendirildiğinde nanopartiküllerin amorf yapısı üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadan bu etkinin sağlandığı görülmektedir (Şekil 5.22.).

5.2.3.7. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizleri

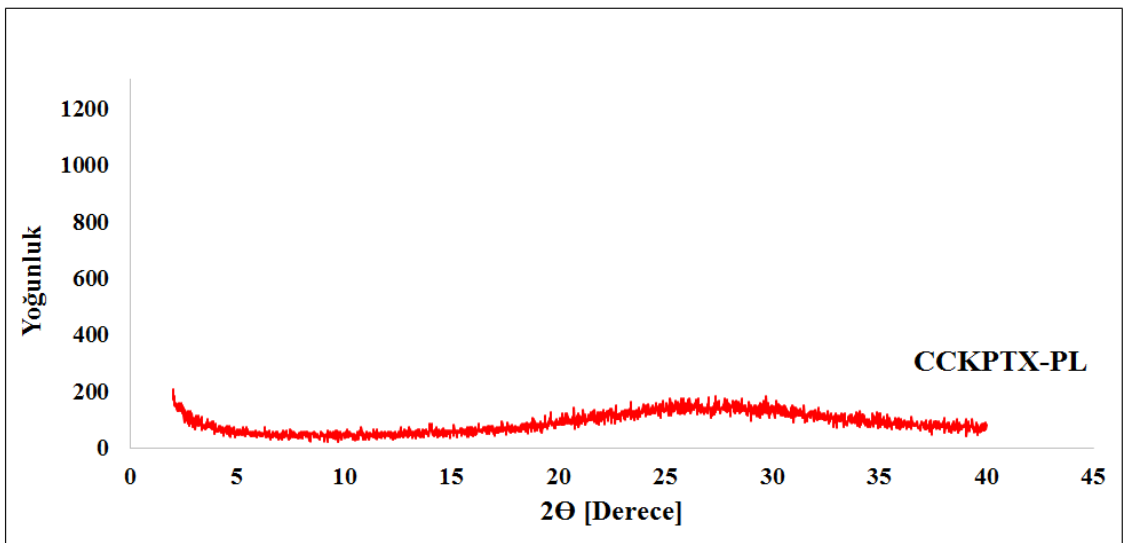
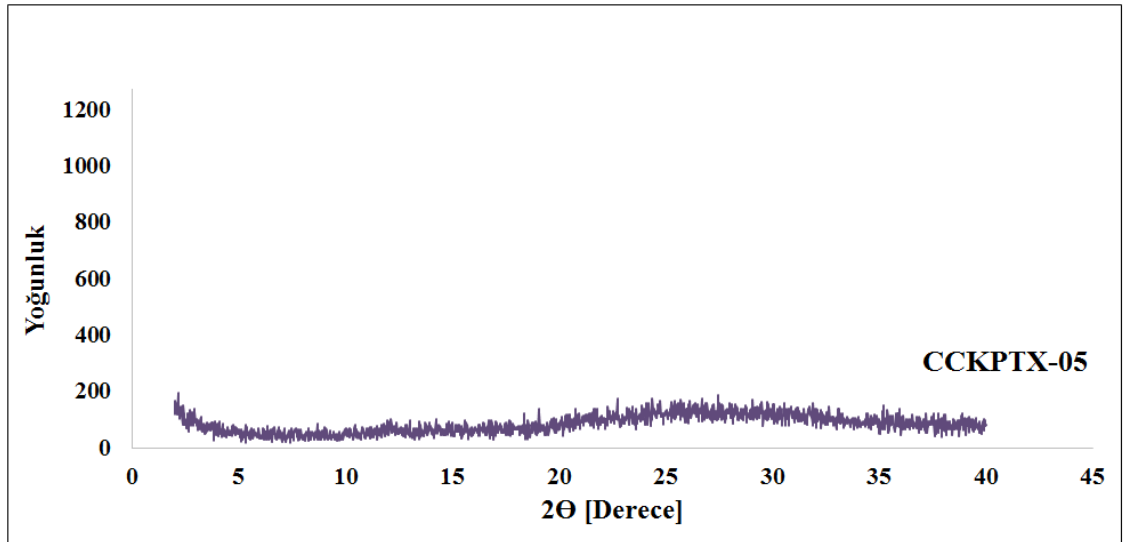
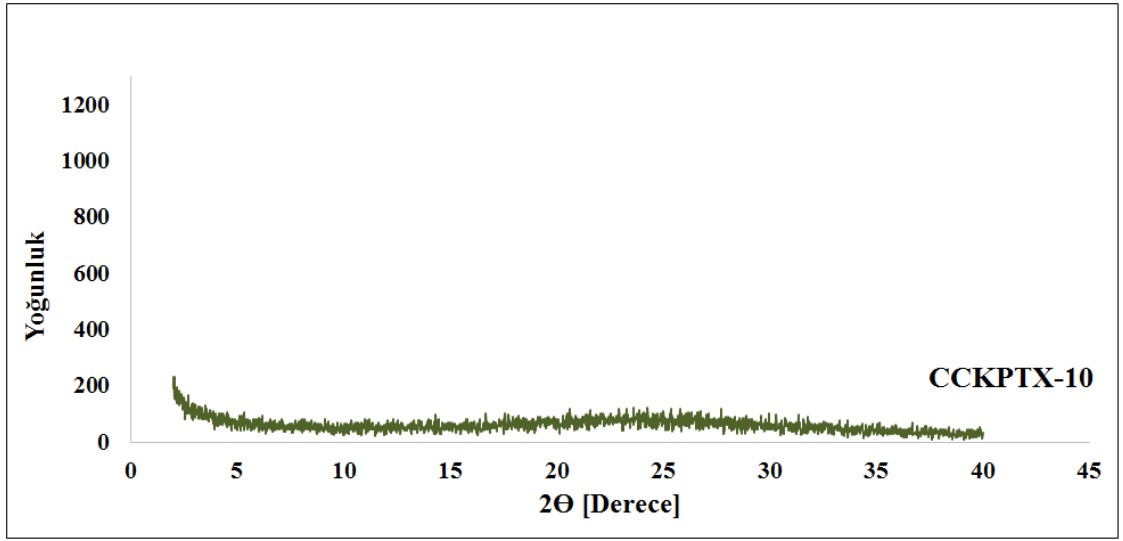
Kitosan ile kaplanarak hazırlanan nanopartiküllerin FT-IR analizlerine ait spektrumlar Şekil 5.23.'de sunulmuştur.

FT-IR analizleri değerlendirildiğinde plasebo formülasyon ile benzer sinyaller alınmış ve KPTX-05 ve KPTX-10 formüllerinin FT-IR analiz sonuçları ile CCKPTX-05 ve CCKPTX-10 formülasyonları karşılıklı olarak değerlendirildiğinde KPTX-05 ve KPTX-10 formülasyonlara ait spektrumlarda belirlenmiş olan 1750 cm^{-1} de C-H gerilme, 1250 cm^{-1} de C-O gerilme, 1000 cm^{-1} de C-N⁺ gerilme sinyallerinde herhangi bir kayıp olmamış yalnızca kaplamaya bağlı olarak şiddetlerinde değişikliğe neden olmuştur.

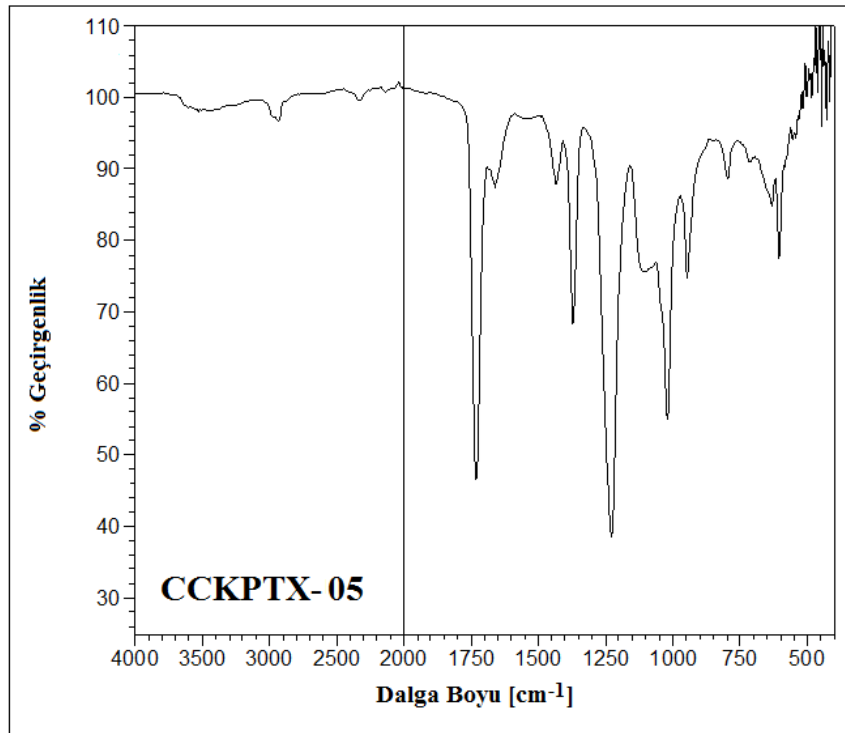
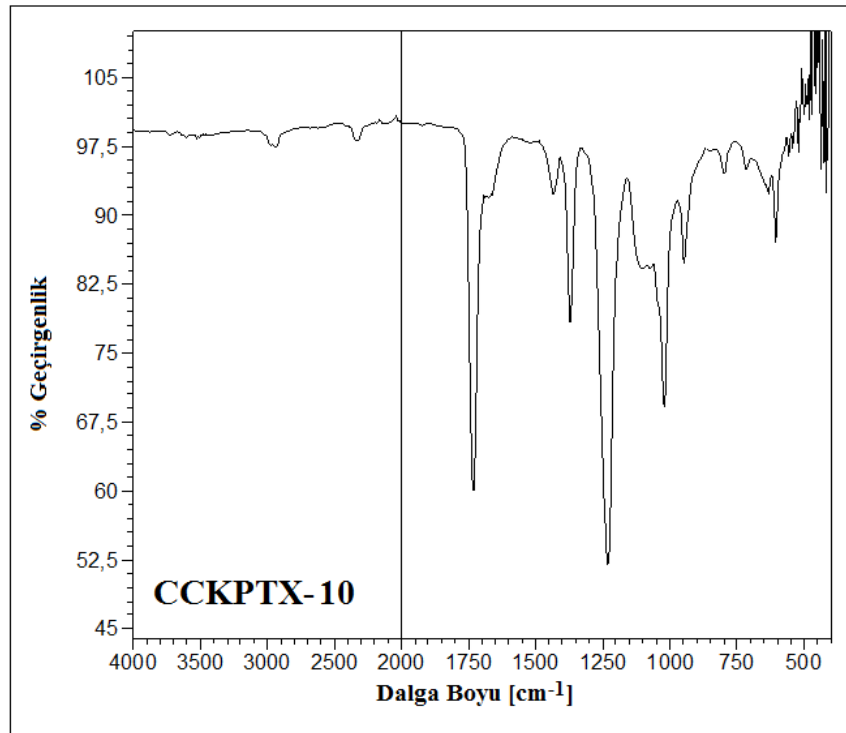
Kitosan ile kaplamanın başarı ile gerçekleştiği sinyallerin farklılaşmasına bağlı olarak açıkça görülmektedir (Şekil 5.18. ve Şekil 5.23.).



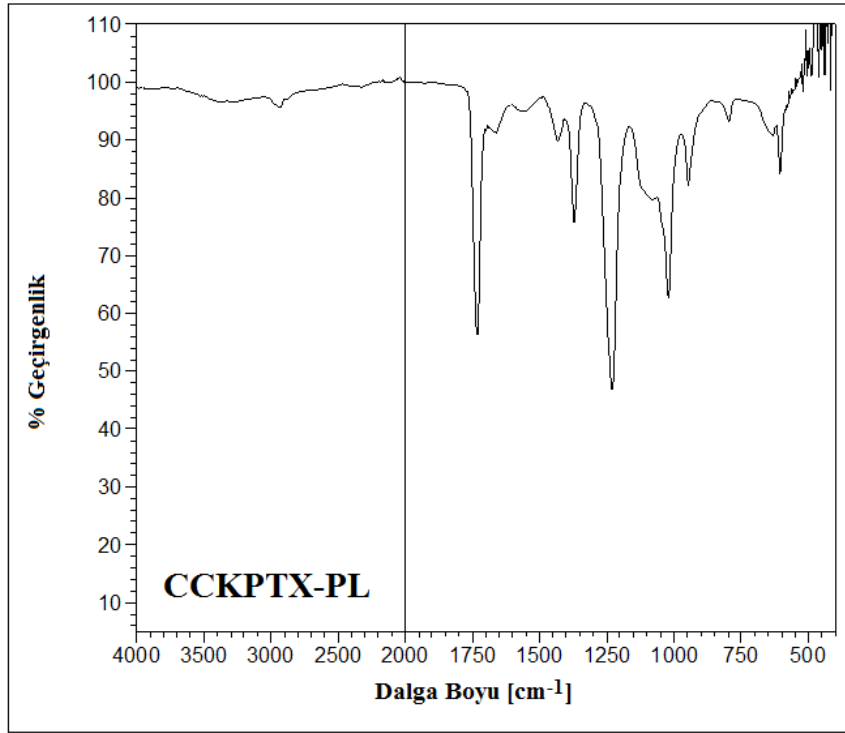
Şekil 5.21. Kitosan ile kaplanmış Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin termal analizlerine ait termogramlar



Şekil 5.22. Kitosan ile kaplanmış Kollidon® SR nanopartiküllerinin X-ışını kırınım analiz difraktogramları



Şekil 5.23. Kitosan ile kaplanmış Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analiz spektrumları

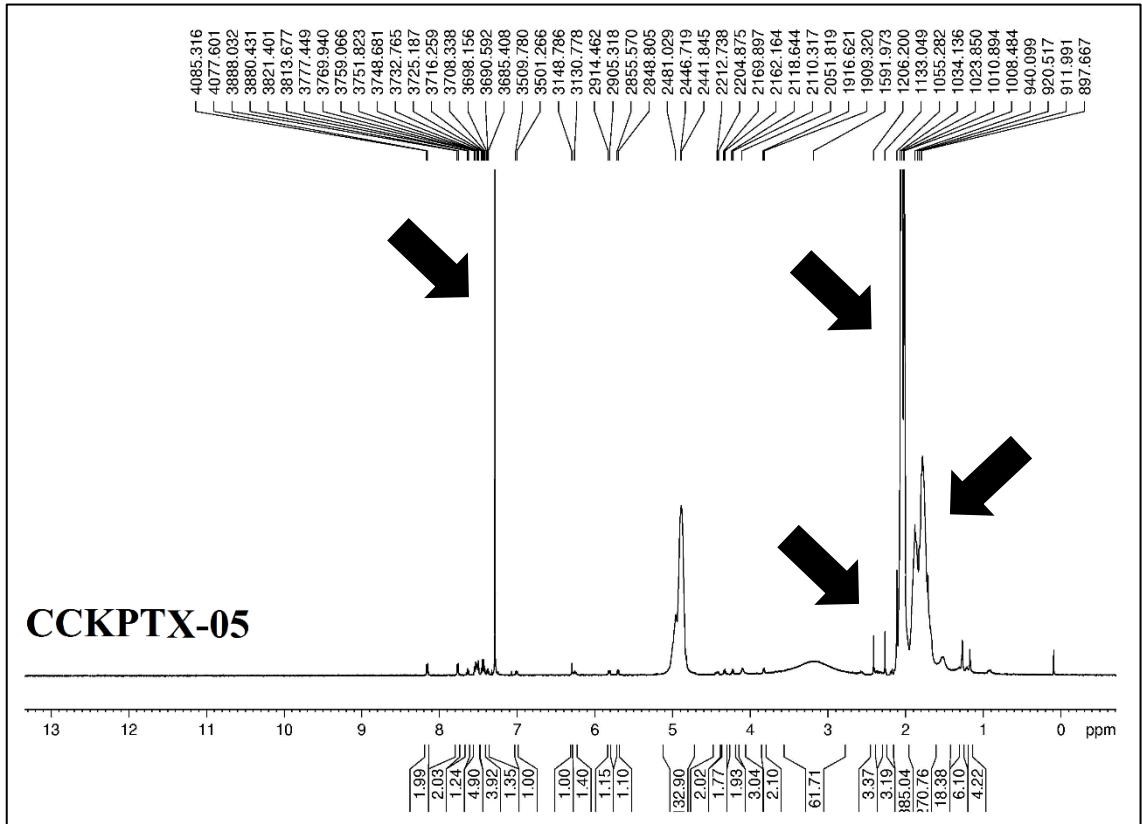
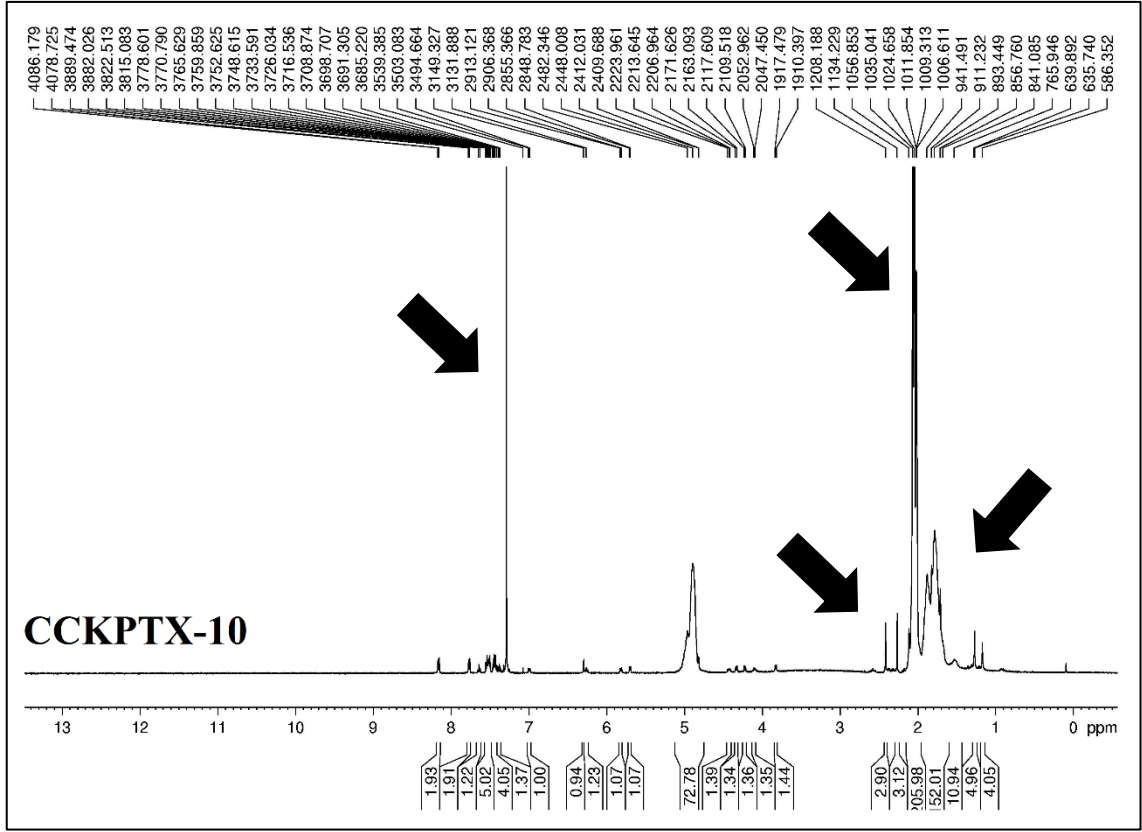


Şekil 5.23. (Devam) Kitosan ile kaplanmış Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analiz spektrumları

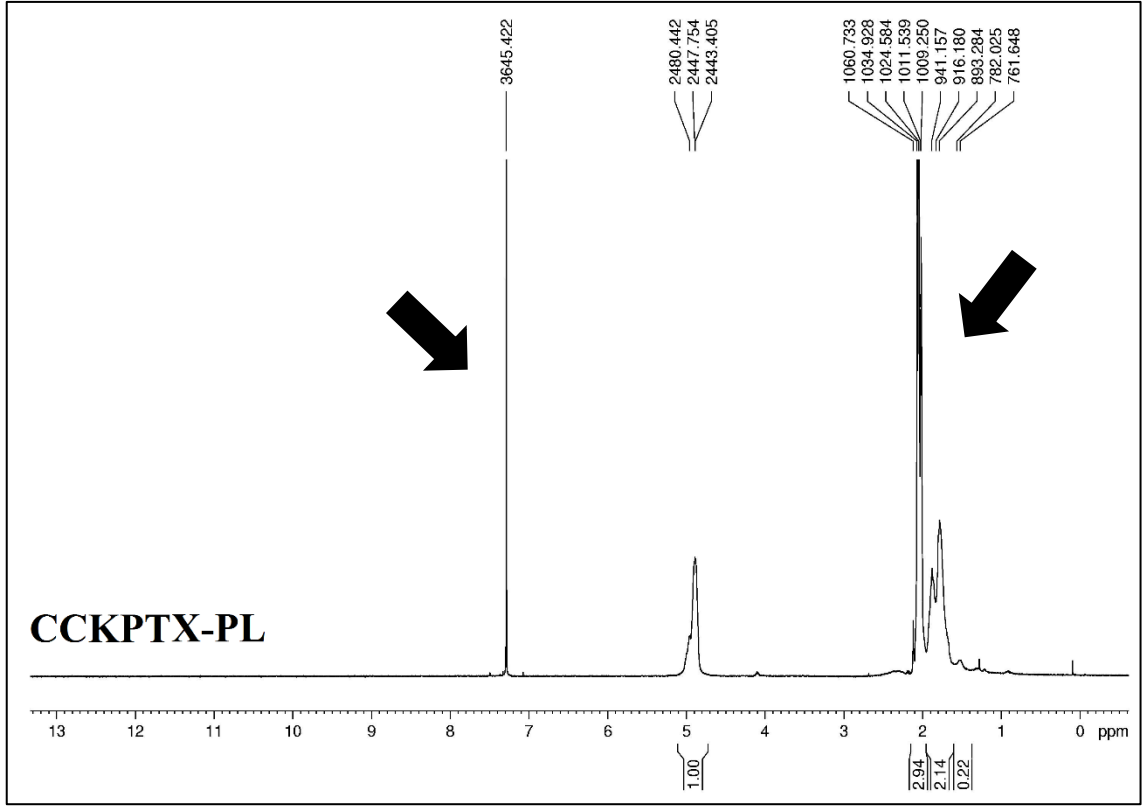
5.2.3.8. Nükleer manyetik rezonans analizleri

Kitosan ile kaplanarak hazırlanan nanopartiküllerin ^1H -NMR analizlerine ait spektrumlar Şekil 5.24.'de sunulmuştur.

Kaplı nanopartiküllerde kitosan varlığına bağlı olarak belirli sinyallerin şiddetinde farklılaşma gözlenmiştir (oklar ile işaretli) (Şekil 5.24.). Sinyallerde kaydedilen bu farklılaşma ile FT-IR analizlerinin yanı sıra ^1H -NMR analizleri de kaplamanın başarı ile gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 5.24.).



Şekil 5.24. Kitosan ile kaplanmış Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin nükleer manyetik rezonans analiz spektrumları



Şekil 5.24. (Devam) Kitosan ile kaplanmış Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin nükleer manyetik rezonans analiz spektrumları

5.2.4. Kitosan nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyon çalışmaları

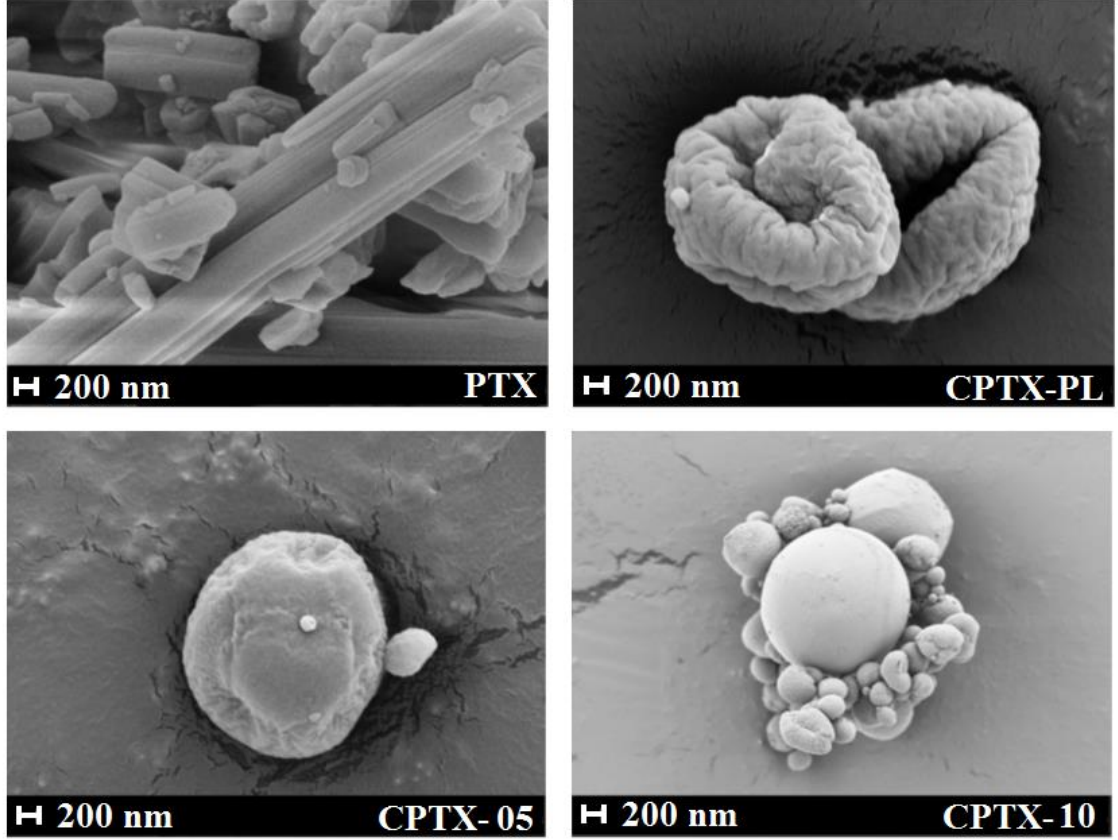
Kollidon® SR polimeri ile hazırlanan partiküllerin ve bunların kitosan ile kaplanmaları ile elde edilen partiküllerin yanı sıra doğal katyonik bir polimer olan ve yüksek biyoyumluluğa sahip kitosan ile de hazırlanan nanopartiküllerin de yapısal özellikleri detaylı olarak incelenmiştir (Başaran ve Yazan, 2012; Başaran vd., 2014; Yenilmez vd., 2015).

5.2.4.1. Parçacık şekli analizleri

Kitosan ile hazırlanan nanopartiküllere ait SEM görüntüleri Şekil 5.25’de sunulmuştur.

Analiz sonuçları düzgün yüzeyli küresel parçacıkların başarı ile elde edildiğini göstermiştir. Plasebo formülasyonların içi boş partiküller oluşturduğu analizlerde ortaya konmuştur. Sisteme etkin maddenin yüklenmesi partikülün dayanıklılığını artırarak küresel partiküllerin analiz sırasında yapısı korunmuştur (Şekil 5.25.).

Ayrıca analiz sonuçları analiz edilen örneklerin parçacık büyüklüğünün de nanometre boyutunda olduklarını göstermiştir (Şekil 5.25.).



Şekil 5.25. Kitosan nanopartikül formülasyonlarının taramalı elektron mikroskobu görüntüleri

5.2.4.2. Parçacık büyüklüğü ve dağılımı analizleri

Kanserli dokular başkalaşmış izole bir yapıdan ziyade immün sistem hücrelerinin kanser oluşumunu engellemek yerine arttırdığı kompleks bir organ gibi davranmalarına neden olmaktadır. Kanserli bölgenin enerjiye olan ihtiyacı anjiyogenezi arttırarak bu ihtiyacı karşılamaya çalışmaktadır. Oluşan yeni damarlarda enerji ihtiyacının bir an önce karşılanmasının sağlanması amacı ile damarları oluşturan endotel hücreler arasında kanserli dokunun yapısına bağlı olarak 100 nm to 2 μ m büyüklüğe sahip geniş boşluklar oluşur. Bu boşluklardan dolaşım sistemine verilen nanopartiküller kolaylıkla geçerek pasif hedefleme ile kanserli bölgede kolaylıkla birikirler (Kinoshita vd., 2017; Kalyane vd., 2019). Bu nedenle kanser tedavisinde kullanılacak partiküler yapıdaki ilaç taşıyıcı sistemlerin parçacık büyüklüklerinin belirlenmesi kritik önem taşımaktadır.

Nanopartiküllerin parçacık büyüklükleri ve parçacık büyüklüğü dağılımları zeta potansiyel analiz cihazı ile analiz edilmiş ve sonuçlar Çizelge 5.7.'de sunulmuştur.

Analiz sonuçları nanometre boyutunda oldukça homojen parçacık büyüklüğü dağılımına sahip nanopartiküllerin oluştuğunu göstermektedir (Çizelge 5.7.).

Çizelge 5.7. Kitosan nanopartikül formülasyonlarının parçacık büyüklüğü (PB), polidisperslik indisi (PdI), zeta potansiyel (ZP) ve pH analiz bulguları (n=3, Ortalama±SH)

KOD	PB (nm)	PdI	Zeta (mV)	pH
CPTX-PL	221,9±0,64	0,50±0,04	+36,6±1,4	5,80±0,00
CPTX-05	222,3±0,23	0,56±0,03	+37,5±0,7	5,19±0,06
CPTX-10	345,6±0,18	0,69±0,02	+33,4±2,1	5,30±0,04

5.2.4.3. Zeta potansiyel analizleri

Nanopartiküllerin zeta potansiyel değerleri, zeta potansiyel analiz cihazı ile belirlenmiş ve kitosanın katyonik yapısına bağlı olarak ~+34 - +38 aralığında değerler almıştır (Çizelge 5.7.).

Kitosanın katyonik özelliği, hücre yüzeyine daha fazla tutunmasını sağlayarak iyonik etkileşimler ile hücre ile daha uzun süre temasta bulunmayı sağlayarak daha etkin ilaç taşıyıcı sistemlerin oluşturulmasına imkan vermektedir. Ayrıca biyoadeziv özelliği ile hedeflenen bölgede daha uzun süre tutunmayı sağlayarak özellikle dosetaksel, PTX, DNA ve proteinler gibi büyük molekülü yapıların etkinliklerinde artış sağlamaktadır (Mehata vd., 2019). Oluşturacakları süspansiyonlar da etkin elektriksel itme kuvvetleri sayesinde oldukça kararlı formülasyonlar olacaktır (Freitas ve Müller, 1998).

5.2.4.4. pH analizleri

Kanserli hücreler değişmiş metabolik aktivitelerine bağlı olarak enerji üretiminde glikoz yerine laktik asit kullanmaktadırlar. Bu nedenle kanserli dokularda yüksek oranda laktik asit bulunmaktadır. Ancak hücrelerin çoğalabilmesi için pH değerinin nötr değerde olması gerekmektedir. Buna bağlı olarak kanserli hücreler çoğalırken enerji üretimi için kullandıkları laktik asiti hücre dışına atmakta ve bu nedenle kanserli dokuların pH değerleri sağlıklı dokulara kıyasla daha asidik değerler almaktadır (Glitsch, 2019).

Elde edilen pH değerleri incelendiğinde, kitosan çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan asetik asit nedeni ile elde edilen nanopartiküllerin pH değerlerinin de asidik özellik gösterdiği (~ 5,2 – 5,8) belirlenmiş ve hedef bölge olan kanserli dokuların bulunduğu bölgeler ile uyumlu olması nedeni ile pH ayarlaması yapılmamıştır (Çizelge 5.7.).

5.2.4.5. Termal analizler

Kitosan ile hazırlanan nanopartiküllerin DSC analizlerine ait termogramlar Şekil 5.26.'da sunulmuştur.

DSC analizleri ile kitosan ile PTX arasındaki olası etkileşimler ve polimerin ve etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri incelenmiş ve ön formülasyon çalışmalarında da belirlendiği gibi kitosanın amorf yapıda olduğu (Şekil 5.11.) ve hazırlanan formülasyonların da amorf yapıyı korudukları gözlenmiştir (Şekil 5.26.).

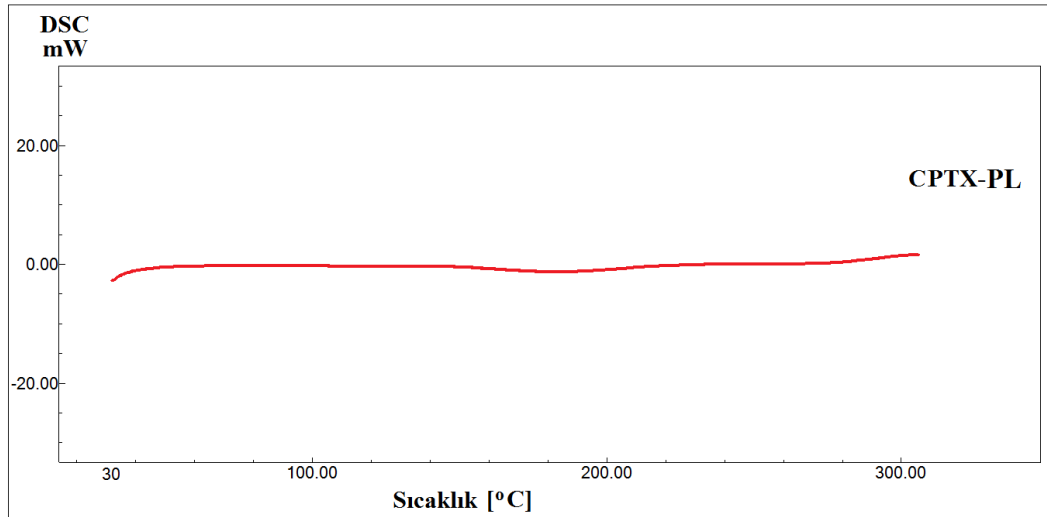
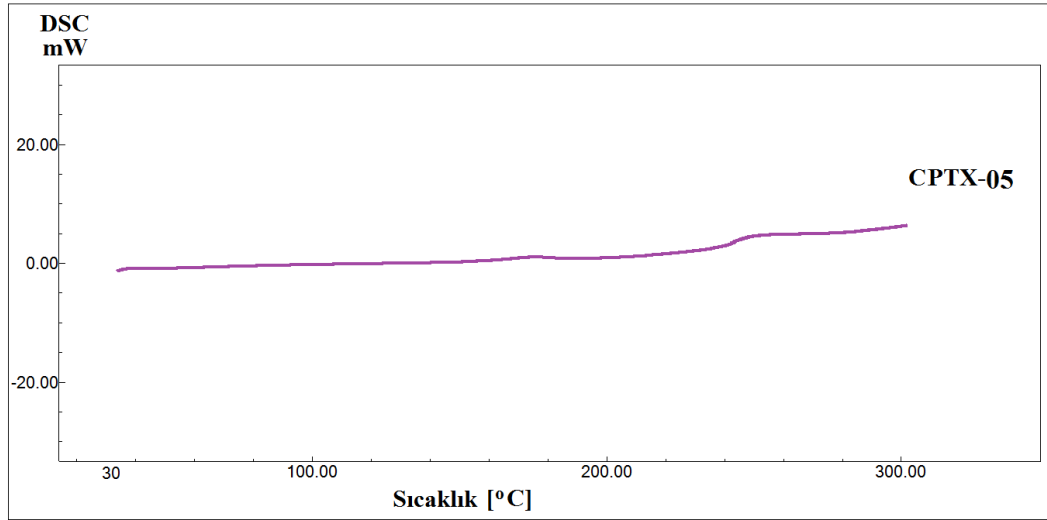
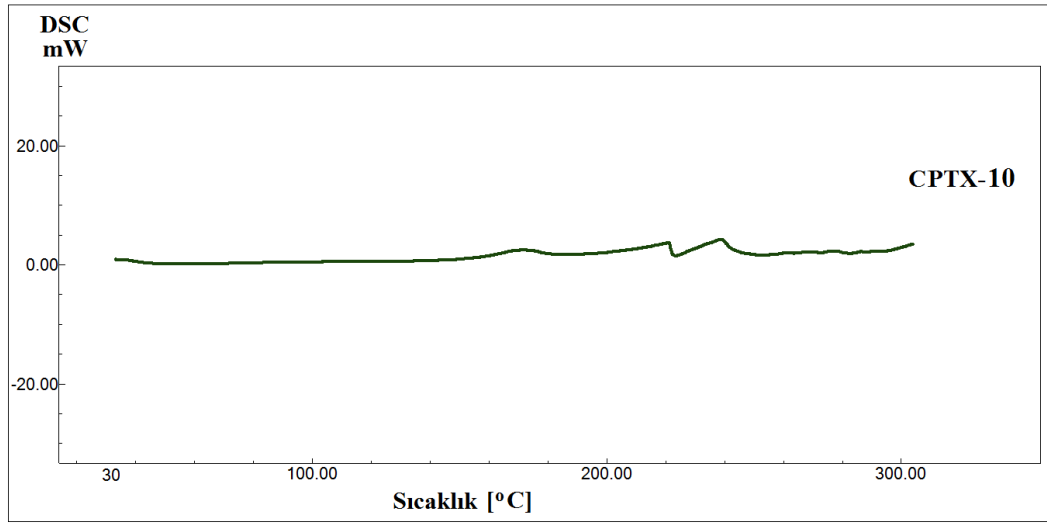
CPTX-05 formülasyonunda PTX'e ait bir pik gözlenemezken artan etkin madde miktarına bağlı olarak CPTX-10 formülasyonunda büyük olasılıkla yüzeyde yerleşen PTX'lere ait erime piki gözlenmiştir (Şekil 5.26.). Etkin madde pikinin gözlenmemesi maddenin nanopartikül içinde kristal halde bulunmadığını, moleküler olarak disperse olduğunu göstermektedir (Şekil 5.26.) (Crucho vd., 2017; Escalona-Rayo vd., 2019).

5.2.4.6. X-ışını kırınım analizleri

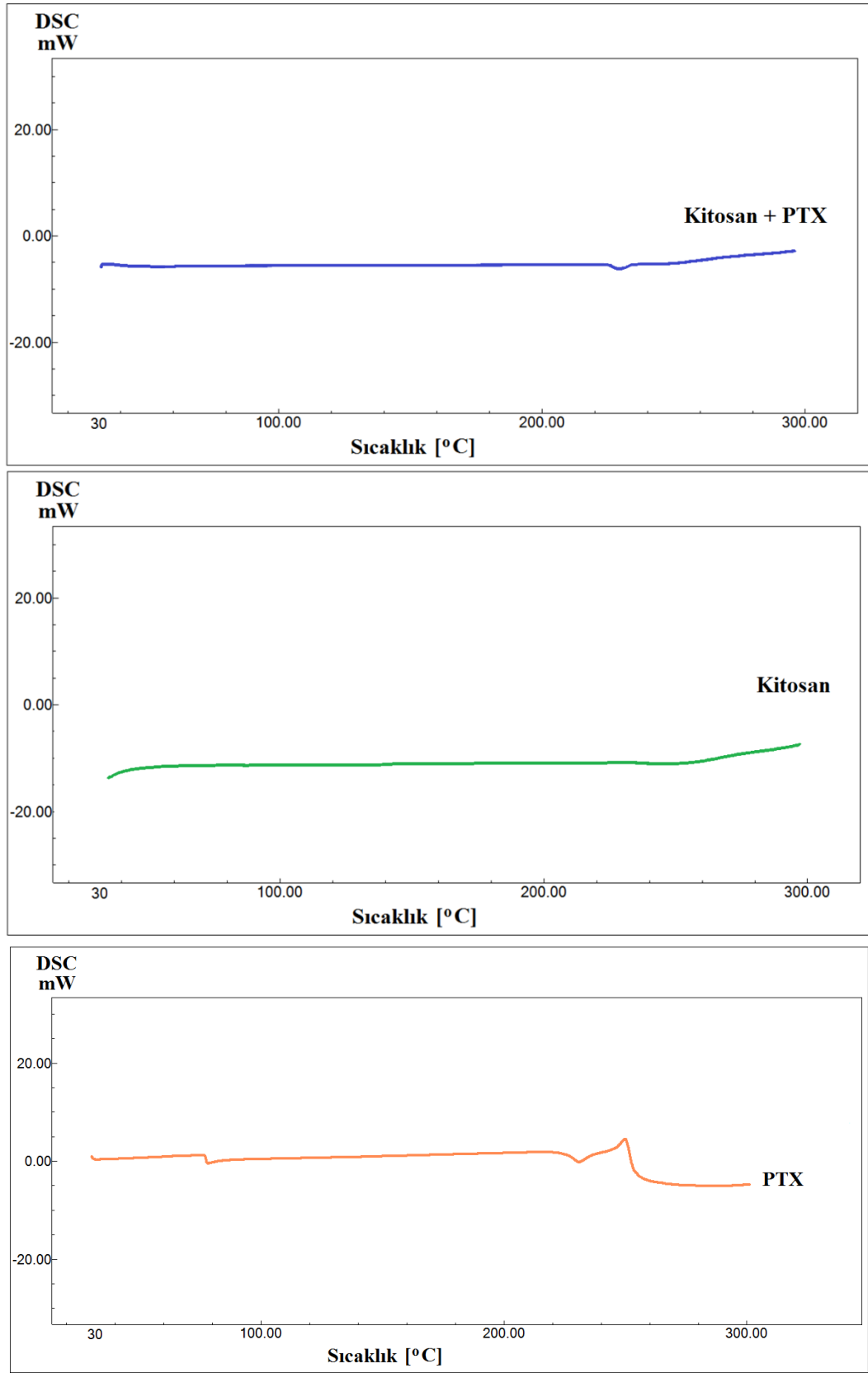
XRD analizleri, kitosan nanopartiküllerinin ve onlara yüklenen etkin maddenin kristal yapısının, oluşan polimerik kafesin özelliklerinin belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilmiş ve XRD analizlerine ait spektrumlar Şekil 5.27.'de sunulmuştur (Naik ve Raval, 2016).

Analiz sonuçları değerlendirildiğinde CPTX-05 ve CPTX-10 formülasyonları da etkin madde içermeyen CPTX-PL formülasyonu ile benzer difraktogramlar oluşturmuş ve amorf yapıda oldukları belirlenmiştir (Şekil 5.27.).

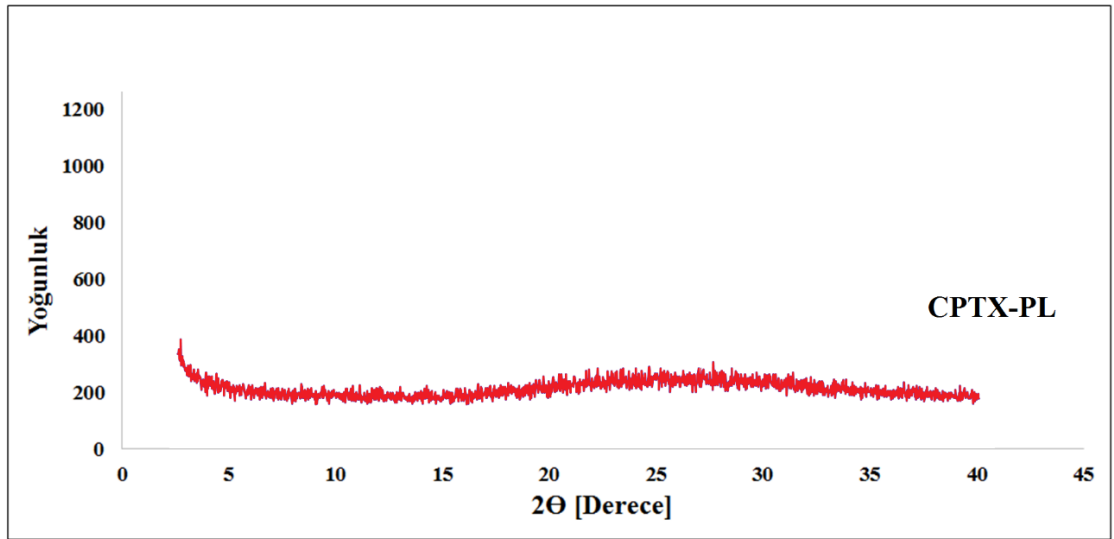
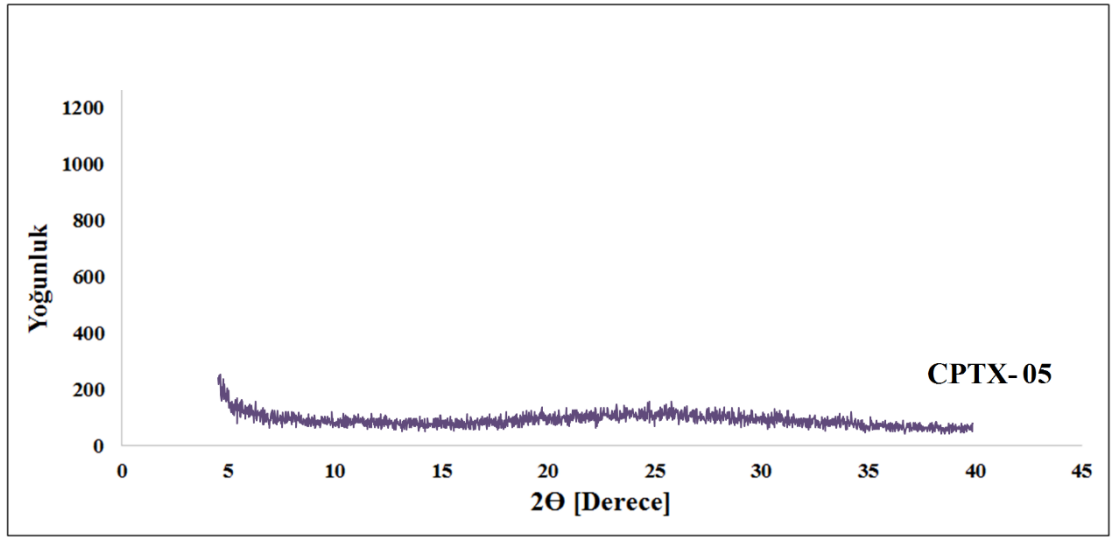
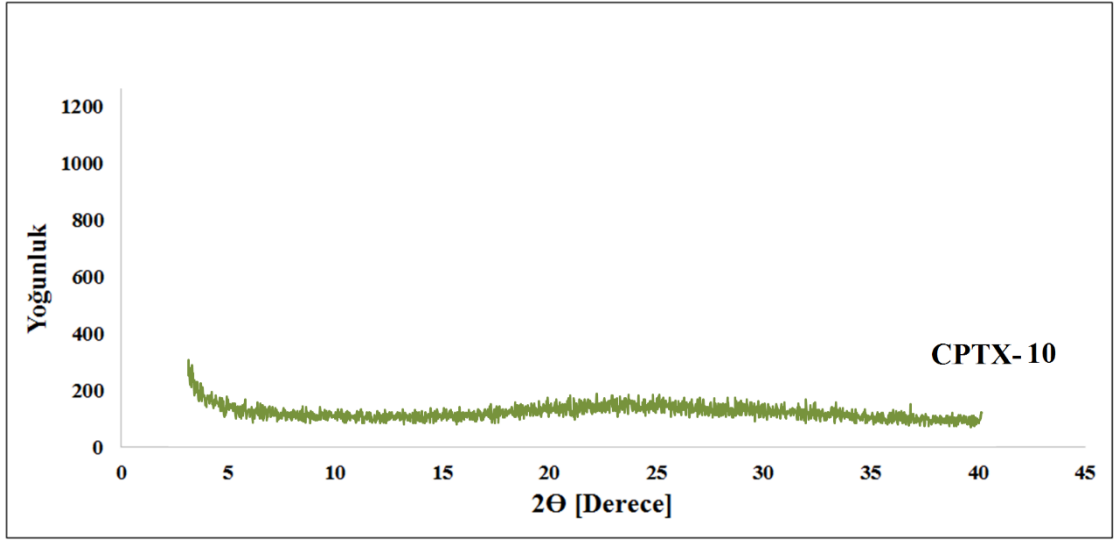
Elde edilen difraktogramlar kararlılık çalışmalarında olası değişimlerin belirlenebilmesi için referans olarak kullanılmıştır.



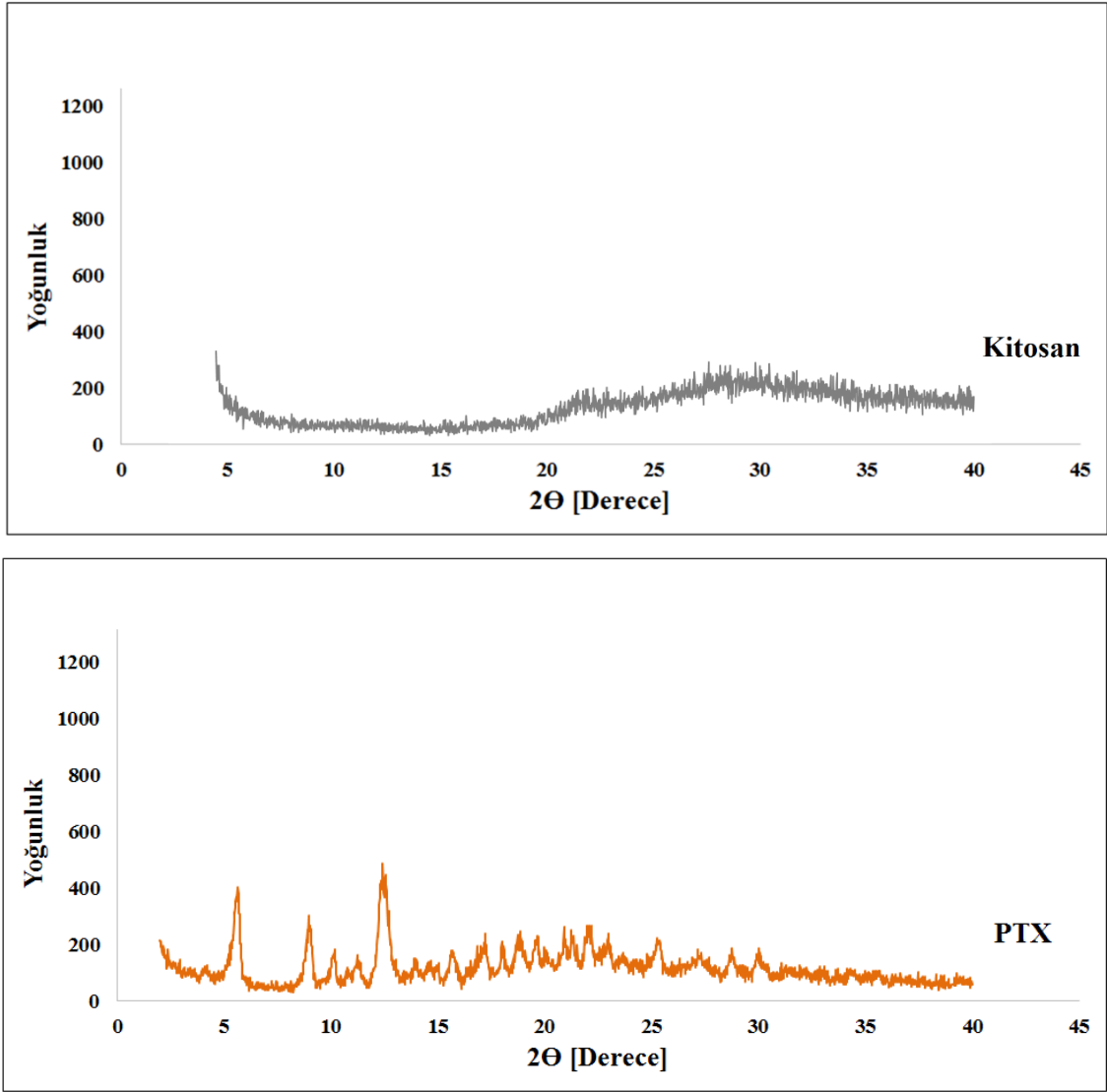
Şekil 5.26. Kitosan ile hazırlanan nanopartiküllerin ve saf maddelerin termal analizlerine ait termogramlar



Şekil 5.26. (Devam) Kitosan ile hazırlanan nanopartiküllerin ve saf maddelerin termal analizlerine ait termogramlar



Şekil 5.27. Kitosan ile hazırlanan nanopartiküllerin ve saf maddelerin X-ışını kırınım analiz difraktogramları



Şekil 5.27. (Devam) Kitosan ile hazırlanan nanopartiküllerin ve saf maddelerin X-ışını kırınım analiz difraktogramları

5.2.4.7. Fourier dönüşümlü kızılötesi analizleri

Kitosan ile hazırlanan nanopartiküllerin FT-IR analizlerine ait spektrumlar Şekil 5.28.'de sunulmuştur.

Mevcut analitik yöntemler arasında, FT-IR spektroskopisi, formülasyonu oluşturan maddeler ve bunlarda bulunan farklı fonksiyonel gruplar arasındaki etkileşimleri ortaya koyarak maddeler arasında kimyasal etkileşimlerin meydana gelip gelmediği hakkında detaylı bilgiler sağlamakta ve bu nedenle karakterizasyon analizlerinde sıklıkla kullanılan yöntemler arasına girmektedir (Das vd., 2015).

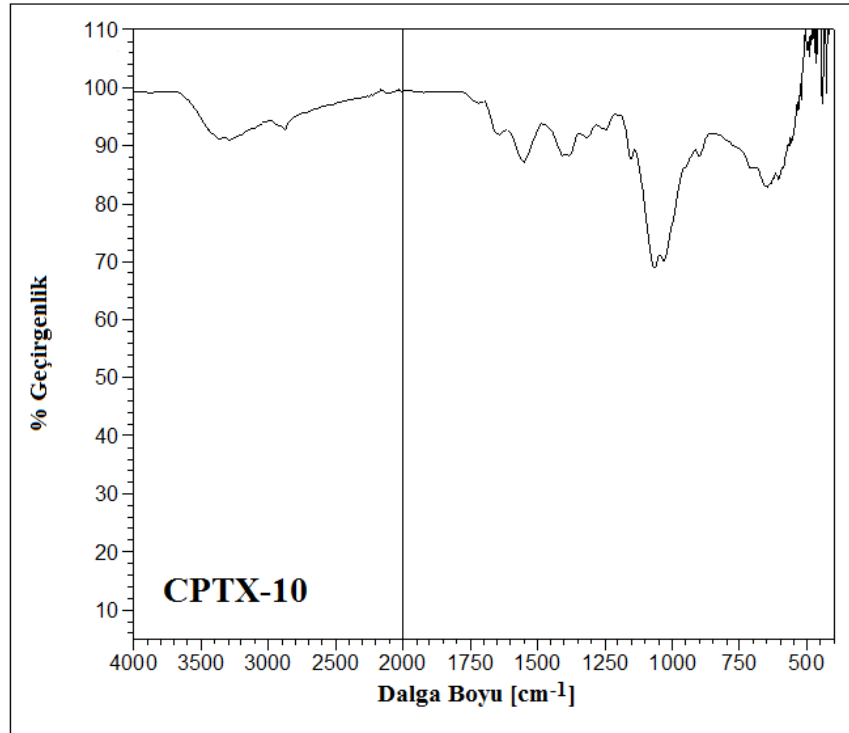
Analiz sonuçları değerlendirildiğinde formülasyonlara ait spektrumlar (CPTX-05 ve CPTX-10) etkin madde içermeyen formülasyon (CPTX-PL) ile çok benzer sinyaller oluşturmuş ve kitosana ait O-H gerilimine bağlı karakteristik geniş sinyal 3600-3100 cm^{-1} aralığında belirlenmiştir. PTX'e ait ayırt edici diğer sinyaller maddenin polimer matris içindeki moleküler dağılımına ve polimer ile herhangi kimyasal bir etkileşimde bulunmamasına bağlı olarak spektrumlarda saptanamamıştır (Şekil 5.28.) (Başaran vd., 2014).

5.2.4.8. Nükleer manyetik rezonans analizleri

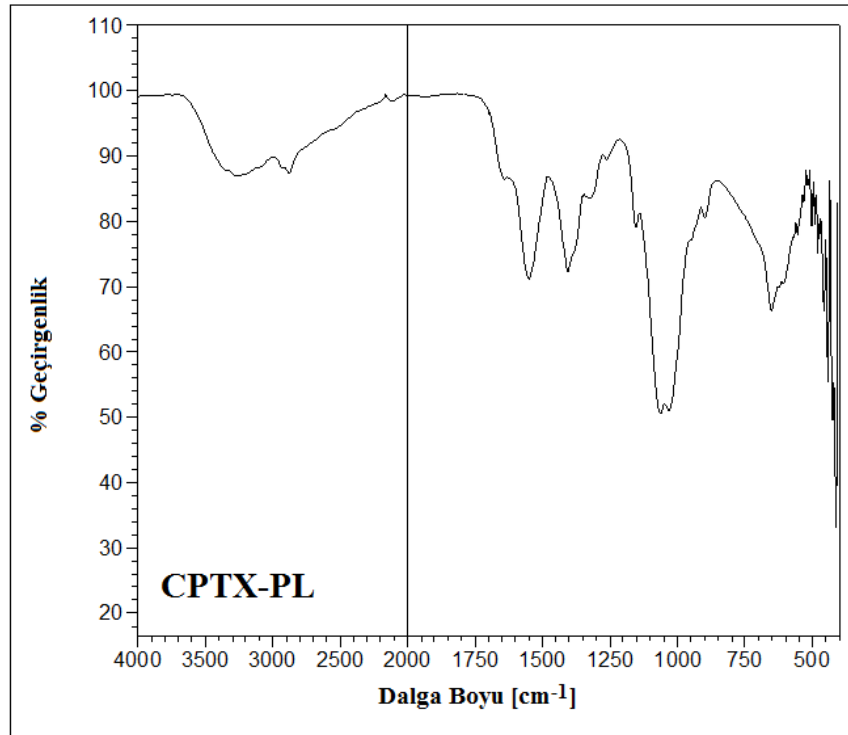
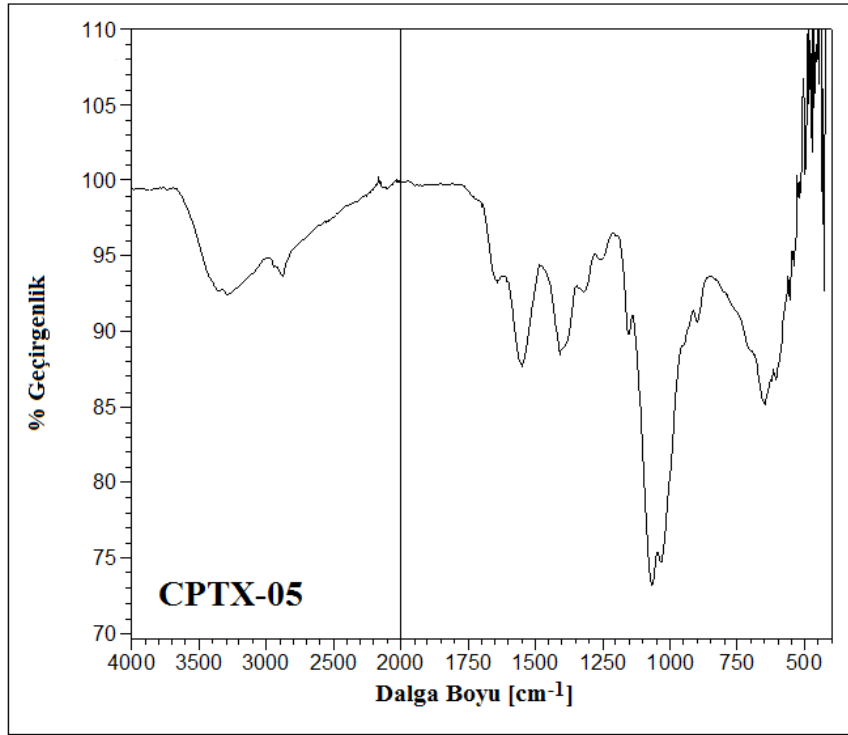
Kitosan ile hazırlanan nanopartiküllerin ^1H -NMR analizlerine ait spektrumlar Şekil 5.29'da sunulmuştur.

PTX yüklenmiş kitosan nanopartiküllerinde meydana gelebilecek olası kimyasal etkileşimlerin belirlenebilmesi için diğer nanopartiküller ile benzer şekilde ^1H -NMR analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.29.) (Li vd., 2008; Başaran vd., 2017; 2018; Ha vd., 2019).

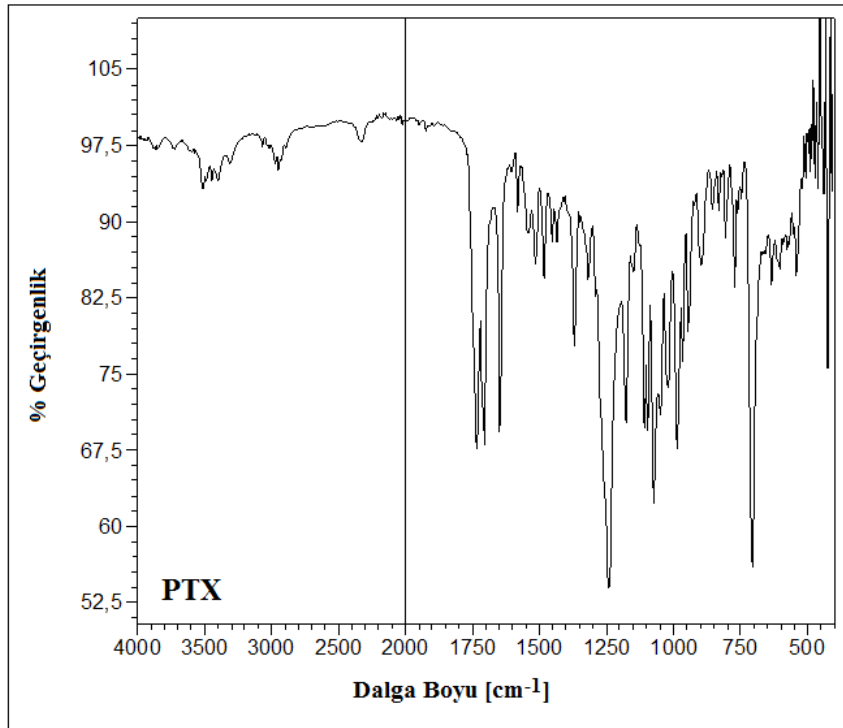
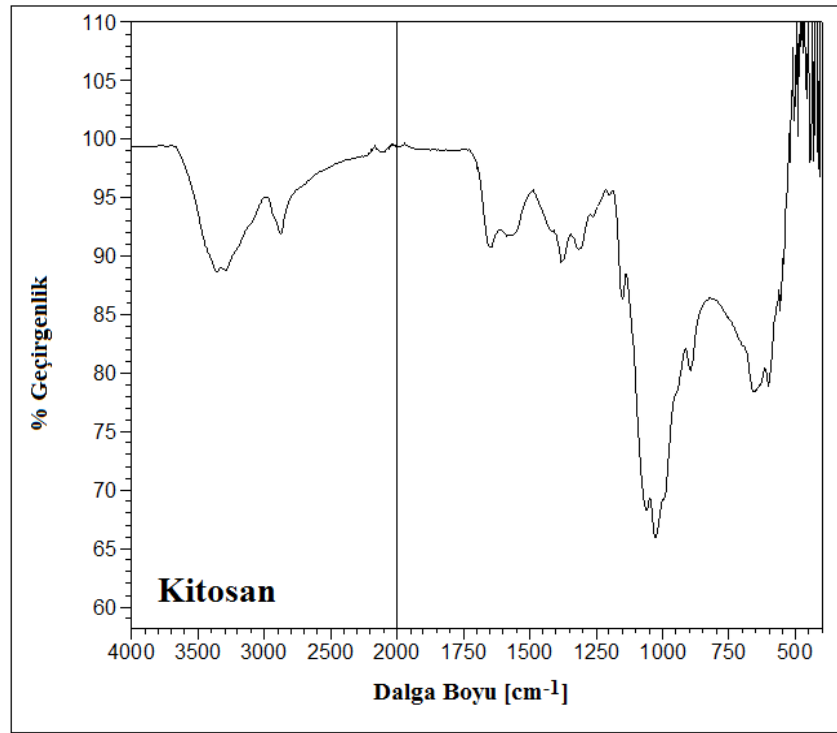
Elde edilen spektrumlar değerlendirildiğinde nanopartiküllere yüklenmiş PTX varlığı özellikle 2-3 ppm ve 7-8 ppm aralığında belirgin şekilde gözlenebilmektedir (oklar ile işaretli) (Şekil 5.29).



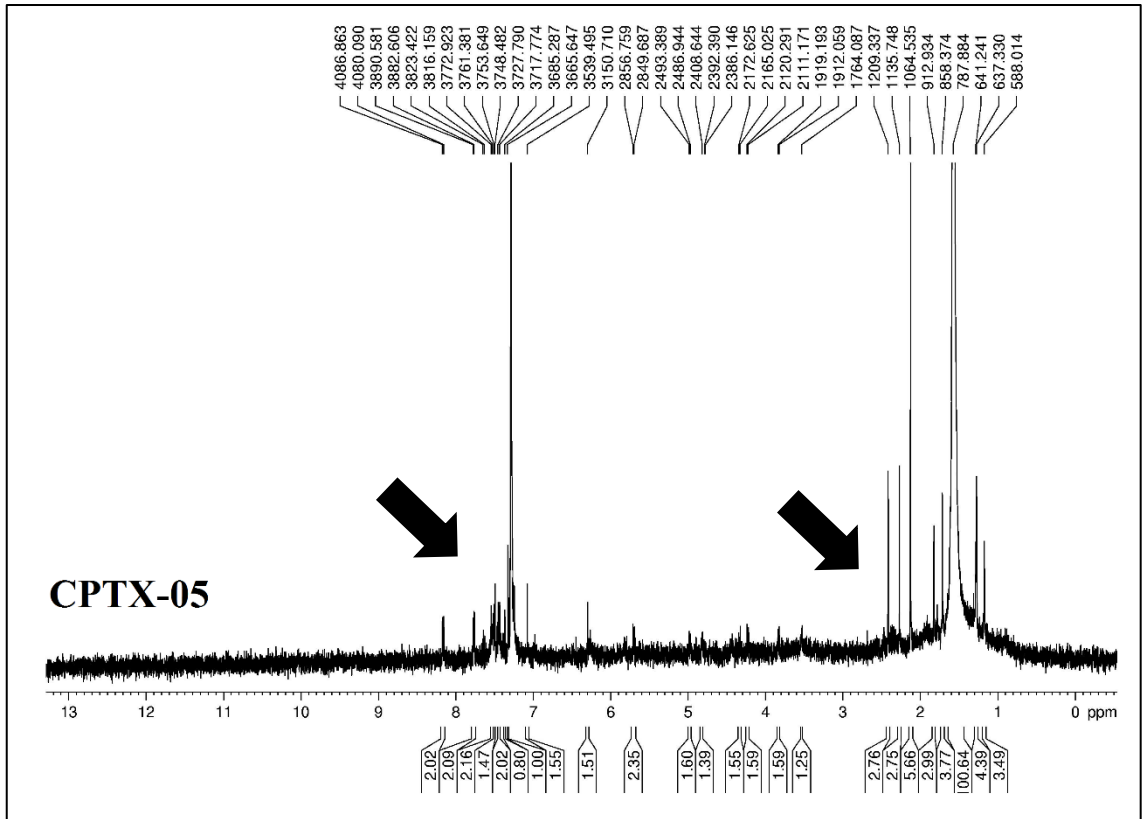
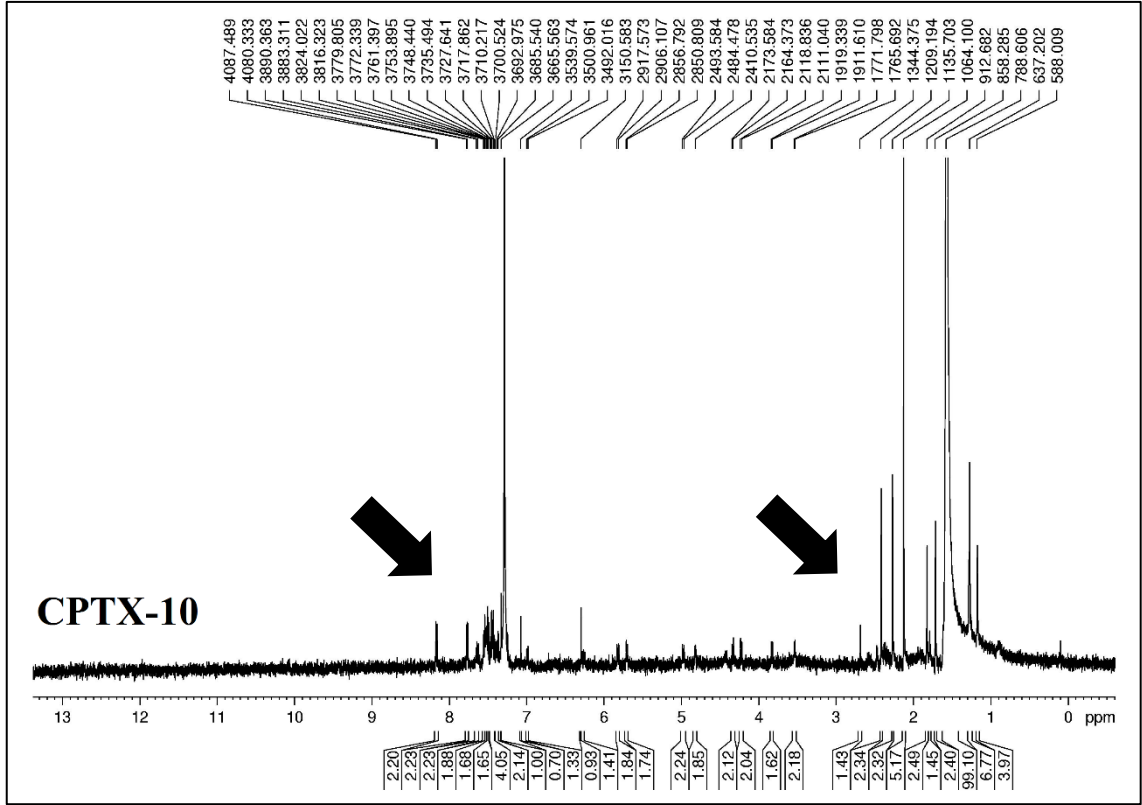
Şekil 5.28. Kitosan ile hazırlanan nanopartiküllerin ve saf maddelerin Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analiz spektrumları



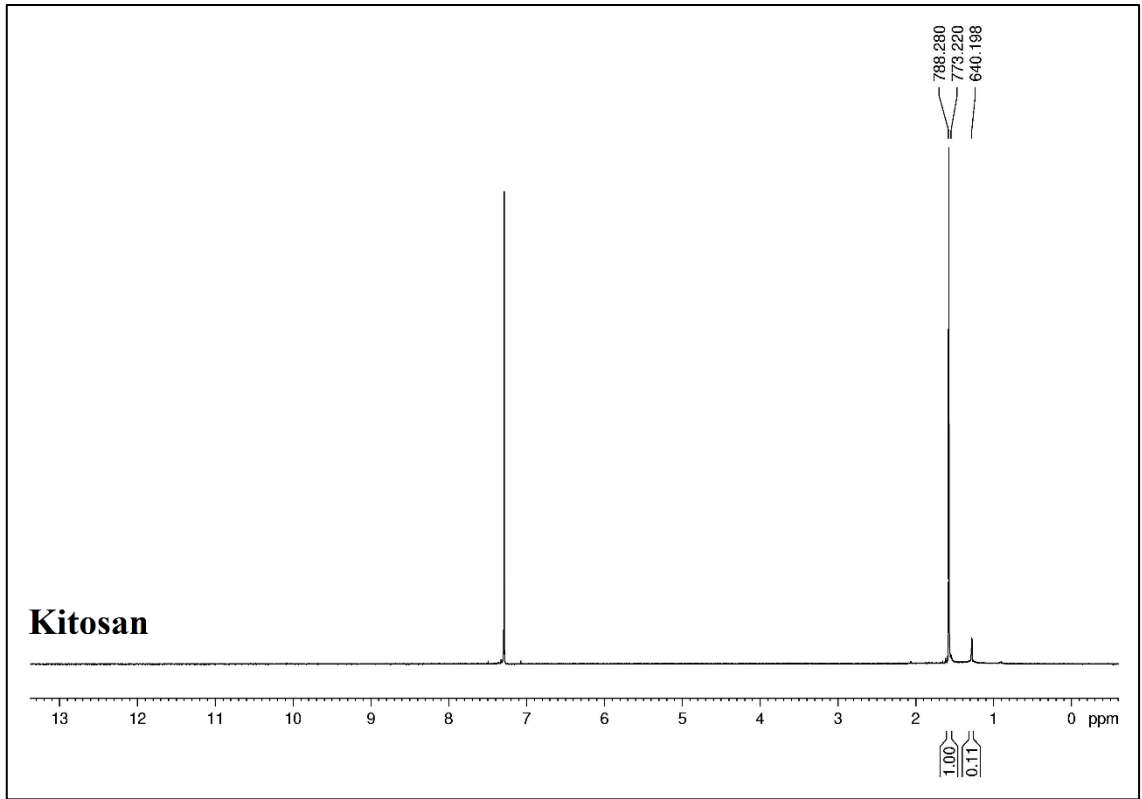
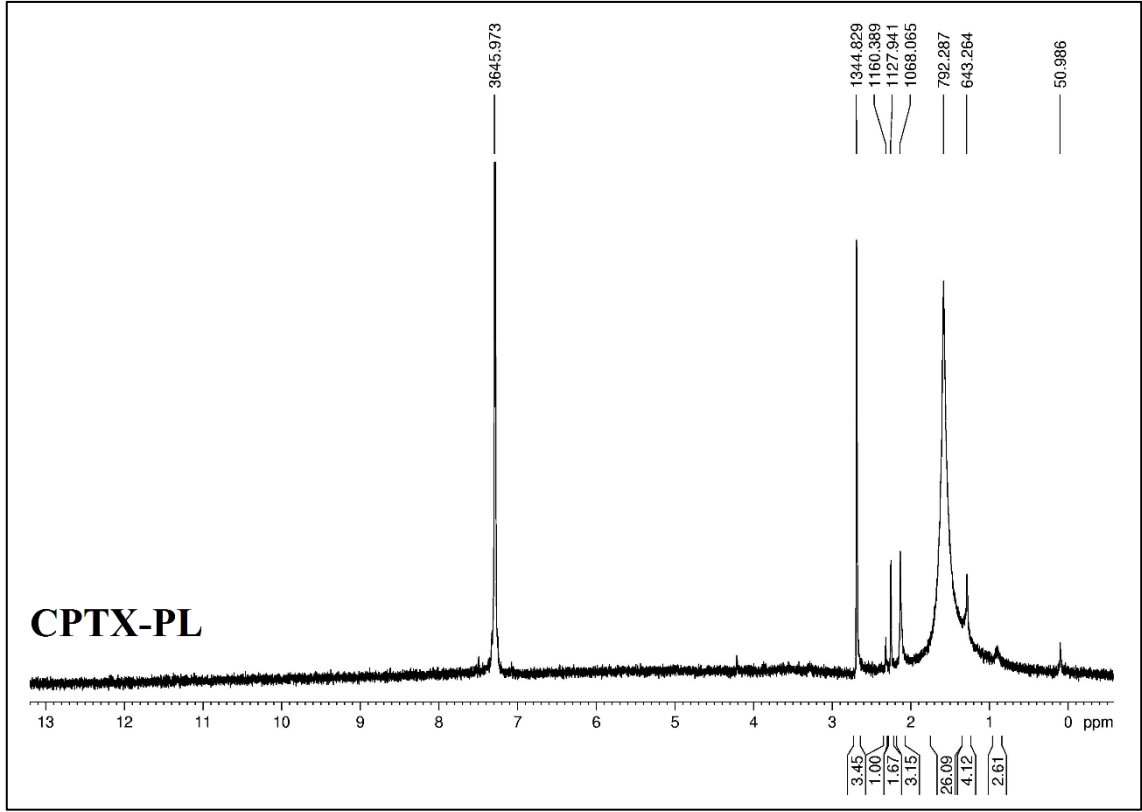
Şekil 5.28. (Devam) Kitosan ile hazırlanan nanopartiküllerin ve saf maddelerin Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analiz spektrumları



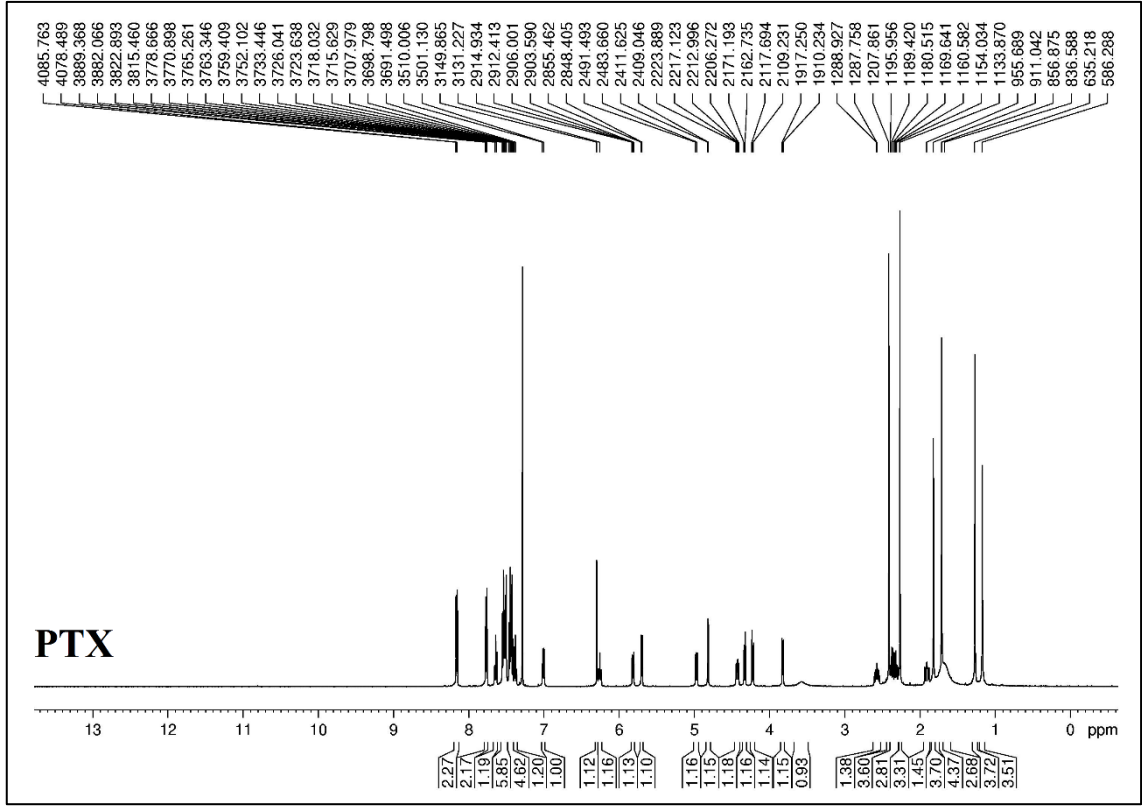
Şekil 5.28. (Devam) Kitosan ile hazırlanan nanopartiküllerin ve saf maddelerin Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analiz spektrumları



Şekil 5.29. Kitosan ile hazırlanan nanopartiküllerin ve saf maddelerin nükleer manyetik rezonans analiz spektrumları



Şekil 5.29. (Devam) Kitosan ile hazırlanan nanopartiküllerin ve saf maddelerin nükleer manyetik rezonans analiz spektrumları



Şekil 5.29. (Devam) Kitosan ile hazırlanan nanopartiküllerin ve saf maddelerin nükleer manyetik rezonans analiz spektrumları

5.2.4.9. Kitosan ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında etkin madde miktar tayini

Kitosan ile hazırlanan nanopartiküllere yüklenen ve hapsedilen PTX miktarı HPLC yöntemi ile belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 5.8.'de sunulmuştur.

Çizelge 5.8. Kitosan ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına yüklenen ve hapsedilen Paklitaksel miktarları ($n=3$, Ortalama $\pm$ SH)

KOD	Toplam PTX (mg)	Yüzeyde Bulunan PTX (%)	Hapsedilen PTX (%)
CPTX-PL	-	-	-
CPTX-05	4,66 $\pm$ 0,26	86,02 $\pm$ 4,11	13,98 $\pm$ 4,11
CPTX-10	8,18 $\pm$ 0,41	66,41 $\pm$ 5,14	33,59 $\pm$ 5,14

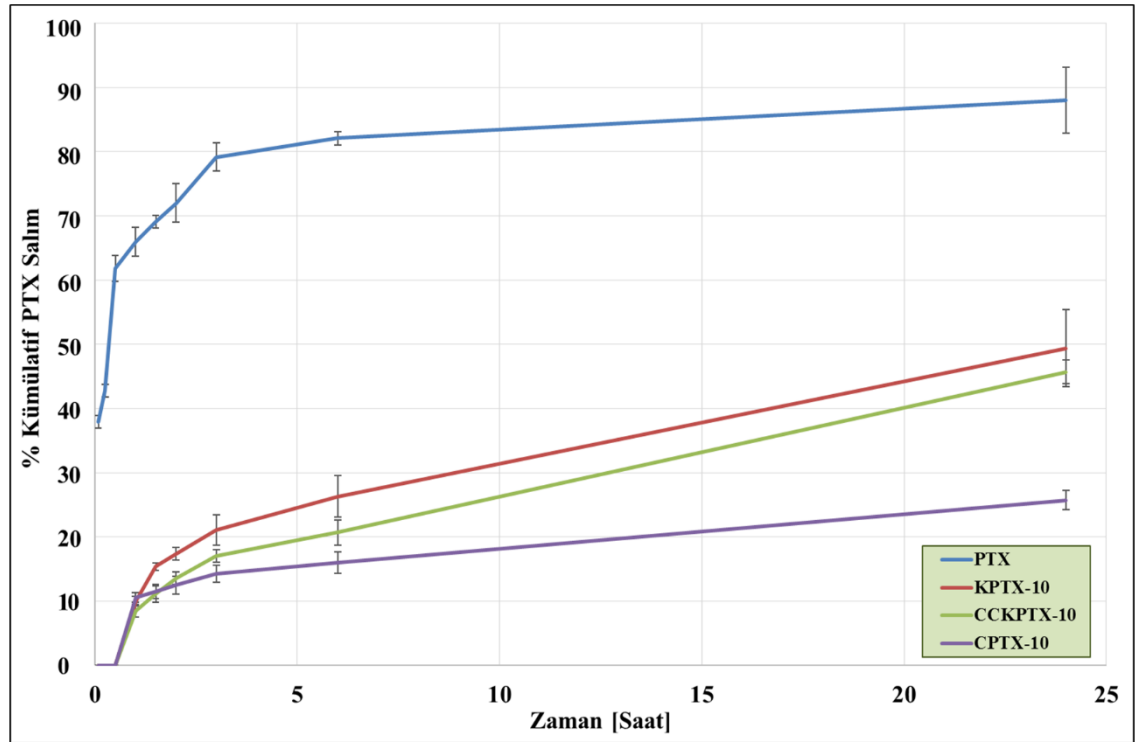
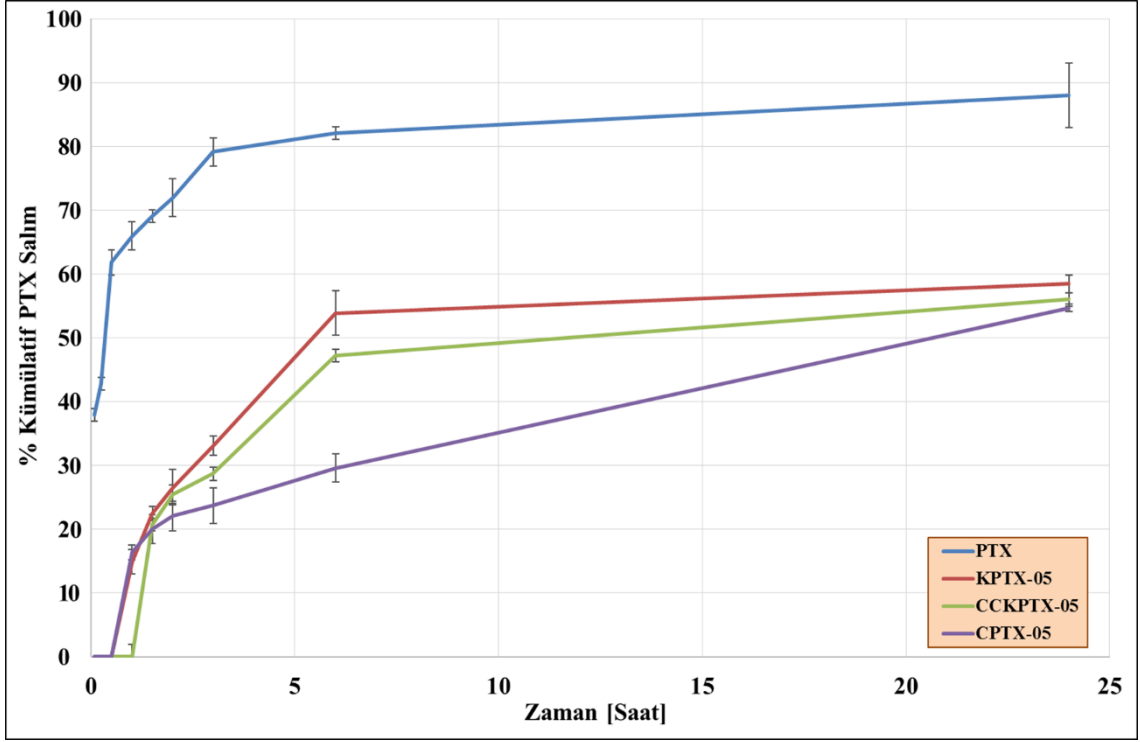
Analiz sonuçları PTX'in büyük oranda yüzeyde lokalize olduğunu göstermektedir (Çizelge 5.8.). Etkin madde yükleme kapasitesini etkileyen pek çok parametre bulunmaktadır (Das ve Chaudhury, 2011). Özellikle polimerik yapının amorf ya da kristal halde oluşu etkin madde yükleme oranını belirleyen en önemli parametredir. Yüksek kristal yapıda oluş veya zamana bağlı olarak amorf yapıdan kristal yapıya geçiş etkin maddenin nanopartikül dışında lokalize olmasına veya dışarı atılmasına neden olmaktadır (Attama vd., 2007; Das ve Chaudhury, 2011). Farklı molekül ağırlıklarına sahip kitosan nanopartikülleri ile daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Başaran vd., 2014; Başaran vd., 2015; Al-Heibshy vd., 2016; Choi vd., 2019). Yapılan çalışmalarda Siklosporin-A etkin maddesi için hapsedilme kapasitesi ~%8-25 (a/a) aralığında değerler almış, etkin maddenin büyük bir kısmı partikülün yüzeyinde yer almıştır (Başaran vd., 2014). Bir diğer çalışmada ise etkin madde olarak Ornidazol'un hapsedilme kapasitesi ancak ~%8,2 – 8,4 (a/a) aralığında değerler alabilmiştir (Başaran vd., 2015).

5.2.4.10. Polimerik nanopartikül formülasyonlarında in vitro salım çalışmaları

Nanopartiküllere yüklenen PTX'in salım profilleri 37°C±2°C'de pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 200 rpm karıştırma hızında diyaliz membran kullanılarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen salım profilleri Şekil 5.30.'de sunulmuştur.

Salım profilleri incelendiğinde nanopartiküllerin yüzeyindeki PTX miktarına bağlı olarak iki aşamalı salım profilleri elde edilmiştir. İlk bir saat içinde salım ortamında belirlenen etkin madde miktarı yüzeyde yer alan etkin madde nedeni ile ~%20 konsantrasyona ulaşmıştır. Partiküllerin içine hapsedilen PTX ile de 24 saatlik süre içerisinde etkin maddenin salımı artarak devam etmiştir ve uzatılmış salım elde edilmiştir. Saf etkin madde 24 saat sonunda ~ %90 oranında salınırken diğer tüm sistemlerde salınan etkin madde miktarı artarak devam etmiş ve KPTX-05, CCKPTX-05 ve CPTX-05 formülasyonları için %60 oranına yaklaşmıştır. KPTX-10, CCKPTX-10 ve CPTX-10 formülasyonlarında ise salım oranı %50 civarında kalmıştır (Şekil 5.30.).

Kollidon® SR ile hazırlanan formülasyonlardan (KPTX-05 ve KPTX-10) etkin madde salımı kitosan nanopartiküllerine (CPTX-05 ve CPTX-10) kıyasla daha hızlı gerçekleşmiştir. Kitosan ile kaplama sonrasında (CCKPTX-05 ve CCKPTX-10) salım nispeten yavaşlamış ancak yine de kitosan nanopartiküllerinden daha hızlı bir salım elde edilmiştir (Şekil 5.30.).



Şekil 5.30. Hazırlanan nanopartiküllere yüklenen paklitaksel'in in vitro salım çalışmaları

Yapılan bir çalışmada Olopatadin HCl etkin maddesi içeren Kollidon® SR nanopartikülleri oküler uygulama için hazırlanmış ve bulgularımıza benzer şekilde

başlangıçta ani bir etkin madde salımını takiben uzatılmış etkin madde salımı başarı ile elde edilmiştir (Güven ve Yenilmez, 2019).

Bir diğer çalışmada ise suda düşük çözünürlüğe sahip Karvedilol etkin maddesini içeren Kitosan nanopartikülleri hazırlanmış ve elde edilen nanopartiküllerin salım özellikleri değerlendirildiğinde tezimiz ile benzer şekilde iki aşamalı salım profili elde edilmiş ve 60 saate kadar uzatılmış salım elde edilebilmiştir (Sharma vd., 2019).

Pek çok nanopartikül formülasyonu için geçerli olan bu salım profilleri göstermektedir ki; yüzeyde yer alan etkin maddeler ilk terapötik etkiyi oluştururken, hapsedilen etkin maddeler ile uzun süreli etkin bir tedavinin gerçekleştirilmesi mümkün olmaktadır (Kang vd., 2004; Başaran vd., 2011; Massella vd., 2018; Thiyagarajan vd., 2019; Choudhury vd., 2019).

5.2.4.11. Polimerik nanopartikül formülasyonlarında *in vitro* salım çalışmalarının kinetik modellere uyumu

Hazırlanma amaçlarına bağlı olarak nanopartiküllerden etkin madde salımının belirlenmesi en önemli karakterizasyon çalışmaları arasında yer almaktadır. Nanopartiküllerden etkin madde salımı kolaylıkla bir matematik model ile açıklanabilmektedir (Shaikh vd., 2015). Çoğunlukla başlangıçta gerçekleşen ani salım ve bunu takiben sıfırıncı ve birinci derece kinetik ile devam eden etkin madde salımı elde edilmektedir (Bruschi, 2015). Kontrollü salım sağlayan sistemlerde istenen özellik belirlenen süre boyunca kandaki etkin madde konsantrasyonunu belli bir değerde tutmaktır. Bunu sağlamak ancak sıfırıncı derece salım sağlayan bir sistemin oluşturulması ile mümkün olmaktadır (Park, 2014).

Değiştirilmiş salım sağlayan sisteminden etkin madde salım mekanizması, çözünme, difüzyon, dağılım, ozmoz, şişme ve erozyon gibi çeşitli şekilde gerçekleşebilmektedir (Langer ve Peppas 1983; Peppas ve Narasimhand, 2014). Etkin maddenin salım ortamına difüzyonu, difüzyonun gerçekleştiği yapının güçlü bir fonksiyonudur ve matematiksel modellerin belirlenmesinde difüzyonun gerçekleştiği yapının morfolojisini dikkate almak önemlidir (Siepmann ve Peppas, 2001).

Salım özelliklerinin ve salım kinetiğinin (sıfırıncı derece, birinci derece, Hixson-Crowell, Weibull, Higuchi, Baker-Lonsdale, Korsmeyer-Peppas, ve Hopfenberg vb. modeller) belirlenmesi ile nanopartiküllerin *in vitro* ve *in vivo* ortamlardaki davranışları değerlendirilebilmektedir (Singhvi ve Singh 2011; Bruschi, 2015; Shaikh vd., 2015).

Tez çalışmalarımızda nanopartiküllerden PTX'in salım özelliklerini en iyi ifade edecek kinetik modelin belirlenmesi amacı ile DDSolver programı kullanılmış (Zhang vd., 2010) ve Akaike kriteri'nin (AIC) en düşük ve r^2 değerinin en yüksek olduğu modeller en uygun salım modeli olarak belirlenmiştir (Bruschi, 2015). Analiz sonuçları Çizelge 5.9.'da sunulmuştur.

Analiz sonuçları değerlendirildiğinde saf etkin maddenin membrandan salım/geçiş profilinin birinci derece kinetik, Hixson-Crowell ve Hopfenberg kinetik modellerine uyduğu belirlenmiştir (Çizelge 5.9.).

Hixson-Crowell çoğunlukla tablet formundaki, zamana bağlı olarak boyutları küçülen sistemlere uygun bir model olarak tanımlanmaktadır. Hopfenberg kinetik modeli ise düzlemsel, küresel veya silindirik aşınır polimer filmlerden ilaç salımını tanımlamak için kullanılmaktadır (Bruschi, 2015).

Çoğunlukla doğal yada sentetik membranlardan geçişin birinci derece kinetiğe uyduğu bildirilmiştir (Mircioiu vd., 2019). Birinci derece kinetik temel teorilerle basit bir şekilde açıklanamamakla birlikte pek çok etkin madde için geçerli olan konsantrasyona bağımlı bir salım kinetiği olarak tanımlanmaktadır (Bruschi, 2015). Saf etkin maddenin veya partikül yüzeyine tutunmuş ancak polimerik yapı içerisinde yer almamış etkin maddenin salım profillerinin birinci derece kinetiğe uyum gösterdiği belirtilmiştir (Balcerzak ve Mucha, 2010).

Bu açıklamalar doğrultusunda PTX'in salım özelliklerini tanımlayan en doğru yaklaşım birinci derece kinetik ile açıklanabilmektedir (Çizelge 5.9.).

Nanopartiküllerin salım kinetiklerinin Higuchi ve Gompertz kinetiklerine uyduğu belirlenmiştir (Çizelge 5.9.). Higuchi modeli polimer matrislerden etkin madde salımını ilk olarak tanımlayan kinetik modelidir. Sudaki çözünürlüğü düşük veya yüksek olan etkin maddelerin katı veya yarıkatı taşıyıcılara yüklenmesi ile oluşan sistemlerden gerçekleşen etkin madde salımını başarı ile tanımlamaktadır (Bruschi, 2015; Paarakh vd., 2018).

Gompertz modeli daha çok suda yüksek çözünürlüğe sahip olan etkin maddeler için tanımlanan bir salım modelidir. Gompertz modeline ait " α " değeri $t = 1$ zamanında çözünmemiş oranı belirlemekte ve yer ve ölçek parametresi olarak değerlendirilirken " β " değeri ise birim zamandaki çözülme hızını gösteren şekil parametresi olarak tanımlanmaktadır (Ramteke vd., 2014).

PTX'in sudaki düşük çözünürlüğüne bağlı olarak Gompertz kinetiğinden çok Higuchi kinetiği PTX'in nanopartiküllerden salımı için seçilebilecek bir kinetik model olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 5.9.).

5.2.4.12. Hazırlanan formülasyonların sitotoksitesi

Hazırlanan Kollidon® SR nanopartiküllerinin kitosan ile kaplanma amaçlarından en önemlisi hazırlanan nanopartiküllere kitosanın mukoadezif özelliğinin kazandırılmasıdır (Başaran ve Yazan, 2012). Kanser tedavisine yönelik hazırlanan formülasyonların ilk olarak kolon kanseri tedavisinde kullanıma olasılığı değerlendirilmek istenmiş ve bu nedenle sitotoksite testlerinde kolon kanseri hücreleri olan HT-29 (ATCC® HTB-38™) ve HTC-15 (ATCC® CCL-225™) hücreleri kullanılmıştır (http-6; http-7; Ettarh vd., 2010).

Yüklenen PTX miktarına bağlı olarak 40 µg.mL⁻¹ – 180 µg.mL⁻¹ konsantrasyon aralığında formülasyonlar HT-29 ve HTC-15 hücreleri üzerine uygulanmış ve 48. saat sonunda MTT analizleri ile formülasyonların hücreler üzerindeki etkileri hücre canlılıkları değerlendirilerek belirlenmiştir (Şekil 5.31. ve Şekil 5.32.).

Etkin madde içermeyen plasebo formülasyonlar (KPTX-PL, CPTX-PL ve CCKPTX-PL) hücreler üzerine uygulanmış ve en yüksek konsantrasyonda dahi toksik etki göstermemiştir. Hücre ve doz bazında tüm formülasyonlar değerlendirildiğinde, hücre canlılığının HT-29 hücreleri için %90'nın, HTC-15 hücreleri için %80'nin altına düşmediği belirlenmiştir. KPTX-PL'nin en yüksek dozu ile CCKPTX-PL'nin en düşük dozunun HT-29 hücrelerinde hücre canlılığını, kontrol grubuna göre arttırdığı gözlenmiştir. HTC-15 hücreleri için aynı etki, CCKPTX-PL formülasyonlarının neredeyse tüm dozlarında gözlenmiştir (Şekil 5.31. ve Şekil 5.32.).

Formülasyonların içermiş olduğu PTX miktarı doza bağımlı olarak hesaplanmış ve hücrelerdeki etkisinin belirlenmesi için pozitif kontrol grubu olarak, DMSO içerisinde çözündürülerek hücrelere uygulanmıştır. %5 PTX formülasyon içeren formülasyonlar için hesaplanan PTX miktarı dikkate alındığında, en yüksek dozdaki hücre canlılığının HT-29 hücreleri için %69,54, HTC-15 için %71,67 olduğu belirlenmiştir. %10 PTX içeren formülasyon oranındaki PTX'in en yüksek dozundaki miktarın ise, her iki hücre için hücre canlılığının %50 seviyelerinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.31. ve Şekil 5.32.).

Çizelge 5.9. Hazırlanan formülasyonların in vitro salım kinetik modelleri

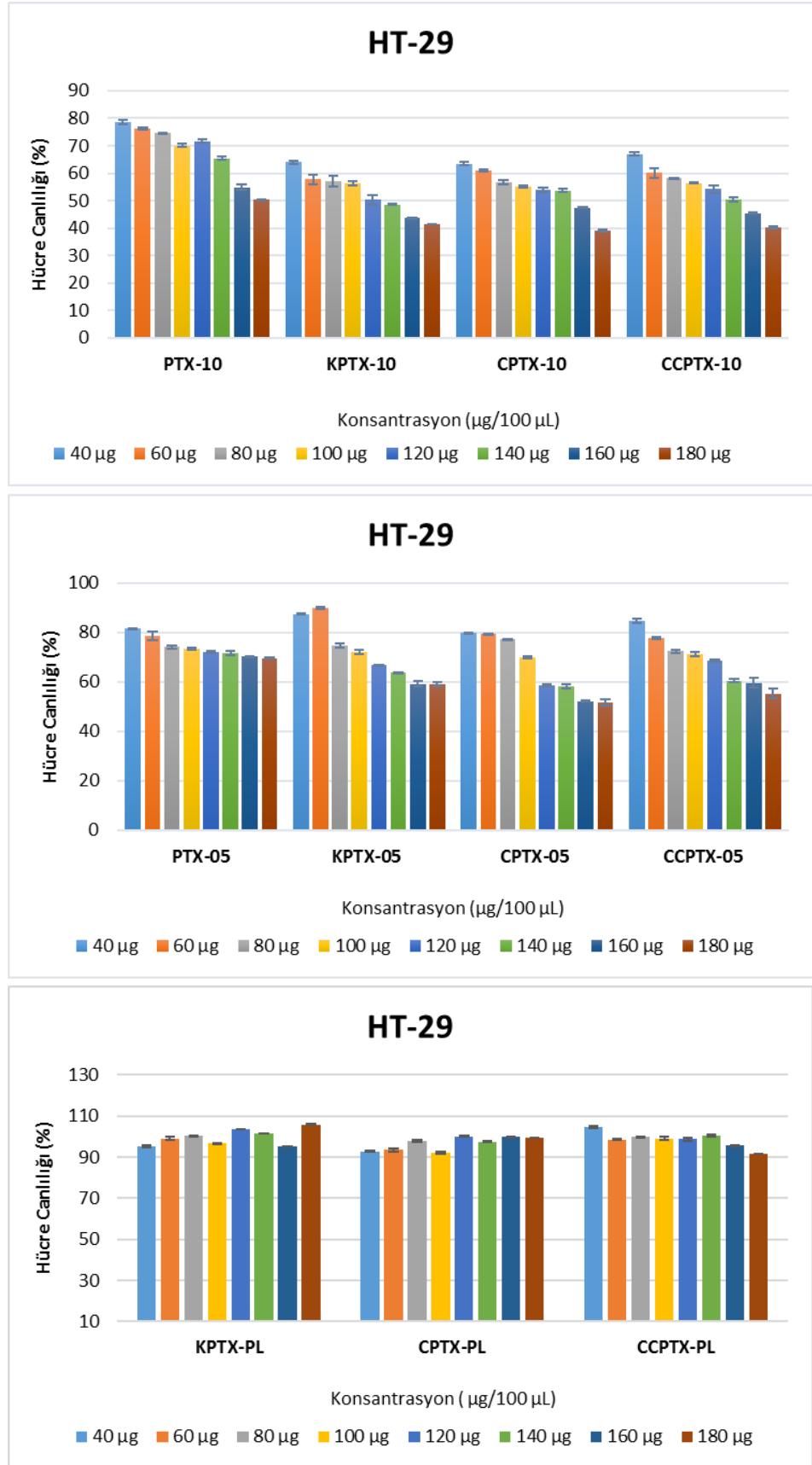
KOD	Kriterler	Sıfıncı Derece	Birinci Derece	Higuchi	Hixson Crowell	Korsmeyer-Peppas	Hopfenberg	Weibull	Gompertz
PTX	k	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$\alpha:0,029 \beta:0,000$	$\alpha:0,004 \beta:0,000$
	r ²	-0,01	-0,01	-0,004	-0,01	0,001	-0,01	0,001	0,001
	AIC	0,052	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,023	0,013
KPTX-05	k	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$\alpha:0,297 \beta:0,00$	$\alpha:0,007 \beta:0,00$
	r ²	0,00	0,00	0,001	0,00	0,001	0,00	0,001	0,001
	AIC	0,032	0,032	0,021	0,032	0,022	0,034	0,023	0,019
KPTX-10	k	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$\alpha:0,562 \beta:0,00$	$\alpha:0,007 \beta:0,00$
	r ²	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	AIC	0,020	0,020	0,004	0,020	0,007	0,022	0,007	0,003
CCKPTX-05	k	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$\alpha:0,223 \beta:0,00$	$\alpha:0,006 \beta:0,00$
	r ²	0,00	0,00	0,001	0,00	0,001	0,00	0,001	0,001
	AIC	0,030	0,029	0,020	0,029	0,024	0,031	0,026	0,023
CCKPTX-10	k	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$\alpha:0,878 \beta:0,001$	$\alpha:0,008 \beta:0,00$
	r ²	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	AIC	0,014	0,014	0,00	0,014	0,001	0,016	0,002	-0,002
CPTX-05	k	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$\alpha:0,266 \beta:0,00$	$\alpha:0,006 \beta:0,00$
	r ²	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	AIC	0,025	0,024	0,009	0,025	0,015	0,027	0,015	0,012
CPTX-10	k	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$\alpha:0,297 \beta:0,00$	$\alpha:0,007 \beta:0,00$
	r ²	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,001	0,001
	AIC	0,016	0,016	0,003	0,016	0,008	0,018	0,009	0,002

KPTX-05 ve KPTX-10 formülasyonları kıyaslandığında, her iki hücrede de KPTX-10 formülasyonunun yüzeydeki etkin madde miktarının daha fazla olmasına bağlı olarak KPTX-05 formülasyonuna oranla her iki hücrede de benzer ve doza bağımlı olarak daha toksik etki gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 5.31. ve Şekil 5.32.).

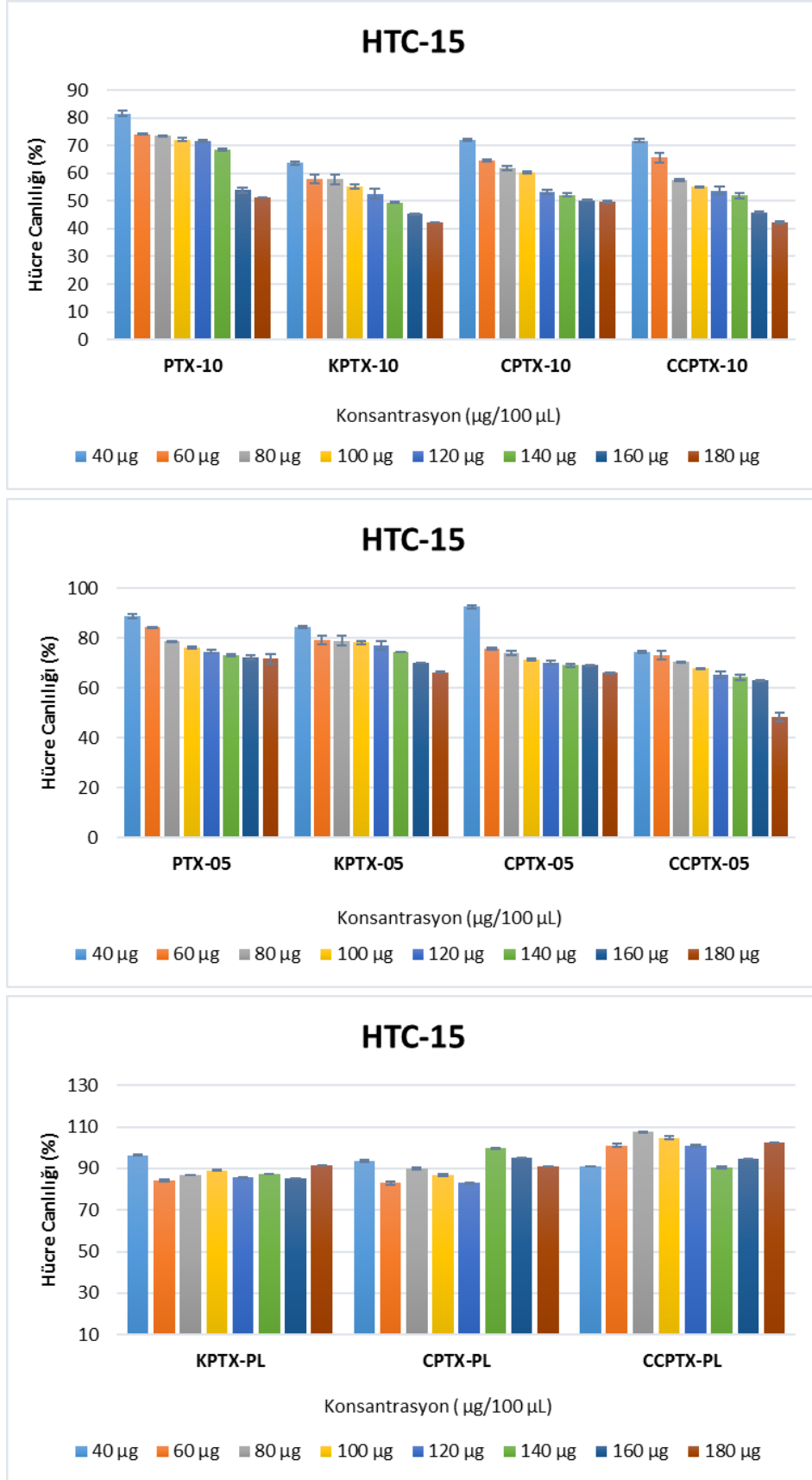
KPTX-05 ve KPTX-10 formülasyonlarının kitosan ile kaplanması ile elde edilen CCKPTX-05 ve CCKPTX-10 formülasyonlarının diğer formülasyonlara oranla daha yüksek hücre canlılığı göstermiştir. Bu durumun, kitosanın hücre canlılığı üzerindeki olumlu etkisi ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 5.31. ve Şekil 5.32.) (Katas ve Alpar, 2006).

Kitosan için IC_{50} değeri $210 \mu g.mL^{-1}$ olarak tanımlanmıştır (Kean ve Thanou, 2010). Kitosan nanopartikülleri olan CPTX-05 ve CPTX-10 formülasyonları da diğer formülasyonlar ile benzer sonuçlar oluşturmuşlar ve artan PTX dozuna bağlı olarak her iki hücre üzerinde sitotoksik etki göstermiştir (Şekil 5.31. ve Şekil 5.32.).

Sonuç olarak, HT-29 ve HTC-15 hücreleri üzerinde 48 saat süresince gerçekleştirilen sitotoksisite çalışmaları sonunda hazırlanan plasebo formülasyonların (KPTX-PL, CPTX-PL ve CCKPTX-PL) toksik özellik göstermediği, formülasyonların ise yüklenen PTX oranına ve artan doza bağlı olarak toksik özellik gösterdiği belirlenmiştir. Formülasyonların içerdiği oranlardaki PTX'in göstermiş olduğu hücre canlılığı değerlendirildiğinde ise, PTX'in taşıyıcı sistem ile hücrelere daha iyi taşındığı ve daha düşük dozda etki ettiği sonucuna varılmıştır (Şekil 5.31. ve Şekil 5.32.) (Zou vd., 2016).



Şekil 5.31. Hazırlanan nanopartiküllerin HT-29 hücreleri üzerindeki sitotoksikite değerleri ($n=3$, $Ort \pm SS$)



Şekil 5.32. Hazırlanan nanopartiküllerin HTC-15 hücreleri üzerindeki sitotoksikite değerleri (n=3, Ort±SS)

5.3. Nanopartikül Formülasyonlarına Ait Kararlılık Çalışmaları

Hazırlanan nanopartiküller, saf PTX'in kararlılık durumu değerlendirilerek uzun süreli kararlılık çalışmaları için $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ve hızlandırılmış kararlılık çalışmalarında ise nanopartiküller $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ - $\%60 \pm \%5$ rölatif neme sahip ortamlarda saklanmıştır (ICH Q1A-R2, 2003).

Nanopartiküller amber renkli sıkıca kapalı cam ambalajlara konulmuş ve kararlılıklarının incelenmesi amacıyla, 0, 3, ve 6 aylık sürelerin sonunda, parçacık büyüklüğü, parçacık büyüklüğü dağılımı, zeta potansiyel, pH ve PTX miktar tayinleri analizleri gerçekleştirilerek kararlılıkları değerlendirilmiştir (Çizelge 5.10. ve Çizelge 5.11.) (Crucho ve Barros, 2017; Mourdikoudis vd., 2018; Escalona-Rayo vd., 2019).

Parçacık büyüklüğü, parçacık büyüklüğü dağılımı analizleri değerlendirildiğinde buzdolabında saklanan formülasyonlar için parçacık büyüklüğü daha az değişkenlik gösterirken oda ısısındaki formülasyonlardaki değişim daha fazla olmuştur ancak yine de her iki ortamda saklanan formülasyonlar için anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p > 0,05$) ve partiküller homojen dağılımlarını 6 aylık saklama süresince korumuşlardır ($p > 0,05$) (Çizelge 5.10. ve Çizelge 5.11.).

Zeta potansiyel analizleri Kollidon[®] SR ile hazırlanan formülasyonların (KPTX-PL, KPTX-05 ve KPTX-10) anyonik özelliklerini 6 aylık saklama süresince korumuşlar ve her iki saklama ortamında $\sim -12\text{mV}$ - -20mV aralığında değerler almıştır ($p > 0,05$) (Çizelge 5.10. ve Çizelge 5.11.).

KPTX-PL, KPTX-05 ve KPTX-10 formülasyonlarının kitosan ile kaplanması ile elde edilen CCKPTX-PL, CCKPTX-05 ve CCKPTX-10 formülasyonlara kazandırılan katyonik özellik saklama süresince değişmeden kalmış ve $\sim +21\text{mV}$ - $+34\text{mV}$ aralığında değerler almıştır ($p > 0,05$) (Çizelge 5.10. ve Çizelge 5.11.).

PH analiz sonuçları tüm fomülasyonlar için başlangıçtaki değerlerinden çok farklılaşmamış ve 5.02 - 6.21 arasında değerler almıştır ($p > 0,05$) (Çizelge 5.10. ve Çizelge 5.11.).

Çizelge 5.10. Hazırlanan formülasyonların uzun süreli kararlılık çalışmaları sonucunda elde edilen parçacık büyüklüğü (PB), polidisperslik indisi (PdI), Zeta Potansiyel (ZP), pH ve etkin madde miktar tayini analiz sonuçları ($5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$; $n=3$, Ortalama $\pm$ SH)

0. Zaman Analizleri	PB (nm)	PdI	ZP (mV)	pH	Toplam PTX (% a/a)
KPTX-PL	207,5 $\pm$ 3,8	0,5 $\pm$ 0,0	-16,9 $\pm$ 0,8	6,09 $\pm$ 0,19	-
KPTX-05	240,2 $\pm$ 2,9	0,5 $\pm$ 0,1	-19,5 $\pm$ 1,5	5,69 $\pm$ 0,01	5,06 $\pm$ 0,01
KPTX-10	268,7 $\pm$ 3,9	0,6 $\pm$ 0,3	-20,2 $\pm$ 2,8	5,60 $\pm$ 0,02	9,63 $\pm$ 0,02
CCKPTX-PL	345,6 $\pm$ 2,6	0,7 $\pm$ 0,1	+27,1 $\pm$ 0,4	5,61 $\pm$ 0,00	-
CCKPTX-05	364,1 $\pm$ 1,9	0,6 $\pm$ 0,1	+31,0 $\pm$ 0,2	5,39 $\pm$ 0,04	5,06 $\pm$ 0,01
CCKPTX-10	452,9 $\pm$ 2,3	0,6 $\pm$ 0,4	+36,4 $\pm$ 1,4	5,44 $\pm$ 0,05	9,63 $\pm$ 0,02
CPTX-PL	221,9 $\pm$ 0,6	0,5 $\pm$ 0,4	+36,6 $\pm$ 1,4	5,80 $\pm$ 0,00	-
CPTX-05	222,3 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,3	+37,5 $\pm$ 0,7	5,19 $\pm$ 0,06	4,66 $\pm$ 0,06
CPTX-10	345,6 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,2	+33,4 $\pm$ 2,1	5,30 $\pm$ 0,04	8,18 $\pm$ 0,04
3. Ay Analizleri ($5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$)	PB (nm)	PdI	ZP (mV)	pH	Toplam PTX (% a/a)
KPTX-PL	234,6 $\pm$ 3,8	0,6 $\pm$ 0,5	-15,6 $\pm$ 0,1	6,21 $\pm$ 0,22	-
KPTX-05	255,1 $\pm$ 1,1	0,7 $\pm$ 0,3	-17,5 $\pm$ 1,3	5,65 $\pm$ 0,03	5,01 $\pm$ 0,06
KPTX-10	258,4 $\pm$ 1,2	0,6 $\pm$ 0,1	-19,1 $\pm$ 1,5	5,72 $\pm$ 0,06	9,55 $\pm$ 0,01
CCKPTX-PL	352,5 $\pm$ 2,6	0,5 $\pm$ 0,2	+23,7 $\pm$ 0,8	5,66 $\pm$ 0,10	-
CCKPTX-05	376,2 $\pm$ 0,8	0,7 $\pm$ 0,4	+30,2 $\pm$ 1,6	5,41 $\pm$ 0,21	5,02 $\pm$ 0,04
CCKPTX-10	445,8 $\pm$ 2,1	0,6 $\pm$ 0,1	+34,2 $\pm$ 0,3	5,48 $\pm$ 0,08	9,61 $\pm$ 0,00
CPTX-PL	254,4 $\pm$ 0,4	0,4 $\pm$ 0,6	+33,1 $\pm$ 3,2	5,66 $\pm$ 0,00	-
CPTX-05	262,1 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,2	+36,2 $\pm$ 3,9	5,24 $\pm$ 0,03	4,72 $\pm$ 0,02
CPTX-10	359,9 $\pm$ 0,8	0,4 $\pm$ 0,4	+33,6 $\pm$ 1,1	5,37 $\pm$ 0,02	8,10 $\pm$ 0,08

Çizelge 5.10. (Devam) Hazırlanan formülasyonların uzun süreli kararlılık çalışmaları sonucunda elde edilen parçacık büyüklüğü (PB), polidisperslik indisi (PdI), Zeta Potansiyel (ZP), pH ve etkin madde miktar tayini analiz sonuçları ($5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$; $n=3$, Ortalama $\pm$ SH)

6. Ay Analizleri ($5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$)	PB (nm)	PdI	ZP (mV)	pH	Toplam PTX (% a/a)
KPTX-PL	242,8 $\pm$ 1,3	0,7 $\pm$ 0,2	-14,5 $\pm$ 0,8	5,02 $\pm$ 0,08	-
KPTX-05	265,3 $\pm$ 2,2	0,7 $\pm$ 0,1	-18,4 $\pm$ 1,5	5,78 $\pm$ 0,01	5,04 $\pm$ 0,02
KPTX-10	287,7 $\pm$ 1,2	0,6 $\pm$ 0,3	-19,2 $\pm$ 1,0	5,45 $\pm$ 0,03	9,57 $\pm$ 0,04
CCKPTX-PL	414,3 $\pm$ 4,6	0,5 $\pm$ 0,1	+24,2 $\pm$ 0,7	5,85 $\pm$ 0,00	-
CCKPTX-05	436,2 $\pm$ 3,1	0,7 $\pm$ 0,2	+28,0 $\pm$ 1,2	5,27 $\pm$ 0,01	5,01 $\pm$ 0,03
CCKPTX-10	478,3 $\pm$ 3,7	0,6 $\pm$ 0,4	+30,6 $\pm$ 2,7	5,63 $\pm$ 0,05	9,52 $\pm$ 0,01
CPTX-PL	336,4 $\pm$ 2,8	0,5 $\pm$ 0,6	+33,1 $\pm$ 0,4	5,45 $\pm$ 0,03	-
CPTX-05	378,6 $\pm$ 1,6	0,6 $\pm$ 0,3	+35,8 $\pm$ 1,3	5,26 $\pm$ 0,05	4,55 $\pm$ 0,08
CPTX-10	384,0 $\pm$ 0,4	0,4 $\pm$ 0,1	+34,7 $\pm$ 1,1	5,38 $\pm$ 0,06	8.03 $\pm$ 0,01

Çizelge 5.11. Hazırlanan formülasyonların hızlandırılmış kararlılık çalışmaları sonucunda elde edilen parçacık büyüklüğü (PB), polidisperslik indisi (PdI), zeta potansiyel (ZP), pH ve etkin madde miktar tayini analiz sonuçları (25°C±2°C %60±5 RN, n=3, Ortalama±SH)

0. Zaman Analizleri	PB (nm)	PdI	ZP (mV)	pH	Toplam PTX (% a/a)
KPTX-PL	207.5±3.8	0,5±0,0	-16,9±0,8	6,09±0,19	-
KPTX-05	240,2±2.9	0,5±0,1	-19,5±1,5	5,69±0,01	5,06±0,01
KPTX-10	268.7±3.9	0,6±0,3	-20,2±2,8	5,60±0,02	9,63±0,02
CCKPTX-PL	345.6±2.6	0,7±0,1	+27,1±0,4	5,61±0,00	-
CCKPTX-05	364.1±1.9	0,6±0,1	+31,0±0,2	5,39±0,04	5,06±0,01
CCKPTX-10	452.9±2.3	0,6±0,4	+36,4±1,4	5,44±0,05	9,63±0,02
CPTX-PL	221.9±0,6	0,5±0,4	+36,6±1,4	5,80±0,00	-
CPTX-05	222.3±0,2	0,6±0,3	+37,5±0,7	5,19±0,06	4,66±0,06
CPTX-10	345.6±0,1	0,7±0,2	+33,4±2,1	5,30±0,04	8,18±0,04
3. Ay Analizleri (25°C±2°C)	PB (nm)	PdI	ZP (mV)	pH	Toplam PTX (% a/a)
KPTX-PL	245.8±1.5	0,4±0,2	-12,5±0,2	6,12±0,01	-
KPTX-05	265.1±2.3	0,5±0,3	-14,1±0,6	6,04±0,06	5,12±0,03
KPTX-10	278.4±1.6	0,5±0,4	-16,2±3,2	5,84±0,03	9,51±0,02
CCKPTX-PL	370,4±3.2	0,6±0,1	+21,5±2,5	5,75±0,04	-
CCKPTX-05	386.1±2.4	0,3±0,8	+27,4±0,1	5,54±0,10	4,95±0,06
CCKPTX-10	415.2±1.7	0,5±0,3	+28,1±1,6	5,37±0,04	9,47±0,01
CPTX-PL	314.8±1.3	0,6±0,7	+29,6±2,2	5,71±0,02	-
CPTX-05	345.7±3.6	0,5±0,5	+31,4±1,4	5,20±0,01	4,54±0,03
CPTX-10	375.4±4.2	0,6±0,2	+32,6±2,1	5,27±0,02	8,02±0,01

Çizelge 5.11. (Devam) Hazırlanan formülasyonların hızlandırılmış kararlılık çalışmaları sonucunda elde edilen parçacık büyüklüğü (PB), polidisperslik indisi (PdI), zeta potansiyel (ZP), pH ve etkin madde miktar tayini analiz sonuçları (25°C±2°C %60±5 RN, n=3, Ortalama±SH)

6. Ay Analizleri (25°C±2°C)	PB (nm)	PdI	ZP (mV)	pH	Toplam PTX (% a/a)
KPTX-PL	254,1±3,6	0,6±0,1	-14,5±1,4	5,75±0,02	-
KPTX-05	312,2±1,2	0,5±0,3	-13,8±2,5	5,71±0,05	4,94±0,02
KPTX-10	290,8±0,9	0,6±0,4	-18,4±0,6	5,55±0,01	9,34±0,06
CCKPTX-PL	384,2±1,8	0,6±0,1	+22,1±1,2	5,73±0,04	-
CCKPTX-05	392,4±2,2	0,5±0,6	+24,6±0,2	5,32±0,01	4,92±0,04
CCKPTX-10	410,1±0,8	0,6±0,2	+26,7±1,4	5,51±0,08	9,42±0,02
CPTX-PL	340,8±1,4	0,5±0,4	+30,2±1,5	5,56±0,04	-
CPTX-05	388,6±2,3	0,6±0,1	+30,5±0,2	5,16±0,06	4,41±0,03
CPTX-10	421,0±4,2	0,7±0,3	+31,3±0,6	5,24±0,05	7,95±0,01

En önemli kararlılık parametresi olarak iki farklı ortamda 6 ay süresince saklanan formülasyonların PTX miktarlarındaki değişimin belirlenmesi amacı ile miktar tayin analizleri gerçekleştirilmiş ve $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan KPTX-05 ve KPTX-10 formülasyonlarının %5,06 ve %9,63 olan başlangıç PTX miktarları 6. ay sonunda sırası ile %5,04 ve %9,57 değerinde bulunurken, $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve %60 $\pm$ %5'lik ortamda saklanan formülasyonlardaki PTX miktarları %4,94 ve %9,34 olarak bulunmuş ve anlamlı bir farkın oluşmadığı gözlenmiştir ($p < 0,005$) (Çizelge 5.10. ve Çizelge 5.11.).

$5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan CCKPTX-05 ve CCKPTX-10 formülasyonlarının başlangıç PTX konsantrasyonları sırası ile %5,06 ve %9,63 iken, 6. ay sonundaki PTX miktarları sırası ile %5,01 ve %9,52; $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve %60 $\pm$ %5 rölatif nem ortamında saklanan formülasyonlardaki PTX miktarları ise %4,92 ve %9,42 olarak bulunmuştur. Analiz sonuçları değerlendirildiğinde kitosan ile kaplamanın etkin maddenin kararlılığı üzerinde olumlu etki oluşturduğu ve 6 ay saklama süresi sonunda kayda değer bir değişikliğin oluşmadığı sonucuna varılmıştır ($p > 0,005$) (Çizelge 5.10. ve Çizelge 5.11.).

Başlangıçta CPTX-05 ve CPTX-10 formülasyonlarının PTX değerleri sırası ile %4,66 ve %9,55 iken; $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formülasyonların 6. ay sonundaki PTX miktarları sırası ile %4,55 ve %8,03 değerinde bulunurken, $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve %60 $\pm$ %5 rölatif nem ortamında saklanan formülasyonlardaki PTX miktarları %4,41 ve %7,95 olarak analiz edilmiş ve özellikle $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve %60 $\pm$ %5 rölatif nem ortamında saklanan formülasyonlarda anlamlı farklar gözlenmiştir ($p < 0,005$) (Çizelge 5.10. ve Çizelge 5.11.).

Analiz sonuçları değerlendirildiğinde hızlandırılmış kararlılık çalışmalarında nanopartiküllerde gözlenen PTX kaybının %5'ten az olması nedeni ile hazırlanan tüm formülasyonların her iki saklama koşulunda da kararlı oldukları sonucuna varılmıştır (Çizelge 5.10. ve Çizelge 5.11.) (ICH-Q1A- R2, 2003).

Polimerik yapıdaki olası değişiklikler ise 6. ay sonunda gerçekleştirilen DSC (Şekil 5.33.), XRD (Şekil 5.34.), analizleri ile değerlendirilmiştir (Sarmiento vd., 2006; Ingham, 2015).

DSC analiz sonuçları değerlendirildiğinde saklama süresi boyunca polimerik yapılarda herhangi bir değişiklik olmamış ve amorf yapılarını korumuşlardır. Ayrıca PTX'e ait herhangi bir pik de ortaya çıkmamıştır. Analiz sonuçları PTX'in polimer matris içinde her iki koşulda da kristal hale dönüşmeden kaldığını ve polimerik ağ içersinde moleküler halde dağılmış halde bulunduğunu göstermiştir (Şekil 5.33.).

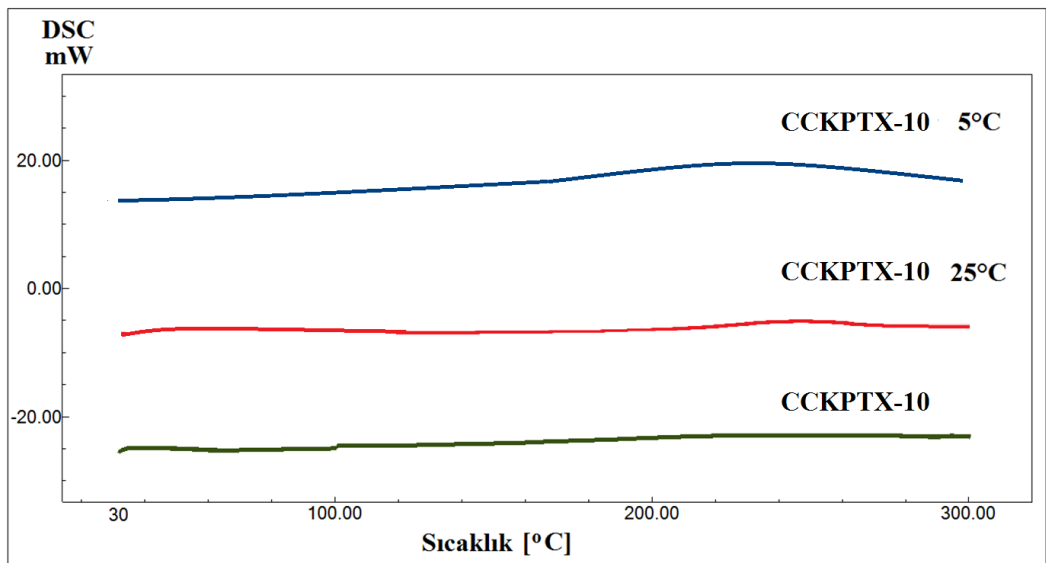
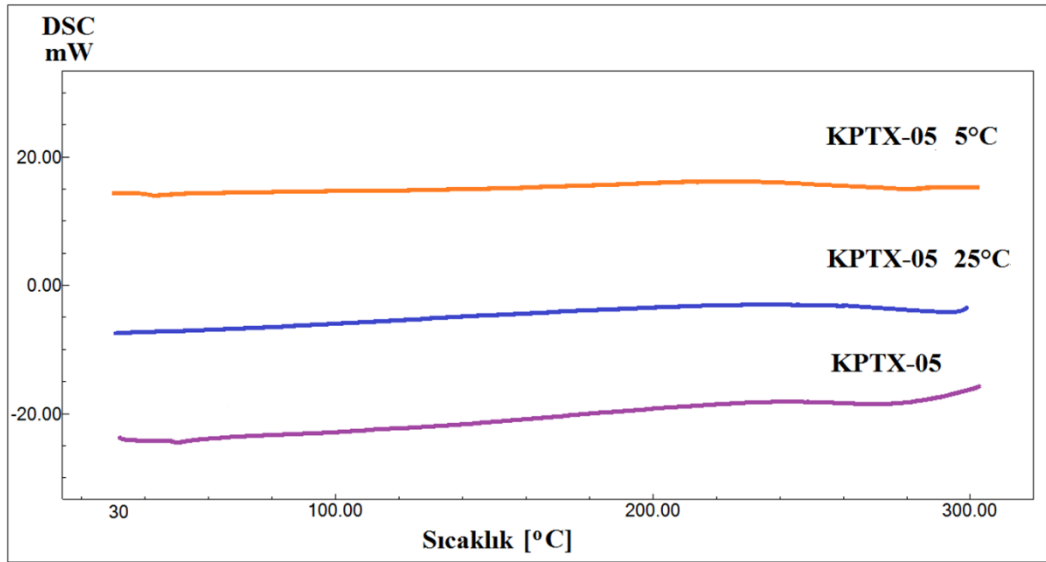
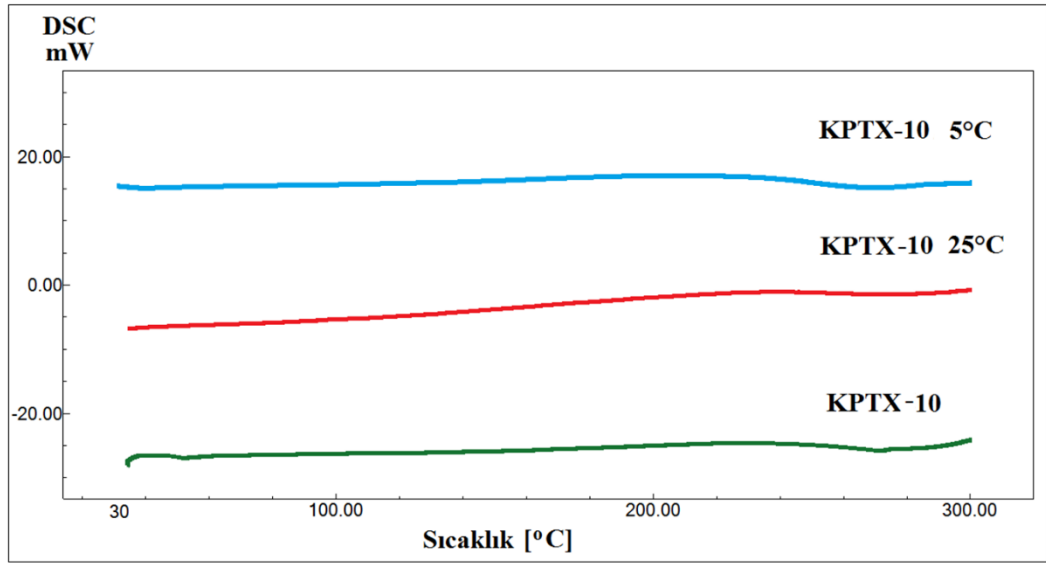
XRD analiz sonuçları da DSC analiz sonuçlarını destekleyen sonuçlar ortaya koymuştur. Elde edilen diffraktogramlarda kristal yapılara ait herhangi bir sinyal elde edilmemiş ve nanopartiküllerin saklama süresi boyunca amorf yapılarını korudukları belirlenmiştir. Diffraktogramlarda PTX'e ait herhangi bir sinyalin elde edilmemesi PTX'in nanopartikülün dışına atılmadığını ve polimer matris içinde moleküler halde dağılmış halde bulunduğunu göstermiştir (Şekil 5.34.).

Kararlılık çalışmalarında gerçekleştirilen tüm analizler değerlendirildiğinde hazırlanan tüm formülasyonların $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ve $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ - $\%60 \pm \%5$ rölatif neme sahip ortamlarda 6 ay süresince kararlı oldukları sonucuna varılmıştır.

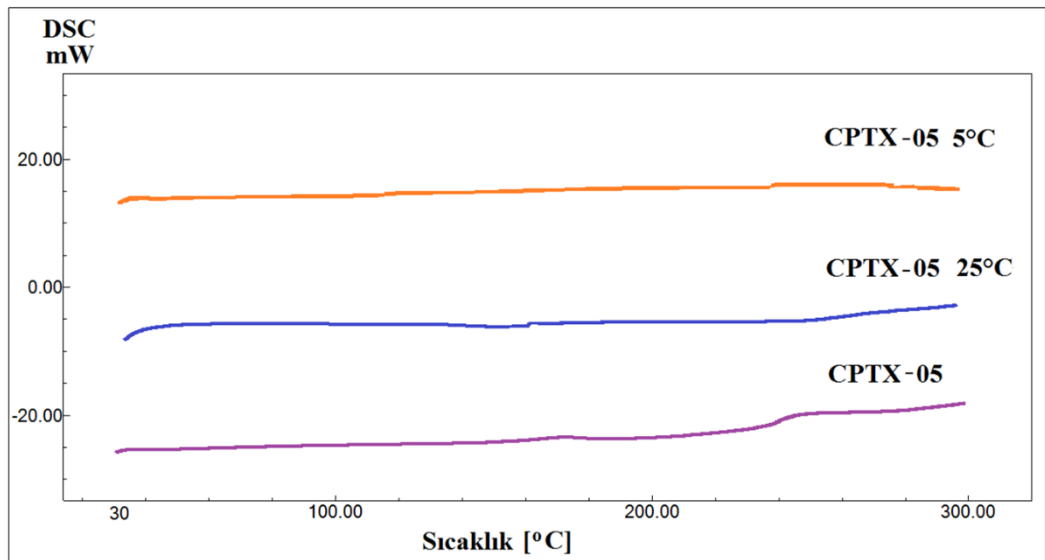
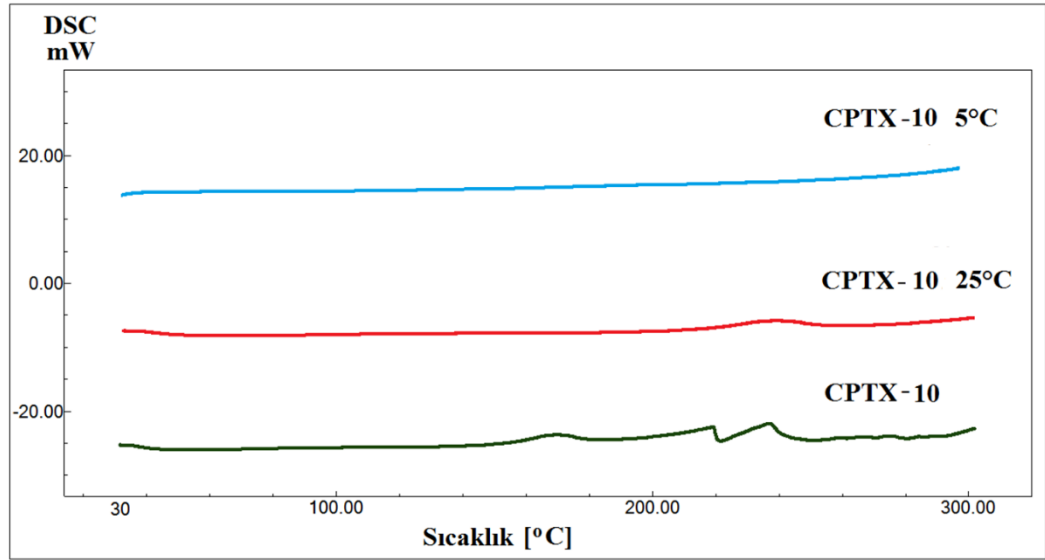
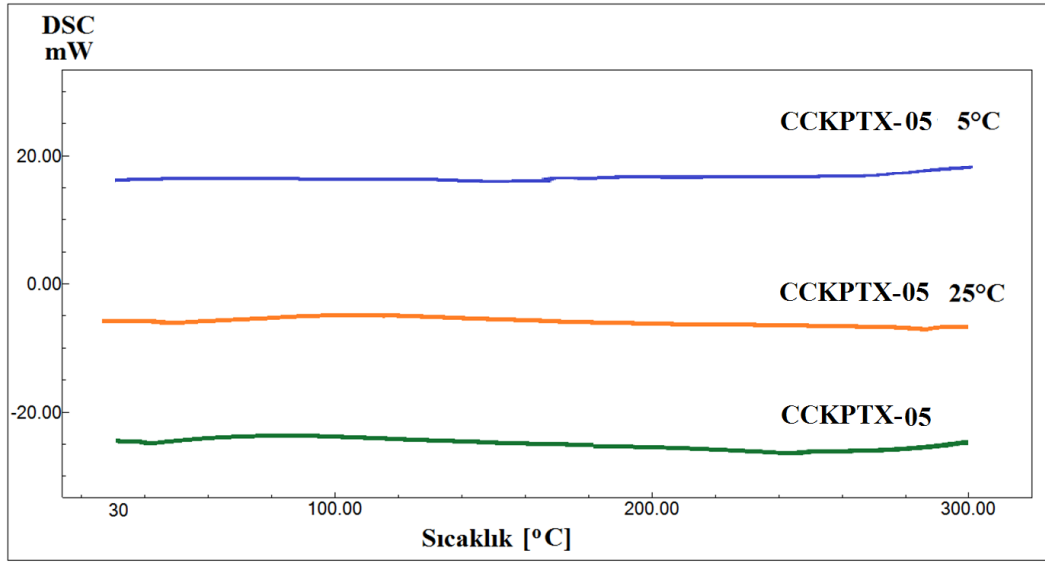
6. SONUÇ

Tez çalışmasında kanser tedavisinde kullanılmak üzere Kollidon® SR ve Kitosan polimerleri ile PTX içeren polimerik nanopartiküller püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlanmıştır. Elde edilen partiküllerin karakterizasyon çalışmaları parçacık büyüklüğü, parçacık büyüklüğü dağılımı, zeta potansiyel, pH, miktar tayini, DSC, XRD, FT-IR ve ¹H-NMR analizleri ve hücre kültürü çalışmaları ile detaylı olarak incelenmiştir. Hazırlanan formülasyonların uzun süreli kararlılık çalışmaları 5°C ± 3°C ve hızlandırılmış kararlılık çalışmaları ise 25°C ± 2°C - %60 ± %5 rölatif neme sahip ortamlarda 6 ay süresince analiz edilmiştir.

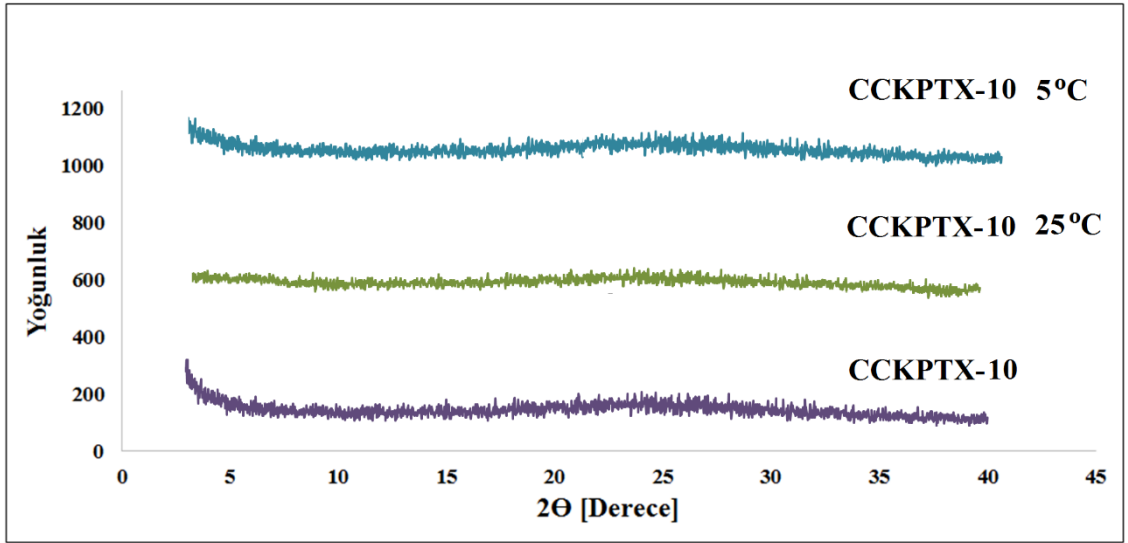
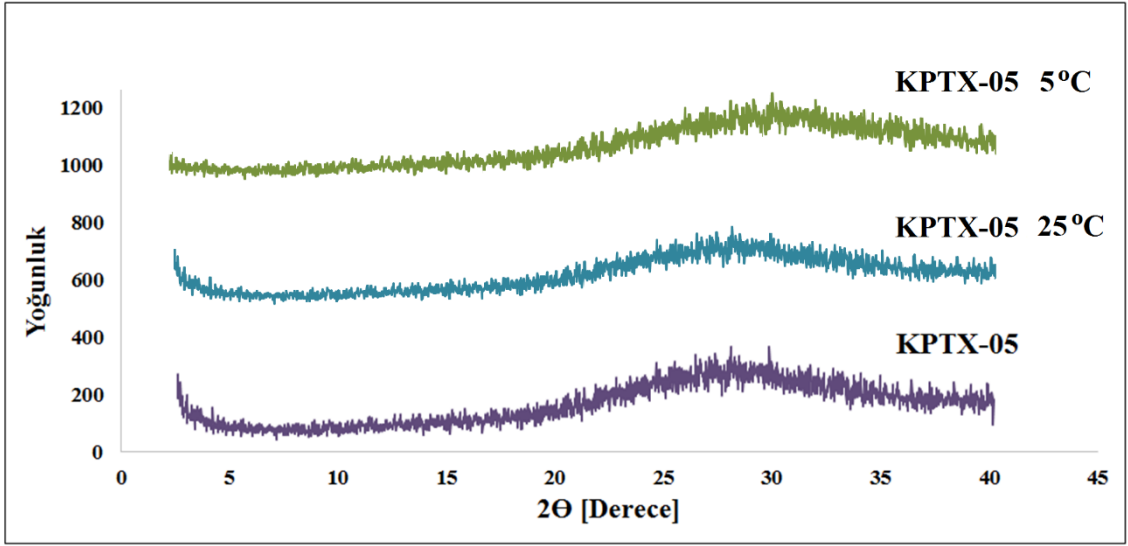
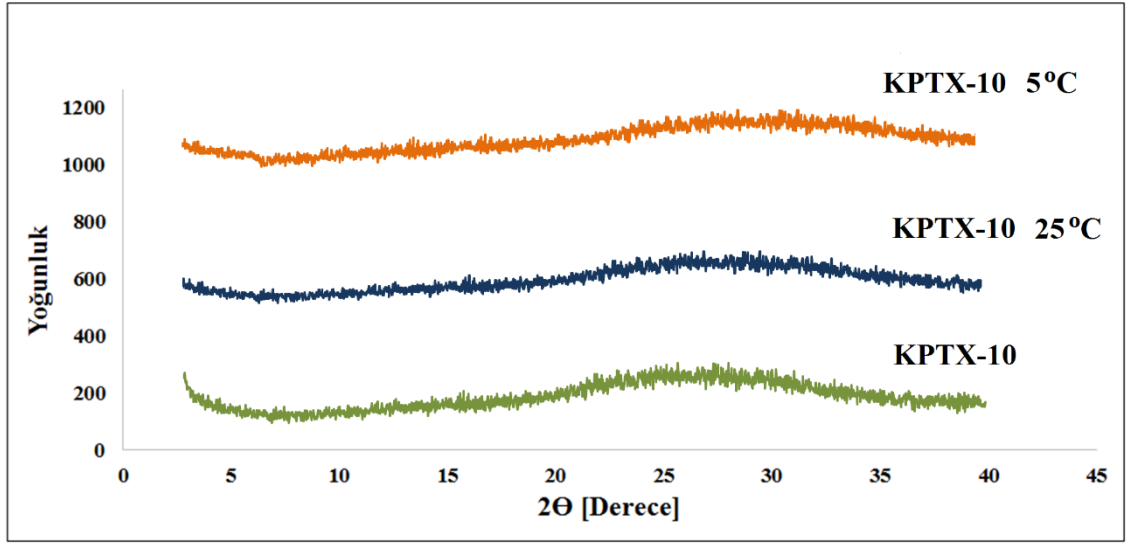
Elde edilen veriler nanopartiküllerin başarı ile hazırlandığını ve 6 ay süresince her iki saklama ortamında kararlılıklarını başarı ile koruduklarını göstermiştir. Hücre kültürü analiz sonuçları da değerlendirildiğinde tüm formülasyonlar kanser tedavisinde kullanılabilecek umut vaad eden sistemler olarak değerlendirilmiştir.



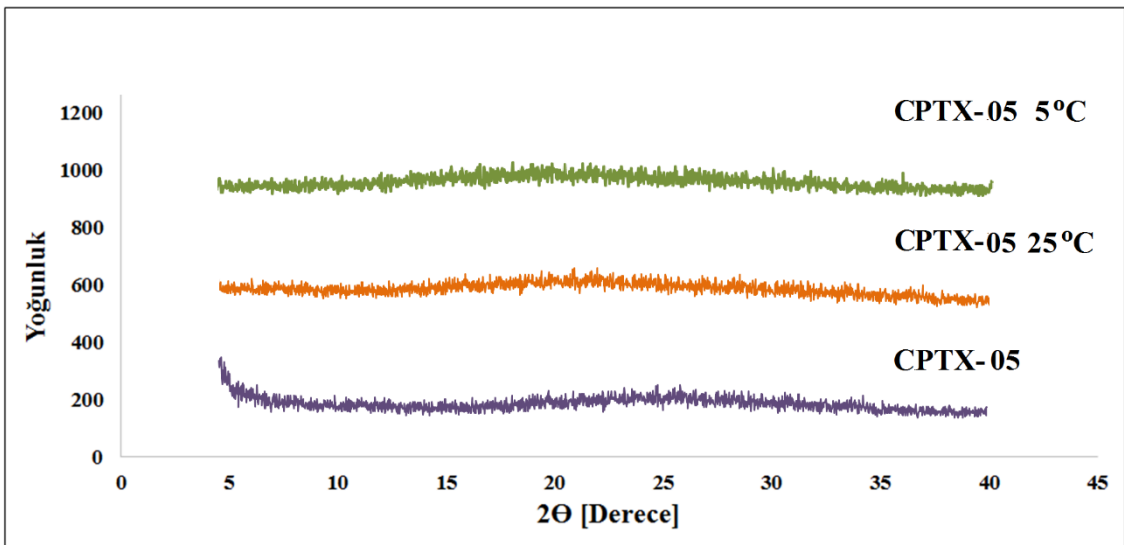
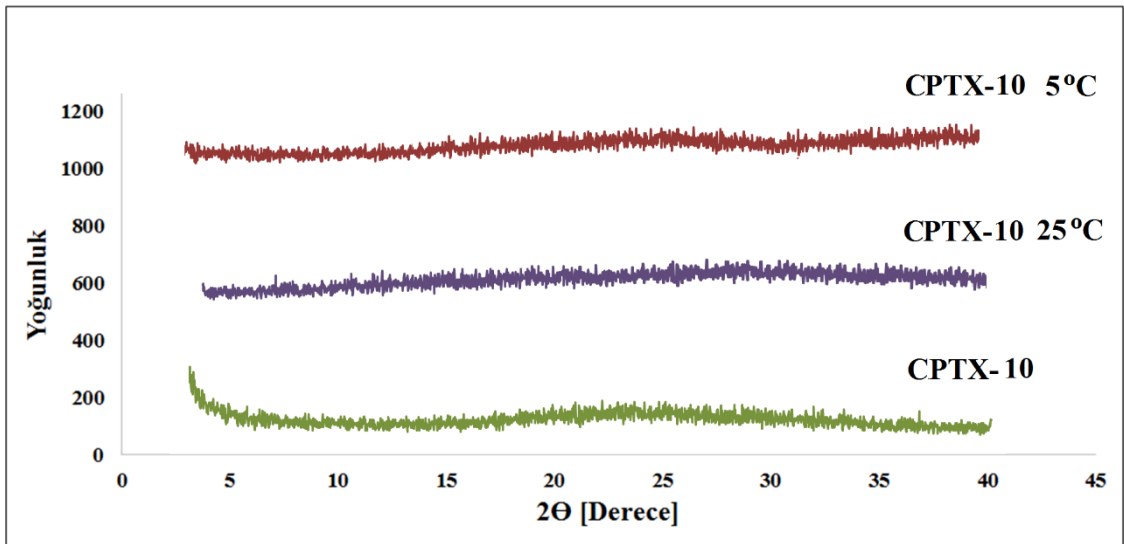
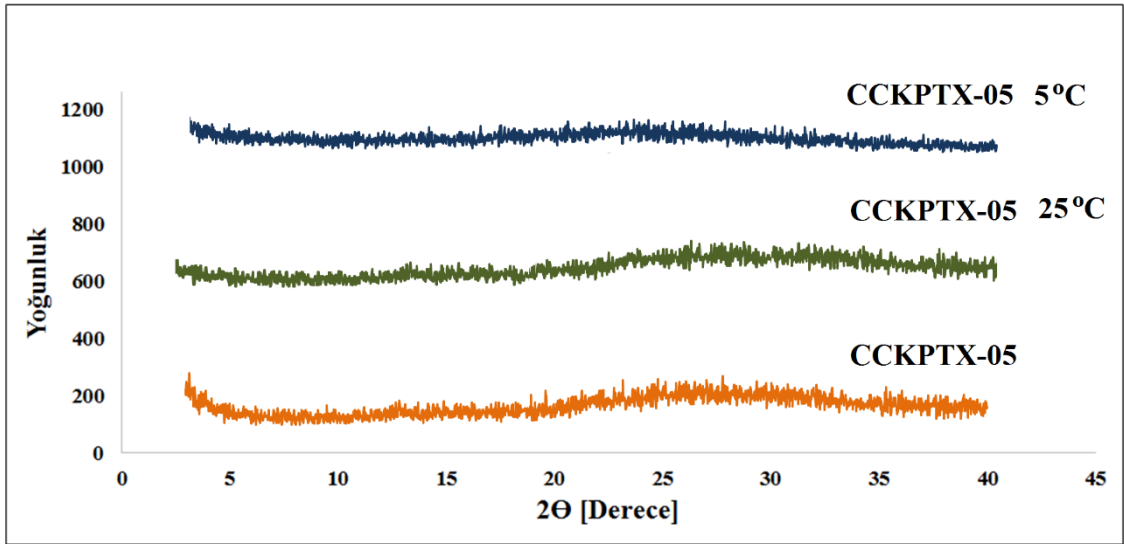
Şekil 5.33. Hazırlanan nanopartiküllerin 6. ay termal analiz sonuçları



Şekil 5.33. (Devam) Hazırlanan nanopartiküllerin 6. ay termal analiz sonuçları



Şekil 5.34. Hazırlanan nanopartiküllerin 6. ay X-ışını kırınım analiz sonuçları



Şekil 5.34. (Devam) Hazırlanan nanopartiküllerin 6. ay X-ışını kırınım analiz sonuçları

KAYNAKÇA

- Abriata, J. P., Turatti, R. C., Luiz, M. T., Raspantini, G. L., Tofani, L. B., do Amaral, R. L. F., ... & Marchetti, J. M. (2019). Development, characterization and biological in vitro assays of paclitaxel-loaded PCL polymeric nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 96, 347-355.
- Akgün, Ş., Küçüksayan, H., & Akça, H. (2018) Tümör Baskılayıcı Genler. *Research Gate*. 12. 151-160.
- Akın T.(2009). *Rektum ve Rektosigmoid Kanserlerin Tedavisinde Laparoskopik Cerrahinin Periooeratif ve Erken Dönem Onkolojik Sonuçları ile Yaşam Kalitesine Etkisi*.Uzmanlık tezi. İstanbul: Dr. Lütfü Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi.
- Al-Heibshy, F. N., BAŞARAN, E., & DEMİREL, M. (2016). Studies on Rosuvastatin Calcium Incorporated Chitosan Salt Nanoparticles. *Latin American Journal of Pharmacy*, 35(1), 1065-1076.
- Araki, T., Kono, Y., Ogawara, K. I., Watanabe, T., Ono, T., Kimura, T., & Higaki, K. (2012). Formulation and evaluation of paclitaxel-loaded polymeric nanoparticles composed of polyethylene glycol and polylactic acid block copolymer. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35(8), 1306-1313.
- Arıncı, K., & Elhan, A. (1997). *Anatomi 1. Cilt*. Ankara :Güneş Kitabevi.
- Arpagaus, C., Collenberg, A., Rützi, D., Assadpour, E., & Jafari, S. M. (2018). Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, 546(1-2), 194-214.
- Attama, A. A., Schicke, B. C., Paepenmüller, T., & Müller-Goymann, C. C. (2007). Solid lipid nanodispersions containing mixed lipid core and a polar heterolipid: characterization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67(1), 48-57.
- Badea, I., Ciutaru, D., Lazar, L., Nicolescu, D., & Tudose, A. (2004). Rapid HPLC method for the determination of paclitaxel in pharmaceutical forms without separation. *Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 34(3), 501-507.

- Balcerzak, J., & Mucha, M. (2010). Analysis of model drug release kinetics from complex matrices of polylactide-chitosan. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, 15, 117-126.
- Banfalvi, G. (2014). *Homeostasis-tumor-metastasis*. Springer Netherlands.
- Başaran, E. (2017). Ocular Application of Dirithromycin Incorporated Polymeric Nanoparticles: an In Vitro Evaluation. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(2).
- Başaran, E., Demirel, M., Sirmagül, B., & Yazan, Y. (2010). Cyclosporine-A incorporated cationic solid lipid nanoparticles for ocular delivery. *Journal of Microencapsulation*, 27(1), 37-47.
- Başaran, E., Demirel, M., Sirmagül, B., & Yazan, Y. (2011). Polymeric cyclosporine-A nanoparticles for ocular application. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 7(5), 714-723.
- Başaran, E., & Yazan, Y. (2012). Ocular application of chitosan. *Expert opinion on drug delivery*, 9(6), 701-712.
- Başaran, E., Yenilmez, E., Berkman, M. S., Büyükköroğlu, G., & Yazan, Y. (2014). Chitosan nanoparticles for ocular delivery of cyclosporine A. *Journal of Microencapsulation*, 31(1), 49-57.
- Başaran, E., Gencer, H. K., Yenilmez, E., & Guven, U. M. (2017). Voriconazole Incorporated Polymeric Nanoparticles for Ocular Application. *Latin American Journal of Pharmacy*, 36(10), 1983-1994.
- Baykara O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5 (3) , 154-165
- Betancourt, T., Doiron, A., & Brannon-Peppas, L. (2006). Polymeric Nanoparticles for Tumor-Targeted Drug Delivery. M. Amiji (Ed.), *In Nanotechnology for Cancer Therapy* içinde (s. 226-240). ABD; CRC Press.
- Bhavsar, M. D., Shenoy, D. B., & Amiji, M. M. (2006). Polymeric nanoparticles for delivery in the gastro-intestinal tract. V.Torchilin. (Ed.) *Nanoparticulates as Drug Carriers* içinde (s. 609-649). London; Imperial College Press.
- Bismuth, H., Adam, R., Lévi, F., Farabos, C., Waechter, F., Castaing, D., ... & Engerran, L. (1996). Resection of nonresectable liver metastases from colorectal cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Annals of surgery*, 224(4), 509.

- Blinman, P., King, M., Norman, R., Viney, R., & Stockler, M. R. (2012). Preferences for cancer treatments: an overview of methods and applications in oncology. *Annals of Oncology*, 23(5), 1104-1110.
- Bruschi, M. L. (2015). Mathematical models of drug release. M. L. Bruschi (Ed.), *Strategies To Modify The Drug Release From Pharmaceutical Systems* içinde (s. 63-86), Birleşik Krallık: Woodhead Publishing.
- Boulanger, J., Boursiquot, J. N., Cournoyer, G., Lemieux, J., Masse, M. S., Almanric, K., ... & Comité de l'évolution des pratiques en oncologie. (2014). Management of hypersensitivity to platinum-and taxane-based chemotherapy: ceo review and clinical recommendations. *Current Oncology*, 21(4), 630.
- Bu, L. L., Yan, J., Wang, Z., Ruan, H., Chen, Q., Gunadhi, V., ... & Gu, Z. (2019). Advances in drug delivery for post-surgical cancer treatment. *Biomaterials*.
- Chen, L., Mei, L., Feng, D., Huang, D., Tong, X., Pan, X., ... & Wu, C. (2018). Anhydrous reverse micelle lecithin nanoparticles/PLGA composite microspheres for long-term protein delivery with reduced initial burst. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 163, 146-154.
- Chen, W., Shen, Y., Rong, H., Lei, L., & Guo, S. (2012). Development and application of a validated gradient elution HPLC method for simultaneous determination of 5-fluorouracil and paclitaxel in dissolution samples of 5-fluorouracil/paclitaxel-co-eluting stents. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 59, 179-183.
- Cho, E. J., Holback, H., Liu, K. C., Abouelmagd, S. A., Park, J., & Yeo, Y. (2013). Nanoparticle characterization: state of the art, challenges, and emerging technologies. *Molecular Pharmaceutics*, 10(6), 2093-2110.
- Choi, J. S., Cho, N. H., Kim, D. H., & Park, J. S. (2019). Comparison of paclitaxel solid dispersion and polymeric micelles for improved oral bioavailability and in vitro anti-cancer effects. *Materials Science and Engineering: C*. 100, 247–259.
- Choudhury, H., Gorain, B., Pandey, M., Kaur, R., & Kesharwani, P. (2019). Strategizing biodegradable polymeric nanoparticles to cross the biological barriers for cancer targeting. *International Journal of Pharmaceutics*. 565, 509-522.
- Chowdhury, P., Nagesh, P. K., Hatami, E., Wagh, S., Dan, N., Tripathi, M. K., ... & Jaggi, M. (2019). Tannic acid-inspired paclitaxel nanoparticles for enhanced anticancer

- effects in breast cancer cells. *Journal of Colloid and Interface Science*, 535, 133-148.
- Chung, D. C., & Rustgi, A. K. (1995). DNA mismatch repair and cancer. *Gastroenterology*, 109(5), 1685-1699.
- Cosco, D., Mare, R., Paolino, D., Salvatici, M. C., Cilurzo, F., & Fresta, M. (2019). Sclareol-loaded hyaluronan-coated PLGA nanoparticles: Physico-chemical properties and in vitro anticancer features. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132, 550-557.
- Croce, C. M. (2008). Oncogenes and cancer. *New England Journal of Medicine*, 358(5), 502-511.
- Crucho, C. I., & Barros, M. T. (2017). Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science and Engineering: C*, 80, 771-784.
- Cryer, A. M., & Thorley, A. J. (2019). Nanotechnology in the diagnosis and treatment of lung cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 198, 189-205.
- Das, P. J., Paul, P., Mukherjee, B., Mazumder, B., Mondal, L., Baishya, R., ... & Dey, K. S. (2015). Pulmonary delivery of voriconazole loaded nanoparticles providing a prolonged drug level in lungs: a promise for treating fungal infection. *Molecular Pharmaceutics*, 12(8), 2651-2664.
- Das, S., & Chaudhury, A. (2011). Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. *Aaps Pharmscitech*, 12(1), 62-76.
- Davoodi, P., Lee, L. Y., Xu, Q., Sunil, V., Sun, Y., Soh, S., & Wang, C. H. (2018). Drug delivery systems for programmed and on-demand release. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 132, 104-138.
- Devaraj, P., Kumari, P., Aarti, C., & Renganathan, A. (2013). Synthesis and characterization of silver nanoparticles using cannonball leaves and their cytotoxic activity against MCF-7 cell line. *Journal of Nanotechnology*, 2013, 1-5.
- Ding, D., Sun, B., Cui, W., Chen, Q., Zhang, X., Zhang, H., ... & Luo, C. (2018). Integration of phospholipid-drug complex into self-nanoemulsifying drug delivery system to facilitate oral delivery of paclitaxel. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*.

- Domínguez-Ríos, R., Sánchez-Ramírez, D. R., Ruiz-Saray, K., Oceguera-Basurto, P. E., Almada, M., Juárez, J., ... & Daneri-Navarro, A. (2019). Cisplatin-loaded PLGA nanoparticles for HER2 targeted ovarian cancer therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 178, 199-207.
- Dong, W., Wang, X., Liu, C., Zhang, X., Zhang, X., Chen, X., ... & Mao, S. (2018). Chitosan based polymer-lipid hybrid nanoparticles for oral delivery of enoxaparin. *International Journal of Pharmaceutics*, 547(1-2), 499-505.
- Erdemoğlu, N., & Şener, B. (2000). Taksan sınıfı bileşiklerin antitümör etkileri. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 29(1), 77-90.
- Escalona-Rayo, O., Fuentes-Vázquez, P., Jardon-Xicotencatl, S., García-Tovar, C. G., Mendoza-Elvira, S., & Quintanar-Guerrero, D. (2019). Rapamycin-loaded polysorbate 80-coated PLGA nanoparticles: Optimization of formulation variables and in vitro anti-glioma assessment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 52, 488-499.
- Ettarh, R., Cullen, A., & Calamai, A. (2010). NSAIDs and cell proliferation in colorectal cancer. *Pharmaceutics*, 3(7), 2007-2021.
- Ezrahi, S., Aserin, A., & Garti, N. (2019). Basic principles of drug delivery and microemulsions—the case of paclitaxel. *Advances In Colloid and Interface Science*. 263. 95–130.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., ... & Bray, F. (2012). Cancer incidence and mortality worldwide: *IARC CancerBase. GLOBOCAN 2012* v10, 11.
- Fonte, P., Reis, S., & Sarmiento, B. (2016). Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 225, 75-86.
- Freitas, C., & Müller, R. H. (1998). Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*, 168(2), 221-229.
- Gharieh, A., Khoei, S., & Mahdavian, A. R. (2019). Emulsion and miniemulsion techniques in preparation of polymer nanoparticles with versatile characteristics. *Advances In Colloid and Interface Science*. 269, 152-186.

- Glitsch, M. (2019). Mechano-and pH-sensing convergence on Ca^{2+} -mobilising proteins—a recipe for cancer?. *Cell Calcium*, 80, 30-45.
- Guideline, I. H. T. (2003). Stability testing of new drug substances and products. *Q1A (R2)*, current step, 4, 1-24.
- Gupte, A., & Ciftci, K. (2004). Formulation and characterization of Paclitaxel, 5-FU and Paclitaxel+ 5-FU microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 276(1-2), 93-106.
- Gültekin, M., & Boztaş, G. (2014). Türkiye kanser istatistikleri. Sağlık Bakanlığı, *Türkiye Halk Sağlığı Kurumu*, 43.
- Güven, U. M., & Yenilmez, E. (2019). Olopatadine hydrochloride loaded Kollidon® SR nanoparticles for ocular delivery: Nanosuspension formulation and in vitro–in vivo evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51, 506-512.
- Ha, M., Thiessen, A. N., Sergeyev, I. V., Veinot, J. G., & Michaelis, V. K. (2019). Endogenous dynamic nuclear polarization NMR of hydride-terminated silicon nanoparticles. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, 100, 77-84.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Hu, Q., Bae, M., Fleming, E., Lee, J. Y., & Luo, Y. (2019). Biocompatible polymeric nanoparticles with exceptional gastrointestinal stability as oral delivery vehicles for lipophilic bioactives. *Food Hydrocolloids*, 89, 386-395.
- Ingham, B. (2015). X-ray scattering characterisation of nanoparticles. *Crystallography Reviews*, 21(4), 229-303.
- Jain, V., Jain, S., & Mahajan, S. C. (2015). Nanomedicines based drug delivery systems for anti-cancer targeting and treatment. *Current Drug Delivery*, 12(2), 177-191.
- Jin, C., Bai, L., Wu, H., Tian, F., & Guo, G. (2007). Radiosensitization of paclitaxel, etanidazole and paclitaxel+ etanidazole nanoparticles on hypoxic human tumor cells in vitro. *Biomaterials*, 28(25), 3724-3730.
- Joerger, M. (2012). Prevention and handling of acute allergic and infusion reactions in oncology. *Annals of Oncology*. 23 (10), 313–319.
- Jog, R., & Burgess, D. J. (2017). Pharmaceutical amorphous nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106(1), 39-65.
- John, M., Hinke, A., Stauch, M., Wolf, H., Mohr, B., Hindenburg, H. J., ... & Schlosser, J. (2012). Weekly paclitaxel plus trastuzumab in metastatic breast cancer

- pretreated with anthracyclines-a phase II multipractice study. *BioMed Central Cancer*, 12(1), 165.
- Kalyane, D., Raval, N., Maheshwari, R., Tambe, V., Kalia, K., & Tekade, R. K. (2019). Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): Nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer. *Materials Science and Engineering: C*, 98, 1252–1276.
- Kang, B. K., Chon, S. K., Kim, S. H., Jeong, S. Y., Kim, M. S., Cho, S. H., ... & Khang, G. (2004). Controlled release of paclitaxel from microemulsion containing PLGA and evaluation of anti-tumor activity in vitro and in vivo. *International Journal of Pharmaceutics*, 286(1-2), 147-156
- Katas, H., & Alpar, H. O. (2006). Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 115(2), 216-225.
- Kean, T., & Thanou, M. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1), 3-11.
- Kefayat, A., & Vaezifar, S. (2019). Biodegradable PLGA implants containing doxorubicin-loaded chitosan nanoparticles for treatment of breast tumor-bearing mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 48–56.
- Khalid, M., & El-Sawy, H. S. (2017). Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 528(1-2), 675-691.
- Kim, S. C., Yu, J., Lee, J. W., Park, E. S., & Chi, S. C. (2005). Sensitive HPLC method for quantitation of paclitaxel (Genexol®) in biological samples with application to preclinical pharmacokinetics and biodistribution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39(1-2), 170-176.
- Kinoshita, R., Ishima, Y., Chuang, V. T., Nakamura, H., Fang, J., Watanabe, H., ... & Otagiri, M. (2017). Improved anticancer effects of albumin-bound paclitaxel nanoparticle via augmentation of EPR effect and albumin-protein interactions using S-nitrosated human serum albumin dimer. *Biomaterials*, 140, 162-169.
- Kommareddy, S., Shenoy, D. B., & Amiji, M. M. (2007). Long-Circulating Polymeric Nanoparticles for Drug and Gene Delivery to Tumors. M. Amiji (Ed.), *In Nanotechnology for Cancer Therapy* içinde (s. 231-242). ABD; CRC Press.

- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., & Aster, J. C. (2014). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. (professional 9th edition e-book). Canada: Elsevier health sciences.
- Kumar, V. D., Verma, P. R. P., & Singh, S. K. (2015). Development and evaluation of biodegradable polymeric nanoparticles for the effective delivery of quercetin using a quality by design approach. *LWT-Food Science and Technology*, 61(2), 330-338.
- Küçükzeybek, Y., Bolat Küçükzeybek, B., & Demir, C. (2010). HER2 Pozitif Metastatik Meme Kanserlerinde Trastuzumab İçeren Kemoterapi İle Progresyon Sonrasında Tedavi Seçenekleri. *Van Tıp Dergisi*, 17(4), 164-169.
- Langer, R. S., & Peppas, N. A. (1983). Chemical and physical structure of polymers as carriers for controlled release of bioactive agents: A review. *Journal of Macromolecular Science – Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics*, C23(1), 61–126
- Learoyd, T. P., Burrows, J. L., French, E., & Seville, P. C. (2008). Chitosan-based spray-dried respirable powders for sustained delivery of terbutaline sulfate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68(2), 224-234.
- Li, Y., Wong, H. L., Shuhendler, A. J., Rauth, A. M., & Wu, X. Y. (2008). Molecular interactions, internal structure and drug release kinetics of rationally developed polymer–lipid hybrid nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 128(1), 60-70.
- Liu, J., Meisner, D., Kwong, E., Wu, X. Y., & Johnston, M. R. (2009). Translymphatic chemotherapy by intrapleural placement of gelatin sponge containing biodegradable paclitaxel colloids controls lymphatic metastasis in lung cancer. *Cancer Research*, 69(3), 1174-1181.
- Liu, J., Meisner, D., Kwong, E., Wu, X. Y., & Johnston, M. R. (2007). A novel trans-lymphatic drug delivery system: implantable gelatin sponge impregnated with PLGA–paclitaxel microspheres. *Biomaterials*, 28(21), 3236-3244.
- Liu, Y., Ng, Y., Toh, M. R., & Chiu, G. N. (2015). Lipid-dendrimer hybrid nanosystem as a novel delivery system for paclitaxel to treat ovarian cancer. *Journal of Controlled Release*, 220, 438-446.
- Liu, Y., Gao, S., Chen, X., Liu, M., Mao, C., & Fang, X. (2016). Overexpression of miR-203 sensitizes paclitaxel (Taxol)-resistant colorectal cancer cells through

- targeting the salt-inducible kinase 2 (SIK2). *Tumor Biology*, 37(9), 12231-12239.
- Liu, L., Yin, L., Bian, H., & Zhang, N. (2019). Polymeric nanoparticles of poly (2-oxazoline), tannic acid and doxorubicin for controlled release and cancer treatment. *Chinese Chemical Letters*.
- Mamounas, E. P., Bryant, J., Lembersky, B., Fehrenbacher, L., Sedlacek, S. M., Fisher, B., ... & Wolmark, N. (2005). Paclitaxel after doxorubicin plus cyclophosphamide as adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: results from NSABP B-28. *Journal of Clinical Oncology*, 23(16), 3686-3696.
- Massey, A. E., Sikander, M., Chauhan, N., Kumari, S., Setua, S., Shetty, A. B., ... & Yallapu, M. M. (2019). Next-generation paclitaxel-nanoparticle formulation for pancreatic cancer treatment. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 102027.
- Mehata, A. K., Bharti, S., Singh, P., Viswanadh, M. K., Kumari, L., Agrawal, P., ... & Muthu, M. S. (2019). Trastuzumab decorated TPGS-g-chitosan nanoparticles for targeted breast cancer therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 173, 366-377.
- Mehta, M., Sharma, N., Vyas, M., Khurana, N., Maurya, P. K., Singh, H., ... & Wadhwa, R. (2019). Interactions with the macrophages: An emerging targeted approach using novel drug delivery systems in respiratory diseases. *Chemico-biological Interactions*.304, 10-19.
- Mircioiu, C., Voicu, V., Anuta, V., Tudose, A., Celia, C., Paolino, D., ... & Mircioiu, I. (2019). Mathematical Modeling of Release Kinetics from Supramolecular Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*, 11(3), 140.
- Misra, R., Sarkar, K., Lee, J., Pizzuti, V. J., Lee, D. S., Currie, M. P., ... & Elzey, B. D. (2019). Radioluminescent nanoparticles for radiation-controlled release of drugs. *Journal of Controlled Release*, 303, 237-252.
- Mori, N. M., Patel, P., Sheth, N. R., Rathod, L. V., & Ashara, K. C. (2017). Fabrication and characterization of film-forming voriconazole transdermal spray for the treatment of fungal infection. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 55(1), 41-51.

- Mottaghitlab, F., Farokhi, M., Fatahi, Y., Atyabi, F., & Dinarvand, R. (2019). New insights into designing hybrid nanoparticles for lung cancer: Diagnosis and treatment. *Journal of Controlled Release*, 295, 250-267.
- Mourdikoudis, S., Pallares, R. M., & Thanh, N. T. (2018). Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale*, 10(27), 12871-12934.
- Mu, L., & Feng, S. S. (2001). Fabrication, characterization and in vitro release of paclitaxel (Taxol®) loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by spray drying technique with lipid/cholesterol emulsifiers. *Journal of Controlled Release*, 76(3), 239-254.
- Muzzarelli, C., Stanic, V., Gobbi, L., Tosi, G., & Muzzarelli, R. A. (2004). Spray-drying of solutions containing chitosan together with polyuronans and characterisation of the microspheres. *Carbohydrate Polymers*, 57(1), 73-82.
- Naik, D. R., & Raval, J. P. (2016). Amorphous polymeric binary blend pH-responsive nanoparticles for dissolution enhancement of antiviral drug. *Journal of Saudi Chemical Society*, 20, 168-S177.
- Nguyen, H. T., Soe, Z. C., Yang, K. Y., Dai Phung, C., Nguyen, L. T. T., Jeong, J. H., ... & Kim, J. O. (2019). Transferrin-conjugated pH-sensitive platform for effective delivery of porous palladium nanoparticles and paclitaxel in cancer treatment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 176, 265-275.
- Oliveira, C. L., Veiga, F., Varela, C., Roleira, F., Tavares, E., Silveira, I., & Ribeiro, A. J. (2017). Characterization of polymeric nanoparticles for intravenous delivery: Focus on stability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 150, 326-333.
- Park, K. (2014). Controlled drug delivery systems: past forward and future back. *Journal of Controlled Release*, 190, 3-8.
- Pavlopoulou, A., Spandidos, D. A., & Michalopoulos, I. (2015). Human cancer databases. *Oncology reports*, 33(1), 3-18.
- Peng, X., Liu, P., Pang, B., Yao, Y., Wang, J., & Zhang, K. (2019). Facile fabrication of pH-responsive nanoparticles from cellulose derivatives via Schiff base formation for controlled release. *Carbohydrate Polymers*, 216, 113-118.
- Peppas, N. A., & Narasimhan, B. (2014). Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 190, 75-81.

- Pérez-Herrero, E., & Fernández-Medarde, A. (2015). Advanced targeted therapies in cancer: drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 93, 52-79.
- Perry MC.(2012) Approach to the patient with cancer. In: Goldman L, Schafer AI, eds. Goldman's Cecil Medicine. 24th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 1164-1177.
- Petros, R. A., & DeSimone, J. M. (2010). Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(8), 615.
- Pillai, O., & Panchagnula, R. (2001). Polymers in drug delivery. *Current Opinion In Chemical Biology*, 5(4), 447-451.
- Prasanna, A., Pooja, R., Suchithra, V., Ravikumar, A., Gupta, P. K., & Niranjana, V. (2018). Smart Drug Delivery Systems for Cancer Treatment Using Nanomaterials. *Materials Today: Proceedings*, 5(10), 21047-21054.
- Ramteke, K. H., Dighe, P. A., Kharat, A. R., & Patil, S. V. (2014). Mathematical models of drug dissolution: a review. *Scholars Academic Journal of Pharmacy*, 3(5), 388-396.
- Rivas, C. J. M., Tarhini, M., Badri, W., Miladi, K., Greige-Gerges, H., Nazari, Q. A., ... & Elaissari, A. (2017). Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 532(1), 66-81.
- Rowinsky, E. K., Eisenhauer, E. A., Chaudhry, V., Arbuck, S. G., & Donehower, R. C. (1993). Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol). *Seminars In Oncology*. 20(4), 1-15.
- Rychahou, P., Bae, Y., Reichel, D., Zaytseva, Y. Y., Lee, E. Y., Napier, D., ... & Evers, B. M. (2018). Colorectal cancer lung metastasis treatment with polymer–drug nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 275, 85-91.
- Sakai, M., Elhilali, M., & Papadopoulos, V. (2015). The gnRH antagonist degarelix directly inhibits benign prostate hyperplasia cell growth. *Hormone and Metabolic Research*, 47(12), 925-931.
- Sarcan, E. T., Silindir-Gunay, M., & Ozer, A. Y. (2018). Theranostic polymeric nanoparticles for nir imaging and photodynamic therapy. *International Journal of Pharmaceutics*. 551, 329–338.

- Sarmiento, B., Ferreira, D., Veiga, F., & Ribeiro, A. (2006). Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydrate Polymers*, 66(1), 1-7.
- Senapati, S., Mahanta, A. K., Kumar, S., & Maiti, P. (2018). Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 3(1), 7.
- Shaikh, H. K., Kshirsagar, R. V., & Patil, S. G. (2015). Mathematical models for drug release characterization: a review. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(4), 324-338.
- Sharma, R., Bisen, D. P., Shukla, U., & Sharma, B. G. (2012). X-ray diffraction: a powerful method of characterizing nanomaterials. *Recent Research in Science and Technology*, 4(8).
- Sharma, M., Sharma, R., Jain, D. K., & Saraf, A. (2019). Enhancement of oral bioavailability of poorly water soluble carvedilol by chitosan nanoparticles: Optimization and pharmacokinetic study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 246-260.
- Shekunov, B. Y., Chattopadhyay, P., Tong, H. H., & Chow, A. H. (2007). Particle size analysis in pharmaceuticals: principles, methods and applications. *Pharmaceutical Research*, 24(2), 203-227.
- Shu, Y., Yin, H., Rajabi, M., Li, H., Vieweger, M., Guo, S., ... & Guo, P. (2018). RNA-based micelles: A novel platform for paclitaxel loading and delivery. *Journal of Controlled Release*, 276, 17-29.
- Siepmann, J., & Peppas, N. A. (2012). Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 163-174.
- Song, X., Wang, J., Xu, Y., Shao, H., & Gu, J. (2019). Surface-modified PLGA nanoparticles with PEG/LA-chitosan for targeted delivery of arsenic trioxide for liver cancer treatment: Inhibition effects enhanced and side effects reduced. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 180, 110-117.
- Sonnichsen, D. S., & Relling, M. V. (1994). Clinical pharmacokinetics of paclitaxel. *Clinical Pharmacokinetics*, 27(4), 256-269.
- Strauss, G. M., Herndon, J. E., II, M. A. M., Johnstone, D. W., Johnson, E. A., Harpole, D. H., ... & Vokes, E. E. (2008). Adjuvant paclitaxel plus carboplatin compared

- with observation in stage IB non–small-cell lung cancer: CALGB 9633 with the Cancer and Leukemia Group B, Radiation Therapy Oncology Group, and North Central Cancer Treatment Group Study Groups. *Journal of Clinical Oncology*, 26(31), 5043.
- Sun, B., Taha, M. S., Ramsey, B., Torregrosa-Allen, S., Elzey, B. D., & Yeo, Y. (2016). Intraperitoneal chemotherapy of ovarian cancer by hydrogel depot of paclitaxel nanocrystals. *Journal of Controlled Release*, 235, 91-98.
- Swan, J., Breen, N., Coates, R. J., Rimer, B. K., & Lee, N. C. (2003). Progress in cancer screening practices in the United States: results from the 2000 National Health Interview Survey. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 97(6), 1528-1540.
- Swarbrick, J. (2013). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Boca Raton: CRC Press.
- Theochari, I., Goulielmaki, M., Danino, D., Papadimitriou, V., Pintzas, A., & Xenakis, A. (2017). Drug nanocarriers for cancer chemotherapy based on microemulsions: the case of Vemurafenib analog PLX4720. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 154, 350-356.
- Thiyagarajan, A., Saravanabhavan, S., & Thangarasu, V. (2019). Preparation and Biopharmaceutical Evaluation of Novel Polymeric Nanoparticles Containing Etoposide for Targeting Cancer Cells. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(2), 132-140.
- Uccello-Barretta, G., Balzano, F., Aiello, F., Senatore, A., Fabiano, A., & Zambito, Y. (2014). Mucoadhesivity and release properties of quaternary ammonium–chitosan conjugates and their nanoparticulate supramolecular aggregates: An NMR investigation. *International Journal of Pharmaceutics*, 461(1-2), 489-494.
- Vicente, J., Pinto, J., Menezes, J., & Gaspar, F. (2013). Fundamental analysis of particle formation in spray drying. *Powder Technology*, 247, 1-7.
- Vilar, G., Tulla-Puche, J., & Albericio, F. (2012). Polymers and drug delivery systems. *Current Drug Delivery*, 9(4), 367-394.
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, 10(8), 789.

- Voigt, N., Henrich-Noack, P., Kockentiedt, S., Hintz, W., Tomas, J., & Sabel, B. A. (2014). Toxicity of polymeric nanoparticles in vivo and in vitro. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(6), 2379.
- Wakaskar, R. R. (2017). Cancer therapy with drug delivery systems. *Journal of Pharmacogenomics and Pharmacoproteomics*, 8, 158.
- Wang, Y., Li, X., Wang, L., Xu, Y., Cheng, X., & Wei, P. (2011). Formulation and pharmacokinetic evaluation of a paclitaxel nanosuspension for intravenous delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 1497.
- Wang, Z., Ling, L., Du, Y., Yao, C., & Li, X. (2019). Reduction responsive liposomes based on paclitaxel-ss-lysophospholipid with high drug loading for intracellular delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 564, 244-255.
- Wolinsky, J. B., Colson, Y. L., & Grinstaff, M. W. (2012). Local drug delivery strategies for cancer treatment: gels, nanoparticles, polymeric films, rods, and wafers. *Journal of Controlled Release*, 159(1), 14-26.
- Xia, Q., Ling, L., Ismail, M., Du, Y., He, W., Zhou, W., ... & Li, X. (2019). Paclitaxel encapsulated in artesunate-phospholipid liposomes for combinatorial delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51, 372-382.
- Xia, X. J., Peng, J., Zhang, P. X., Jin, D. J., & Liu, Y. L. (2013). Validated HPLC Method for the Determination of Paclitaxel-related Substances in an Intravenous Emulsion Loaded with a Paclitaxel-Cholesterol Complex. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(6), 672.
- Yalçın, E. (2018). Kanser Tedavisinde Kullanılmak Üzere İpek Protein Nanopartiküllerin Hazırlanması Ve Karakterizasyonu. *Ankara : Hacettepe Üniversitesi*
- Yan, C., Liang, N., Li, Q., Yan, P., & Sun, S. (2019). Biotin and arginine modified hydroxypropyl- β -cyclodextrin nanoparticles as novel drug delivery systems for paclitaxel. *Carbohydrate Polymers*, 216, 129-139.
- Yenilmez, E., Kirimlioglu, G. Y., Senel, B., & Basaran, E. (2017). Preparation, Characterization and In Vitro Evaluation of Dirithromycin Loaded Eudragit® RS 100 Nanoparticles for Topical Application. *Latin American Journal Of Pharmacy*, 36(11), 2203-2212.
- Yokuş, B., & Çakır, D. Ü. (2012). Kanser biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (1), 7-18.

- Zhang, E., Xing, R., Liu, S., Qin, Y., Li, K., & Li, P. (2019). Advances in Chitosan-based Nanoparticles for Oncotherapy. *Carbohydrate Polymers*, 222, 115004.
- Zhao, Z., Hu, R., Shi, H., Wang, Y., Ji, L., Zhang, P., & Zhang, Q. (2019). Design of ruthenium-albumin hydrogel for cancer therapeutics and luminescent imaging. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 194, 19-25.
- Zou, H., Li, L., Carcedo, I. G., Xu, Z. P., Monteiro, M., & Gu, W. (2016). Synergistic inhibition of colon cancer cell growth with nanoemulsion-loaded paclitaxel and PI3K/mTOR dual inhibitor BEZ235 through apoptosis. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 1947.
- http-1: <https://www.stemcell.com/paclitaxel.html> (EriřimTarihi:06.07.2019)
- http-2: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=Paclitaxel&interface=Product%20Name&N=0+&mode=mode%20matchpartialmax&lang=en®ion=US&focus=productN=0%20220003048%20219853286%20219853109> (EriřimTarihi: 06.07.2019)
- http-3: <http://kocakfarma.com/urun-aciklama.aspx?bolumSeo=kisabilgi&id=223&lang=tr> (EriřimTarihi: 06.07.2019)
- http-4: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+33069-62-4> (EriřimTarihi: 02.07.2019)
- http-5: <http://www.ilacabak.com/etkengoster.php?Id=L01CD01> (EriřimTarihi: 06. 07. 2019)
- http-6: http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-38.aspx?geo_country=tr (EriřimTarihi: 06. 07. 2019)
- http-7: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-225.aspx?geo_country=tr (EriřimTarihi: 06. 07. 2019)

EK-1

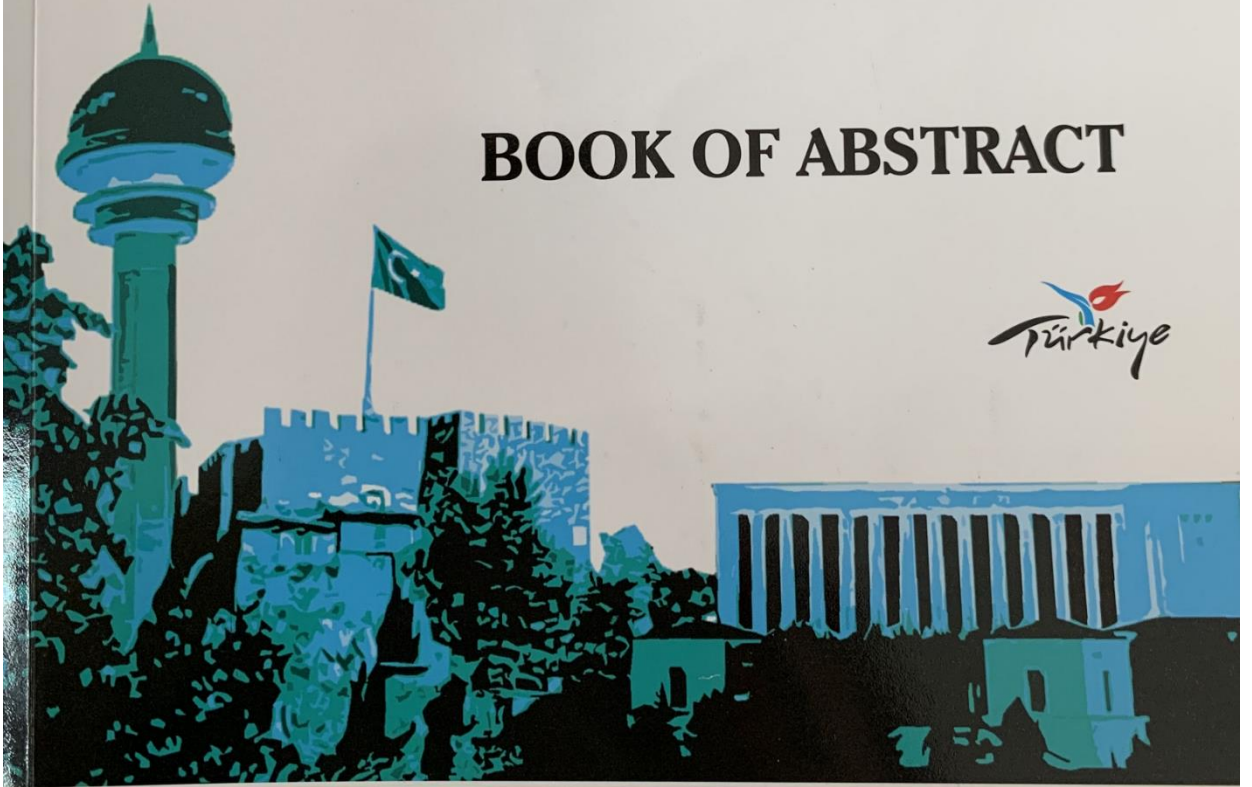


ANKARA UNIVERSITY
FACULTY OF PHARMACY



ISOP
S **11th** International
SYMPOSIUM ON
PHARMACEUTICAL
SCIENCES

BOOK OF ABSTRACT



Türkiye



JUNE 09-12, 2015
ANKARA, TURKEY

FEI, USA). The particle size of NPs obtained from SEM images.

Drug content of NPs

10 mg lyophilized NPs were added in DMSO and mixed on a magnetic-stirrer at 600 rpm for 30 minutes. After mixing, it was placed in ultrasonic bath for 10 minutes. Then, phosphate buffer (PB; pH 7.4) was added into this mixture and mixed for 10 minutes. This dispersion was centrifuged at 12000 rpm for 10 minutes. The drug content of each sample was then measured using a validated UV method at 238 nm.

In vitro Release Studies

NPs(10 mg) were suspended in 20 mL pH 7.4 PB in amber vials and release study was performed using horizontally shaking water bath (37 ± 0.5 °C; 50 rpm). At predetermined time points, 3 mL of sample was withdrawn from the medium and 3 mL of fresh buffer was added into the medium. The samples were centrifuged at 12500 rpm for 10 minutes and their drug content was measured using the validated UV method at 238 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

Surface Morphology

The images of NPs were observed using SEM (Fig.1).The particle size of NPs was 325 ± 39 nm.

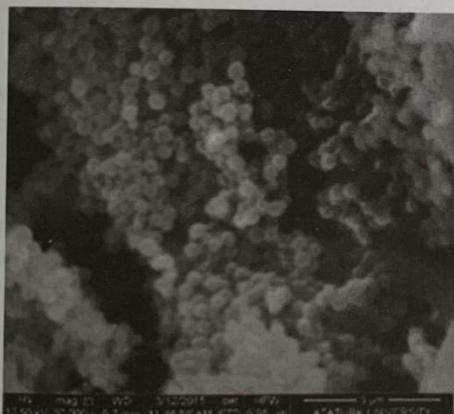


Fig.1. SEM images of NF-loaded PLGA NPs.

Drug content of NPs

The NPs showed the encapsulation efficiency and drug loading values of $17.50 \pm 1.70\%$ and $3.61 \pm 0.54\%$, respectively (mean $\pm$ SD, n=3).

In vitro Release Studies

About 25% and ~90% of the loaded NF was released within 24 hours and 19 days, respectively in PB pH 7.4 (Fig.2).

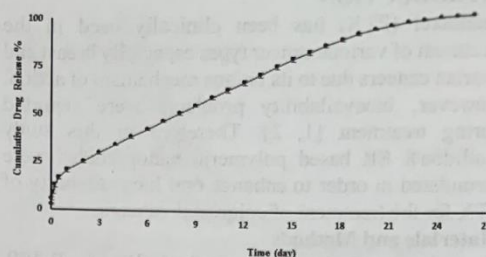


Fig.2. In vitro release profile of NF-loaded PLGA NPs (mean $\pm$ SD, n=3).

CONCLUSION

NF-loaded NPs were prepared successfully and characterized the formulation in terms of morphology, drug loading, and in vitro release. All the experiments were carried out in the dark and under nitrogen. The NPs may be useful to obtain sustained NF release profile.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Ataturk University Research Foundation (project number: 2013/012).

REFERENCES

1. Sweetman, S.C., (Ed.). Martindale: The complete drug reference. London: Pharmaceutical Press, Electronic version 2007.
2. Wu, J.Y., Ho, H.O., Chen, Y.C., Chen, C.C., Sheu, M.T., Thermal analysis and dissolution characteristics of Nifedipine solid dispersions, *J Food Drug Analysis*, 2012, 20, 27-33.
3. Huang, J.; Wigent, R.J.; Bentzley, C.M.; Schwartz, J.B., Nifedipine solid dispersion in microparticles of ammonio methacrylate copolymer and ethylcellulose binary blend for controlled drug delivery: Effect of drug loading on release kinetics, *Int J Pharm* 2006, 319, 44-54.

P-79: IN VITRO EVALUATION OF PACLITAXEL INCORPORATED POLYMERIC NANOPARTICLES

Ö. Atasoy¹, E. Başaran²

¹Sandoz Generic Pharmaceuticals Division of Novartis, Kocaeli, TURKEY

²Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Eskişehir, TURKEY

Paclitaxel (PTX) was successfully incorporated into Kollidon® SR based nanoparticles in order to enhance its oral bioavailability for the treatment of colorectal cancers.

INTRODUCTION

Paclitaxel (PTX) has been clinically used in the treatment of various cancer types especially breast and ovarian cancers due to its unique mechanism of action. However, bioavailability problems were reported during treatment [1, 2]. Therefore in this study Kollidon® SR based polymeric nanoparticles were formulated in order to enhance oral bioavailability of PTX for the treatment of colorectal cancers.

Materials and Methods

Formulation: Spray drying method (Büchi B-190, BÜCHI Labortechnik AG, Switzerland) was used for the preparation of Kollidon® SR (BASF, Germany) based polymeric nanoparticles [3]. PTX (kindly gifted by Actavis, İstanbul) was used in different concentrations and selected compositions were given in Table 1.

Table 1. Compositions of the Formulations Prepared

Code	KSR (g)	PTX (g)	Methanol (mL)
KPTX-PL	2	-	150
KPTX-05	2	0.1	150
KPTX-10	2	0.2	150

KSR: Kollidon® SR, PTX: Paclitaxel

Characterization: SEM, particle size, polydispersity index, zeta potential analyses were performed. In order to evaluate changes of the polymeric structure DSC, XRD, FT-IR and ¹H NMR analyses were also performed. A validated HPLC method was used for the determination of incorporated PTX.

RESULTS AND DISCUSSION

Morphological analyses showed that particles are round in shape with small particle sizes (Figure 1). Particle size, polydispersity index, zeta potential analyses with incorporated PTX amount of the formulations were given in Table 2.

Analyses results revealed that the particle sizes were in the nanometer range with homogenous size distribution (Table 2) with no changes in the polymeric structure (Fig. 2).

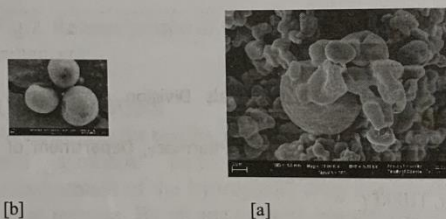


Fig. 1. SEM images of KPTX-05 [a] and KPTX-10 [b]

Table 2. Particle Size, Polydispersity Index, Zeta Potential Analyses with Incorporated PTX Amount of the Formulations Prepared (n=3, mean ±SE)

Code	PS (nm)	PDI	Zeta (mV)	PTX Amount (%)
KPTX-PL	207.5±3.8	0.5±0.0	-	-
KPTX-05	240.2±22.9	0.5±0.0	16.9±0.8	5.06
KPTX-10	268.7±3.9	0.6±0.0	19.5±1.5	9.63

PS: Particle Size, PDI: Polydispersity Index

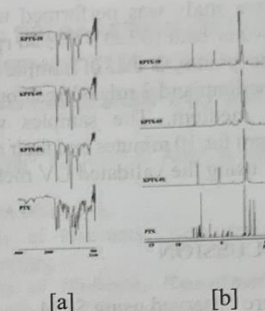


Fig.2. FT-IR [a] and ¹H NMR [b] analyses of the formulations prepared

CONCLUSIONS

As a conclusion PTX incorporated polymeric nanoparticles were successfully formulated for the treatment of colorectal cancers.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed by Anadolu University Scientific Research Project Foundation (No: 1403S065).

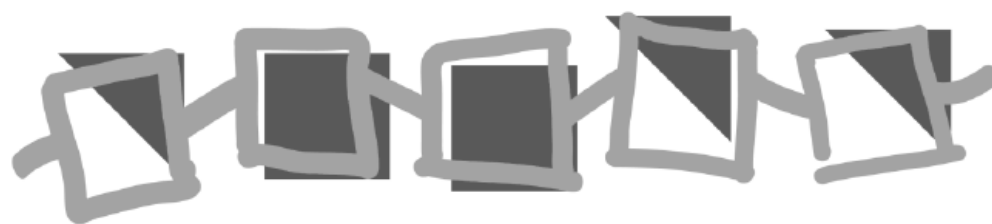
REFERENCES

1. Gupte, A.; Ciftci, K., Formulation and characterization of Paclitaxel, 5-FU and Paclitaxel+5-FU microspheres. *Int J Pharm* **2004**, 276, 93-106.
2. Singla, A.; Garg, A.; Aggarwal, D., Paclitaxel and its formulations. *Int J Pharm* **2002**, 235, 179-192.
3. Başaran, E.; Yenilmez, E.; Berkman, M.S.; Büyükköroğlu, G.; Yazan, Y., Chitosan nanoparticles for ocular delivery of cyclosporine A. *J Microencapsul* **2014**, 31(1), 49-57

P-80: DEVELOPMENT OF RADIOLABELING ALENDRONATE SODIUM MICROEMULSION WITH TECHNETIUM-99M

Yetkin Elitez, Meliha Ekinci, Derya Ilem-Ozdemir, Evren Gundogdu¹, Makbule Asikoglu

¹Faculty of Pharmacy, Department of Radiopharmacy, Ege University, Bornova, Izmir, Turkey



ICCC13TH
12THEUCHIS

12th International Conference of the European Chitin Society
13th International Conference on Chitin and Chitosan

MÜNSTER
Germany

August 30th to September 2nd
2015

Paclitaxel incorporated chitosan nanoparticles: An *in vitro* evaluation

Ö. Atasoy¹, E. Başaran²

¹Sandoz Generic Pharmaceuticals Division of Novartis, Turkey; ²Anadolu University, Turkey

Paclitaxel (PTX) is recognized as a unique anti-cancer drug for the treatment of a wide range of carcinomas, however, its poor water solubility and high toxicity limits its clinical success. Therefore PTX (kindly gifted by Actavis, İstanbul, Turkey) was incorporated into high molecular weighted Chitosan (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany; 800.000cps) in different concentrations by spray drying method in order to enhance its oral bioavailability with superior characteristic properties of the polymer.

SEM, particle size, PDI, zeta potentials, DSC, XRD, FT-IR and ¹H-NMR analyses were performed. A validated HPLC method was used for the determination of incorporated PTX.

According to the analyses results particles were round in shape with small particle sizes in the nanometer range with homogenous size distribution (ranged between 221.9±4.6 nm and 345.6±6.2 nm with PDI data between 0.425±0.3 and 0.538±0.9). Particles were cationic as expected (ranged between 33.4±2.1 mV and 37.5±0.7 mV) and no changes in the polymeric structure were detected considering the results of DSC, XRD, FT-IR and ¹H-NMR analyses. The success of the incorporated PTX amount of the formulations were nearly 93% and 82% for the CPTX-05 and CPTX-10 formulations respectively.

As a conclusion; PTX was successfully incorporated into cationic biodegradable chitosan based nanoparticles for the enhancement of the low bioavailability of PTX in cancer treatments.

Acknowledgement

This study was financed by Anadolu University Scientific Research Project Foundation (No: 1403S065). BIBAM management, Faculty of Science (Assoc. Prof. Dr. Murat Erdem) and Faculty of Engineering were acknowledged for ¹H-NMR, SEM and XRD analyses respectively.



PACLITAXEL INCORPORATED CHITOSAN NANOPARTICLES

AN IN VITRO EVALUATION



Özge ATASOY¹, Ebru BAŞARAN²

¹Sandoz Generic Pharmaceuticals Division of Novartis, Kocaeli, TURKEY

²Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology 26470 Eskişehir- TURKEY

INTRODUCTION

Paclitaxel (PTX) is recognized as a unique anti-cancer drug for the treatment of a wide range of carcinomas, however its poor water solubility and high toxicity limits its clinical success [1, 2]. Therefore in this study high molecular weighted Chitosan based polymeric nanoparticles were formulated in order to enhance oral bioavailability of PTX for the treatment of colorectal cancers.

EXPERIMENTAL

MATERIALS

Paclitaxel (PTX)	Kindly gifted by Actavis, Istanbul, TURKEY
Chitosan (High molecular weighted)	
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, GERMANY
Methanol	
Acetic Acid	

METHOD



SPRAY DRYING
800H-8390 Switzerland (A)

COMPOSITION OF FORMULATIONS

CODE	Chitosan (g)	PTX (g)	Ethanol (mL)	Methanol (mL)	Acetic Acid (%2, v/v, mL)
CPTX-PL	2	-	300	200	400
CPTX-05	2	0.1	300	200	400
CPTX-10	2	0.2	300	200	400



HPLC METHOD

HPLC Model	Shimadzu-20A
Column	Inertsil-ODS-3
Mobile System	Acetonitrile: Distilled Water [60:40, v/v]
Dedector	Shimadzu Photodiode Array Detection
Wavelength	227 nm
Flow Rate	1 mL.min ⁻¹
Injection Volume	20 µL
Column Temperature	30°C ± 1°C
Injector	Automatic (Shimadzu-Japan)

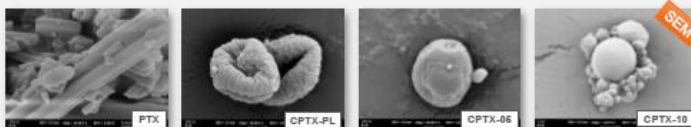
[1] Singh, A., Garg, A., Apperwal, D., *Int J Pharm* 235, 179-192 (2002)

[2] Gupta A., Chit, K., *Int J Pharm* 276, 85-106 (2004)

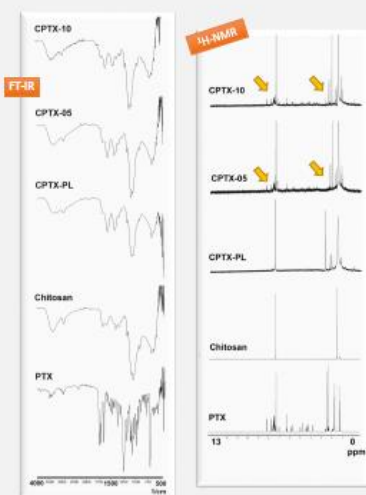
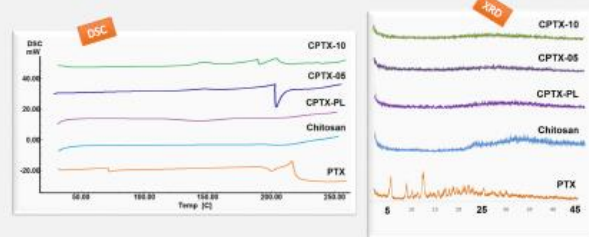
[3] Supuran, E., Todorov, E., *Supuran, E. S., Todorov, E. S., Todorov, E. S., Todorov, E. S.*

[4] Jin et al., *Biomaterials* 28, 3724-3730 (2007)

RESULTS



CODE	Particle Size (nm)	Polydispersity Index	Zeta Potential (mV)	PTX Amount (%)
CPTX-PL	221.9±0.64	0.95±0.04	36.6±1.4	-
CPTX-05	222.3±0.23	0.56±0.03	37.5±0.7	4.66
CPTX-10	345.6±0.18	0.69±0.02	33.4±2.1	8.18



CONCLUSION

In this study, PTX was successfully incorporated into Chitosan based polymeric nanoparticles by Spray Drying Method. Physicochemical characteristics of the nanoparticles were analyzed in detail. Analytical results demonstrated that particles were round in shape and have considerably high zeta potentials with particle sizes in the nanometer range. DSC, XRD, FT-IR and ¹H-NMR analyses showed that neither active agent nor polymeric structure were affected from the production parameters.

• Faculty of Science for SEM Analyses
• Department of Pharmaceutical Chemistry for FT-IR
• Faculty of Engineering for XRD Analyses
• BİSİM for ¹H-NMR Analyses
• This study was financed by Anadolu University Scientific Research Project Foundation (No:14039065)



12th International Conference of the European Chitin Society
ECCS International Conference on Chitin and Chitosan
30 August – 02 September 2015, Münster, GERMANY

EK-3



International Society for Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials

The 3rd Annual Conference

August 11 - 12, 2016; Woodbridge, NJ, USA

Thanks to our Exhibitors & Sponsors!



POSTER AWARD Sponsored by:

Applied Polymer
SCIENCE

YOUNG RESEARCHER (ORAL) AWARD Sponsored by:



Isbpbpb Conference August 11 & 12, 2016 – Woodbridge, New Jersey, USA

CHITOSAN COATED PACLITAXEL NANOPARTICLES AIMING COLORECTAL CANCER TREATMENT

Özge Atasoy¹, Ebru Başaran²

¹Sandoz Generic Pharmaceuticals Division of Novartis, Kocaeli, TURKEY

²Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Eskişehir, TURKEY

Paclitaxel (PTX) has been studied by many research groups considering its success in cancer treatment, however due to its low solubility in water limits the clinical use. In this study PTX was incorporated into Kollidon® SR based nanoparticles by spray drying method. Considering anionic character of the polymer used, nanoparticles were coated by high molecular weighted chitosan for the enhancement of the internalization ability of the nanoparticles by colorectal cancer cells.

SEM, particle size, zeta potential analyses were performed. In order to evaluate changes of the polymeric structure DSC, XRD, FT-IR and ¹H-NMR analyses were also performed. A validated HPLC method was used for the determination of incorporated PTX.

Ack: Financed by Anadolu University Scientific Research Project Foundation [No: 1403S065]



ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

CHITOSAN COATED PACLITAXEL NANOPARTICLES

AIMING

COLORECTAL CANCER TREATMENT



Özge ATASOY

1

Ebru BASARAN

2



¹Sandoz Generic Pharmaceuticals Division of Novartis, Kocaeli, TURKEY

²Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Eskişehir, TURKEY