



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**PLATİNE DİRENÇLİ OVER KANSERİ TEDAVİSİNE
YÖNELİK NANOPARTİKÜLER İLAÇ TAŞIYICI
SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Özge EŞİM

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Canan HASÇİÇEK

ANKARA

2020

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PLATİNE DİRENÇLİ OVER KANSERİ TEDAVİSİNE
YÖNELİK NANOPARTİKÜLER İLAÇ TAŞIYICI
SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Özge EŞİM

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Canan HASÇİÇEK

Bu Araştırma TÜBİTAK tarafından 116S395 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

2020

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Platine Dirençli Over Kanseri Tedavisine Yönelik Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve Değerlendirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir ve hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma ve araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Özge EŞİM

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında Özge EŞİM tarafından hazırlanan “Platine Dirençli Over Kanseri Tedavisine Yönelik Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve Değerlendirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 13.01.2020

Prof. Dr. Nurten ÖZDEMİR
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL
Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Canan HASÇİÇEK
Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. A. Lale DOĞAN
Hacettepe Üniversitesi

Prof. Dr. İmran VURAL
Hacettepe Üniversitesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	ix
Simgeler ve Kısaltmalar	xi
Şekiller	xii
Çizelgeler	xv
1.GİRİŞ	1
1.1. Kanser	1
1.2. Kanser Fizyolojisi	2
1.3. Kanser Tedavisinde Geleneksel Yaklaşım	4
1.4. Over Kanseri	4
1.4.1. Over Kanseri Risk Faktörleri	5
1.4.2. Over Kanseri Gelişimi ve Tedavisi	6
1.5. İlaç Direnci	10
1.5.1. İlaç Direncini Önleme Yaklaşımları	17
1.5.1.1. İntraperitoneal Uygulamalar	18
1.5.1.2. Kombinasyon Tedavisi	18
1.5.1.3. Epigenetik Yaklaşım	20
1.5.1.4. Yeni İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Rolü	22
1.6. Yeni İlaç Taşıyıcı Sistemler	25
1.6.1. Polimerik Nanopartiküller	25
1.6.2. Protein Bazlı Nanopartiküller	26
1.6.3. Lipit Kaplı Nanopartiküller	28
1.6.3.1. Lipit Kaplı Polimerik Nanopartiküler Sistemlerin Üretim Yöntemleri	30
1.6.4. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	37
1.6.4.1. Partikül Büyüklüğü ve Partikül Büyüklüğü Dağılımı	37
1.6.4.2. Zeta Potansiyel	38
1.6.4.3. Etkin Madde Enkapsülasyon Etkinliği	39
1.6.4.4. İn Vitro Etkin Madde Çözünme Hızı	40
1.6.4.5. Morfolojik Özellikler	40
1.6.4.6. Termal Özellikler	41
1.6.5. Sterilizasyon	42
1.7. Deney Tasarımı	43
1.8. Hücre Kültürü Çalışmaları	44
1.8.1. Sitotoksite Deneyleri	45
1.8.2. Western Blot	46
1.8.3. Akım Sitometrisi	46
1.9. Çalışmada Kullanılan Etkin ve Yardımcı Maddelerle İlgili Bilgiler	47
1.9.1. Karboplatin	47
1.9.2. Desitabin	49
1.9.3. Albümin	50
1.9.3.1. Albümin Nanopartikül Üretim Yöntemleri	52

1.9.4. Çalışmada Kullanılan Lipitler ile İlgili Genel Bilgiler	55
1.9.4.1. Lesitin	55
1.9.4.2. Kolesterol	55
1.9.4.3. Distearoil Fosfatidilkolin, Dipalmitoil Fosfatidilkolin ve Dimiristoil Fosfatidilkolin	55
1.9.4.4. Oleik asit	56
2. GEREÇ VE YÖNTEM	58
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler	58
2.2. Kullanılan Cihazlar	60
2.3. Karboplatin ve Desitabinin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	61
2.3.1. Karboplatin ve Desitabinin Ultraviyole (UV) Spektrumunun Alınması	61
2.3.2. Karboplatin ve Desitabinin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared - FT-IR) Spektrumunun Alınması	61
2.3.3. Karboplatin ve Desitabinin X-Işını Toz Difraktometrisi	61
2.3.4. Karboplatin ve Desitabinin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ile Analizi	62
2.4. Karboplatin ve Desitabinin Aynı Anda Miktar Tayini İçin Analitik Yöntem Geliştirilmesi	62
2.4.1. Karboplatin ve Desitabinin Kalibrasyon Doğrularının Hazırlanması	62
2.4.2. Karboplatin ve Desitabinin HPLC ile Miktar Tayini Yönteminin Analitik Validasyonu	63
2.4.2.1. Doğrusallık ve Aralığı	63
2.4.2.2. Doğruluk ve Geri Elde	63
2.4.2.3. Kesinlik	64
2.4.2.4. Özgünlük (Seçicilik)	65
2.4.2.5. Teşhis (LOD) ve Tayin Sınırlarının (LOQ) Belirlenmesi	65
2.5. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları	66
2.5.1. Karboplatin Yüklü PCL ve PLGA Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması	67
2.5.2. Karboplatin Yüklü Kitozan Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması	68
2.5.3. Karboplatin Yüklü Albümin Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması	70
2.5.4. Optimum Karboplatin Yüklü Albümin Nanopartikül Formülasyonunun Belirlenmesi	74
2.5.5. Karboplatin Yüklü Albümin Nanopartiküllerin Lipit Tabaka ile Kaplanması	75
2.5.6. Hazırlanan Nanopartiküler Sistemlerin Karakterizasyonu	78
2.5.6.1. Partikül Büyüklüğü ve Partikül Büyüklüğü Dağılımı	78
2.5.6.2. Zeta Potansiyeli Ölçümü	78
2.5.6.3. Formülasyonlara Yüklenen Etkin Madde ve Enkapsülasyon Etkinliği Tayini	78
2.5.6.4. İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları	79
2.5.6.5. Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) Analizi	80
2.5.6.6. Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM) Analizi	80
2.5.6.7. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizleri	81
2.5.6.8. X-ışını Kırınımı (XRD) Analizi	81
2.6. Stabilité Çalışmaları	81

2.7. Nanopartiküllerin Sterilizasyonu	82
2.7.1. Nanopartiküllerin Sterilizasyon Yöntemi	82
2.7.2. Sterilizasyon Sonrasında Yapılan Kontroller	82
2.8. İn vitro Hücre Kültürü Çalışmaları	83
2.8.1. Hücre Dizisi ve Hücre Kültürü Koşulları	83
2.8.2. Sitotoksikite çalışmaları	84
2.8.3. Hücresel Alımın Konfokal Görüntüleme ile Belirlenmesi	85
2.8.4. Hücresel Alımın Akım Sitometrisi ile Belirlenmesi	86
2.8.5. Apoptoz ve Direncin Modülasyonunun Western Blot Yöntemi ile Değerlendirilmesi	87
2.9. İstatistiksel Veri Analizi	89
3. BULGULAR	90
3.1. Karboplatin ve Desitabinin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	90
3.1.1. Karboplatin ve Desitabinin Ultraviyole (UV) Spektrumunun Alınması	90
3.1.2. Karboplatin ve Desitabinin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared - FT-IR) Spektrumunun Alınması	91
3.1.3. Karboplatin ve Desitabinin X-Işını Toz Difraktometrisi	92
3.1.4. Karboplatin ve Desitabinin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ile Analizi	93
3.2. Karboplatin ve Desitabinin Aynı Anda Miktar Tayini İçin Analitik Yöntem Geliştirilmesi	94
3.2.1. Kalibrasyon Doğrularının Hazırlanması	97
3.2.2. Karboplatin ve Desitabinin HPLC ile Miktar Tayini Yönteminin Analitik Validasyonu	98
3.2.2.1. Doğrusallık ve Aralığı	98
3.2.2.2. Doğruluk ve Geri Elde	100
3.2.2.3. Kesinlik	101
3.2.2.4. Özgünlük (Seçicilik)	103
3.2.2.5. Teşhis (LOD) ve Tayin Sınırlarının (LOQ) Belirlenmesi	104
3.3. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları	105
3.3.1. Karboplatin Yüklü PCL ve PLGA Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması	105
3.3.2. Karboplatin Yüklü Kitozan Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması	105
3.3.3. Karboplatin Yüklü Albümin Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması	106
3.3.3.1. Farklı Glutaraldehit:BSA Oranları ile Farklı Dispersiyon Ortamlarının Etkisi	106
3.3.3.2. BSA Konsantrasyonunun İncelenmesi	107
3.3.3.3. Desolvasyon Ajanı:Sulu Faz Oranının Etkisinin İncelenmesi	108
3.3.3.4. Çapraz Bağlama Yönteminin Etkisi	108
3.3.3.5. BSA Çözeltisi pH'sının Etkisi	109
3.3.3.6. Yüzey Etkin Madde Varlığının Etkisi	110
3.3.3.7. Karıştırma Hızının Etkisi	111
3.3.4. Optimum Karboplatin Yüklü Albümin Nanopartikül Formülasyonunun Belirlenmesi	112
3.3.5. Karboplatin Yüklü Albümin Nanopartiküllerin Lipit Tabaka ile Kaplanması	114

3.3.6. Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM) Analizi	119
3.3.7. Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM) Analizi	122
3.3.8. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizleri	123
3.3.9. X-ışını Kırınımı (XRD) Analizi	124
3.4. Stabilite Çalışmaları	125
3.5. Sterilizasyon çalışmaları	126
3.6. İn vitro Hücre Kültürü Çalışmaları	127
3.6.1. Hücre Dizisi ve Hücre Kültürü Koşulları	127
3.6.2. Karboplatin ve Desitabinin Sitotoksikite çalışmaları	128
3.6.3. Karboplatin ve Desitabin Yüklü Nanopartiküler Sistemlerin Sitotoksikite Çalışmaları	130
3.6.4. Hücresel Alımın Konfokal Görüntüleme ile Belirlenmesi	137
3.6.5. Hücresel Alımın Akım Sitometrisi ile Belirlenmesi	138
3.6.6. Apoptoz ve Direncin Modülasyonunun Western Blot Yöntemi ile Değerlendirilmesi	139
4. TARTIŞMA	143
4.1. Karboplatin ve Desitabinin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	143
4.1.1. Karboplatin ve Desitabinin Ultraviyole (UV) Spektrumunun Alınması	143
4.1.2. Karboplatin ve Desitabinin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared - FT-IR) Spektrumunun Alınması	143
4.1.3. Karboplatin ve Desitabinin X-ışını Toz Difraktometrisi	143
4.1.4. Karboplatin ve Desitabinin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ile Analizi	144
4.1.5. Karboplatin ve Desitabinin Aynı Anda Miktar Tayini İçin Analitik Yöntem Geliştirilmesi	144
4.1.6. Karboplatin ve Desitabinin Kalibrasyon Doğrularının Hazırlanması ve Analitik Validasyonu	146
4.2. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları	147
4.2.1. Karboplatin Yüklü PCL ve PLGA Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması	148
4.2.2. Karboplatin Yüklü Kitozan Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması	150
4.2.3. Karboplatin Yüklü Albümin Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması	151
4.2.3.1. Farklı Glutaraldehit:BSA Oranlarının Etkisi	152
4.2.3.2. Dispersiyon Ortamının Etkisi	153
4.2.3.3. BSA Konsantrasyonunun İncelenmesi	154
4.2.3.4. Desolvasyon Ajanı:Sulu Faz Oranının Etkisinin İncelenmesi	154
4.2.3.5. Çapraz Bağlama Yönteminin Etkisi	156
4.2.3.6. BSA Çözeltili pH'sının Etkisi	157
4.2.3.7. Yüzey Etkin Madde Varlığının Etkisi	158
4.2.3.8. Karıştırma hızının etkisi	159
4.2.4. Optimum Karboplatin Yüklü Albümin Nanopartikül Formülasyonunun Belirlenmesi	159
4.2.5. Karboplatin Yüklü Albümin Nanopartiküllerin Lipit Tabaka ile Kaplanması	162
4.2.6. Geçirimli Elektron Mikroskopu Analizleri	167
4.2.7. Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM) Analizi	168

4.2.8. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizleri	168
4.2.9. X-ışını Kırınımı (XRD) Analizi	169
4.2.10. Stabilit�e �alışmaları	169
4.3. Sterilizasyon �alışmaları	170
4.4. �n vitro Hücre Kültürü �alışmaları	170
4.4.1. Sitotoksisite �alışmaları	170
4.4.2. Hücresel Alımın Konfokal Görüntüleme ile Belirlenmesi	174
4.4.3. Hücresel Alımın Akım Sitometrisi ile Belirlenmesi	174
4.4.4. Apoptoz ve Direncin Modülasyonunun Western Blot Yöntemi ile Değerlendirilmesi	175
4.4.4.1. Apoptozun Western Blot Yöntemi ile Değerlendirilmesi	175
4.4.4.2. İlaç Direncinin Western Blot Yöntemi ile Değerlendirilmesi	177
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	179
ÖZET	182
SUMMARY	183
KAYNAKLAR	184
�ZGE�Mİş	201

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması kapsamında, over kanseri tedavisinde sıklıkla karşılaşılan ilaç direncinin modülasyonu ve over kanseri tedavisinde başarı sağlanabilmesi için karboplatin ve metilasyon yolu ile susturulan tümör baskılayıcı genlerin yeniden ekspresyonunu sağlayacak bir demetilasyon ajanı olan desitabin kombinasyonunu taşıyan, pasif hedeflendirme yolu ile over kanseri hücrelerine alımı artırılan lipit kaplı nanopartiküler ilaç taşıyıcı bir sistem hazırlanmış ve over kanseri tedavisinde kullanım olanaklarının değerlendirilmiştir.

Doktora çalışmalarım boyunca hem bilimsel hem de manevi anlamda benden tecrübelerini, desteğini ve güler yüzünü esirgemeyen, umutsuzluğa düşmeme izin vermeyen, her anlamda yol göstericim olan danışman hocam Prof. Dr. Canan HASÇİÇEK'e,

Doktora tez çalışmamı 116S395 numaralı bilimsel araştırma projesi ile destekleyen TÜBİTAK'a,

Tez İzleme Komitemde bulunan ve tez çalışmama katkı sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL ve Prof. Dr. A. Lale DOĞAN'a,

Başta Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı başkanı sayın hocam Prof. Dr. Nurten ÖZDEMİR olmak üzere çalışma hayatım boyunca desteklerini hissettiğim anabilim dalımızın değerli hocalarına,

Doktora tez projemin hücre kültürü çalışmalarına olan bilimsel katkı ve desteği için Prof. Dr. A. Lale DOĞAN'a

Tezimin hücre kültürü deneylerinde sonsuz bir özveri, disiplin ve özenle çalışan Uzm. Bio. Mustafa Emre GEDİK'e

Hücre kültürü çalışmalarında akım sitometrisi deneyini gerçekleştiren Gürcan GÜNAYDIN'a

Karboplatin ve desitabinin aynı anda miktar tayini için analitik yöntem geliştirilmesindeki yardım ve desteklerinden dolayı Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN ve Doç. Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ'a

Hem bilimsel hem de manevi destekleri için sevgili hocalarım Doç. Dr. Ceyda Tuba ŞENGEL-TÜRK ve Dr. Öğr. Özge İNAL'a

Doktora çalışmalarım boyunca destek ve ilgilerini hissettiren, birlikte görev yapmaktan mutluluk duyduğum sevgili arkadaşlarım Dr. Ecz. Gülin AMASYA, Dr. Ecz. Aslıhan Hilal ALGAN, Dr. Ecz. Umut Can z, Dr. Ecz. Ahmet Doğan ERĖİN, Uzm. Ecz. Tuğrul Mert SERİM ve Uzm. Ecz. Gizem Rüya TOPAL’a

İç arkadaşından çok kardeş olan sevgili arkadaşlarım Dr. Ecz. Berrin KKTRKMEN, Dr. Tuğba EREN-BNC ve Dr. Ecz. Miray İLHAN’a

Ablam, eniştem ve yeğenim Tuğba-Zeynal-Eylül ECE SIRMA ve zge-Numan-Doruk BİLGET, kayınvalidem Perihan EşİM ve başta canım annem Tülay GÜN olmak üzere tüm aileme,

Sevgisi, desteği, sabrı ve özverisi için hayattaki en büyük şansım sevgili eşim zgr EşİM’e

Teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AFM	Atomik Kuvvet Mikroskopisi (Atomic Force Microscopy)
BSA	Bovin serum albumin
BSS	Bağıl standart sapma
DES	Desitabin
DMPC	1,2-dimiristoil-sn-gliser-3-fosfotidilkolin
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-gliser-3- fosfotidilkolin
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
DSPC	1,2-distearoil-sn-gliser-3- fosfotidilkolin
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
ICH	Uluslararası Harmonizasyon Örgütü
KRB	Karboplatin
LOD	Teşhis sınırı (Limit of Detection)
LOQ	Tayin sınırı (Limit of Quantification)
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difenil tetrazolium bromür
NSAİ	Nonsteroidal antiinflamatuvar ilaç
PARP	Poli (ADP-riboz) polimeraz
PBS	Fosfat salin tamponu
PCL	Polikaprolakton
PDI	Polidispersite indeksi
PLGA	Poli(laktik asit-ko-glikolik asit)
PVA	Polivinilalkol
RES	Retikulo endotelial sistem
TEM	Geçirimli elektron mikroskopu
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
XRD	X-ışını difraktometrisi

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Kadın üreme sisteminin şematik gösterimi.	4
Şekil 1.2. Over kanseri evreleme sisteminin şematik gösterimi.	6
Şekil 1.3. İlaç direnci gelişimi	11
Şekil 1.4. Farklı kombinasyon tedavisi yaklaşımları	19
Şekil 1.5. Lipit kaplı nanopartiküler sistemlerin şematik gösterimi.	29
Şekil 1.6. Lipit kaplı nanopartiküler sistemlerin çift basamaklı yöntemle üretiminin şematik gösterimi.	32
Şekil 1.7. Nanopresipitasyon yöntemi ile lipit kaplı polimerik nanopartikül üretiminin şematik gösterimi.	34
Şekil 1.8. Emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile lipit kaplı polimerik nanopartikül üretiminin şematik gösterimi.	35
Şekil 1.9. Box-Behnken modelinin tasarım noktaları.	44
Şekil 1.10. Karboplatinin kimyasal formülü.	47
Şekil 1.11. Desitabinin kimyasal formülü.	49
Şekil 2.1. Karboplatin yüklü PCL ve PLGA nanopartiküllerin üretiminin şematik gösterimi	68
Şekil 2.2 Karboplatin yüklü kitozan nanopartikül üretiminin şematik gösterimi	69
Şekil 2.3 Albümin nanopartikülleri hazırlanmasının şematik gösterimi	71
Şekil 2.4. Lipit kaplı albümin nanopartikül üretiminin şematik gösterimi.	76
Şekil 2.5. TAEK'te sterilizasyon işleminin gerçekleştirildiği Cobalt-60 kaynağı Gama-Cell cihazı.	83
Şekil 2.6. MTT sitotoksikite testi deney protokolü	85
Şekil 3.1. Karboplatin (a) ve desitabinin (b) 200-400 nm arasında alınan UV spektrumları.	90
Şekil 3.2. Karboplatin (a) ve desitabine ait (b) FT-IR spektrumları.	91
Şekil 3.3. Karboplatin (a) ve desitabine ait (b) XRD difraktogramları	92
Şekil 3.4. Karboplatin (a) ve desitabine (b) ait DSC termogramları	93
Şekil 3.5. 10, 40 ve 80 µg.mL ⁻¹ konsantrasyonda KRB ve DES kombinasyonunun geliştirilen HPLC yöntemi ile gerçekleştirilen analizinden elde edilen kromatogram.	97
Şekil 3.6. Karboplatine ait kalibrasyon doğrusu.	97
Şekil 3.7. Desitabine ait kalibrasyon doğrusu	98
Şekil 3.8. Karboplatin (a) ve desitabinin (b) doğrusallık grafikleri.	99
Şekil 3.9. Seçicilik çalışmaları kapsamında 50 µg.mL ⁻¹ KRB ve DES kullanılarak gerçekleştirilen bozunma koşullarında elde edilen kromatogramlar	104
Şekil 3.10. Farklı pH'larda BSA çözeltileri ile hazırlanan albümin nanopartiküllerin in vitro çözünme hızı profilleri.	110
Şekil 3.11. Farklı konsantrasyonda yüzey etkin madde içeren formülasyonların in vitro çözünme hızı profilleri.	111
Şekil 3.12. Farklı karıştırma hızlarında hazırlanan formülasyonların in vitro çözünme hızı profilleri.	112

Şekil 3.13. Box-Behnken tasarımına göre bağımsız değişkenlerin partikül büyüklüğü üzerine etkisi.	113
Şekil 3.14. Box-Behnken tasarımına göre bağımsız değişkenlerin PDI üzerine etkisi.	113
Şekil 3.15. Box-Behnken tasarımına göre bağımsız değişkenlerin enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi.	113
Şekil 3.16. F4 formülasyonuna ait in vitro çözünme hızı profili.	114
Şekil 3.17. Lesitin ile hazırlanan formülasyonlarda oleik asitin desitabinin in vitro çözünme hızına etkisi.	117
Şekil 3.18. DPPC ile hazırlanan formülasyonlarda oleik asitin desitabinin in vitro çözünme hızına etkisi.	117
Şekil 3.19. Farklı lipit bileşimlerinin desitabinin in vitro çözünme hızına etkisi.	118
Şekil 3.20. Kabuk kısmında desitabin ile birlikte karboplatin içeren LA9 formülasyonunun in vitro çözünme hızı.	118
Şekil 3.21. F4 kodlu çekirdek formülasyon ve kaplı LA7 kodlu formülasyon arasındaki partikül büyüklüğü, polidispersite ve zeta potansiyel farklılıkları	119
Şekil 3.22. F4 kodlu karboplatin yüklü albümin nanopartikül ile LA1, LA2, LA3, LA4 kodlu lipit kaplı albümin nanopartiküllere ait TEM görüntüleri	120
Şekil 3.23. LA6 ve LA7 kodlu formülasyonlara ait TEM görüntüleri.	121
Şekil 3.24. F4 kodlu karboplatin yüklü albümin nanopartikül ve LA2, LA4 ve LA7 kodlu lipit kaplı albümin nanopartikül formülasyonlarına ait AFM görüntüleri.	122
Şekil 3.24 Devam. F4 kodlu karboplatin yüklü albümin nanopartikül ve LA2, LA4 ve LA7 kodlu lipit kaplı albümin nanopartikül formülasyonlarına ait AFM görüntüleri.	123
Şekil 3.25. DSC termogramları a)Karboplatin b) Desitabin c)BSA d)Oleik asit e)Kolesterol f)Lesitin g)F4 kodlu formülasyon h)LA7 kodlu formülasyon	124
Şekil 3.26. Karboplatin ve desitabin yüklü La7 kodlu lipit kaplı albümin nanopartikül formülasyonuna ait XRD difraktogramları	124
Şekil 3.27. Başlangıç ve 5°C’de 3. ay stabilite değerlendirmesi sonucu elde edilen TEM görüntüsü	125
Şekil 3.28. Başlangıç ve 3. ay stabilite değerlendirmesi sonucu elde edilen DSC termogramları.	126
Şekil 3.29. Sterilizasyon işlemi sonrasında hücre kültürü çalışmaları için seçilen lipit kaplı nanopartikül formülasyonu ile elde edilen TEM görüntüleri	127
Şekil 3.30. A2780 hücre dizisinin mikroskop görüntüleri.	128
Şekil 3.31. A2780cis hücre dizisinin mikroskop görüntüleri	128
Şekil 3.32. Karboplatin ve desitabinin A2780 ve A2780cis hücre dizilerinin canlılığı üzerine etkileri	129

Şekil 3.32 Devam. Karboplatin ve desitabinin A2780 ve A2780cis hücre dizilerinin canlılığı üzerine etkileri	130
Şekil 3.33. Boş nanopartikül formülasyonu, LA7, LA7D, LA8, LA8D ve LA9 kodlu formülasyonlarının A2780 hücre dizisi üzerindeki 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda sitotoksik etkileri.	131
Şekil 3.34. Boş nanopartikül formülasyonu LA7, LA7D, LA8, LA8D ve LA9 kodlu formülasyonların A2780 hücre dizisi üzerindeki 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda sitotoksik etkileri.	132
Şekil 3.35. Boş nanopartikül formülasyonu LA7, LA7D, LA8, LA8D ve LA9 kodlu formülasyonların A2780 hücre dizisi üzerindeki 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda sitotoksik etkileri.	133
Şekil 3.36. Boş nanopartikül formülasyonu, LA7, LA7D, LA8, LA8D ve LA9 kodlu formülasyonlarının A2780cis hücre dizisi üzerindeki 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda sitotoksik etkileri.	135
Şekil 3.37. Boş nanopartikül formülasyonu, LA7, LA7D, LA8, LA8D ve LA9 kodlu formülasyonlarının A2780cis hücre dizisi üzerindeki 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda sitotoksik etkileri.	235
Şekil 3.38. Boş nanopartikül formülasyonu, LA7, LA7D, LA8, LA8D ve LA9 kodlu formülasyonlarının A2780cis hücre dizisi üzerindeki 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda sitotoksik etkileri	136
Şekil 3.39. Rodamin B yüklü albümin nanopartiküller ile lipit kaplı albümin nanopartiküllerin A2780 ve A2780cis hücre hatlarına alımının konfokal mikroskop ile görüntülenmesine ait bulgular.	137
Şekil 3.40. Rodamin B yüklü albümin ve lipit kaplı albümin nanopartiküllerin A2780 ve A2780cis hücre hatlarına alımının akım sitometrisi yöntemi ile belirlenmesine dair bulgular.	138
Şekil 3.41. A2780 ve A2780cis hücre hatlarına rodamin B yüklü lipit kaplı nanopartikül ve serbest rodamin B alımına ait akım sitometri deneyi sonuçları.	138
Şekil 3.42. A2780 ve A2780cis hücre dizilerinde LA9 kodlu formülasyon uygulamasından 12 ve 24 saat sonra Western Blot analizi ile elde edilen protein bantlarının görüntüsü.	139
Şekil 3.43. A2780 ve A2780cis hücre dizilerinde LA9 kodlu formülasyon uygulamasından 12 ve 24 saat sonra apoptotik yolak proteinlerinin Western Blot analiz sonuçları.	140
Şekil 3.43 Devam A2780 ve A2780cis hücre dizilerinde LA9 kodlu formülasyon uygulamasından 12 ve 24 saat sonra apoptotik yolak proteinlerinin Western Blot analiz sonuçları.	141
Şekil 3.44. A2780 ve A2780cis hücre dizilerinde LA9 kodlu formülasyon uygulamasından 12 ve 24 saat sonra MLH1 proteininin Western Blot analiz sonuçları	142

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Over kanseri risk faktörleri.	5
Çizelge 1.2. FIGO Over kanseri evreleme sistemi.	7
Çizelge 1.3. Geleneksel kemoterapi ve nanoteknolojiye dayalı kemoterapi karşılaştırması	24
Çizelge 1.4. Çift basamaklı yöntemle üretilmiş lipit kaplı polimerik nanopartiküler sistemler.	33
Çizelge 1.5. Tek basamaklı yöntemle hazırlanan lipit kaplı nanopartiküler sistemler.	36
Çizelge 1.6. Lipit kaplama formülasyonlarında kullanılan fosfolipit türevleri ve özellikleri	56
Çizelge 2.1 Karboplatin yüklü PCL ve PLGA bazlı polimerik nanopartikül formülasyonları	67
Çizelge 2.2. Karboplatin yüklü kitozan nanopartikül formülasyonlarının bileşimi	70
Çizelge 2.3. Farklı Glutaraldehit:BSA oranları ve dispersiyon ortamları kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonları.	72
Çizelge 2.4. Farklı BSA konsantrasyonlarında hazırlanan albümin nanopartikül formülasyonları.	72
Çizelge 2.5. Farklı desolvasyon ajanı:sulu faz oranı ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları.	73
Çizelge 2.6. Farklı çapraz bağlama yöntemleri ile hazırlan nanopartikül formülasyonları.	73
Çizelge 2.7. Farklı pH'larda BSA çözeltisi ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları.	73
Çizelge 2.8. Farklı konsantrasyonda yüzey etkin maddeler ile nanopartikül formülasyonları.	73
Çizelge 2.9. Farklı iki karıştırma hızında hazırlanan albümin nanopartikül formülasyonları	73
Çizelge 2.10. Box-Behnken tasarımındaki bağımsız değişkenler ve seviyeleri	74
Çizelge 2.11. Box-Behnken tasarımındaki bağımlı değişkenler ve hedeflenen değerler	74
Çizelge 2.12. Box-Behnken tasarımı	75
Çizelge 2.13. Farklı lipit:nanopartikül oranı ve farklı lipit oranlarının lipit kaplı albümin nanopartikül formülasyonları üzerine etkisi.	77
Çizelge 2.14. Lipit kaplama işlemi sırasında dispersiyon ortamına sızan karboplatin miktarını azaltmaya yönelik çalışmalar.	77
Çizelge 2.15. Farklı lipit bileşimlerinin lipit kaplı albümin nanopartiküller üzerine etkisi.	77
Çizelge 2.16. Deney grupları	84
Çizelge 3.1. Farklı sabit fazlar kullanılarak gerçekleştirilen analizlere ait sistem uygunluk testi sonuçları	94

Çizelge 3.2. Farklı hareketli fazlar kullanılarak gerçekleştirilen analizlere ait sistem uygunluk testi sonuçları.	95
Çizelge 3.3. Hareketli faz konsantrasyonu ve hareketli faz akış hızındaki değişiklikler sonrasında gerçekleştirilen analizlere ait sistem uygunluk testi sonuçları.	95
Çizelge 3.4. Farklı kolon fırın sıcaklıkları kullanılarak gerçekleştirilen analizlere ait sistem uygunluk testi sonuçları.	96
Çizelge 3.5. Karboplatin ve desitabinin aynı anda analizi için belirlenen optimum analiz koşulları.	96
Çizelge 3.6. Optimum koşullarda gerçekleştirilen analizlerden elde edilen sistem uygunluk testi sonuçları.	96
Çizelge 3.7. Karboplatin ve desitabinin doğrusallık parametreleri	99
Çizelge 3.8. Karboplatinin doğruluk ve geri elde verileri.	100
Çizelge 3.9. Desitabinin doğruluk ve geri elde verileri.	100
Çizelge 3.10. Karboplatinin tekrarlanabilirlik verileri.	101
Çizelge 3.11. Desitabinin tekrarlanabilirlik verileri.	101
Çizelge 3.12. Karboplatinin ara kesinlik verileri.	102
Çizelge 3.13. Desitabinin ara kesinlik verileri.	103
Çizelge 3.14. Karboplatin ve desitabinin teşhis ve tayin sınırları.	104
Çizelge 3.15. Karboplatin yüklü PCL ve PLGA nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonu	105
Çizelge 3.16. Karboplatin yüklü kitozan nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonu.	106
Çizelge 3.17. Farklı glutaraldehit:BSA oranları ve dispersiyon ortamının nanopartiküllerin in vitro özelliklerine etkisi	107
Çizelge 3.18. BSA konsantrasyonunun albümin nanopartiküllerin in vitro özellikleri üzerine etkisi.	107
Çizelge 3.19. Farklı desolvasyon ajanı:sulu faz oranı ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonu	108
Çizelge 3.20. Farklı çapraz bağlama yöntemleri ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonu.	109
Çizelge 3.21. Farklı pH'larda BSA çözeltisi ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonu.	109
Çizelge 3.22. Farklı konsantrasyonda yüzey etkin maddeler ile nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonu.	110
Çizelge 3.23. Farklı iki karıştırma hızında hazırlanan albümin nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonu.	111
Çizelge 3.24. Box-Behnken tasarımı sonucu elde edilen veriler	112
Çizelge 3.25. Box-Behnken tasarımına göre bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenler üzerine etkilerinin matematiksel ifadeleri.	114

Çizelge 3.26. Farklı lipit:nanopartikül oranı ve farklı lipit oranlarının lipit kaplı albümin nanopartikül formülasyonları üzerine etkisi.	115
Çizelge 3.27. Lipit kaplama işlemi sırasında dispersiyon ortamına sızan karboplatin miktarını azaltmaya yönelik çalışmalar.	115
Çizelge 3.28 Farklı lipit bileşimlerinin lipit kaplı albümin nanopartiküller üzerine etkisi.	116
Çizelge 3.29. Karboplatin ve desitabin yüklü lipit kaplı nanopartikül formülasyonunun stabilite testi sonuçları.	125
Çizelge 3.30. Sterilizasyon işleminin karboplatin ve desitabin yüklü nanopartikül formülasyonunun in vitro özellikleri üzerine etkisi.	126



1.GİRİŞ

Over kanseri jinekolojik kanserler içinde en ölümcül olanlardan biridir ve kadınlarda görülen kanserlerin yalnızca %5'ini oluştursa da kansere bağlı ölüm nedenleri arasında beşinci sıradadır. Cerrahi ve kemoterapiden oluşan standart tedavi şemasına cevap başlangıçta iyi olsa da hastalık sıklıkla tekrarlar ve sonunda ilaç direnci gelişimi ile tedavi başarısızlıkla sonuçlanır. Over kanserinde ilaç direnci gelişiminin en önemli nedenlerinden biri tümör süpresör genlerin epigenetik değişimler yoluyla susturulması nedeniyle DNA tamir mekanizmalarının değişmesi ve kanser hücrelerinin kemoterapötiklere toleransının artması ve kemoterapötiklerin kanser hücrelerine alımlarında görülen değişikliklerdir.

Bu tez çalışmasında, over kanserinin standart tedavisinde kullanılan karboplatin ile bir DNA metil transferaz inhibitörü olan desitabin kombinasyonu lipit kaplı nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlere enkapsüle edilerek platin direncinin modüle edilmesi ve aynı zamanda pasif hedefleme yoluyla sağlıklı dokulara zarar vermeden tümör dokusundaki etkin madde konsantrasyonunun artırılması hedeflenmiştir.

1.1.Kanser

Düzensiz hücre büyümesi ve hücrelerin köken aldığı birincil bölgeden yakın dokulara ve vücuttaki diğer bölgelere yayılması ile karakterize edilen heterojen bir hastalık grubu olan kanser çağın en büyük sağlık sorunlarından birini oluşturmaktadır (Estanqueiro ve ark., 2015; Pecorino, 2012). Uluslararası Sağlık Ajansı (IARC) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nun projesi olan GLOBOCAN'ın 2018 verilerine göre dünya çapında her yıl 18,1 milyon yeni kanser vakası, 9,6 milyon kanser nedeniyle ölüm gerçekleşmektedir. En çok görülen kanserler %11,6 oranı ile akciğer ve meme kanseri ile %10,2 oranı ile kolon kanseri olurken en yüksek mortaliteye %18,4 oranı ile akciğer ve %9,2 oranı ile kolon kanseri neden olmaktadır (Estanqueiro ve ark., 2015). Over kanseri ise rahim ağzı ve rahim kanserinden sonra en sık görülen üçüncü jinekolojik kanserdir. Over kanseri, meme kanseri ile karşılaştırıldığında daha düşük

bir prevalansa sahip olmasına rağmen, meme kanserinden üç kat daha ölümcüldür (Momenimovahed ve ark., 2019).

Kanser oluşumunun temelini, normal hücre döngüsünde yer alan biyolojik olayları etkileyen kromozomal translokasyon, nokta mutasyonu, gen silinmesi ya da gen amplifikasyonu, insersiyon gibi mutasyonların aşamalı olarak biraraya gelmesi oluşturmaktadır. Gerçekleşen bu mutasyonlar tümör hücrelerinin hızla ve sınırsız çoğalmalarına ve çevre dokulara metastazına neden olmaktadır (Doğan ve Güç, 2004).

Günümüzde 100'den fazla farklı kanser türü tanımlanmıştır. Kanser köken aldığı birincil doku, kanserin ayırt edici özelliklerini belirlemektedir. Kanserlerin yaklaşık %85'i epitel hücrelerinde görülür ve karsinom olarak sınıflandırılırken, mezoderm hücrelerinden (örneğin, kemik, kas) türemiş kanserlere sarkoma, glandüler doku (örneğin meme) kanserleri adenokarsinom olarak adlandırılmaktadır. Farklı hücre tiplerinden köken alan kanserler, karsinogenezde yer alan farklı moleküler mekanizmalar ile hücrelerin birincil bölgelerinden yayılma düzenleri açısından farklılıklar göstermekte ve farklı tedavi stratejileri gerektirmektedir (Pecorino, 2012).

1.2.Kanser Fizyolojisi

Tümör fizyolojisinin anlaşılması kanser tedavisinin etkinliği için önemli bir rol oynamaktadır. Tümör dokusu çeşitli fizyolojik özellikleri ile sağlıklı dokulardan farklılık göstermektedir. Tümör mikroçevresi tümörün anormal damarlanması, tümör hücreleri arası yüksek basınç, hipoksik bölgeler, asidik pH ve otofaji eğilimi ile karakterizedir (Vaupel, 2004).

Tümör damarlanması: Kanser hücreleri artmış olan besin ihtiyacı ve metabolik atıkların uzaklaştırılması gerekliliği nedeniyle anjiyogenezi tetikleyecek faktörler salgılasa da tümör damarlanması normal bir dokudaki gibi organize bir yapıya sahip olamaz (Tan ve ark., 2015). Katı tümörlerdeki mikrodamarlar genelde yapısal ve fonksiyonel anormalliklere sahip; dilate, uzun, kıvrımlı, aşırı dallanmış ve kör uçlu bir

yapı sergilemektedir. Eksik ve hatalı endotel tabaka ile hasarlı bazal membran nedeniyle oluşan gözenekler damar geçirenliğini artırmaktadır. Normal olmayan damar morfolojisi ve azalmış düz kas yoğunluğu yetersiz kanlanmaya neden olmaktadır. (Vaupel, 2004).

Yüksek hücrelerarası basınç: Tümör dokusu, içindeki sıvıyı direne etmek ve tümör boşluğundan dışarı atmak konusunda yetersiz kalmaktadır. Gelişen tümör içerisindeki anormal sızdıran damar yapısının kendi işlevsel lenfatik drenaj sistemini oluşturmaması nedeniyle hücreler arası boşlukta önemli miktarda birikerek matriste yüksek basınç oluşturmaktadır (Vaupel, 2004).

Hipoksi: Tümör dokusu içerisindeki kıvrımlı damar yapısı, damar dağılımındaki ve mikrodolaşımdaki heterojenlik tümör dokusunun oksijenlenmesinde değişikliklere ve oksijen konsantrasyonunun sıfıra düştüğü bölgeler oluşmasına neden olmaktadır (Tan ve ark., 2015; Vaupel, 2004).

Asidik tümör mikroçevresi: Katı tümörlerde ekstraselüler pH; yüksek glikoliz oranı, laktik ve karbonik asitlerin üretimi ve azalmış atılımı nedeniyle genelde normal dokulardan daha düşüktür. Aynı zamanda hipoksi de ekstraselüler asidifikasyona neden olan karbonik anhidrazların ekspresyonunu ve aktivitesini artırma eğilimi göstermektedir (Damaghi ve ark., 2013; Tan ve ark., 2015).

Otofaji: Eski veya hasarlı hücresel bileşenlerini, hücre için gerekli temel makromoleküllere geri dönüştürmek üzere kullanılan bir hücresel mekanizmadır. Tüm hücreler otofajiye maruz kalmaktadır; ancak besin veya büyüme faktörü eksikliği veya hipoksi gibi stres koşullarına maruz kalan hücrelerde otofaji artma eğilimi göstermektedir (Tan ve ark., 2015).

1.3.Kanser Tedavisinde Geleneksel Yaklaşım

Kanser tedavisi temel olarak cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, immünoterapi ve bunların kombinasyonlarından oluşmaktadır (Estanqueiro ve ark., 2015; Steichen ve ark., 2013). Cerrahi ile tümörün tamamı ya da bir kısmı alınmaktadır. Radyoterapi vücut dışından vücudun belirli bölgelerini hedef alan bir cihaz aracılığıyla, radyasyon kaynağının tümör içine veya yakınına yerleştirilmesi ya da İV yolla sıvı radyasyon kaynağının hastaya verilmesi şeklinde uygulanmaktadır (Allen ve ark., 2017). En yaygın olarak bilinen kanser tedavisi ise kemoterapidir. Kemoterapi kanser hücrelerini öldürerek yok etmek ya da tümörü küçültmek, büyümesini veya yayılmasını engellemek amacıyla kullanılmaktadır. Her yöntemin kendine özgü avantaj ve dezavantajlarının bulunması ve tedavilerin kişiden kişiye farklılık göstermesi nedeniyle tek ve kesin bir tedavi yönteminin varlığından bahsetmek imkansızdır. Ancak tüm teknolojik gelişmelere rağmen geleneksel kemoterapi ile tedaviden beklenen etki elde edilememiştir (Estanqueiro ve ark., 2015).

1.4.Over Kanseri

Kadın üreme sisteminin bir parçası olan overler, uterusun her iki tarafına yerleşmiş olarak bulunmaktadır (Şekil 1.1.). Overler; fertil kadınlarda her ay bir yumurta üretiminden ve kadının doğurganlık süresi boyunca kadın cinsiyet hormonları olan östrojen ve progesteron üretiminden sorumludur (Desai ve ark., 2014).



Şekil 1.1. Kadın üreme sisteminin şematik gösterimi (National Ovarian Cancer Coalition, Son erişim tarihi Ocak, 2020).

Over kanseri kadınlar arasında en sık karşılaşılan 7., en ölümcül 8. kanser türüdür. Tüm dünyada her yıl 240000 kadına over kanseri teşhisi konulmakta, %45'in altındaki 5 yıllık sağ kalım süresi ile yılda 150000 kadının ölümüne neden olmaktadır. 40 yaş altındaki kadınlarda over kanseri görülme sıklığı az olmakla birlikte 40 yaşın üzerinde görülen over kanserlerinin % 90'dan fazlası epitelyal tümörlerdir. Yaş ile birlikte risk artar ve 70'li yaşların sonuna doğru zirveye çıkar (Webb ve Jordan, 2017). Over kanseri ileri seviyede bile yaklaşık %60-80 tedaviye cevap oranıyla en duyarlı tümörlerden biri olmasına rağmen en ölümcül jinekolojik kanserdir Balch ve ark., 2004; Holmes, 2015; Kigawa, 2013).

1.4.1. Over Kanseri Risk Faktörleri

Over kanseri için en büyük risk faktörünün aile öyküsü olduğu bilinmektedir. Birinci derece akrabalarında over kanseri öyküsü bulunan kadınların over kanserine yakalanma riskleri aile öyküsü olmayan kadınlara göre üç kat fazladır. Çizelge 1.1'de over kanseri riskini artıran ve azaltan faktörler özetlenmiştir (Webb ve Jordan, 2017).

Çizelge 1.1. Over kanseri risk faktörleri.

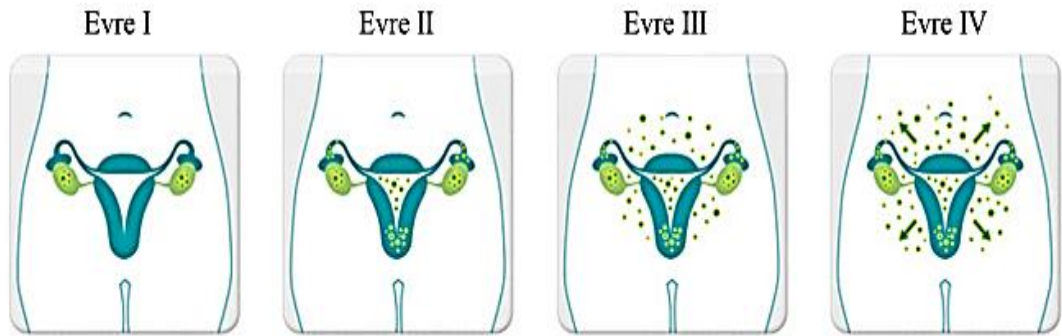
Riski artıran faktörler	Riski azaltan faktörler
Aile öyküsü	Geciken ilk menstrüasyon*
İnfertilite	Geç menapoz*
Menapozal hormon tedavisi	Gebelik
Endometriozis	Emzirme
Polistik over sendromu*	Kombine oral kontraseptifler
Pelvik inflamatuvar hastalık	NSAİ
Diabetes mellitus	Fiziksel aktivite
Obezite	
Alkol	
Sigara	
Talk pudrası	

* Belirgin değil

1.4.2. Over Kanseri Gelişimi ve Tedavisi

Overlerde kanser, yumurtayı saran epitel doku, hormon üretiminden sorumlu olan stromal hücreler ve germ hücreleri olmak üzere 3 tip dokuda meydana gelmektedir (American Cancer Society, 2014). Over kanserlerinin %90'ı epitelyal kökenli iken %10'u germ ve stromal hücre kökenlidir (Engelberth ve ark., 2014; Zahedi ve ark., 2012). Epitelyal over kanseri, intraperitoneal kavitede lokalize olmuş, farklı morfoloji ve klinik görünümüne sahip yüksek ve düşük derecede seröz, müsinöz, berrak hücreli ve endometrioid over kanserleri gibi farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır (Engelberth ve ark., 2014; Zahedi ve ark., 2012). Yüksek derecede seröz over kanserleri peritoneal kaviteye hızla yayılan ancak kemoterapiye duyarlı özellik gösteren kanserlerken, düşük derecede seröz tümörler yavaş gelişir ve kemoterapiye dirençlidir. Endometrioid ve müsinöz kanserler genelde düşük dereceli tümörlerdir ve yumurtalıklarda sınırlanmaktadır (Zahedi ve ark., 2012).

Over kanserinde evreleme kanserin ne kadar yaygın olduğunu belirlemek açısından önemlidir; çünkü kanser farklı evrelerde farklı prognoz göstermekte ve farklı bir tedavi şekli gerektirmektedir. Over kanseri ve fallop tüpü kanserleri genelde FIGO sistemi ile evrelendirilmektedir (Çizelge 1.2 ve Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Over kanseri evreleme sisteminin şematik gösterimi (National Ovarian Cancer Coalition, Son erişim tarihi Ocak, 2020).

Çizelge 1.2. FIGO Over kanseri evreleme sistemi.

Evre I	Overler ile sınırlı tümör	IA	Tümör bir overde sınırlı ve kapsül sağlamdır. Over yüzeyinde tümör yoktur. Asit ya da peritoneal yıkamada malign hücre yoktur.	
		IB	Her iki overde de tümör vardır.	
		IC	IC1	Cerrahi dökülme
			IC2	Kapsül bozukluğunun ardından cerrahi operasyon ya da over yüzeyinde tümör
			IC3	Asit ya da peritoneal yıkamada malign hücre vardır.
Evre II	Pelvik yayımlı ve bir ya da iki overle sınırlı tümör	IIA	Uterus ve/veya fallopi tüpünde tümör yayılımı ve/veya tümör implantı.	
		IIB	Diğer pelvik dokulara tümör yayılımı	
Evre III	Pelvis dışında sitolojik ya da histolojik olarak doğrulanmış peritoneal ve/veya retroperitoneal metastazlı bir veya her iki overi tutan tümör	IIIA	Retroperitoneal lenf nodlarında ve/veya pelvis dışında mikroskopik metastaz	IIIA1 Sadece retroperitoneal lenf nodları
				IIIA2 Mikroskopik, pelvis dışında peritoneal yayılım ± retroperitoneal lenf nodları
		IIIB	≤ 2 cm, makroskopik, pelvis dışında peritoneal metastaz ± retroperitoneal lenf nodları. Karaciğer/dalak kapsülüne yayılım	
		IIIC	≥ 2 cm, makroskopik, pelvis dışında peritoneal metastaz ± retroperitoneal lenf nodları. Karaciğer/dalak kapsülüne yayılım	
Evre IV	Peritoneal metastazlar dışında uzak metastazlar	IVA	Pozitif sitoloji ile birlikte plevral efüzyon	
		IVB	Karaciğer ve/veya dalakta parenkimal metastaz, abdominal bölge dışındaki organlara metastaz	

Birinci evre over kanseri, tümörün bir veya her iki overde bulunduğu ve pelvik veya alt karın bölgesindeki organlara, lenf bezlerine veya karın bölgesi dışına yayılmamış olguları içermektedir. Evre I over kanserlerinde, hastaların çoğu uygun cerrahi müdahale ile iyileşmektedir. Erken evre over kanserinde uygulanan cerrahi girişim tümör çıkarıldığı ve yayılma olasılığı olan bütün alanların örneklemesi yapıldığı için “evreleme cerrahisi” olarak tanımlanmaktadır. Evreleme cerrahisi

usulüne göre yapıldığında sağ kalım %80-95 arasındadır. Ancak bu grup hastalarda bile nüks ve buna bağlı ölüm riski mevcuttur. Evreleme cerrahisi sonucunda olası nüksleri engellemek için verilen kemoterapiye “Adjuvan Kemoterapi” denilmektedir. Evre I over kanserinde adjuvan kemoterapide standart tedavi olarak karboplatin önerilmekle birlikte, yüksek risk taşıyan hastalarda paklitaksel ve karboplatin kombinasyonu kullanılmaktadır. Ancak bu tedavinin uzun süre devam etmesi ciddi toksisite artışına neden olmaktadır (Gökaslan, 2019).

İkinci evre over kanseri, overler ve diğer alt karın bölgesi organları ile sınırlıdır. Kanser henüz karın üst bölgesine, lenf bezlerine veya karın bölgesi dışına yayılmamıştır. Evre IIA kanserlerde tümör uterus ve/veya fallopi tüplerine yayılma göstermektedir. Evre IIB’de ise tümör diğer pelvis içi organlara yayılmış olup pelvis ile sınırlıdır. İkinci evre over kanserinin standart tedavisi, cerrahi müdahale ardından kemoterapi tedavisinden oluşmaktadır. IIA evresindeki hastalarda kanserin tekrarlama olasılığı %30-40’tır. Ancak, daha ileri evre olan IIB hastalarda bu oran daha da yükselmektedir. Bu evre için standart tedavi olarak, Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (National Comprehensive Cancer Network-NCCN) rehberine göre, altı kür intravenöz taksan ve karboplatin kombinasyonu önerilmektedir (Gökaslan, 2019).

Üçüncü evrede over kanseri, yumurtalık dışında üst karın bölgesindeki karın zarına veya lenf bezlerine yayılmaktadır; ancak henüz karın bölgesi dışına veya karaciğere yayılma henüz göstermemiştir. Üçüncü evre over kanseri için standart tedavi cerrahi müdahale ve sonrasında uygulanan platin ve taksan kombinasyonundan oluşan kemoterapidir. Fakat, standart tedavi gören hastaların yaklaşık %40’ından daha azı 10 yıldan uzun yaşam süresine sahip olabilmektedir. Bunun sebebi, cerrahi müdahale ile kanser dokusunun tamamının alınamaması ve arkasından uygulanan kemoterapinin kalan kanser hücrelerini öldürme konusunda tek başına yeterli olamamasıdır. Evre III’te cerrahi tedavi, evreleme cerrahisinin ötesinde mevcut bütün tümör odaklarının tamamının temizlenmesi şeklinde ileri cerrahi işlem gerektirmektedir. Tümörü suboptimal çıkarılmış olgularda, sispaltin/dosataksel, dosataksel/karboplatin, paklitaksel/karboplatin, Pegile lipozomal doksorubisin/karboplatin kombinasyonlarından biri kullanılabilir. Tümörü

optimal çıkarılmış hastalarda ise intravenöz tedavilere periton içi tedavilerde eklebilmekte ve daha başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Bu standart tedavide, birinci gün intravenöz paklitaksel, ikinci gün intraperitoneal sisplatin, sekizinci gün intraperitoneal paklitaksel uygulanmaktadır. Periton içi kemoterapinin ısıtılarak (42 °C) uygulandığı bir tedavi olan HIPEC (Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy - Hipertermik Periton içi Kemoterapi) ile de umut verici sonuçlar bildirilmiştir.

Kemoterapi kürleri tamamlandıktan sonra hasta kemoterapiye klinik olarak yanıt vermemiş ise hastalık “platine dirençli hastalık” ve “yanıtsız over kanseri” olarak adlandırılmaktadır. Bu durumda tedaviyi pekiştirmek için anjiogenez inhibitörleri, anjiopoetin inhibitörleri, PARP inhibitörleri, EGFR tirozin kinaz inhibitörleri, folat reseptör alfa inhibitörleri gibi over kanserinde birinci basamak tedaviden ziyade daha çok nüksetmiş olgularda hedefe yönelik tedavi ve immünoterapi uygulanmaktadır (Günakan ve Dursun, 2019). Hedeflendirilmiş tedavi daha yeni bir yaklaşımdır. Hedeflendirilmiş tedavide kullanılan her ajan farklı şekilde etki etmektedir; ancak temel olarak kanser hücrelerini tanıyarak bu hücrelerin büyüme, bölünme, kendini onarma veya diğer hücrelerle etkileşime girme şeklini değiştirmekte, sağlıklı hücrelere daha az zarar vermektedir. Hormon tedavisinde ise hormonlar ya da hormon engelleyici ilaçlar kullanılmaktadır. Bu tip sistemik tedavi daha çok stromal over tümörlerini tedavi etmek için tercih edilmektedir (American Cancer Society, 2014).

Evre IV over kanseri, kanserin batin boşluğu dışına çıktığı veya organ metastazlarının görüldüğü sistemik bir tutulum durumudur. Dördüncü evre over kanseri standart tedavisi uygun ise cerrahi uygulamak ve takiben kemoterapiden oluşmaktadır. İleri evre yumurtalık kanserinin kemoterapisinde platin ile birlikte paklitaksel kombinasyonu kullanımının yaşam sürelerini uzattığı gözlemlenmiştir. Son yıllarda bu ikili kemoterapiye, kan ve lenf damarlarının yüzeyinde bulunan insan vasküler endotelial büyüme faktörüne (VEGF) bağlanarak etkisini gösteren bir monoklonal antikor olan Bevasizumab (Avastin®) eklenmesi ile tedaviden alınan yanıt oranları artmıştır. Evre IV’te hastalığın tekrarlama olasılığı kaçınılmaz olduğu için idame tedavi önerilmektedir. Ancak bu amaçla topotekan, antrasiklin veya platin ile genel sağ kalım avantajı çok yüksek sonuçlar sağlamamıştır (Gökaslan, 2019).

Over kanserinde radyoterapi: Radyoterapi (ışın tedavisi), yüksek enerjili ışınların tedavi amacıyla kullanıldığı, kanserin tedavi yöntemlerinden biridir. Radyoterapide kullanılan iyonize ışınların temel etki mekanizması, kanser hücrelerinin DNA'sını hasara uğratarak çoğalmasını engellemek, radyasyon bölgesinde bulunan tüm kanserli hücreler yok etmektir. Ancak, kanser vücudun diğer bölümlerine yayılma göstermişse, radyoterapi uygulanan bir tedavi yöntemi değildir. Radyoterapi, cerrahi müdahale gibi bölgesel bir tedavi şeklidir. Kemoterapiye dirençli ve cerrahiye uygun olmayan hastalarda ve palyatif (destek) tedavi olarak kullanılmaktadır. Palyatif radyoterapide amaç, tümörün karın bölgesinde pelvis içinde büyüdüğü alanda veya metastaz yapmış olduğu alanda ağrıyı ve baskıyı azaltmaktır.

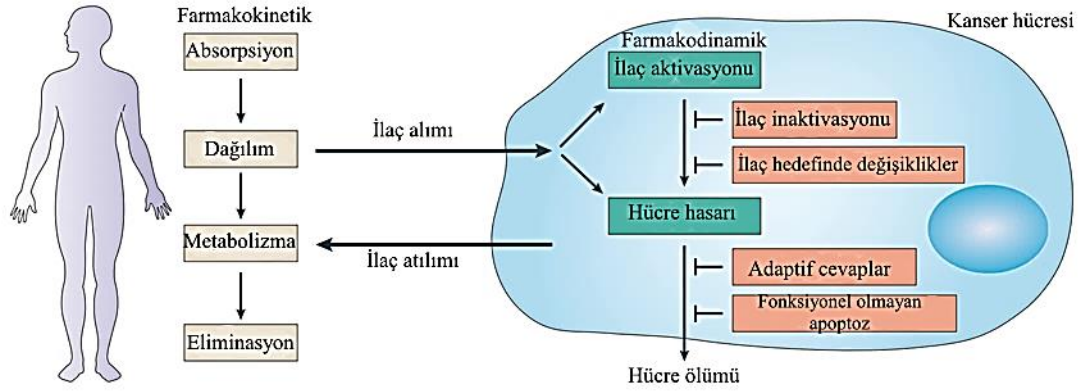
Over kanserinde immünoterapi: İmmün tedaviler over kanseri tedavisinde son yıllarda yerini almaktadır. Nivolumab, pembrolizumab, ipilimumab, avelumab, durvalumab gibi pek çok monoklonal antikor ile yapılmış başarılı sonuçlar vaat eden çalışmalar mevcuttur.

1.5.İlaç Direnci

Kemoterapi, kanser tedavisinin başlıca tedavi seçeneği olmasına rağmen , ilaç direnci kanser tedavisinin başarısızlığının ve hastaların %90'ında metastatik hastalık nedeniyle ölümün nedenidir (Agarwal ve Kaye, 2003; Sato ve Itamochi, 2015). Klinik uygulamada ilaç direnci yönetilebilir toksisiteli dozlarda görülen progresif hastalık olarak tanımlanmaktadır. Çoğu kemoterapötik ilaç düşük terapötik indekse sahip olduğu için tümör hücrelerinin duyarlılığındaki küçük değişiklikler bile klinik olarak dirence neden olabilir (Agarwal ve Kaye, 2003).

İlaç direnci; doğal ve kazanılmış olmak üzere iki temel sınıfa ayrılmaktadır. Doğal ilaç direncinde tümör dokusu içerisinde tedavi öncesinde dirençle ilgili faktörler bulunurken, kazanılmış dirençte başlangıçta tedaviye duyarlı olan kanser tedavi sırasında gelişen çeşitli mutasyonlar nedeniyle dirençli hale gelmektedir (Holohan ve ark., 2013).

İlaç direnci; farmakokinetik, tümör mikroçevresine özgü ve kanser hücresine özgü olmak üzere üç temel gruba ayrılmaktadır. Farmakokinetik ilaç direnci; ilk geçiş etkisi, önilaçların aktif metabolitlerine dönüştürülmesi, renal klerens, hepatik ilaç metabolizması ve tümör damarlanması gibi bireysel farmakokinetik değişkenlere bağlı olarak hücre içi ilaç konsantrasyonunda meydana gelen farklılıkları ifade ederken, tümör mikroçevresine bağlı direnç hipoksinin neden olduğu serbest radikal oluşumunda azalma, artan ilaç detoksifikasyonu ve genomik instabilite, apoptozun inhibisyonunu ifade etmektedir. Kanser hücresine özgü ilaç direnci, zaman içerisinde oluşan somatik mutasyonlar ve epigenetik değişimler sonucu ilaç-hedef etkileşimini ve hücre hasarını etkileyen mekanizmalardan oluşmaktadır (Agarwal ve Kaye, 2003). İlaç direnci, Şekil 1.3'te gösterilen farklı mekanizmalardan kaynaklanmaktadır (Holohan ve ark., 2013).



Şekil 1.3. İlaç direnci gelişimi (Holohan ve ark., 2013)

a) İlacın aktif dışı atılımı

En çok araştırılan direnç mekanizmalarından biri hücre içi ilaç birikimini azaltan aktif dışı atılımdır (Housman ve ark., 2014). Hücre membranında bulunan çeşitli taşıyıcı proteinler, ilaçların aktif dışı atılımını tetikleyerek yaygın olarak kullanılan kemoterapötiklere karşı direnç gelişimine neden olmaktadır. ATP-bağımlı taşıyıcı protein (ATP-binding cassette - ABC) ailesi bu dışı atılımı sağlayan önemli transmembran protein grubudur. Bu taşıyıcı ailesine ait taşıyıcılar olan çoklu ilaç direnci proteini 1 (multidrug resistance protein 1 - MDR1 - p-glikoprotein), çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein ailesi (MDR-associated protein 1 - MRP1) ve meme kanseri

direnç proteini (breast cancer resistance protein - BCRP); çoklu ilaç direnci ile yakından ilgilidir (Holohan ve ark., 2013; Housman ve ark., 2014). Bunun yanında bakır taşıyıcı ATP7A ve ATP7B proteinleri, platin bazlı kemoterapötiklerin hücre dışına atılmasında rol oynamaktadırlar (Nakayama ve ark., 2001).

b) İlaç aktivasyon ve inaktivasyonu

Diğer bir direnç mekanizması ise ilaçların inaktive edilmesi ya da aktivasyonunda görülen eksikliklerdir. Bu tür mekanizmalar her etkin madde sınıfı için oldukça özeldir. Örneğin, platin türevi ilaçlar, tiyol glutatyon tarafından etkisiz hale getirilmektedir (Holohan ve ark., 2013).

c) İlaç hedeflerinde değişiklik

İlaca cevap ve direnç, ilacın moleküler hedefindeki mutasyonlar ya da ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler gibi değişikliklerden etkilenmektedir (Holohan ve ark., 2013; Housman ve ark., 2014).

d) DNA hasar tamiri

Pek çok kemoterapötik ajan DNA hasarı oluşturarak etki göstermektedir. Oluşan DNA hasarına cevap ise hasarın tamiri ya da hücre ölümü şeklinde meydana gelmektedir. Bu durumda kanser hücresinin DNA tamir kapasitesi ilacın etkinliğini değiştiren önemli bir parametre halini almaktadır (Holohan ve ark., 2013). Kanser hücreleri, DNA hasarına cevap olarak DNA hasar yanıt mekanizmaları yoluyla hasarı tamir edebilmektedir (Housman ve ark., 2014). Kanser hücrelerinin DNA hasarını tamir etme kapasitelerindeki artış ilaç direncine neden olmakta ve özellikle platin bazlı kemoterapiye karşı oluşan dirençte sıkça rastlanmaktadır (Mihanfar ve ark., 2019). Platin bazlı kemoterapötikler hücreyi apoptoza götürebilecek DNA çapraz bağlarına

neden olarak etki göstermektedirler. Platin bazlı kemoterapötiklere direnç, çoğu zaman nükleotit ya da baz eksizyon onarımından kaynaklanmaktadır (Housman ve ark., 2014). Kemoterapötüğün neden olduğu lezyon, bu mekanizmalarla çıkarılarak tamir edilmektedir (Nikolaou ve ark., 2018). Bu DNA tamir yollarındaki hasarlar ise platin bazlı kemoterapötiklere hassasiyeti artırmaktadır (Norouzi-Barough ve ark., 2018). Bu açıdan bakıldığında DNA tamirinin seçici olarak inhibe edilmesi kemoterapötiklerin etkinliğini artırabilecek bir yaklaşımdır (Mihanfar ve ark., 2019).

Diğer yandan platin bazlı kemoterapinin sitotoksik etkisi, esas olarak, replikasyonun durdurulmasına, hücre döngüsü kontrol noktasının aktivasyonuna, G₂ fazının uzamasına ve hasarın çok şiddetli olması durumunda hücre ölümüne yol açan DNA ürünleri oluşumundan kaynaklanmaktadır. DNA yanlış eşleşme tamir sistemi (MMR) sisplatin ve karboplatin gibi antineoplastik etkin maddelere cevap olarak oluşan hücre ölümünde kritik öneme sahiptir. MMR, DNA replikasyonundan sonra baz uyumsuzluklarını onarmak, özdeş olmayan DNA dizileri arasındaki rekombinasyonu engellemek ve belirli DNA hasarı türlerinin ardından hem bir kontrol noktasını etkinleştirmek hem de apoptotik yanıtları tetiklemekle görevlidir. (O'Brien ve Brown, 2006). Platin bazlı kemoterapi tarafından oluşturulan hasarlı DNA'nın tespiti için etkin bir MMR sistemi gerekmektedir. Etkin bir MMR sisteminde DNA hasarı Mut adı verilen proteinler tarafından tespit edilmektedir. Platin bazlı kemoterapide ise platin-DNA ürünleri MMR etkinliğine dahil olarak hasarlı DNA'nın onarımının tamamlanmasını engellemektedir. DNA onarımının tamamlanamaması ise apoptozu tetiklemektedir. MMR eksikliğinde ise kanser hücreleri, onarımın tamamlanamamasına rağmen hücre döngüsünü durdurmadan kansere karşı direnç kazanarak çoğalmaya devam etmektedir (Martin ve ark., 2008). Genetik ya da epigenetik değişiklikler sonucu MMR sisteminde oluşan bu eksikliğin hedef alınması ise platin bazlı kemoterapiye karşı gelişen direncin aşılması için kullanılabilecek bir stratejidir.

e) Hücre ölümünün inhibisyonu

Apoptoz ve otofaji, hücre ölümünü düzenleyen iki temel mekanizmadır (Housman ve ark., 2014). Apoptoza karşı direnç gelişmesi kanserin başlıca belirtilerinden biri olarak görülmektedir (Holohan ve ark., 2013). Pek çok kanser tipinde doğal apoptoz yolağının bileşenlerinden olan BCL-2 protein ailesi aşırı eksprese edilmekte ve kemoterapi için iyi bir hedef oluşturmaktadır (Housman ve ark., 2014). BCL-2 ailesinde özellikle BCL-2, BCL-XL olmak üzere antiapoptotik proteinlerin aşırı ekspresyonu sonucunda bu ilaçlara karşı direnç gelişmektedir. Apoptoz yolağına hedeflendirme yaklaşımı ise ilaç direncinin önüne geçmek için uygulanabilecek stratejilerden biridir. Apoptoz prosesi karmaşık bir proses olmasına rağmen terapötik girişim için pek çok olası hedef sunmaktadır (Fojo ve Bates, 2003).

Sitoplazmik materyalin lizozoma taşınması ve burada parçalanması anlamına gelen otofaji; besin eksikliği, hipoksi, hipertermi, oksidatif stres gibi etkenlerle aktive olmaktadır. Otofajinin artması apoptozun azalmasına ve over kanseri gibi kanserlerde direnç gelişimine neden olmaktadır (Norouzi-Barough ve ark., 2018).

f) Kanser hücresinin değişkenliği

Tüm bu direnç gelişim mekanizmalarının yanı sıra heterojen bir kanser hücresi popülasyonundaki ilaca dirençli hücrelerin sayıca artması da gözönünde bulundurulması gereken bir diğer mekanizmadır. Bu heterojen topluluktaki hücrelerin bir kısmı kök hücre özelliğine sahiptir ve genellikle ilaca karşı dirençlidirler. Bunun yanında yetişkin kanser hücrelerinin bir kısmı da ilaca direnç özelliği gösterir ve tedavi sonrasında hayatta kalan bu hücreler zamanla yeniden tümör gelişimine ya da metastaz oluşumuna neden olabilirler (Housman ve ark., 2014).

g) Epigenetik faktörler

Epigenetik, DNA zincirinde herhangi bir değişiklik olmaksızın kromozom bölgelerindeki yapısal adaptasyonlardan kaynaklanan gen ekspresyonunun kalıtsal fenotipik değişikliğidir. Kanser hücrelerindeki epigenetik değişiklikler DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kodlamayan RNA (mikroRNA)'lar ve transkripsiyon faktörlerindeki değişiklikler yoluyla anormal gen ekspresyonu ile sonuçlanmaktadır. Bu modifikasyonlar, over kanserinin başlaması ve gelişimi ile ilişkilendirilmektedir (Nguyen ve ark., 2014). Epigenetik değişiklikler aynı zamanda ilaç direncinde rol alan genlerin ekspresyonunu değiştirerek ilaç direnci gelişimine de yol açmaktadırlar (Sato ve Itamochi, 2015). Hem doğal hem de kazanılmış dirençte gen ekspresyonlarında değişiklikler meydana gelmektedir. Over tümörlerinde hücre farklılaşması, DNA tamiri ve anjiyogenez ile ilgili genler normalden çok eksprese edilirken, proapoptotik, antiproliferatif ve DNA yanlış eşleşme genleri gibi genler normalden daha az eksprese edilmektedir (Balch ve ark., 2004).

DNA metilasyonu çoklu ilaç direnci ile ilişkili en çok araştırılan ve gen ekspresyonu ve farklılaşmasını kontrol eden temel epigenetik mekanizmalardan biridir (Zeller ve Brown, 2010; Zhang ve ark., 2016). DNA'nın hipermetilasyonu kritik genlerin susturulmasına neden olurken hipometilasyonu genlerin aktivasyonuna neden olmaktadır. DNA metilasyonu genelde CpG adaları olarak adlandırılan ve sitozin-guanince zengin bölgelerdeki sitozin-guanin dinükleotitlerinin sitozin artıklarında DNA'ya metil gruplarını eklenmesi şeklinde gerçekleşmektedir (Balch ve ark., 2004; Nguyen ve ark., 2014). Susturulmuş kritik tümör baskılayıcı genlerdeki hipermetile CpG adaları hücre büyümesinin kontrolü ve proliferasyonun inhibisyonundan sorumludur (Nguyen ve ark., 2014). Bu epigenetik susturulma tümör başlangıcı, büyümesi ve ilaç direnci de dahil olmak üzere kanser proseslerinin tüm fazlarına etki etmektedir (Matei ve Nephew, 2010). DNA hipometilasyonu ise daha önceden susturulmuş olan onkogenlerin transkripsiyonunu aktive ederek karsinogeneze katkıda bulunmaktadır (Nguyen ve ark., 2014).

Tümör baskılayıcı genler; hücre proliferasyonu, farklılaşma, migrasyon, hücre döngüsü, DNA hasarının tespiti ve tamiri gibi çeşitli hücresel aktivitelerde düzenleyici olarak rol alan genlerdir ve fonksiyonlarını kaybetmeleri kanser gelişimine neden olmaktadır. Tümör baskılayıcı genlerdeki genetik ve epigenetik değişiklikler over kanserinde ilaç direnci gelişimine katkıda bulunmaktadır (Yin ve ark., 2013).

Daha önce de bahsedildiği gibi DNA metilasyonu, gen susturulması ile yakından ilişkilidir ve tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyonunu engelleyebilir. HumanMutL homolog 1 (hMLH1) ve meme kanseri direnç geni 1 (BRCA1), DNA hasarına cevap ve yanlış DNA eşleşmesinin tamirinde yer alan proteinlerin transkripsiyonunda kritik öneme sahip iki gendir. Over kanserinde bu proteinleri kodlayan genlerin promotor bölgeleri hipermetile haldedir ve hMLH1 ile BRCA1 düşük düzeyde eksprese edilmektedir (Nguyen ve ark., 2014).

Aktif bir yanlış eşleşme tamir yolağı platin sitotoksitesini artırabilirken, bu yolaktaki herhangi bir aksaklık ya da eksiklikte platin bazlı kemoterapötiklere karşı direnç gelişmektedir. Yanlış eşleşme tamir genlerinden biri olan hMLH1, pek çok alkilleyici ajana verilen hücresel cevaplar ve platin bazlı kemoterapötiklere bağlı DNA hasarı için gereklidir; ancak over kanserlerinin önemli bir kısmında platin direnci durumunda metilasyon ile susturulmaktadır (Agarwal ve Kaye, 2003). hMLH1'in aşırı metilasyonu sonucu MLH1 ekspresyonunun kaybedilmesi platin bazlı kemoterapide platin-DNA ürünlerine bağlı apoptotik cevap gelişimini inhibe etmektedir. hMLH1'deki kazanılmış metilasyon, over kanserinde platin bazlı tedavi sonrası gelişmekte ve platin direncinin ana moleküler nedeni olarak düşünülmektedir (Balch ve ark., 2004; Nguyen ve ark., 2014; Sato ve Itamochi, 2015; Zeller ve Brown, 2010).

DNA metilasyonu, DNA metiltransferaz (DNMT) enzim ailesinin katalizörlüğünde gerçekleşmektedir (Balch ve ark., 2004; Nguyen ve ark., 2014). Over kanseri hücrelerindeki değişen DNMT RNA seviyeleri ve gen hipermetilasyonu arasındaki ilişki doğrusal olmasa da over kanserinde platin direnci kazanılması sırasında DNMT seviyelerinde önemli artış gözlenmektedir. Bu durum, anormal metilasyonun artmış ya da değişmiş DNMT aktivitesinden kaynaklandığını

gösterebilir (D. E. Matei ve Nephew, 2010). DNA metil transferaz inhibitörleri aracılığı ile susturulan kritik tümör baskılayıcı genlerin yeniden etkinleştirilmesi ise ilaç direncini önlemek ve ilaca dirençli over kanserlerinin geleneksel kemoterapötiklere tekrar duyarlılaştırılması için uygun bir strateji olarak görülmektedir (Sato ve Itamochi, 2015). Over kanserinde kullanılan pek çok etkin madde, etkisini apoptotik yollardan gösterdiği için bu susturulmuş apoptotik genlerin tekrar ekspresyonunun tümör hücrelerinin duyarlılaşması ile sonuçlanması beklenmektedir (Balch ve ark., 2004). Kanserdeki epigenetik değişimlerin anlaşılması, epigenetik tedavi olarak adlandırılan epigenetik modülatörlere hedeflendirme ile tedaviye olanak sağlamaktadır (Qin ve ark., 2015).

1.5.1. İlaç Direncini Önleme Yaklaşımları

İlaç direncini önleme yaklaşımları; ilaca maruziyetin artırılmasına yönelik çalışmalar, varolan sitotoksik ajanların analogları, yeni sitotoksik ajanlar, potansiyel direnç modülatörleri, apoptotik sinyal modülatörleri ya da sinyal transdüksiyon inhibitörlerinin kullanımı ya da kombinasyon tedavisidir (Agarwal ve Kaye, 2003).

İlaç direnci ile ilgili moleküler mekanizmaların aydınlatılması hastaların yaşam sürelerinin uzatılması adına çok önemli bir adımdır. Over kanseri tedavisinde platin direncinin sıklığı nedeniyle yeni tedavi seçenekleri geliştirilmesi için çaba harcanmaktadır (Engelberth ve ark., 2014; Matei ve Nephew, 2010). Bu amaçla; kemoterapötiklerin uygulanması için intraperitoneal yolun kullanılması, hedeflendirilmiş ilaçların geliştirilmesi (bevasizumab (Avastin®)), kombinasyon tedavisi ve pasif ve/veya aktif ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanılması gibi farklı yaklaşımlar geliştirilmiştir.

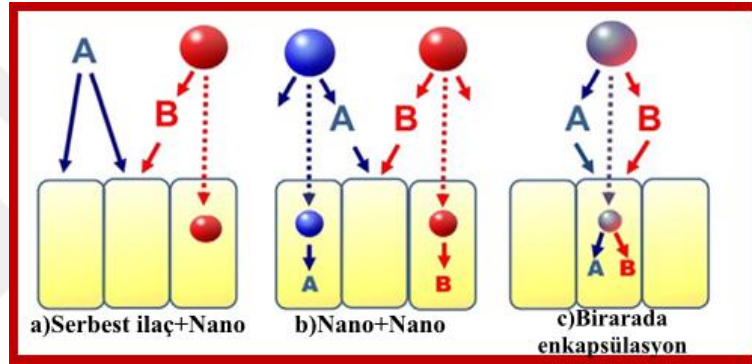
1.5.1.1.İntraperitoneal Uygulamalar

Platin direnci, over kanseri tedavisinde alternatifleri oldukça kısıtlamaktadır. Alternatiflerden biri platin bazlı kemoterapinin oral ya da intravenöz uygulama yerine intraperitoneal yolla uygulanmasıdır (Morgan ve ark., 2014). Kemoterapide ilaçlar daha çok intravenöz (İV) ya da oral yoldan verilebileceği gibi bazı durumlarda bir kateter yardımıyla abdominal kaviteye enjekte edilerek uygulanmaktadır. Bu uygulama şekline intraperitoneal (İP) uygulama adı verilmektedir (American Cancer Society, 2014). İntraperitoneal kemoterapi uygulaması sırasında başlangıçta daha fazla yan etki görülmesine rağmen ortalama yaşam süresinde artış görülmektedir (Morgan ve ark., 2014). İP yolla kemoterapötik uygulanması; over kanserini göreceli olarak sınırlandırabilmesi, intraperitoneal kavitedeki metastatik lezyonlar nedeniyle tümöre daha iyi bir hedeflendirme sağlaması ve sistemik toksisite potansiyelini azaltması nedeniyle uzun yıllardır gündemdedir (Engelberth ve ark., 2014). Ancak bu tedavi şekli ile ilaç direnci önlenemediği için hastalığın tekrar etmesi kaçınılmazdır. (Morgan ve ark., 2014). Diğer yandan İV yolla karşılaştırıldığında İP yolla ilaç uygulanması abdominal bir kateterin varlığı nedeniyle hasta için daha az konforlu bir tedavidir. Ayrıca İP uygulama intraabdominal enfeksiyon ve gastrointestinal yan etki gibi lokal toksisite riskini de artırmaktadır (Engelberth ve ark., 2014).

1.5.1.2.Kombinasyon Tedavisi

Kombinasyon tedavisi; bir ilaca dirençli olan tümör hücrelerinin farklı bir etki ve direnç mekanizmasına sahip bir başka ilaca duyarlı olabilmesi, iki ilaç arasında biyokimyasal bir sinerji olabilmesi (Agarwal ve Kaye, 2003), tek bir ilacın tümör heterojenliği ve ilaç direnci nedeniyle tedavi için kısıtlı klinik cevap sağlayabilmesi gibi gerekçelere dayanmaktadır (Kemp ve ark., 2016; Xu ve ark., 2015). Kombinasyon tedavisinin amacı ise sistemik toksisiteyi artırmadan kanser tedavisinin etkinliğini artırmak ve aynı zamanda ilaç direncinin önüne geçmektir (Kemp ve ark., 2016). Kombinasyon tedavisinde kanser gelişimindeki farklı yollar, genler ya da hücresel olayları hedefleyen iki ya da daha çok ajanın sinerjik etkisinden yararlanılmaktadır

(Dickens ve Ahmed, 2018; Xu ve ark., 2015). Etkili bir kombinasyon oluşturmak için gözönünde bulundurulması gereken bir takım ilkeler bulunmaktadır. Örneğin; hücre döngüsünün farklı fazları hedeflenmelidir, aditif ya da sinerjik etkinin elde edilebilmesi için farklı etki mekanizmalarına sahip olmalıdırlar, toksisite profilleri birbirleriyle örtüşmemelidir (Dickens ve Ahmed, 2018). Bu şekilde etkin maddeler daha düşük dozlarda kullanılarak etkilerinin artırılması ve sitotoksik etkilerinin azaltılması mümkün kılınabilir (Kemp ve ark., 2016; Xu ve ark., 2015). Pratikte ise tek bir ilaçla yapılan tedavi ile karşılaştırıldığında kombinasyon tedavisinin ortalama yaşam süresini uzattığı görülmüştür (Xu ve ark., 2015).



Şekil 1.4. Farklı kombinasyon tedavisi yaklaşımları (Zhang ve ark.;2016)
A ve B: etkin maddeler

Over kanserinin standart tedavisi bir kombinasyondan oluşsa da günümüze kadar over kanseri tedavisi için araştırılan nanosistemler genelde tek bir terapötik ajanın taşınmasına odaklanmıştır. Ancak, literatürde bir hücreye girebilecek nanopartikül miktarının sınırlı olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak birden çok ajanı bir arada taşıyan nanopartikül uygulaması (Şekil 1.4c) ile tek bir ajan taşıyan farklı nanopartiküllerin aynı anda uygulanması (Şekil 1.4b) karşılaştırıldığında tek ajan taşıma stratejisi ile etkin maddelerin sadece yarısının hücreye girişi sağlanabilmektedir. Bu nedenle geleceğin nanosistemleri tümör içerisinde optimum dağılıma sahip, birden çok ilacın sinerjik kombinasyonunun taşınmasına odaklanmalıdır (Morgan ve ark., 2014).

1.5.1.3.Epigenetik Yaklaşım

İlaç direncinin önlenmesinde bir diğer yaklaşım tedavide başlangıçta etkili olan, ancak daha sonra direnç kazanılan ilaçlar için yeniden duyarlılık kazandırılmasına yönelik çalışmalardır (Fojo ve Bates, 2003; Watanabe ve ark., 2007). Over kanseri anormal gen metilasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyonel susturulması gibi epigenetik değişikliklerle yakından ilişkilidir (Matei ve ark., 2012). Genetik mutasyonların aksine epigenetik değişimlerin geri dönüşlü olması enzim inhibisyonlarını yeni terapiler için çekici hedefler haline getirmiştir (Matei ve Nephew, 2010; Zeller ve Brown, 2010). Bu nedenle DNA metil transferaz inhibitörleri aracılığıyla elde edilen DNA hipometilasyonu ile epigenetik olarak susturulmuş tümör baskılayıcı genlerin yeniden ekspresyonu sağlanarak kanser hücrelerinin antikanser etkili etkin maddelere tekrar duyarlılaştırılması sağlanabilmektedir (Matei ve ark., 2012; Nguyen ve ark., 2014). Bu epigenetik tedaviler ile anormal regüle edilen genlerin etkinleştirilmesi ya da susturulması ve böylece ilaç direnci de dahil olmak üzere kanser fenotiplerinin çoğu özelliğinin geri çevrilme potansiyeli, DNA metil transferaz inhibitörlerinin var olan kemoterapötiklerle kombinasyon halinde kullanımı ile kazanılmış ilaç direncinin modüle edilebileceğini düşündürmekte ve bu yönde çalışmalar yapılmaktadır (Matei ve Nephew, 2010; Zeller ve Brown, 2010). 2009 yılında Li ve ark. tarafından yapılan bir araştırmada; serbest ilaç halindeki azasitidinin platin bazlı tedaviye dirençli over kanseri hücrelerini (2008/C13 ve Hey) serbest ilaç halindeki karboplatine duyarlı hale getirip getiremeyeceği araştırılmıştır. Çalışma sonunda 24 saatlik azasitidin uygulamasından sonra yapılan 48 saatlik karboplatin uygulaması ile 2008/C13 ve Hey hücrelerinin büyümesinin önemli ölçüde inhibe edildiği, hedef gen DR4'ün demetile edilerek DR4 mRNA ekspresyonunun arttığı bulunmuştur. Ayrıca azasitidin ve karboplatinin tek başlarına yüksek dozlarda kullanıldıklarında büyümeyi bir miktar inhibe ettikleri; ancak kombinasyon tedavisinde, özellikle sırayla uygulamada, daha düşük konsantrasyonlarda inhibisyon sağladıkları görülmüştür.

hMLH1 geninin bir demetilasyon ajanı kullanılarak modülasyonunun ilaca duyarlılığı artırdığı bilinmekte ve bu bilgi DNA yanlış eşleşme tamiri eksik olan

sporadik tümörlerin çoğunda promotor bölgenin hipermetilasyonu ile ilişkili olarak MLH1 proteini eksikliği olmasına dayanmaktadır. Ayrıca klinik olarak hMLH1 ekspresyonu ve ilaç direnci arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. *In vitro* olarak yanlış eşleşme tamir yolağındaki aksaklık sisplatin ve doksorubisin gibi DNA hasarı oluşturarak apoptozu aktive eden ilaçlara direnç gelişimi ile sonuçlanmaktadır. MLH1 proteininin gen transferi ya da azasitidin veya desitabin epigenetik demetilasyon ajanlarıyla tedavinin ardından yeniden ekspresyonunun sağlanması sisplatin, doksorubisin, epirubisin ya da temozolomid gibi ilaçlara duyarlılığı artırdığı düşünülmektedir. *In vivo* çalışmalar ise desitabinin toksik olmayan dozlarının MLH1 ekspresyonunu indüklediğini ve ilaca duyarlılığı artırdığını göstermiştir (Fojo ve Bates, 2003).

Qin ve ark. (2015) susturulmuş genlerin etkinleştirilebilmesi hipotezine dayanarak, SW48 kolon kanseri hücre hattından türetilmiş YB5 hücre hattı üzerinde farklı antineoplastik ilaçların epigenetik etkin madde desitabin ile kombinasyonunun yeniden etkinleştirme etkilerini incelemişlerdir. Bunun sonucunda platin analoglarının desitabin ile epigenetik sinerji gösterdiği görülmüştür.

Karboplatin ve desitabin kombinasyonuna dair ilk klinik çalışmalar Appleton ve ark. (2007) tarafından ortaya konulmuştur. 33 hasta ile yapılan bu Faz I çalışmasında 28 günlük bir siklusta hastalara birinci günde 90 mg/m² dozda desitabin verilmiş ve sekizinci günde ise karboplatin uygulanmıştır. Uygulamanın major toksisitesinin tahmin edilebilir ve kontrol edilebilir şekilde doza bağlı olarak ortaya çıkan myelosupresyon olduğu görülmüştür. Desitabinin karboplatinle güvenle kombine edilebileceği, yapılacak bir Faz II çalışması için uygun desitabin dozunun 90 mg/m² olduğu sonucuna varılmıştır.

Indiana University Simon Cancer Center (IUSCC)'inde yürütülen çalışmada ise 10 platin dirençli ya da tekrarlayan over kanseri hastası üzerinde serbest desitabin ve karboplatin kombinasyonu ile Faz I çalışmaları yapılmıştır. Toksisiteyi azaltmak ve desitabinin demetilasyon özelliğini artırmak amacıyla karboplatin uygulamasından önce beş gün düşük dozda (7 hastaya 10 mg/m² ve 3 hastaya 20 mg/m²) desitabin

uygulanmıştır. Bir hasta tedaviye tamamen cevap verirken üç hastanın hastalığı altı aydan uzun bir süre stabil kalmıştır. Çalışma sonucunda karboplatin ile birlikte tekrarlayan düşük doz desitabin uygulaması ile tedavinin tolere edilebildiği ve klinik yanıt elde edilebildiği ortaya konulmuştur (Fang ve ark., 2010; Matei ve Nephew, 2010).

Plumb ve ark. (2000) tarafından yapılan bir çalışmada serbest desitabin çözeltisinin hMLH1 geninin metilasyonu nedeniyle MLH1 negatif olan A2780/cp70 over ve SW48 kolon kanseri hücreleri ile oluşturulan over ve kolon tümör ksenograftlarına farklı kemoterapötikler için duyarlılık kazandırıp kazandırmayacağı araştırılmıştır. Tümörlü farelere toksik olmayan dozda ($5\text{mg/kg} \times 3 = 15\text{mg/kg}$ total doz) desitabin çözeltisinin İP yolla uygulanması hMLH1 genindeki metilasyonun azalmasına bağlı olarak MLH1'in yeniden ekspresyonunu başlatmıştır. Tek başına desitabin tedavisi tümör büyümesine etki etmemesine rağmen maksimum tolere edilebilir dozlarının altındaki kemoterapötiklerle kombinasyonu durumunda ksenograftları sisplatin, karboplatin, temozolomid ve epirubisine duyarlı hale getirmiştir.

Su ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada desitabin ve doksorubisinin PLGA-lesitin-PEG nanopartikülleri ile birlikte taşınması ile MB231 meme ve HONE1 nazofaringeal kanser hücrelerinin doksorubisine duyarlılığının artırılması amaçlanmıştır. Desitabin ve doksorubisin yüklü PLGA-lesitin-PEG nanopartiküllerinin uygulanması ile kanser hücrelerinin doksorubisine duyarlılığı artırılarak kanser hücrelerinin büyümesi inhibe edilmiş, apoptoz artırılmış, aynı zamanda susturulmuş tümör supresör genlerin yeniden ekspresyonunu sağlamıştır.

1.5.1.4.Yeni İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Rolü

Nanotıp, nanoboyutlu materyallerin avantajlarından yararlanarak standart tedavilerden daha etkili ve daha az yan etkili sistemler vaat etmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan nanosistemler, günümüzde var olan kemoterapötikleri

nanoboyutlu taşıyıcılarla kombine ederek terapötik etkiyi artırmayı hedefleyen minyatür taşıyıcı sistemlerdir. Nanomateriyallerin en yaygın kullanım alanlarından biri olan onkolojide antikanser ilaçların biyoyararlanım, güvenlik ve seçicilik yönünden performanslarının artırılması amaçlanmaktadır. Onkolojik nanosistemlerin en önemli avantajı var olan antikanser ilaçların etki bölgelerine ulaşmaları açısından seçiciliklerini artırarak daha etkili ve seçici bir tedavi oluşturmalarıdır. Bu durum nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin dokuya penetrasyonunu artıran büyüklük ve yüzey özelliklerinin doğrudan bir sonucudur (Bregoli ve ark., 2016). Nanoteknolojiye dayalı kemoterapinin geleneksel kemoterapiye üstünlükleri Çizelge 1.3'te liste halinde sunulmuştur. Bunun yanında nanotaşıyıcılar,

- Etkin maddelerin etkinliğini artırırken, toksik etkilerini azaltırlar (Alexis ve ark., 2008; Aslan ve ark., 2013).
- Özellikle antikanser etkili etkin maddelerin terapötik indekslerini genişletirler (Alexis ve ark., 2008; Aslan ve ark., 2013; Mukherjee ve ark., 2019).
- Kararlı durum konsantrasyonunu daha uzun süre devam ettirirler (Alexis ve ark., 2008; Aslan ve ark., 2013).
- Tümör dokusu içerisindeki etkin madde birikimini artırır (Alexis ve ark., 2008; Aslan ve ark., 2013).
- Etkin maddelerin moleküler yapılarını değiştirmeden farmakokinetik özelliklerini geliştirirler (Mukherjee ve ark., 2019),
- Zayıf çözünürlüklü etkin maddelerin çözünürlüğünü artırır (Alexis ve ark., 2008; Aslan ve ark., 2013; Sezgin ve ark., 2003).
- Dolaşım yarı ömrünü uzatırlar (Alexis ve ark., 2008; Aslan ve ark., 2013).
- Etkin maddelerin stabilitelerini artırır (Alexis ve ark., 2008; Aslan ve ark., 2013).
- Çok fonksiyonlu sistemlerin geliştirilmesine olanak sağlar (Alexis ve ark., 2008; Aslan ve ark., 2013).
- Doku, hücre ve moleküler hedeflendirme sağlar (Mukherjee ve ark., 2019; Sezgin ve ark., 2003).
- Farklı fizikokimyasal özelliklere sahip etkin maddelerin aynı anda taşınmasını sağlar (Mukherjee ve ark., 2019).

Çizelge 1.3. Geleneksel kemoterapi ve nanoteknolojiye dayalı kemoterapi karşılaştırması (de la Puente ve Azab, 2017).

Özellik	Geleneksel kemoterapi	Nanoteknoloji bazlı kemoterapi
İlaç çözünürlüğü	Zayıf	Artırılmış çözünürlük ve stabilite
Kontrollü salım	Yok	Salım yeri ve zamanının kontrolü, çevresel etkilerden koruma
Hedefleme özelliği	Seçici olmayan hedefleme, dağılım; sistemik yan etkiler; etki bölgesinde düşük etkin madde konsantrasyonu; dar terapötik pencere	Seçici hedefleme; daha az sistemik yan etki; etki bölgesinde artmış etkin madde konsantrasyonu; genişletilmiş terapötik pencere
Çok işlevlilik	Yok	Tanı, görüntüleme ve tedavi için kombinasyon

Nanosistemlerin en önemli avantajı terapötik maddelerin biyodağılımlarının pasif hedefleme yolu ile geliştirilmesidir. Tümörlerin sızdıran damar yapısının 10–500 nm boyutundaki nanopartiküllerin ekstrasvazasyonuna izin vermesi olarak adlandırılan pasif hedefleme, nanosistemlerin küçük boyutlarına ve tümörlerin anormal damar yapısına dayanmaktadır (Ngoune ve ark., 2016; Xu ve ark., 2015). Bölüm 1.2.’de ayrıntılı olarak incelenen anormal tümör yapısı (yüksek permeabiliteli damarlar, yetersiz lenfatik drenaj) nedeniyle artmış permeasyon nanopartiküllerin tümör dokusunda diğer organlardan daha çok birikimini sağlamaktadır. Bu etki artmış geçirgenlik ve alıkonma etkisi (Enhanced Permeability and Retention effect-EPR) olarak adlandırılmaktadır. Nanopartiküllerin uzun süreli alıkonması ise tümörün kısıtlı lenfatik drenajına bağlı olarak gerçekleşmektedir (Ngoune ve ark., 2016). Pegilasyon gibi yöntemlerle nanosistemlerin yüzey yüklerinin nötralleştirilmesi, yüzeylerinin hidrofilik özelliklerinin artırılması ve mononükleer fagositik sistemin aktive olmasının önüne geçecek şekilde partikül boyutunun <400 nm’ye ayarlanması ile kanda kalış sürelerinin artırılmasından sonra dokuda birikimleri de EPR etkisi ile artırılabilir (Perez-Herrero ve Fernandez-Medarde, 2015; Xin ve ark., 2016; Xu ve ark., 2015).

Bunun yanında geleneksel kombinasyon yaklaşımı, birden fazla etkin maddenin aynı anda uygulanmasına dayanır ve birbirine benzemeyen farmakokinetik ve doku dağılımına sahip ilaçların bir arada uygulanmasının ilaçların hedef kanser hücrelerinde aynı anda bulunmasını, aynı anda etki göstermesini ve sinerjik etkin madde oranlarının

sabit tutulmasını engellemesi nedeniyle sınırlı etkinlik göstermektedir (Xu ve ark., 2015; Yang ve ark., 2015; Zhang, Cai ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2016). Ayrıca birden çok antikanser ilacın serbest çözelti halinde normal dozlarda bir arada uygulanması yan etkileri artırabilmektedir (Zhang, Cai ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2016). Nanosistemler ise enkapsüle edilen etkin maddelerin salımını kontrol ederek bu soruna bir çözüm getirmektedir (Yang ve ark., 2015; Zhang, Cai ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2016). Birden fazla etkin madde yüklü nanosistemlerin uygulanması, ilaçların farmokokinetik ve toksik profillerini değiştirebilmekte, tümör bölgesinde ilaç birikimini sağlayabilmekte, ilaçların senkronize bir hızda salımını sağlayarak sinerjik ilaç oranlarını hücre içi alıma kadar sabit tutabilmektedir (Xu ve ark., 2015; Zhang, Cai ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2016).

1.6.Yeni İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nanosistemler kanser tedavisinde ilaç taşıyıcı olarak umut vaat eden bir platform oluşturmaktadır. İnorganik, polimerik, protein ve lipit gibi pek çok farklı yapıda materyaller ve farklı hazırlama yöntemleri kullanılarak nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Çalışmamızda polimerik ve protein bazlı nanopartiküller sistemler ile lipit kaplı nanopartiküller sistemler geliştirildiği için bu sistemler ayrıntılı olarak incelenmiştir.

1.6.1.Polimerik Nanopartiküller

Nanopartiküller ilaç taşıyıcı sistemler büyüklükleri, çeşitlilik sunan bileşimleri, yüzeylerinin fonksiyonelleştirilebilmesi, stabiliteleri ve tümör mikroçevresine hedeflendirilebilmeleri ve hücrelerle etkileşebilmeleri ile kanser tedavisi için umut vaat etmektedirler (Steichen ve ark., 2013). Polimerik nanopartiküller, etkin maddelerin polimerik bir matris içerisine enkapsüle edilebildiği, matris içerisine ya da yüzeyine konjuge edilebildiği nanoboyutlu küresel partiküllerdir. Diğer nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler gibi sağlıklı hücrelerle etkileşimi en aza indirerek toksisiteyi

azaltırlar, dolaşım süresini uzatırlar, kanser hücreleri tarafından hücre sel alımı artırır lar. Bunun yanında diğ er sistemlerden daha yüksek bir stabiliteye, homojen bir partikül büyüklüğü dağılımına, daha kontrol edilebilir fizikokimyasal özelliklere, yüksek enkapsülasyon etkinliğine, polimerik matr isten difüzyonla ya da matrisin erozyonuyla daha kontrol edilebilir salım özelliklerine sahiptirler (Perez-Herrero ve Fernandez-Medarde, 2015). Poli(d,l-laktit-ko-glikolik) asit (PLGA) (Hascicek ve ark., 2017; Sengel-Turk ve ark., 2012), polikaprolakton (PCL) gibi Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration-FDA) onaylı biyoyoumlu ve biyoparçalanır sentetik polimerler kullanılabileceğ i gibi kitozan (Nogueira ve ark., 2013), aljinat, jelatin, dekstran, albümin (Dubey ve ark., 2015) gibi doğ al polimerler de nanopartikül üretimi için kullanılabilmektedir (Palazzolo ve ark., 2018; Perez-Herrero ve Fernandez-Medarde, 2015). Kullanılacak polimerin seçimi ise elde edilmek istenen nanopartikül büyüklüğü, yüzey özellikleri ve işlevselliğ ine, etkin maddenin çözünürlük, stabilite gibi özelliklerine, biyoparçalanabilirlik özelliklerine ve hedeflenen etkin madde salım özelliklerine göre belirlenmektedir (Palazzolo ve ark., 2018). Nanopartiküller önceden oluşturulmuş polimerlerin dispersiyonu ya da monomerlerin polimerizasyonu gibi farklı yaklaşımlarla hazırlanmaktadır (Gurunathan ve ark., 2018).

1.6.2. Protein Bazlı Nanopartiküller

Nanopartiküler sistemler metaller, sentetik polimerler, lipitler, polisakkaritler gibi pek çok farklı materyal kullanılarak hazırlanabilmektedir (Jain ve ark., 2018; Lohcharoenkal ve ark., 2014). Kullanılan tüm materyaller bazı üstünlük ve sakıncalar taşımaktadır. Örneğ in metalik nanopartiküller, özellikle kanser kemoterapisinde farklı yapıdaki etkin maddelerin farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini geliştirmek ve hücre iç i etkin madde konsantrasyonunu artırmak için araştırılmaktadır; ancak, partiküller yüksek toksisiteye sahiptir ve modifikasyonları oldukça güçtür. Sentetik polimerler; tahmin edilebilir parçalanma süreleri, modifiye edilebilir ilaç salım profilleri ve kinetik özellikleri göz önüne alındığında sıkça kullanılmaktadır (Jain ve

ark., 2018). Ancak, üretimlerinde kullanılan toksik etki yaratabilecek organik çözücüler dezavantaj yaratmaktadır.

Proteinler gibi doğal biyomoleküller ise sağladıkları yüksek güvenilirlikle sentetik materyaller için iyi birer alternatif oluşturmaktadır (Lohcharoenkal ve ark., 2014). Protein bazlı nanopartiküller, toksik kimyasallar ve organik çözücüler kullanılmadan gerçekleşen üretimleri ve biyoyumlu ve biyoparçalanır özellikleri ile büyük avantaj oluşturmaktadır (Verma ve ark., 2018).

Protein bazlı ilaç taşıyıcı sistemler önilaç, ilaç konjugatı, nanopartikül, mikrokapsül, hidrojel ve üç boyutlu iskele formunda hazırlanabilmektedir. Protein nanopartiküller toksik olmayan, biyoparçalanır, kolay metabolize olan, biyoyumlu sistemlerdir ve insan vücudunda bulunan enzimlerce parçalanırlar. Ayrıca immün yanıt oluşturmazlar ya da önemsenmeyecek düzeyde oluştururlar. Proteinlerin amfifilik yapısı hidrofilik ve hidrofobik etkin maddeler ve çözücülerle etkileşimlerini sağlamaktadır. Yapılarındaki hidroksil, amino ve karboksil grupları proteinleri kimyasal modifikasyona ve etkin maddeler ya da ligandlarla kovalan ya da kovalan olmayan bağlanmaya uygun hale getirirler (Jain ve ark., 2018). Jelatin, ipek fibroini, albümin, gliadin, keratin, kolajen, elastin, kazein, fibrinojen, hemoglobin, gluten ve farklı yollarla elde edilen diğer proteinler ilaç taşıyıcı sistem olarak çalışılmaktadır (DeFrates ve ark., 2018; Jain ve ark., 2018).

Protein nanopartiküller; tuzla çöktürme, emülsiyon-çözücü ekstraksiyonu, desolvasyon (koaservasyon), polielektrolit kompleksleştirme ve elektropüskürtme yöntemiyle başarıyla üretilebilmekte ve partikül büyüklükleri pH, iyonik güç ve sıcaklık gibi çevresel faktörler değiştirilerek kolayca ayarlanabilmektedir (Jain ve ark., 2018).

Protein bazlı nanopartiküllerin birçok avantajının yanında bazı sakıncaları da bulunmaktadır. Geniş bir partikül büyüklüğü dağılım aralığında elde edilebilmeleri, rekombinant proteinlerin bakteriyel ekspresyon sistemlerinden elde edildiklerinde endotoksin içermeye olasıları, üretim verimlerinin düşük olması, protamin gibi bazı

proteinlerin hızla parçalanması ve genelde bifazik etkin madde salımı göstermeleri sakıncaları arasında sayılmaktadır (Jain ve ark., 2018).

1.6.3. Lipit Kaplı Nanopartiküller

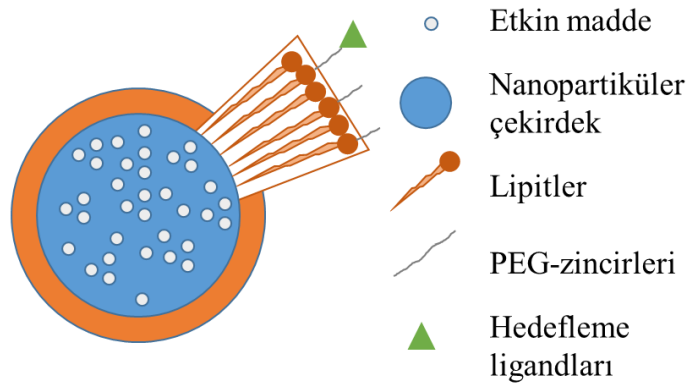
Lipit-bazlı ilaç taşıyıcı nanosistemler kanser tedavisinde birçok biyolojik engeli aşabilen, biyouyumlu, biyoparçalanır ve güvenli sistemler olarak ortaya çıkmışlardır. Üretim yöntemleri ve kullanılan bileşenler nedeniyle başta lipozomlar olmak üzere nanoemülsiyonlar (Ganta ve ark., 2016), katı lipit nanopartiküller (Oliveira ve ark., 2016), lipit-yapılı nano taşıyıcılar (Wang ve ark., 2016), çekirdek kabuk tipi sistemler (Sengel-Turk ve Hascicek, 2017), lipit-polimer hibrit sistemler (Wong ve ark., 2006), biyomimetik lipit-bazlı sistemler (Chen ve ark., 2016) gibi pek çok lipit bazlı ilaç taşıyıcı sistem kanser tedavisi için yaygın olarak araştırılmaktadır. Bu sistemler, çok işlevli uygulamalar için basit modifikasyon olanağı, aynı anda farklı özelliklere sahip birden fazla terapötik ajan yüklemek için yeterli kapasite, partikül büyüklüğünü kontrol etme imkanı ve taşıyıcı kaynaklı toksisiteyi minimuma indirme gibi çeşitli faydalar sağlamaktadır (Kim ve ark., 2018).

1,2-dioleoil-sn-glisero-3-fosfokolin (DOPC), 1-palmitoil-2-oleoil-glisero-3-fosfokolin (POPC), 1,2-miristoil-sn-glisero-3-fosfokolin (DMPC), 1,2-dioleoil-sn-glisero-3-fosfoserin (DOPS), 1,2-dioleoil-3-trimetilamonyum-propan (DOTAP) gibi farklı özellikteki fosfolipitler nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin üretilmesinde sıkça kullanılmaktadırlar (Li ve ark., 2015).

En çok araştırılan lipit bazlı ilaç taşıyıcı sistem olan lipozomlar bir ya da daha fazla fosfolipit ve kolesterol içeren, iç sulu kompartımanında hidrofilik, lipit tabaka içerisinde ise hidrofobik etkin maddeleri taşıyan veziküler ilaç taşıyıcı sistemlerdir (Kroon ve ark., 2014). Lipozomlar, FDA tarafından onaylanan ilk nanoteknoloji bazlı ilaç taşıyıcı sistemlerdir. 1995 yılında Doxil®'in over kanseri ve AIDS'e bağlı Kaposi sarkoma tedavisi için onay almasından sonra günümüzde pek çok lipozomal formülasyon klinik olarak kullanılmaktadır. Ancak lipozomların en büyük dezavantajı

yaşanan stabilite sorunudur. Lipozom formülasyonunda bulunan doymamış açıl zincirlerinin oksidasyonu ya da ester bağlarının hidrolizi partikül büyüklüğünün ve lipozomun tabaka geçirgenliğinin artmasına neden olmaktadır. Böylece lipozomun taşıdığı etkin madde hedef dokuya ulaşmadan ya da depolama sırasında sızmakta ve aynı zamanda vezikül büyüklüğünün artması lipozomun RES tarafından hızla tanınarak dolaşımdan temizlenmesine neden olmaktadır (Olusanya ve ark., 2018). Lipozomların diğer dezavantajları ise sterilizasyonlarının güçlüğü, enkapsüle ettiği etkin maddenin patlama etkisi ile salımı ve geniş partikül büyüklüğü dağılımıdır (Date ve ark., 2018). Diğer yandan lipit bazlı bu taşıyıcı sistemler daha iyi enkapsülasyon etkinliğine, maliyet-etkin bir üretim sürecine ve yüksek biyouyumluluğa sahiptir (Olusanya ve ark., 2018; Tan ve ark., 2013).

Literatürde kanser kemoterapisi için en çok araştırılan nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemler olan polimerik nanopartiküller ve lipozomların üstünlüklerinden yararlanabilmek amacıyla çekirdek-kabuk yapılı yeni bir nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistem olan lipit-kaplı nanopartiküler sistemler geliştirilmiştir.



Şekil 1.5. Lipit kaplı nanopartiküler sistemlerin şematik gösterimi.

Lipit kaplı polimerik nanopartiküller lipit yapılı bir kabuk tarafından sarılmış polimerik çekirdekten oluşan nanoboyutlu partiküler ilaç taşıyıcı sistemlerdir (Tan ve ark., 2013). Bu ilaç taşıyıcı sistemler, lipozomlar ve nanopartiküllerin yapısal üstünlüklerini bir araya toplamakta ve dezavantajlarını ortadan kaldırmaktadırlar (Hadinoto ve ark., 2013; Tan ve ark., 2013; Zhang ve Zhang, 2010). Yapısal olarak etkin maddeyi taşıyan bir çekirdek ve çekirdeği saran lipidik kabuk olmak üzere iki

temel bölümden oluşmaktadırlar (Mukherjee ve ark., 2019) (Şekil 1.5). Birbirinden farklı özelliklere sahip iki kısımdan oluşan bu yapıları nedeniyle pek çok farklı özellikte madde ile yüklenebilmektedirler (De Miguel ve ark., 2000). Katı çekirdek yapısal bir çerçeve görevi görür ve nanopartiküllere mekanik stabilite, şekil kontrolü, biyolojik parçalanabilirlik, dar partikül büyüklüğü dağılımı ve geniş bir yüzey alan sağlarken, lipit kabuk ise hücre zarına benzer yapısı nedeniyle biyoyumluluğa katkıda bulunmakta, moleküler bir bariyer oluşturarak suyun iç çekirdek kısmına difüzyonunu, enkapsüle edilmiş etkin maddenin sızmasını ve çekirdek yapısının parçalanmasını engellemektedir (Gong ve Winnik, 2012; Li ve ark., 2017; Mukherjee ve ark., 2019). Lipit kaplı nanopartiküller geleneksel lipozomlar ve nanopartiküllerle karşılaştırıldıklarında yapısal ayrışma, sınırlı dolaşım süresi ve içerik sızıntısı gibi dezavantajlarının üstesinden gelmektedir. Yüksek enkapsülasyon etkinliği, hücrelerle etkileşimin ve hücre alımının artışı, hedefe uygun bir salım kinetiği, çekirdek ve kabuk kısımlarına suda çözünürlük gibi farklı fizikokimyasal özelliklere sahip etkin maddeleri yükleme olanağı yani kombinasyon terapisi, doku, hücre ve moleküler hedefleme özellikleri sunmaktadırlar (Hadinoto ve ark., 2013; Li ve ark., 2017; Mukherjee ve ark., 2019; Tan ve ark., 2013; Zhang ve Zhang, 2010).

1.6.3.1. Lipit Kaplı Polimerik Nanopartiküler Sistemlerin Üretim Yöntemleri

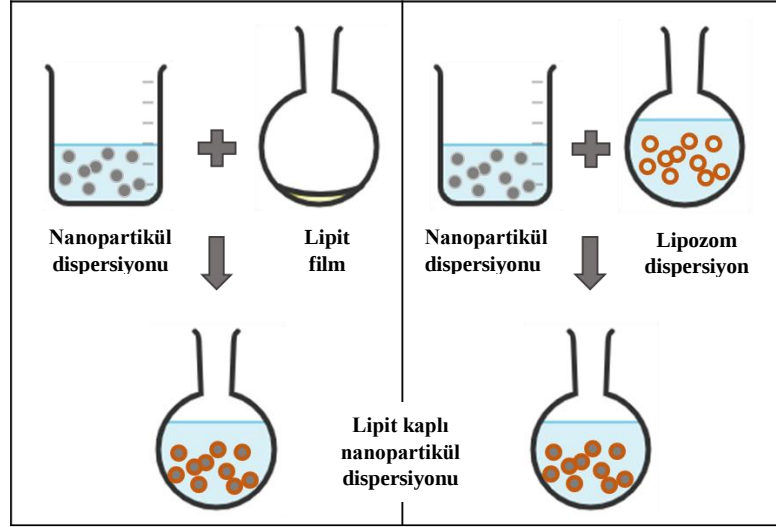
Lipit kaplı polimerik nanopartiküller öncelikle çift basamaklı yöntem ile hazırlanmış, daha sonra ise tek basamaklı yöntemler geliştirilmiştir (Yingchoncharoen ve ark., 2016).

1- Çift basamaklı yöntem (Geleneksel yöntem)

Çift basamaklı yöntemin esası lipit kabuk ile çekirdek bölümlerinin ayrı ayrı hazırlanması ve daha sonra çeşitli yöntemlerle istenilen oranlarda bir araya getirilmesine dayanmaktadır. Polimerik çekirdek nanopartiküller, kullanılan etkin maddelerin fizikokimyasal özellikleri ve istenilen partikül büyüklüğüne göre belirlenen emülsiyon oluşturma, yüksek basınçlı homojenizasyon ya da

nanopresipitasyon gibi yöntemler kullanılarak hazırlanmaktadır. Lipitlerin polimerik çekirdek üzerinde bir tabaka oluşturmaları, lipidin faz geçiş sıcaklığının üzerindeki bir sıcaklıkta lipit filmin çekirdeğin sulu süspansiyonu ile doğrudan hidrasyon, sonikasyon, vorteks ya da ekstrüzyon gibi yöntemlerle hidrate edilmesi ya da önceden oluşturulan lipozomlar ile nanopartiküllerin inkübasyonu gibi yöntemlerle sağlanabilmektedir (Şekil 1.6). Lipitlerin faz geçiş sıcaklığı açıl zincirlerinin kristal formdan sıvı forma geçtiği sıcaklıktır. Faz geçiş sıcaklığında açıl zincirinin etkinliği iyileşmekte ve lipit membranın geçirgenliği artmaktadır. Her iki yöntemde de lipit moleküllerinin çekirdek üzerinde bir film oluşturmaları vorteks ve/veya ultrasonikasyon gibi dışarıdan uygulanan bir enerjinin tetiklemesi ile gerçekleşmektedir (Hadinoto ve ark., 2013; Krishnamurthy ve ark., 2015; Li ve ark., 2017; Mandal ve ark., 2013; Mukherjee ve ark., 2019; Zhang ve Zhang, 2010). Nanopartiküllerin önceden oluşturulan veziküllerle kaplanma mekanizması temel olarak üç basamaktan oluşmaktadır. Öncelikle veziküller, nanopartikül yüzeyine adsorbe olmakta daha sonra deforme olmaya başlayan veziküllerin nanopartikül ile temas yüzey alanı artmaktadır. Son olarak veziküller parçalanarak partikül yüzeyinde parçalar halinde lipit tabakayı oluşturmaktadır (Luchini ve Vitiello, 2019; Richter ve ark., 2006).

Lipit membran nanopartikül yüzeyinde elektrostatik etkileşimler aracılığı ile oluşmaktadır (Li ve ark., 2017). Zıt yüklü polimerik çekirdek ile lipit kabuk materyali arasındaki elektrostatik etkileşimler, lipitlerin yeniden organize olarak polimerik çekirdeği kaplamasını tetiklerken, DPPC gibi nötral fosfolipitler sistemin serbest enerjisini düşürmek üzere hidrofobik etkileşimler yoluyla hidrofobik nanopartikül yüzeyine adsorplanmakta ve kendiliğinden oluşmaktadır. Lipitlerin hidrofobik kuyrukları nanopartikül yüzeyine tutunurken, hidrofilik baş grupları çevredeki sulu ortama uzanarak nanopartiküllerin sulu ortamda stabil kalmalarını sağlamak ve lipit tek tabaka ile kaplanmış nanopartikülleri oluşturmaktadırlar. Eklenen lipit miktarı arttıkça kaplama tabakasının yanı sıra veziküller de oluşmakta ve oluşan bu veziküller ilerleyen dönemde van der Waals etkileşimleri ile lipit tabaka ile kaplanmış nanopartiküller üzerinde toplanmaktadır (Gong ve Winnik, 2012).



Şekil 1.6. Lipit kaplı nanopartiküler sistemlerin çift basamaklı yöntemle üretiminin şematik gösterimi.

Çift basamaklı yöntemle üretilen lipit kaplı polimerik nanopartiküllerin fiziksel özellikleri aşağıda yer alan parametrelere bağlı olarak değişmektedir

- Lipit veziküllerin üretim yöntemi (Mandal ve ark., 2013),
- Önceden oluşturulan lipit veziküller ve polimerik nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve dağılımı (Hadinoto ve ark., 2013; Mukherjee ve ark., 2019),
- Yüzey yükleri (Hadinoto ve ark., 2013; Mukherjee ve ark., 2019),
- Sulu fazın iyon şiddeti (Hadinoto ve ark., 2013; Mukherjee ve ark., 2019),
- Lipit/polimerik nanopartikül oranı (Hadinoto ve ark., 2013; Mukherjee ve ark., 2019),
- Lipit veziküller ile polimerik nanopartiküllerin birleştirilme yöntemleri (Mandal ve ark., 2013; Mukherjee ve ark., 2019),
- Lipit veziküller ile polimerik nanopartiküllerin inkübasyon sıcaklığı (Mandal ve ark., 2013)

Çizelge 1.4'te çift basamaklı yöntemle hazırlanan lipit kaplı nanopartikül örnekleri bulunmaktadır. Örneğin Zhao ve ark.'ları (2015) çift basamaklı yöntemle gempitabin ve HIF1 α siRNA yüklü lipit kaplı polimerik nanopartiküller geliştirmişlerdir. Gempitabin yüklü çekirdek mPEG-PLGA nanopartikülleri çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemiyle üretilmiş, lesitin:DSPE-PEG₂₀₀₀:kolesterolden oluşan lipit filmi bu çekirdek nanopartikül dispersiyonu ile

sonikasyon yardımıyla hidrate etmişlerdir. Lipit film tabakası gempitabin sızıntısını önemli ölçüde önlemiş ve partiküllerin serum stabilitesini ve dolaşımında kalış süresini artırmıştır. Panc-1 insan pankreatik duktal adenokarsinom hücre hattı üzerinde yapılan etkinlik çalışmalarında ise HIF1 α ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı *in vivo* çalışmalarda ise kaplanmamış partiküllerle kıyaslandığında daha iyi bir sinerjistik antitümör etki ve tümör metastazının inhibisyonu görülmüştür.

Çizelge 1.4. Çift basamaklı yöntemle üretilmiş lipit kaplı polimerik nanopartiküler sistemler.

Çekirdek materyali	Kabuk materyali	Etkin madde	Birleştirme yöntemi	Kaynak
PLGA	PEG-oktadesil-kuaternize lizin modifiye kitosan (PEG-OQLCS)	Paklitaksel	Direkt hidrasyon	(Zhao ve ark., 2012)
PLGA	Fosfatidil kolin, kolesterol, DSPE-PEG	Doksorubisin Kombretastatin	Ekstrüzyon	(Sengupta ve ark., 2005)
mPEG-PLA	DSPE-PEG2000 DSPE-PEG3400-Mal Kolesterol	5- florourasil, İrinotekan, Oksaliptatin, Folinik asit	Direkt hidrasyon Sonikasyon	(Li ve ark., 2015)
PLGA	PEG-oktadesil-kuaternize lizin modifiye kitosan (PEG-OQLCS)	Doksorubisin pEGFP DNA	Direkt hidrasyon Sonikasyon	(Wang ve ark., 2010)
mPEG-PLGA	Lesitin, DSPE-PEG Kolesterol	HIF1 α siRNA Gempitabin	Direkt hidrasyon	(Zhao ve ark., 2015)
PLGA	Lesitin:Kolesterol/18:0 PEG2000 PE	Dosetaksel FTY720	Lipit film hidrasyonu ekstrüzyon	(Wang ve ark., 2017)
PLGA	DSPE-PEG ₂₀₀₀	Dosetaksel	Önceden oluşturulan lipozomlarla nanoprespitasyon	(Dehaini ve ark., 2016)

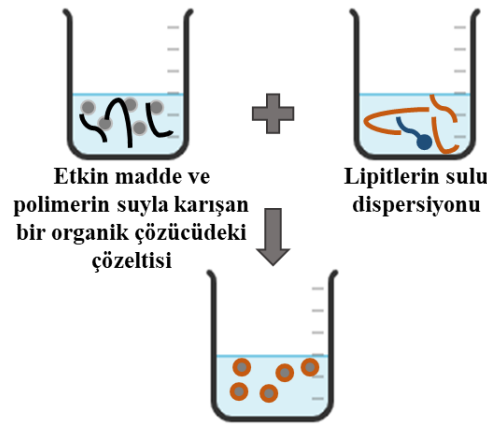
2- Tek basamaklı yöntem

Tek basamaklı üretim yönteminde polimerik çekirdek ve lipidik kabuk ayrı ayrı değil; aynı anda aynı üretim basamağında hazırlanmaktadır. Bu üretim yönteminde organik çözücü içerisindeki polimer lipit(leri) içeren sulu ortama eklendiğinde

çökmekte ve lipit(ler) kendiliğinden çekirdeği çevreleyen bir tek tabaka halinde toplanmaktadır (Mukherjee ve ark., 2019; Zhang ve Zhang, 2010).

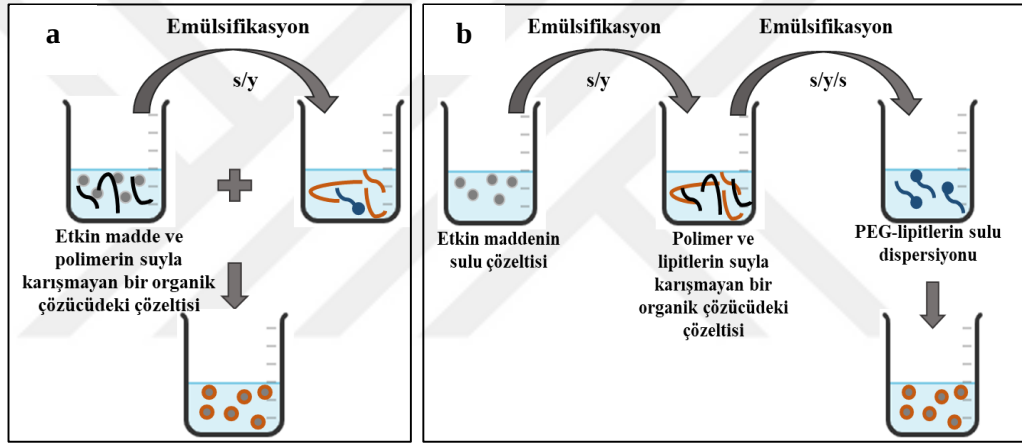
Çift basamaklı yöntem daha çok çift ya da çoklu lipit tabaka oluşturmak için kullanılırken, tek basamaklı yöntemler tipik olarak lipit tek tabaka ile kaplanmış polimerik nanopartiküllerin üretimi için kullanılmaktadır (Zhang ve Zhang, 2010). Tek basamaklı üretim yöntemi kendi içinde kullanılan etkin madde ve polimerin özelliklerine göre nanopresipitasyona dayalı ve emülsiyon-çözücü buharlaştırmaya dayalı yöntemler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Hadinoto ve ark., 2013; Krishnamurthy ve ark., 2015; Mandal ve ark., 2013; Mukherjee ve ark., 2019; Zhang ve Zhang, 2010). Çizelge 1.5’te tek basamakta farklı yöntemlerle hazırlanan lipit kaplı nanopartikül örnekleri bulunmaktadır.

Nanopresipitasyon yönteminde etkin madde ve polimer suyla karışabilen alkol, aseton gibi bir organik çözücünde, lipitler sulu fazda disperse edilmektedir. Lipit çözeltisi lipitlerin faz geçiş sıcaklığının üstünde bir sıcaklığa kadar ısıtıldıktan sonra polimer çözeltisi sıcak lipit çözeltisine damla damla eklenmektedir. Sulu fazın eklenmesiyle birlikte organik çözücü sulu faza hızla difüze olarak polimerin nanopartiküller halinde çökmesine neden olmaktadır. Bu sırada lipitlerin hidrofobik kuyrukları polimerik çekirdekle etkileşerek sistemin serbest enerjisini düşürürken hidrofilik baş grupları sulu faza yönelmektedir (Şekil 1.7) (Mukherjee ve ark., 2019; Zhang ve Zhang, 2010).



Şekil 1.7. Nanopresipitasyon yöntemi ile lipit kaplı polimerik nanopartikül üretiminin şematik gösterimi.

Emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi ise kullanılan etkin maddenin özelliğine göre tekli ya da çift emülsiyon sistemi ile uygulanabilmektedir. Tekli emülsiyon yönteminde organik çözücüde çözünen etkin maddeler polimer ile birlikte suyla karışmayan bir organik çözücüde çözüldükten sonra lipitleri içeren sulu fazla karıştırılmaktadır (Şekil 1.8a). Çift emülsiyon yönteminde ise suda çözünen etkin madde polimer ve lipitleri içeren organik çözücü ile karıştırılır ve s/y emülsiyonu oluşturulmaktadır. Oluşan primer emülsiyon dış su fazı ile karıştırılarak ise s/y/s çift emülsiyonu oluşturulmaktadır (Şekil 1.8b). Her iki yöntemde de oluşan emülsiyonların organik fazları uçurularak lipit kaplı polimerik nanopartiküller elde edilmektedir (Mukherjee ve ark., 2019).



Şekil 1.8. Emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile lipit kaplı polimerik nanopartikül üretiminin şematik gösterimi.

Shi ve ark.'ları (2014) çekirdek olarak PLGA ve kabuk olarak katyonik lipit benzeri bileşen (G0-C₁₄) kullanarak çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemiyle çekirdeğinde siRNA yüklü lipit kaplı polimerik nanopartiküller sentezlemişlerdir. Sentezlenen lipit kaplı polimerik nanopartiküller bir aydan daha uzun süre boyunca uzatılmış siRNA salımı göstermiş, siRNA yarı ömrü yaklaşık 9 güne kadar uzatılmıştır. Uzatılmış siRNA salımı LucHeLa hücrelerinde Lipofectamine₂₀₀₀ ile karşılaştırıldığında daha uzun bir gen susturma süresi sağlamıştır.

Çizelge 1.5. Tek basamaklı yöntemle hazırlanan lipid kaplı nanopartiküler sistemler.

Çekirdek materyali	Kabuk materyali	Etkin madde	Birleştirme yöntemi	Kaynak
PCL	Gelucire 48/16/Fosfolipit S100/DSPE-PEG (2000)	Metotreksat Aseklafenak	Nanopresipitasyon	(Garg ve ark., 2017)
PCL	HSPC/ DSPE-PEG ₂₀₀₀	Erlotinib	Nanopresipitasyon	(Mandal ve ark., 2016)
PLGA	Yumurta fosfatidil kolin Kolesterol MAL-PEG-DSPE	Paklitaksel Tetrandrin	Nanopresipitasyon	(Zhang ve ark., 2017)
PLGA	Lesitin mPEG ₂₀₀₀ -DSPE	Doksorubisin	Nanopresipitasyon	(Guo ve ark., 2015)
PLGA	Lesitin DSPE-PEG ₂₀₀₀ -MAL	Doksorubisin Sorafenib	Nanopresipitasyon	(Zhang ve ark., 2016)
PLGA	Lipoid S100	Metotreksat	Nanopresipitasyon	(Tahir ve ark., 2017)
PLGA	DOPA	Sorafenib	Nanopresipitasyon	(Gao ve ark., 2015)
PLGA	RGD-PEG-DSPE	Sorafenib Kuercetin	Nanopresipitasyon	(Wang ve ark., 2016)
PLGA	Lesitin DSPE-PEG ₂₀₀₀	Doksorubisin Doksorubisin HCl	Nanopresipitasyon	(Tahir ve ark., 2019)
PLGA-kolesterol	PEG ₂₀₀₀ -DSPE	Desitabin Arsenik trioksit	Emülsiyon oluşturma-Çözücü buharlaştırma	(Wu ve ark., 2017)
PLGA	Lipit benzeri bileşen G0-C ₁₄ ,	siRNA	Emülsiyon oluşturma-Çözücü buharlaştırma	(Shi ve ark., 2014)
PLGA	DPPC DSPE-PEG ₂₀₀₀	Kurkumin	Emülsiyon oluşturma-Çözücü buharlaştırma	(Palange ve ark., 2014)
PLGA	DLPC/ DSPE-PEG ₂₀₀₀	Doksorubisin Kurkumin	Emülsiyon oluşturma-Çözücü buharlaştırma	(Wang ve ark., 2016)
PLGA	DOTAP	Sisplatin DNA	Emülsiyon oluşturma-Çözücü buharlaştırma	(Zhang ve ark., 2017)
PLGA	DSPE-PEG ₂₀₀₀ (RGDyk)	10- hidroksikamptotesin	Emülsiyon oluşturma-Çözücü buharlaştırma	(Yang ve ark., 2013)
PEG-PEI-Oleik asit	Compritol888 ATO /Soy Lesitin	Dosetaksel pDNA	Emülsiyon oluşturma-Çözücü buharlaştırma	(Dong ve ark., 2016)
Kitosan	Lipoid S75	Sisplatin	İyonik jelasyon	(Khan ve ark., 2019)

Wu ve ark.'ları (2017) myelodisplastik sendrom tedavisi için sinerjik etkisi olduğu bilinen desitabin ile arsenik trioksitin bir arada neden oldukları ciddi yan etkileri azaltmak amacıyla çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemini kullanarak alendronat konjugasyonu ile kemiğe hedeflendirilmiş DSPE-PEG₂₀₀₀-COOH kaplı PLGA nanopartiküller geliştirmişlerdir. Farelerde yürütülen *in vivo* çalışmalarda geliştirilen bu nanopartiküllerin dolaşımda kalış süresi 3 güne kadar uzatılmış, hedeflendirilmemiş nanopartiküllere oranla kemikteki desitabin birikimi 6,7, arseniktrioksit birikimi 7,9 kat artırılmış, ortalama yaşam süresi önemli ölçüde uzatılmıştır.

Literatürde yer alan lipit kaplı polimerik nanopartiküllerin büyük bir çoğunluğu tek basamaklı yöntemle hazırlanmıştır. Çift basamaklı üretim yöntemlerinin;

- Polimerik nanopartikülleri ve lipit veziküllerin ayrı ayrı hazırlanması nedeniyle daha zor ve uzun süreli olması (Hadinoto ve ark., 2013),
- Üretilen lipit kaplı polimerik nanopartiküllerin fiziksel özelliklerinin pek çok değişkene bağlı olması,

gibi nedenler üretim için tek basamaklı yöntemlerin tercih edilmesine neden olmuştur (Li ve ark., 2017). Ancak çalışmamızda kullandığımız geleneksel antikanser etkin madde olan karboplatin ve karboplatine karşı oluşan direnci modüle etmek amacıyla formülasyonumuzda yer alan epigenetik etkin maddemiz desitabin arasındaki sinerjik oranı koruyarak formülasyon geliştirmek amacıyla çift basamaklı yöntemin kullanılmasına karar verilmiştir. Bu kapsamda önceden hazırlanan karboplatin yüklü nanopartiküller ile desitabin yüklü lipit filmin önceden hazırlanarak daha sonra bir araya getirilmesi planlanmıştır.

1.6.4. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

İlaç taşıma amacıyla nano boyutlu sistemlerin kullanılmasındaki temel neden belirlenmiş olan hedeflere ulaşabilmek için partikül büyüklüğü, yüzey özellikleri ve etkin maddenin salımının kontrol edilebilmesidir. Nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin karakterizasyonu hem *in vitro* hem de *in vivo* davranışlarının kontrol edilebilmesi açısından önemlidir. Bu sistemler partikül büyüklüğü ve şekli, yüzey yapısı, yükü ve özellikleri, etkin maddenin salım özellikleri açısından pek çok karmaşık yöntem ile karakterize edilmektedir (Jain ve Thareja, 2019).

1.6.4.1. Partikül Büyüklüğü ve Partikül Büyüklüğü Dağılımı

Nanosistemlerin boyutları onları diğer farmasötik dozaj formlarından ayıran temel özellikleridir (Jain ve Thareja, 2019). Partikül büyüklüğü, nanosistemlerin etkin madde yükleme ve çözünme ortamına salım özelliklerini, biyodağılımlarını,

hücrelerle etkileşimlerini ve stabilitelerini etkilemektedir. Bu nedenle partikül büyüklüğünün doğru şekilde analiz edilmesi hem nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarım aşamasında hem de kalite kontrol basamağında önem taşımaktadır. Nanosistemlerin büyüklüklerini belirlemek için en sık kullanılan yöntemler ışık saçılımına dayalı olan dinamik ışık saçılımı (dynamic light scattering-DLS) ya da diğer ismiyle foton korelasyon spektroskopisi (photon correlation spectroscopy-PCS), lazer difraksiyon spektroskopisi, nanopartikül izleme analizi (nanoparticle tracking analysis – NTA) ve akım taramasına dayalı olan Coulter-Counter'dır (Kastner ve Perrie, 2016). Bu tekniklerden DLS, mikrometre aralığının altındaki partikül süspansiyonlarının partikül büyüklüğünü ölçmek için en çok kullanılan yöntemdir (Clayton ve ark., 2016; Kastner ve Perrie, 2016). DLS yönteminde küçük numune hacimleri hızla analiz edilebilmektedir. Analiz sırasında dispersiyon ortamında Brown hareketleri ile hareket eden partiküllere monokromatik bir ışık demeti yollanmaktadır. Dispersiyon içindeki partiküllere çarparak saçılan ışık yoğunluğu cihaz içerisindeki dedektör tarafından algılanmaktadır. Saçılan ışık yoğunluğu partiküllerin büyüklüğüne göre değişmektedir. Daha hızlı hareket eden küçük partiküller, daha yavaş hareket eden büyük partiküllere göre zaman içinde daha hızlı bir ışık yoğunluğu dalgalanmasına neden olmaktadır (Kastner ve Perrie, 2016).

1.6.4.2. Zeta Potansiyel

Nano-boyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin kolloidal stabilitesi, yeniden disperse olabilmesi, uzun süreli depolama koşulları ve *in vivo* performansları zeta potansiyelleri ile yakından ilişkilidir (Bhattacharjee, 2016; Jain ve Thareja, 2019; Manaia ve ark., 2017). Yüklü bir partikül dispersiyon ortamına girdiğinde kendi yükünün tersi yüklü iyonlar adsorbe etmekte ve çevresinde hareket etmeyen, sabit tek tabakalı bir yapı olan Stern tabakası oluşmaktadır. Bu tabakanın etrafında ise partiküle bağlı olmayan, hareketli ikinci bir iyon tabakası meydana gelmektedir. Bu tabakalara difüze çift tabaka adı verilmektedir. Partikülün yüzeyine yapışmış olan elektriksel tabakanın potansiyeline Nerst potansiyeli denmektedir. Çift tabakanın dışında ise nötral bir alan bulunmaktadır. Partikül yüzeyi ile nötral alan arasındaki potansiyel farkına zeta

potansiyel adı verilmektedir (Çelebi, 2004). Zeta potansiyel genelde doppler kayması prensibine göre çalışan lazer doppler anemometresi ile ölçülmektedir. Bu yöntemde seyreltik nanopartikül dispersiyonuna uygulanan zayıf elektriksel alan sonucunda partiküller yüzey yüklerinin tersi olan elektroda doğru hareket etmektedirler. Zeta potansiyel değeri partiküllerin bu hareketlerinin hızından yararlanılarak hesaplanmaktadır. Partiküllerin hızı ise elektroforetik ışık saçılımı yöntemi ile ölçülmektedir. Bu yöntemde partiküllerin üzerine lazer ışık demeti gönderilmekte ve partiküllerden saçılan ışığın oluşturduğu frekans kaymasından yola çıkılarak partikülün elektrik alandaki hızı belirlenmektedir (Jain ve Thareja, 2019).

Genel olarak ± 30 mV'tan büyük zeta potansiyel değerine sahip olan nanopartiküller yüksek oranda stabil kabul edilirken ± 25 mV'tan daha küçük zeta potansiyel değerine sahip nanopartiküller ise zamana bağlı olarak Van der Waals etkileşimler, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağların sebep olduğu partiküller arası etkileşimler nedeniyle aglomere olurlar (Kumar ve Dixit, 2017).

1.6.4.3. Etkin Madde Enkapsülasyon Etkinliği

Enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasitesi, nanopartiküllerin *in vivo* farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini etkileyebilecek kritik kalite özelliklerinden biridir (Yamamoto ve ark., 2018). Birim matriks kütlesi başına enkapsüle edilen etkin madde miktarına yükleme etkinliği adı verilmektedir (Jain ve Thareja, 2019). Literatürde yükleme kapasitesi ve enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi için doğrudan yöntem ve dolaylı yöntem olmak üzere en çok kullanılan iki yöntem bulunmaktadır. Dolaylı yöntemde enkapsüle edilememiş etkin madde konsantrasyonu hesaplanırken, doğrudan yöntemde partiküller içerisinde enkapsüle edilmiş olan etkin madde konsantrasyonu hesaplanmaktadır (Daneshmand ve ark., 2018). Dolaylı yöntemde serbest etkin maddenin ayrılması ultrasantrifüj, diyaliz, ultrafiltrasyon, jel filtrasyon, boyut dışlama kromatografisi, katı faz ekstraksiyonu gibi yöntemlerle gerçekleştirilmektedir (Jain ve Thareja, 2019; Yamamoto ve ark., 2018). Doğrudan yöntemde ise enkapsüle etkin madde miktarı nanotaşıyıcı uygun bir

çözücüde çözülerek ya da etkin madde uygun bir çözücüye ekstrakte edilerek belirlenmektedir (Jain ve Thareja, 2019).

1.6.4.4. *In Vitro* Etkin Madde Çözünme Hızı

Nanopartiküler sistemlerden *in vitro* etkin madde çözünme hızı çalışmaları; ürün performansını ve kalitesini sağlamak, *in vivo* performansı tahmin etmek ve kalite kontrol amacıyla gerçekleştirilmektedir (Shen ve Burgess, 2013). *In vitro* çözünme hızı çalışmaları aynı zamanda etkin maddenin salım mekanizması hakkında da bilgi vererek formülasyonun hedeflenen salım profiline ve mekanizmasına uygun olacak şekilde optimize edilmesine imkân tanımaktadır. Enkapsüle edilen etkin maddenin yapısının yanı sıra geliştirilen nanosistemin polimer tipi, etkin madde yükleme kapasitesi, porozitesi, partikül büyüklüğü, taşıyıcı sistemin tipi gibi özellikleri etkin maddenin çözünme hızını etkileyen temel faktörlerdir. Nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerde *in vitro* çözünme hızı çalışmaları daha çok diyaliz yöntemiyle yapılmakla birlikte, santrifüj, sürekli akış, dinamik dissolüsyon, mikrodializ gibi yöntemler de kullanılmaktadır (Savaser ve ark., 2018).

1.6.4.5. Morfolojik Özellikler

Nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin yapılarının anlaşılması, vücuttaki davranışlarını hem moleküler hem de sistemik seviyelerde büyük ölçüde etkileyen fiziksel ve kimyasal özelliklerinin aydınlatılması için önem taşımaktadır. Geçirimli elektron mikroskopisi (TEM-Transmission electron microscopy) ve taramalı elektron mikroskopisi (SEM-Scanning electron microscopy), nano taşıyıcıların partikül büyüklüğü ve morfolojileri gibi özellikleri açısından yapılarını aydınlatmakta yaygın olarak kullanılan tekniklerdendir. TEM ve SEM, atomik seviyeden mikrometre seviyesine kadar nanomalzemelerin görüntülenmesinde kullanılan en etkili araçlardır (Manaia ve ark., 2017). SEM yönteminde nanotaşıyıcıların görüntülenmesi için numune yüzeyinden yayılan elektronlar kullanılırken, TEM için numune yüzeyine iletilen

elektronlar kullanılmaktadır (Jain ve Thareja, 2019). Görüntü oluşumu için numuneye penetre olan elektronlar objektif lens tarafından odaklanmaktadır ve kamera tarafından dedekte edilmektedir. TEM görüntülemesinde SEM'e göre daha güçlü elektron ışınları kullanılmakta ve daha yüksek çözünürlük elde edilmektedir (Manaia ve ark., 2017); bu nedenle TEM, nanopartiküllerin morfolojik yapılarını incelemek için daha çok kullanılmaktadır. Ancak, TEM'de elektron ışınlarının numuneye penetre olabilmesi için yüksek seviyede vakuma ve ince numune kesitlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Numunenin hazırlanması ve kurutulması nanomalzemelerin fizikokimyasal durumlarını değiştirebilmektedir (Jain ve Thareja, 2019). Ayrıca, lipit kaplı polimerik nanopartiküllerin görüntülemesi sırasında çekirdek-kabuk yapısının aydınlatılması ve iki tabaka arasındaki kontrastın artırılması için fosfotungstik asit, uranil asetat, osmiyum tetraoksit gibi negatif boyama çözeltileri ile boyama işlemi yapılmaktadır (Mandal ve ark., 2013).

1.6.4.6.Termal Özellikler

Maddelerin erime sırasındaki ısı yükselmesi ya da kristalizasyon sırasındaki ısı yayılması gibi yapısal değişiklikleri, ısı değişimleri ile birlikte gerçekleşmektedir. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC), kontrollü ısı programları ile bu ısı değişimlerini ölçerek numunelerin yapısal özellikleri ile ilgili bilgi vermektedir. DSC araştırmalarında numune ve referans madde kontrollü bir hızda ısıtılması ya da soğutulması sırasında numunenin içine giren ya da dışına çıkan ısı kantitatif olarak ölçülmektedir. Uygulanan ısı sırasında numunede herhangi bir yapısal değişiklik olmadığı sürece numune ve referansın ısısı aynı oranda artmaktadır. Numune erime geçişi (melting transition) gibi bir yapısal değişikliğe uğradığında ise sistemden enerji yani ısı alırken numune ısısı sabit kalmaktadır. Bu durum, numune ile referans arasında ısı farkı oluşmasına neden olmakta ve bu fark cihaz tarafından ölçülüp bir sinyale dönüştürülmektedir. Elde edilen sinyal zaman veya sıcaklığın bir fonksiyonu olarak ısı akışıdır. Erime, kristalizasyon veya polimorfik geçişler gibi birinci dereceden geçişler ile pik benzeri sinyaller gözlenmektedir (Bunjes ve Unruh, 2007).

1.6.5. Sterilizasyon

Sterilizasyon, bir üründeki tüm mikroorganizmaların vejetatif ve spor şekilleri ile virüslerin uzaklaştırılması ya da öldürülmesidir. Farmakopelerde belirtilen sterilité güvence sınırı (Sterilite assurance level – SAL) 10^{-6} 'dır (Dortunç, 2004; Vetten ve ark., 2014). Steril ürünler, Avrupa Farmakopesi'ne göre basınçlı buhar ile sterilizasyon, kuru hava sterilizasyonu, iyonize edici radyasyon ile sterilizasyon, gaz sterilizasyonu, steril filtrasyon olmak üzere beş farklı terminal sterilizasyon yöntemiyle ya da aseptik üretim yöntemiyle hazırlanmaktadır (EMA, 2019). Ancak, bu tekniklerin nanosistemlerin fizikokimyasal özellikleri üzerine olumsuz etkileri olabilir. Nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin fizikokimyasal özelliklerindeki herhangi bir değişiklik ise bu sistemlerin hem toksisitesini hem de etkinliğini önemli ölçüde etkileyebilir (Vetten ve ark., 2014).

Steril filtrasyon yönteminde ürün 0,22 µm gözenek genişliğine sahip filtrelerden süzülerek mikroorganizmalar uzaklaştırılmaktadır. Ancak, partikül büyüklüğü 0,22 µm'ye yakın ya da büyük sistemler için uygun değildir. Isı ile sterilizasyon yöntemlerinde ise yüksek sıcaklık nanopartiküler sistemin partikül büyüklüğünde ve dağılımında önemli oranda artış, agregasyon, enkapsülasyon etkinliğinde azalma, partikül morfolojisinde değişme gibi stabilite sorunlarına yol açabilmektedir. Formaldehit ve etilen oksit gibi gazlarla sterilizasyon yönteminde ise sterilizasyon sonrasında üründe kalabilecek olan gaz toksik etkilere yol açabilmektedir. İyonize edici radyasyon ile sterilizasyon yönteminde en çok Kobalt-60 ya da Cesium-137'nin kendi kendine bozunması ile ortaya çıkan gama radyasyon kullanılmaktadır. Gama radyasyon, yüksek penetrasyon kapasitesi nedeniyle sıkça tercih edilmektedir. Radyasyonla sterilizasyon yöntemi sıcaklık ya da kimyasallardan bağımsızdır ve sterilizasyon sonrasında artık kalmaz. Ancak yapılan bazı çalışmalarda nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve morfolojisinde değişikliğe yol açtığı görülmüştür (Vetten ve ark., 2014).

Yukarıda tartışılan sterilizasyon yöntemlerinden gama radyasyon ile sterilizasyonun nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin sterilizasyonu için en uygun

yöntem olduğu öne sürülmektedir. Ancak gama radyasyonun da nanosistemler üzerinde olumsuz etkileri olabileceği görülmektedir ve bu nedenle uygulanan sterilizasyon yönteminin nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri üzerinde anlamlı değişikliklere yol açmadığı her sistem için ayrı ayrı doğrulanmalıdır.

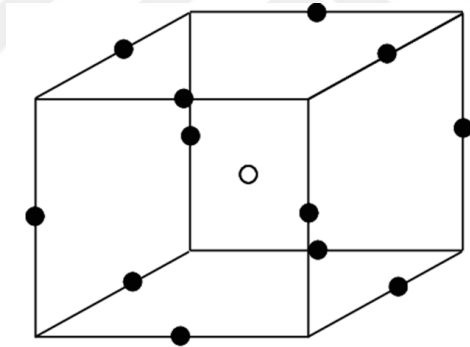
1.7.Deney Tasarımı

Deney tasarımı, bir süreci etkileyen faktörler ve bu sürecin çıktıları arasındaki ilişkileri belirlemek için yapılandırılmış, organize bir yöntem olarak tanımlanmaktadır (Politis ve ark., 2017). Deney tasarımının amacı en çok bilginin en verimli biçimde elde edilebilmesi için yapılacak denemelerin planlanmasıdır (Aksu, 2013). Başka bir deyişle, süreç girdileri ve çıktıları arasında matematiksel ilişkiler kurarak, süreç ile ilgili en fazla bilgiye ulaşma yoludur. Deney tasarımı, prosesin kontrollü girdi faktörlerinin cevaplar üzerindeki etkilerini belirlemek için sistematik olarak değiştiği bir yaklaşım ve kritik işlem parametreleri ile kritik kalite özelliklerinin matematiksel bağlantısıdır. Bu bağlantılar; yararlı pek çok faktör içerisinde en etkili olanın bulunmasına, geliştirilmiş ürün performansını sağlayacak optimum formülasyonun belirlenmesine, faktörler arasındaki etkileşimlerin açıklanmasına olanak sağlamaktadır (Politis ve ark., 2017).

Yanıt yüzey yöntemi (Response Surface Methodology – RSM), pek çok değişkenin sistem özelliklerini etkileyebileceği durumlarda verilen cevaplar ile bağımsız değişkenler, diğer adıyla faktörler, arasındaki ilişkiyi tanımlayan bir tekniktir. RSM, her seferinde bir parametre (One Factor at a Time – OFAT) yaklaşımına göre daha kullanışlı bir yaklaşımdır (Vozza ve ark., 2018). RSM, değişkenlerin değişkenlerle etkileşimleri ve her bir değişkenin optimum seviyesi hakkında önemli bilgiler vererek proses ve formülasyonun optimizasyonunu sağlayan bir yöntemdir. RSM, değişkenler arasındaki etkileşimi göz ardı etmeden deney sayısının azaltılmasına, istatistiksel yorumların geliştirilmesine, pek çok etkili faktörün önem sırasının değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır (Li ve ark., 2011). RSM yaklaşımı ile deney sayısı azaltılabilir, OFAT deneyleri sırasında tipik olarak

tanımlanamayacak olan değişkenlerin bağımlılıkları tespit edilebilir, toplanan bilgilerin daha büyük bir parametre alanında kullanılmasıyla yanıt tahminini geliştirebilmektedir (Vozza ve ark., 2018). Merkezi birleşik tasarım, Box-Behnken tasarımı, D-optimal tasarımı gibi farklı tasarım şekilleri RSM altında incelenmektedir.

Çalışmamızda Demir ve ark.'nın tüm faktörlerin nicel olduğu 2-5 faktörlü optimizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere önerdiği Box-Behnken (BBD) modeli kullanılarak karboplatin yüklü albümin nanopartiküllerin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir (Demir ve ark., 2017). BBD tasarımında tasarım noktaları bir kürenin yüzeyine yerleştirilmiştir ve bir küpün kenarlarının orta noktalarında bulunmaktadır (Şekil 1.9). BBD tasarımının kullanılabilmesi için en az üç faktör nicel olmalıdır. Merkezi birleşik tasarım ile karşılaştırıldığında aynı sayıda faktör konusu iken daha az sayıda deney içerdiği için daha ekonomiktir ve faktör seviyelerinin alt ve üst limitlerinin dışına çıkılamaz.



Şekil 1.9. Box-Behnken modelinin tasarım noktaları.

1.8. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü, bir hayvan veya bitkiden alınan hücrelerin uygun bir yapay ortamda, uygun sıcaklık ve nem koşullarında üretilmesi, yaşatılması ve büyütülmesi olarak ifade edilmektedir (Allen ve ark., 2005; Zucco ve ark., 1998). Hücre kültürü, pek çok farklı amaçla çalışmalar yapılabilmesi ve nispeten daha kısa sürelerde gerçekleştirilebilmesi nedeniyle en yaygın kullanılan yaklaşımlar arasındadır (Ghanemi, 2015). Hücre kültürü çalışmaları, yeni potansiyel ilaç hedefleri önerebilecek hücresel mekanizmaların kolay incelenmesi için olanak sağlar ve

patolojik dokular kullanılan durumlarda patolojinin tedavisinde kullanılabilecek terapötik maddeler ve ilaç taşıyıcı sistemlerin etkinliklerinin, sitotoksitelerinin ve permeabilitelerinin değerlendirilmesinde kullanılabilmektedir (Allen ve ark., 2005; Tekarslan Şahin ve ark., 2017).

Çalışmamızda etkin maddeler ve geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemler sitotoksiteleri ve etkinlikleri hücre kültürü çalışmaları ile incelenmiştir.

1.8.1. Sitotoksite Deneyleri

Sitotoksite deneyleri, *in vitro* terapötik madde ve ilaç taşıyıcı sistemlerin farmakolojik ve toksikolojik değerlendirmeleri için yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücre kültürü yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi uygulama kolaylığı ve *in vivo* çalışmalarla olan uyumu ve bu çalışmalar için yol göstericiliği nedeniyle sıkça tercih edilir hale gelmiştir. Sitotoksite ve hücre canlılığı temel olarak kolorimetrik, lüminometrik ve enzimatik yöntemler olmak üzere üç farklı yöntem ile incelenebilmektedir. Kolorimetrik yöntemlerde kullanılan tetrazolyum tuzları nedeniyle gerçekleşen renk değişikliği ya da özel olarak boyanan hücrelerin ölçümü yapılırken lüminometrik yöntemlerde floresan maddeler ya da lusiferaz adlı enzimler aracılığıyla ölü ya da canlı hücrelerin tespiti gerçekleştirilmektedir. Enzimatik yöntemler ise hücrelerin ölümünden sonra hücre kültürü ortamına geçen laktat dehidrogenaz (LDH) gibi enzimlerin tespitine dayanmaktadır (Riss ve Moravec, 2004).

Tez çalışmamızda etkin maddelerimiz ve geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemlerin sitotoksitelerinin belirlenmesi amacıyla MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) testi kullanılmıştır. MTT testi, tetrazolyum tuzlarının taşıdıkları tetrazolyum halkasının yalnızca canlı hücrelerin mitokondrisindeki süksinat dehidrogenazlar tarafından kırılması ve oluşan renkli çözünmeyen formazan kristallerinin sağlıklı hücrelerin hücre membranlarında birikmesi esasına

dayanmaktadır. Renkli formazanların oluşturduğu renk şiddeti ise kolorimetrik olarak tespit edilmektedir (Tekarslan Şahin ve ark., 2017).

1.8.2. Western Blot

Western blot, hücre biyolojisi ve moleküler biyolojide kullanılan önemli bir tekniktir. Western blot kullanılarak hücrelerden ekstrakte edilen protein karışımlarından spesifik proteinler kalitatif ve kantitatif olarak belirlenebilmektedir. Western Blot yöntemi temel olarak 3 basamaktan oluşmaktadır: (1) proteinlerin jel elektroforez ile molekül ağırlıklarına göre ayrılması, (2) ayrılan proteinlerin katı bir desteye aktararak her proteinin bir bant oluşturması ve (3) hedef proteinin uygun birer birincil ve ikincil antikor kullanılarak işaretlenmesi. İşaretlenen proteinin oluşturduğu bantın kalınlığı ise var olan protein miktarını yansıtmaktadır (Mahmood ve Yang, 2012).

Tez çalışmamızda apoptotik yolak proteinleri olan kaspaz 3, kaspaz 7, kaspaz 9 ve PARP ile platin direnci sırasında susturulan tümör baskılayıcı hMLH1 geni aracılığı ile eksprese edilen MLH1 proteinlerinin ekspresyonundaki değişiklikler Western Blot yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir.

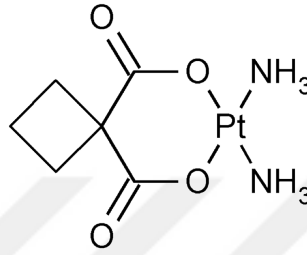
1.8.3. Akım Sitometrisi

Akım sitometrisi, belirli hızda akan bir sıvı içerisindeki hücrelerin özelliklerinin tanımlanması olarak ifade edilebilir. Akım sitometrisi kullanılarak hücrelerin yaklaşık büyüklüğü, granüllüğü ve floresan miktarı hakkında bilgi elde edilebilir. Uygulanan hava basıncı, akış hücresi ismi verilen bölümün şekli ve akan sıvının laminar akışı hücrelerin tek sıra halinde lazer kaynağı önünden geçmesini sağlar. Kısa süre içerisinde çok sayıda hücre incelenerek sonuç alınabilir (Kanev ve Gökalp Muranli, 2015).

Tez çalışmamızda geliştirilen floresan madde yüklü ilaç taşıyıcı sistemlerin hücresel alımları akım sitometrisi yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

1.9. Çalışmada Kullanılan Etkin ve Yardımcı Maddelerle İlgili Bilgiler

1.9.1. Karboplatin



Şekil 1.10. Karboplatinin kimyasal formülü.

Molekül ağırlığı: 371,25 g/mol

IUPAC isimlendirmesi: cis-diamin(1,1-siklobütandikarboksilato) platin(II)

Kapalı formülü: C₆H₁₂N₂O₄Pt

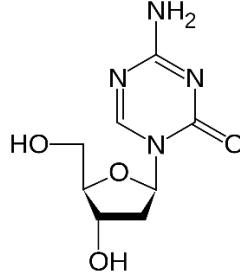
Endikasyonları: Platin bileşikleri yüksüz, sis-konfigürasyonlu antikanser etkin maddelerdir (Oberoi ve ark., 2013). Platin bileşikleri over ve akciğer kanserleri gibi katı tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadırlar (Ruiz ve ark., 2014). Platin bazlı kemoterapi [Sisplatin (Platinex®), Karboplatin (Carboplat®) ve Oksaliplatin (Eloxatin®)], over kanserinin ilk basamak tedavisinde genelde taksanlar ile kombinasyon halinde kullanılmaktadır (Eckstein, 2011).

Etki mekanizması: Sisplatin ve karboplatinin kemoterapötik aktivitesi DNA ürünleri ve 1,2-d (GpG) zincir içi çapraz bağ oluşturmalarına bağlıdır. Karboplatin, hücrelerde çok az tamir edilebildiği bilinen DNA zincirindeki komşu guanozinlerin N7 atomlarını koordine etmektedir (Zeller ve Brown, 2010). Bu reaksiyon primer olarak

1,2- ve 1,3-zincir içi çapraz bağların ve DNA ürünlerinin oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Bu oluşumlar DNA zincirinde katlanmalara ve DNA'nın çeşitli proteinlere bağlanmasına neden olmaktadır. Oluşan protein-DNA ürünleri pek çok hücrel cevap başlatmaktadır (Liu ve ark., 2013). Bu ürünlerin yanlış eşleşme tamir sistemi tarafından tanınması apoptotik yolları aktive etmekte; lezyonun devamlılığı sonucunda replikasyon ve transkripsiyon inhibe olmaktadır. Bu DNA hasarı, DNA yanlış eşleşme enzimleri aracılığıyla apoptoz ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (Balch ve ark., 2004; Zeller ve Brown, 2010).

Yan etkileri: Sisplatin (cis-diamindikloroplatin(II)) klasik platin komplekslerinin ilk üyesidir (Oberoi ve ark., 2013). Sisplatin mide bulantısı, baş dönmesi, renal disfonksiyon, nörotoksisite ve ototoksisite ile karakterize bir toksisite profiline sahiptir (Lokich ve Anderson, 1998). İkinci jenerasyon platin bileşikler, sisplatinin doza bağlı toksisitesini azaltmak üzere geliştirilmişlerdir (Oberoi ve ark., 2013). Bu grubun bir üyesi olan karboplatin, sisplatin ile aynı etki mekanizmasına sahip olmasına rağmen sisplatinden daha farklı bir farmakokinetiğe ve yan etki spektrumuna sahiptir. Karboplatinin nefrotoksik etkisi, gastrointestinal yan etkileri ve nörotoksitesi sisplatinden daha azdır; ancak doza bağlı olarak kemik iliği depresyonuna neden olmaktadır (Eckstein, 2011; Lokich ve Anderson, 1998). Karboplatinin, sisplatinden daha az olan toksisitesi, daha agresif yüksek dozlu bir kemoterapi uygulanmasına imkan tanımaktadır (Oberoi ve ark., 2013). Sisplatin sülfhidril gruplarıyla inaktive olurken karboplatin önemli oranda metabolize olmamaktadır (Lokich ve Anderson, 1998). Ancak karboplatinin hücre içine alımının zayıf olması pek çok siklus boyunca yüksek doz gereksinimine ve sınırlı terapötik etkinliğe yol açmaktadır (Karanam ve ark., 2015; Sadhukha ve Prabha, 2014). Bu nedenle doza bağlı myelosupresyon, trombositopeni, lökopeni gibi hematolojik ve yaşlı ya da daha önce kemoterapi görmüş olan hastalarda renal sorunlar gibi toksik etkiler göstermektedir (Karanam ve ark., 2015; Nanjwade ve ark., 2010).

1.9.2. Desitabin



Şekil 1.11. Desitabinin kimyasal formülü.

Molekül ağırlığı: 228,21 g/mol

IUPAC isimlendirmesi: 5-aza-2'-deoksisitidin

4-amino-1-(2-deoksi-β-D-eritro-pentofuranozil)-
1,3,5triazin 2 (1H)-on

Kapalı formülü: C₈H₁₂N₄O₄

Endikasyonları: Substrat analogları 5-azasitidin (Vidaza®) ve 5-aza-2-deoksisitidin (desitabin) (Dacogen®) günümüzde kullanımda olan ve FDA tarafından onaylanmış DNMT inhibitörleridir (Brueckner ve Lyko, 2004). Desitabin *in vitro* demetilasyon ajanı olarak kullanılırken, akut myeloid lösemi ve myelodisplastik sendrom tedavilerinde klinik olarak kullanılmaktadır (Fojo ve Bates, 2003).

Etki mekanizması: DNMT inhibitörleri nükleosit analogları ve nükleosit analogu olmayanlar olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır. DNMT nükleosit analogu inhibitörleri 5-karbon atomunda farklı substitüsyonlar taşır ve DNA'ya katılarak DNMT'leri kovalan-DNA ürünleri halinde inaktive etmektedirler (Matei ve Nephew, 2010; Nguyen ve ark., 2014). Nükleosit analogu olmayan DNMT inhibitörleri ise enzimleri kovalan bağlanmadan, geri dönüşsüz olarak doğrudan inhibe etmektedirler (Nguyen ve ark., 2014). Desitabin DNA, azasitidin ise RNA ile birleşerek ve DNMT ile kovalan bağlı ürünler oluşturup enzimi inhibe ederek etki göstermektedir (Stresemann ve Lyko, 2008). Azasitidin; sitotoksitesi, stabil olmaması ve sınırlı etkisi nedeniyle yerini daha çok deoksiriboz analogu olan desitabine bırakmıştır. Desitabin, azasitidinden

daha potent bir DNMT inhibitörüdür, mikromolar konsantrasyonların altında bile etkilidir ve over kanseri hücre hatları da dahil pek çok hücre hattı üzerinde etkili olduğu, özellikle hMLH1 olmak üzere pek çok tümör baskılayıcı genin ekspresyonunu devam ettirdiği, böylece sitotoksik etkin maddelere duyarlılığı artırdığı gösterilmiştir (Balch ve ark., 2004; Zeller ve Brown, 2010). Azasitidinin aksine spesifik olarak DNA'ya bağlandığı için daha az sitotoksiktir (Balch ve ark., 2004). Desitabin proteozomal degradasyon ile DNMT1 miktarını azaltmaktadır; aynı zamanda DNA hipometilasyonu ve DNA hasarının indüklenmesi konusunda azasitidinden daha fazla etkiye sahiptir (Hollenbach ve ark., 2010). Ayrıca 4°C'de azasitidinin yarı ömrü desitabinin yarı ömrü iken 20 ve 37 °C' lerde desitabinin yarı ömrü azasitidinden belirgin olarak daha uzundur (Stresemann ve Lyko, 2008).

Yan etkileri: Myeloid lösemi ve myelodisplastik sendrom tedavilerinde desitabin kullanımı ile görülen en önemli yan etki myelosüpresyon ve buna bağlı etkilerdir. Bunun yanında nadiren karşılaşılan diğer yan etkiler ise halsizlik, mide bulantısı, kusma, diyare olarak sıralanabilmektedir (Aribi ve ark., 2007)

1.9.3. Albümin

Memelilerde plazma da en çok bulunan protein olan albümin karaciğerde günde 10-15 g sentezlenmektedir. Ozmotik basıncın sağlanmasında ve düzenlenmesinde, plazmada taşıyıcı olarak çeşitli hidrofobik steroid hormonların bağlanmasında, hemin ve yağ asitleri gibi besinlerin taşınmasında, ekzojenik ya da endojenik ligandların dolaşım sisteminde dağıtılması ve metabolize edilmesinde, ekstraselüler bir antioksidan olarak serbest radikaller ve zararlı kimyasallardan korunmanın indüklenmesinde görev yapmaktadır (Loureiro ve ark., 2016).

Plazmada en çok bulunan protein olan albümin asidik, pH 7,4'te suda çözünürlüğü yüksek (%40 a/h' e kadar), %40'lık etanolde çözünebilen, 10 saate kadar 60°C'de ısıtmaya dayanıklı bir proteindir. Bunun yanında kolay elde edilebilirliği, biyoyuumluluğu, biyoparçalanabilirliği, toksik ve immünojenik olmaması nedeniyle

ilaç taşıyıcı sistem olarak uygun bir adaydır. Ticari olarak önemli miktarlarda albümin yumurta akından, sığır serumundan, insan serumundan ve aynı zamanda soya fasulyesi, süt ve buğdaydan elde edilmektedir (Loureiro ve ark., 2016; Palazzolo ve ark., 2018).

Bovin serum albümin (BSA) ise yaklaşık 69 kDa molekül ağırlığına ve 4,7 izoelektrik noktasına sahip globüler yapılı bir proteindir ve kolay elde edilebilirliği, düşük maliyeti, kolay saflaştırılabilirliği, yüksek ligand bağlama kapasitesi, biyoyumluluğu, biyoparçalanabilirliği, toksik ve immünojenik olmaması nedeniyle farmasötik endüstride kabul görmüş ve ilaç taşıyıcı sistem olarak tercih edilmiştir (Elzoghby ve ark., 2012; Karimi ve ark., 2016; Loureiro ve ark., 2016). Fizyolojik koşullarda %67'si α -heliks yapısında 585 aminoasitten oluşmaktadır (Loureiro ve ark., 2016). BSA'nın önilaçların suda çözünürlüğünü artırabilmesi ve uygun taşıma özellikleri de ilaç taşıyıcı sistem olarak düşünülmesine katkıda bulunmuştur (Karimi ve ark., 2016).

pH 4-9 gibi geniş bir pH aralığına ve ısıya, etanol gibi denatüre edici organik çözücülere dayanıklı olması albümini mikro ve nano- ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması ve kimyasal modifikasyonlar için uygun kılan özellikler olmuştur (Kratz, 2008). Ayrıca albüminin doğal kaynaklı endojen bir madde oluşu, onun güvenilir ve iyi tolere edilebilir olduğunu düşündürmektedir (Karimi ve ark., 2016; Lee ve Youn, 2016). Bunun yanında albüminin sahip olduğu amin ve karboksilik asit kalıntıları fonksiyonel gruplar ile modifikasyona olanak sağlamaktadır (Lee ve Youn, 2016). Moleküler yapısındaki pek çok ilaç bağlayıcı bölge nedeniyle albümin yüksek bağlama ve farklı yapıdaki pek çok molekülü taşıma kapasitesine sahiptir (Karimi ve ark., 2016).

Albümin özellikle tümörler ve enflamasyonlu dokular olmak üzere hedeflenme konusunda avantajlara sahiptir. 20. yüzyılın ortalarında kanser hücrelerinin plazma proteinlerinin parçalanma ürünlerini kendi proliferasyonlarında kullandıklarına dair çalışmalar yapılmıştır (Kratz, 2008). Ayrıca albümin EPR etkisinden yararlanarak 100-600 nm por açılığına sahip kapiller damarlar ve yetersiz lenfatik drenaj nedeniyle

tümör dokusunda birikebilmekte, ayrıca albümin nanopartikülleri EPR etkisiyle daha etkin şekilde tümör içerisine alınabilmektedir. Ayrıca albümin ya da albümin nanopartiküller tümör dokusu çevresindeki endotelial hücrelerin yüzeyinde aşırı eksprese edilen 60 kDa glikoproteine (gp60, albondin) bağlanarak transitoz ile tümör interstisyumuna girebilirler (Kratz, 2008; Lee ve Youn, 2016).

1.9.3.1.Albümin Nanopartikül Üretim Yöntemleri

- Emülsifikasyon

Sulu albümin çözeltisinin susuz ortamda emülsifiye edilmesine dayanan bir yöntemdir. Bu emülsiyonlar yüksek ya da düşük enerjili yöntemlerle oluşturulmaktadır. Yüksek enerjili sistemlerde öncelikle mekanik cihazlarla makrometre boyutundaki damlacıklar parçalanarak ara yüzeyde sürfaktan adsorpsiyonu ile sterik stabilizasyon sağlanmaktadır. Düşük enerjili sistemler ise nanoboyutlu damlacıkların oluşumu için formülasyondaki sürfaktanların, kosürfaktanların ve yardımcı maddelerin fizikokimyasal özelliklerini, sistemin kimyasal enerjisini kullanmaktadır (Loureiro ve ark., 2016). Emülsifikasyon yönteminde, albümin damlacıklarını içeren yağ fazı yüksek hızda homojenize edildikten sonra oluşan albümin nanopartikülleri iki temel yöntemle, termal (fiziksel) ya da kimyasal, stabilize edilmektedir. Termal yöntemde nanopartiküller yüksek sıcaklıkta belirli süre ısıtılıp soğutulduktan sonra yağ fazının viskozitesini düşürmek için etil eterle seyreltilerek santrifüjle ayrılması sağlanırken kimyasal yöntemde yağ fazı içindeki albümin nanopartikülleri çapraz bağlayıcı (glutaraldehit, formaldehit gibi) içeren eter ile resüspande edilerek denatüre edilmektedir (Elzoghby ve ark., 2012; Loureiro ve ark., 2016). Emülsiyon yönteminde albümin nanopartikülleri çapraz bağlayıcı konsantrasyonu, çapraz bağlama süresi ve sıcaklığı (Vural ve ark., 1991), albümin konsantrasyonu, emülsifikasyon süresi ve gücü, karıştırma hızı ve sulu olmayan fazın tipi gibi farklı koşullarda gerçekleştirilebilir. Ancak kullanılan organik çözücü ve sürfaktanların olası sakıncalarından dolayı desolvasyon yöntemi albümin nanopartiküllerinin hazırlanması için sıkça tercih edilmiştir (Liu ve ark., 2015).

- Desolvasyon (Koaservasyon)

Desolvasyon, albümin nanopartiküllerin hazırlanması için geliştirilen ilk yöntemdir (E. S. Lee ve Youn, 2016). Termodinamik olarak gelişen bir kendiliğinden oluşum mekanizması olan desolvasyon işleminde nanopartiküller, sulu albümin çözeltisine çözelti bulanık hale gelene kadar devamlı damla damla etanol ya da aseton gibi bir desolvasyon ajanının eklenmesi ile elde edilmektedir (Loureiro ve ark., 2016). Etanol eklemesiyle birlikte konformasyon değişikliğinden dolayı albüminin sudaki çözünürlüğünün düşmesine bağlı olarak faz ayrışması görülmektedir. Morfolojik olarak kendiliğinden oluşan albümin partikülleri yeterince stabil değildirler ve suda dağıtıldıklarında tekrar çözünebilirler. Bu nedenle oluşan koaservatlar glutaraldehit gibi bir çapraz bağlayıcı ile çapraz bağlanarak sertleştirilmektedir. Çapraz bağlanma sırasında lizin kalıntılarındaki amino grupları ve guanidin yan zincirindeki arjinin grupları glutaraldehitin aldehit grubu ile kondensasyon reaksiyonuna girmektedir (Elzoghby ve ark., 2012; Liu ve ark., 2015; Loureiro ve ark., 2016).

Oluşan nanopartiküllerin özellikleri başlangıçtaki protein konsantrasyonu, pH, iyonik güç, çapraz bağlayıcı ajanın konsantrasyonu, karıştırma hızı, desolvasyon ajanının oranı gibi parametrelere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Loureiro ve ark., 2016).

Çapraz bağlayıcı kullanımı desolvasyon yönteminin en büyük sakıncasıdır. Albümin nanopartikülleri sadece fiziksel ve geçici olarak bir araya geldiklerinde santrifüj ve rekonstitüsyon sonrasında kolayca albümin moleküllerine dönüşebilirler. Bu nedenle oluşan albümin nanopartiküllerin sertleştirilmesi ve morfolojik yapılarını koruyabilmeleri için çapraz bağlayıcıların kullanımı kaçınılmazdır. En çok kullanılan çapraz bağlayıcı ise glutaraldehittir (Lee ve Youn, 2016). Glutaraldehit iyi bilinen bir karsinogen olması nedeniyle ortamda kalan fazla glutaraldehit tamamen uzaklaştırılmalıdır (Loureiro ve ark., 2016).

- Termal jelasyon

Termal jelasyon yöntemi, bazı peptit segmentlerinin ısı ile tetiklenmiş açılmasının ardından hidrojen bağı, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler ve disülfid-sülfidril değiştirme reaksiyonlarından oluşan protein-protein etkileşimlerini içermektedir (Elzoghby ve ark., 2012; Loureiro ve ark., 2016).

- Nano-püskürterek kurutma

Bu yöntem, protein ve etkin madde çözeltisinin damlacıklar şeklinde püskürtülmesi esasına dayanır ve farmasötik endüstride sıkça kullanılır. Tipik bir püskürterek kurutma; çözelti püskürtülmesi, damlacıkların akışkan hava ile etkileşimi, damlacıkların kuruması ve kuru partiküllerin kuru havadan ayrılmasından oluşmaktadır (Loureiro ve ark., 2016).

- Kendiliğinden oluşma

Albüminin disülfid bağlarının kırılması ya da protein üzerindeki primer amino gruplarının azaltılmasıyla hidrofobik özelliğinin artırılmasına dayanmaktadır (Loureiro ve ark., 2016). Bu yöntemde albümin, kovalan ya da non-kovalan olarak hidrofobik modifikasyona uğratarak nanoboyutlu hidrofobik çekirdek ve hidrofilik kabuktan oluşan misel benzeri yapılar oluşturmaktadır. Nanopartikül oluşumu sırasında hidrofobik etkin maddeler çekirdekte tutunmaktadır. Bu yöntemle yapılan bir çalışmada albüminin primer amino grupları oktil aldehit ile modifiye edilerek hidrofobik özellik artırılmış ve kendiliğinden oluşum sağlanmıştır (Lee ve Youn, 2016).

1.9.4. Çalışmada Kullanılan Lipitler ile İlgili Genel Bilgiler

1.9.4.1. Lesitin

Lesitin soya ya da yumurta sarısı gibi doğal kaynaklardan elde edilen bir fosfolipittir (Eloy ve ark., 2014). Ticari olarak soya lesitini, trigliseritler ve az miktarda karbonhidrat, pigment, sterol ve sterol glikozit ile birlikte %65-75 fosfolipit içeren kompleks bir karışımdan oluşmaktadır. İçeriğindeki temel fosfolipitler fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilinositoldür. Rengi saflaştırılma ve beyazlatma işlemine göre değişkenlik göstermektedir (Scholfield, 1981).

1.9.4.2. Kolesterol

Memeli hücrelerinin membranlarında %29 mol/mol konsantrasyonda bulunan kolesterol, lipit membranların geçirgenliği özellikle hidrofilik etkin maddelerin enkapsülasyonu için önemli bir role sahiptir (Cagdas ve ark., 2011). Biyomembranların en önemli bileşenlerinden olan kolesterol membran organizasyonunu, dinamiklerini ve işlevini önemli orandan etkilemektedir. Kolesterol, fosfolipitlerin hidrokarbon zincirlerinin serbestçe dönüşünü azaltma yoluyla membranı stabilize ederek ve hidrofilik etkin maddelerin kaybını azaltmaktadır. Kolesterol, aynı zamanda, lipit membrandaki hidrokarbon fazına su penetrasyonunu azaltırken lipitlerin polar baş kısımlarına su penetrasyonunu artırarak hidrofobik karakteri azaltır ve hidrofilik etkin maddelerin birikimini artırmaktadır (Eloy ve ark., 2014).

1.9.4.3. Distearoil Fosfatidilkolin, Dipalmitoil Fosfatidilkolin ve Dimiristoil Fosfatidilkolin

Distearoil fosfatidilkolin (DSPC), dipalmitoil fosfatidilkolin (DPPC) ve dimiristoil fosfatidilkolin (DMPC), doymuş fosfolipitlerdir ve özellikle lipozom

yapılarında yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Anderson ve Omri, 2004). Birbirinden farklı zincir uzunlukları ve faz geçiş sıcaklıklarına sahiptirler (Çizelge 1.6.) (Sakdiset ve ark., 2018). Lipit tabaka içerisinde yer alan lipitlerin doymunluk oranı ve zincir uzunluğu arttıkça elde edilen tabakanın stabilitesinin arttığı gözlenmiştir (Anderson ve Omri, 2004).

Çizelge 1.6. Lipit kaplama formülasyonlarında kullanılan fosfolipit türevleri ve özellikleri

Fosfolipit	Zincir uzunluğu	Faz geçiş sıcaklığı (°C)
DMPC	14:0	23
DPPC	16:0	41
DSPC	18:0	55

1.9.4.4.Oleik asit

Oleik asit, doymamış yağ asitlerinin bir örneğidir ve zeytin ve susamdan elde edilen bitkisel yağların önemli bir bileşenidir. Oleik asit gibi serbest yağ asitleri, lipit membran yapılarına katılarak membranların fizikokimyasal özelliklerini değiştirebilmektedir. Özellikle *cis*-konfigürasyonlu çift bağ yapısından dolayı, doymun fosfolipit tabakalarının yapısını, akışkanlığını ve geçirgenliğini değiştirdiği gösterilmiştir (Kurniawan ve ark., 2017). Farmasötik ürünlerde emülsifiye edici veya çözünürlüğü artırmak amacıyla ve cilt penetrasyonunu arttırıcı olarak kullanılmaktadır (Srisuk ve ark., 2012).

Bu proje kapsamında, over kanseri tedavisinde çok sık karşılaşılan ilaç direncinin modülasyonu ve over kanseri tedavisinin başarıyla sağlanabilmesi amacıyla yeni bir tedavi seçeneği olarak karboplatin ve platin direncini modüle ederek karboplatinin etkinliğini artıracak bir epigenetik etkin madde olan desitabin ile kombinasyonunu taşıyan, sağlıklı dokulara zarar vermeden tümörlü dokulara hedeflendirilebilen nanopartiküler ilaç taşıyıcı bir sistemin hazırlanması ve over kanserinde kullanım olanaklarının araştırılması planlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda desitabin ve karboplatin ilaç kombinasyonunu içeren lipit kaplı polimerik nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemleri hazırlanmış ve *in vitro*

özellikleri değerlendirilmiş, geliştirilen formülasyonların MTT testi ile sitotoksik etkileri, Western blot (kaspaz 3, kaspaz 9 ve PARP tayini) ile apoptotik yolak proteinleri ve MLH1 proteini ekspresyonundaki değişiklik, floresan madde yüklü nanopartiküllerin konfokal lazer mikroskop ile görüntülenmesi ve akım sitometri yöntemi ile hücrede tutulum düzeyleri platine duyarlı A2780 ve platine dirençli A2780cis hücre dizileri üzerinde değerlendirilmiştir.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler

A2780 hücre hattı	Sigma
A2780cis hücre hattı	Sigma
Bovin serum albümin	Amresco
Desitabin	Sigma-Aldrich
Diklorometan	Sigma-Aldrich
Disodyum hidrojen fosfat	Merck
Diyaliz membran (12000-14000 Da)	Sigma-Aldrich
DMPC	Avanti Polar Lipids, Inc.
DPPC	Avanti Polar Lipids, Inc.
DSPC	Avanti Polar Lipids, Inc.
Enjektör ucu filtre (0,45 µm, 0,22 µm)	Isolab
Etanol	J.T. Baker
FBS (Fötal Dana Serumu)	Lonza
Fosforik asit	Sigma-Aldrich
Glutaraldehit	Sigma-Aldrich
Hücre kültürü plakları (altı kuyulu)	Costar®, Corning
Hücre kültürü plakları (sekiz kuyulu)	Lab-Tek™, Nunc™, Thermo Scientific™
Karboplatin	Sigma-Aldrich
Kitozan (düşük molekül ağırlıklı, 20-300cP)	Sigma-Aldrich
Kloroform	Sigma-Aldrich
Kolesterol	Sigma-Aldrich
L-glutamin	Biochrom
Membran filtre (0,22 ve 0,45 µm)	İsolab
Metanol	Merck
Mikropipet	Boeco
Oleik asit	Sigma-Aldrich

PBS (Fosfat salin tamponu)	Sigma-Aldrich
Penisilin/Streptomisin	Biochrom
Polikaprolakton (MA: 45000 Da)	Aldrich
Polilaktik-ko-glikolik asit (MA:30000-60000 Da, 50:50)	Aldrich
Potasyum dihidrojen fosfat	Carlo Erba
Rodamin B	Sigma
RPMI 1640	Biological Industries
Sodyum hidroksit	Merck
Sodyum klorür	Molchem
Soya lesitini	Sigma-Aldrich
Tween 80	Sigma-Aldrich
X Bridge C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm)	Waters Corporation
X Select® CSH C18 (250 × 4.6 mm; 5µm)	Waters Corporation
X Terra RP18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm)	Waters Corporation

2.2.Kullanılan Cihazlar

Akım sitometri cihazı	FacsAria™ II, BD Biosciences
Atomik kuvvet mikroskobu	Veeco MultiMode V
Çalkalayıcı inkübatör	Jeio Tech SI-300
Çoklu magnetik karıştırıcı	Daihan MS-MP8
Diferansiyel taramalı kalorimetre	Shimadzu
Dikey akımlı hava kabini	Thermo-Electron
Elektroforez tankı	Thermo Scientific
Etüv	Heraeus
Geçirimli elektron mikroskobu	FEI Tecnai G2
Hassas terazi	Mettler Toledo
HPLC	Agilent 1100
Jel yürütme Tankı	Thermo Scientific
Konfokal mikroskop	Zeiss LSM 880, AxioObserver
Liyofilizatör	Zirbus, VaCo 5
Partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçüm cihazı	Malvern, Zetasizer Nano ZS
pH metre	Mettler Toledo
Rotaevaporatör	Büchi RII
Sıvı azot tankı (-196°C)	Taylor Wharton
Soğutmalı santrifüj	Sigma Laboratory Centrifuge 3KS30
Ultrasonik banyo	Jeio Tech SI-300
Ultrasonik prob	Bandelin Sonoplus
Vorteks	IKA

2.3.Karboplatin ve Desitabinin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Karboplatin ve desitabinin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla etkin maddelerin UV ve FT-IR spektrumları, XRD desenleri ve DSC termogramları incelenmiştir.

2.3.1.Karboplatin ve Desitabinin Ultraviyole (UV) Spektrumunun Alınması

Karboplatin ve desitabinin ayrı ayrı 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda stok sulu çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltiler uygun şekilde seyreltilerek elde edilen 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ çözeltilerin 200-400 nm dalga boyları arasında spektrumları alınmıştır.

2.3.2.Karboplatin ve Desitabinin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fouirer Transform Infrared - FT-IR) Spektrumunun Alınması

Karboplatin ve desitabinin kimyasal yapılarının aydınlatılması için potasyum bromür tekniği kullanılarak 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında 4 cm^{-1} aralıklarla FT-IR (Perkin Elmer, Spectrum Two, ABD) spektrumları alınmıştır.

2.3.3.Karboplatin ve Desitabinin X-Işını Toz Difraktometrisi

Karboplatin ve desitabin bakır kaynaklı X ışını tüpüne sahip X-ışını Toz Difraktometresi ile 3-80°C aralığında 2 θ difraksiyon açısı ile analiz edilerek x-ışın toz difraktogramları alınmıştır.

2.3.4.Karboplatin ve Desitabinin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ile Analizi

Karboplatin ve desitabinin termal analizleri diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla cihazının analiz bölmesine içinde 2 mg numune bulunan alüminyum numune kabı yerleştirilerek, numuneler 25°C'den 300°C'ye dakikada 10°C sıcaklık artışı ile ısıtılarak bu sıcaklık aralığında termogramları alınmıştır.

2.4.Karboplatin ve Desitabinin Aynı Anda Miktar Tayini İçin Analitik Yöntem Geliştirilmesi

Karboplatin, desitabin ve desitabinin olası parçalanma ürünlerinin varlığında uygun pik şekilleri ile uygun analiz süresi içerisinde aynı anda tayin edilebilmesi için bir HPLC miktar tayini yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle sabit faz, hareketli faz bileşimi, konsantrasyonu, akış hızı ve kolon fırını sıcaklığı gibi parametreler değiştirilerek her iki etkin maddeyi ve bunların parçalanma ürünlerini birbirinden yeterli seçicilikle ayırabilecek bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir.

2.4.1.Karboplatin ve Desitabinin Kalibrasyon Doğrularının Hazırlanması

Etkin maddelerin kalibrasyon doğrularının çizilebilmesi için karboplatin ve desitabinin 200 µg.mL⁻¹ konsantrasyonda stok sulu çözeltileri hazırlanmış ve bu çözelti uygun şekilde seyreltilerek 0,5-100 µg.mL⁻¹ konsantrasyon aralığındaki çözeltiler geliştirilen HPLC yöntemi ile analiz edilerek her bir konsantrasyona karşılık gelen eğri altında kalan alan saptanmıştır (n=6). Konsantrasyona karşı eğri altında kalan alan değerleri grafiğe geçirilerek her bir etkin madde için kalibrasyon doğruları çizilip doğru denklemleri oluşturulmuştur.

2.4.2. Karboplatin ve Desitabinin HPLC ile Miktar Tayini Yönteminin Analitik Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, miktar tayin yönteminin, amaçlanan uygulama bakımından güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini kanıtlamak amacıyla uygulanır. Çalışmamızda etkin maddelerimizin formülasyonlar içerisindeki miktarının ve *in vitro* çözünme hızı çalışmalarında çözünme ortamındaki miktarının belirlenmesi amacıyla geliştirilen analitik yöntemin validasyonu ICH Q2R1 (2005) kılavuzu gereği aşağıda belirtilen parametreler değerlendirilerek yapılmıştır.

- Doğrusallık ve aralığı
- Doğruluk ve geri elde
- Kesinlik
- Özgünlük (Seçicilik)
- Teşhis (LOD) ve tayin (LOQ) sınırları

2.4.2.1. Doğrusallık ve Aralığı

Analizi yapılacak olan etkin maddeye ait cevap pik alanının, etkin maddenin kullanılan konsantrasyonları ile doğrudan orantılı olmasıdır.

Karboplatin ve desitabinin 0,5-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ aralığındaki 8 farklı konsantrasyondaki çözeltileri geliştirilen HPLC yöntemi ile analiz edilerek konsantrasyona karşı elde edilen eğri altında kalan alan değerler ile grafik çizilmiştir.

2.4.2.2. Doğruluk ve Geri Elde

Bir analitik yöntemin doğruluğu, o yöntem kullanılarak elde edilen sonuçların gerçek değerlere olan yakınlığıdır ve yüzde geri elde değerleri ile ifade edilir. En az üç farklı konsantrasyonda ve en az üçer defa hazırlanan numunelerin yüzde geri

eldelerinin ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve % bağıl standart sapması ile hesaplanmaktadır.

Karboplatin ve desitabinin 10, 40 ve 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki 3 farklı çözeltisinin analizi yapılmış ve yüzde geri eldeleri, standart sapmaları ve % bağıl standart sapması hesaplanmıştır. Bu şekilde elde edilen % bağıl standart sapması değerinin %2'den küçük olması analitik yöntemin doğruluğunu göstermektedir.

2.4.2.3. Kesinlik

Belirlenen koşullarda aynı stoktan hazırlanan birden fazla örneğin bir seri ölçümünün birbirine yakınlığını ifade etmektedir. Tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve tekrar elde edilebilirlik şeklinde değerlendirilir.

- Tekrarlanabilirlik: Aynı koşullarda, aynı kişi tarafından ve kısa zaman aralıklarındaki yapılan ölçümlerin kesinliğini ifade eder. HPLC ile analizler yapıldıktan sonra, kalibrasyon doğrusu kullanılarak her bir analizdeki pik alanının karşılık geldiği konsantrasyon değeri bulunur. Bulunan konsantrasyon değerlerinin ortalama (X), standart sapma (SS), bağıl standart sapma (BSS) ve % BSS değerleri hesaplanır. Yöntemin tekrarlanabilir olması için elde edilen pik alanlarına karşılık hesaplanan konsantrasyon değerlerinin % bağıl standart sapması değeri %2'den küçük olması gerekmektedir.

Tekrarlanabilirlik tayinleri için karboplatin ve desitabinin 10, 40 ve 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olmak üzere 3 farklı konsantrasyonu 3 tekrarlı olarak analiz edilmiştir.

- Ara Kesinlik: Ara kesinlik; farklı gün, farklı analist ve farklı ekipman gibi çeşitli değişkenliklerin incelenmesini ifade eder. Her bir analizdeki pik alanının karşılık geldiği konsantrasyon değerlerinden yola çıkılarak ortalama (X), standart sapma (SS), bağıl standart sapma (BSS) ve %BSS hesaplanır.

Ara kesinlik tayinleri için 3 farklı günde 10, 40 ve 80 µg.mL⁻¹ olmak üzere 3 farklı konsantrasyonunun analizi gerçekleştirilmiştir.

2.4.2.4. Özgünlük (Seçicilik)

Analizi yapılacak olan etkin maddenin belirlenen analiz şartlarında çalışmada kullanılacak diğer maddelerden ayırt edilebilme yeteneğinin gösterilmesi için özgünlük çalışması yapılmıştır. Ayrıca yöntemin seçiciliğini göstermek için hızlandırılmış bozunma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bozunma çalışmaları yapılırken standart karboplatin ve desitabin karışımı hızlandırılmış bozunma koşullarına (0.1 M HCl ile asit hidrolizi, 0.1 M NaOH ile baz hidrolizi, %3'lük H₂O₂ ile oksidasyonu, katı maddelerin 24 saat 254 nm UV ve etüv içerisinde 80°C'de sıcaklığa maruz bırakılması) tabi tutulmuştur.

2.4.2.5. Teşhis (LOD) ve Tayin Sınırlarının (LOQ) Belirlenmesi

Teşhis sınırı analiz edilen maddenin teşhis edilebilen fakat tam olarak tayin edilemeyen en küçük miktarını, tayin sınırı ise analizi yapılan maddenin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik ile kantitatif olarak tayin edilebilen en düşük miktarını ifade etmektedir ve aşağıdaki eşitlikler ile hesaplanmaktadır.

$$LOD = 3,3 \times (\sigma/s) \quad \text{Eşitlik 2.1.}$$

$$LOD = 10 \times (\sigma/s) \quad \text{Eşitlik 2.2.}$$

σ : Gün içi tekrar edilebilirliği % bağlı standart sapması

S : Kalibrasyon doğrusunun eğimi

Hassasiyet çalışmaları için 8 farklı konsantrasyondaki karboplatin ve desitabin çözeltisi analiz edilmiş (n=6) ve elde edilen eğri altında kalan alanlardan yola çıkılarak

kalibrasyon denklemleri oluşturulmuştur. Bu kalibrasyon denklemlerine göre yukarıdaki eşitlikler kullanılarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır.

2.5. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları

Çalışmamızda karboplatin ve desitabin yüklü lipit kaplı nanopartiküller hazırlanması hedeflenmiştir. Formülasyon çalışmaları iki aşamalı olarak yürütülmüştür. Çalışmanın ilk basamağında karboplatin içeren çekirdek nanopartiküller üretilmiş ve daha sonra bu nanopartiküller desitabin içeren lipit tabaka ile kaplanmıştır.

Önformülasyon çalışmalarında karboplatin içeren nanopartiküllerin hazırlanabilmesi için etkin maddelerin fiziksel özellikleri ve seçilecek polimer baz alınarak literatürde yer alan üretim yöntemleri araştırılmıştır. Çalışmanın amacına yönelik olarak nanopartiküllerin hedeflenen boyutlarda üretilmesi, yüksek etkin madde yükleme kapasitesinin sağlanabilmesi amacıyla formülasyonda kullanılacak polimerler ve yardımcı maddeler belirlenmiştir. Çalışmamızda polikaprolakton (PCL), poli(laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA), kitozan ve albümin polimerik materyal olarak kullanılmıştır.

Hazırlanan tüm nanopartikül formülasyonlarının *in vitro* özelliklerinin değerlendirilmesi için elde edilen nanopartiküllerde etkin madde yükleme etkinliği, partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi, zeta potansiyeli gibi çeşitli özellikleri incelenmiş ve optimum nanopartikül formülasyonlarının belirlenmesine yönelik değerlendirmeler yapılmıştır.

2.5.1. Karboplatin Yüklü PCL ve PLGA Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

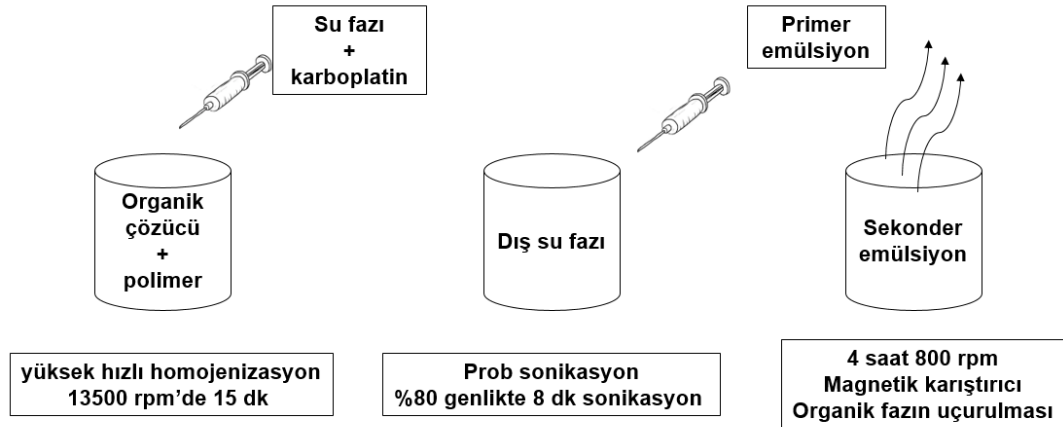
Suda çözünürlüğü yüksek olan karboplatin (>15 mg/ml) [National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=498142, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/498142> (Son erişim tarihi: June 21, 2018)] için yüksek üretim verimine, yaklaşık 200-400 nm boyutunda dar bir partikül büyüklüğü dağılımına ve yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip formülasyonların elde edilmesine yönelik en uygun hazırlama yönteminin çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi olduğuna karar verilmiştir. Bu doğrultuda, Alex ve ark.(2016) tarafından yapılan çalışmada yer alan yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Çalışmamızda PCL (45000 Da) ve PLGA (30000-60000 Da, 50:50) polimerik materyal olarak kullanılmış ve çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile polimerik nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasına yönelik önformülasyon çalışmaları yapılmıştır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 Karboplatin yüklü PCL ve PLGA bazlı polimerik nanopartikül formülasyonları

	NP1	NP2	NP3	NP4	NP5
İç faz (Su)	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
KRB (mg)	5	5	5	5	5
PEG 2000 (mg)	-	-	-	-	-
Yağ fazı (DCM)	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
PCL (mg)	75	75	75	-	75
PLGA (mg)	-	-	-	75	-
Dış faz (Su)	15 ml	15 ml	15 ml	15 ml	15 ml
PVA	300	-	300	300	300
CTAB	-	300	-	-	-
pH	6,0	6,0	10,0	10,0	10,0

NP1-NP4 kodlu formülasyonlar için; polimer organik çözücünde çözülerek yağ fazı, karboplatin saf su içerisinde çözülerek su fazı oluşturulmuştur. Su fazı buz banyosunda yüksek hızlı homojenizatör (UltraTurrax T25 IKA Labortechnik, Staufen, Almanya) kullanılarak yağ fazında 13500 rpm'de 15 dakika homojenize edilmiştir. Oluşan primer emülsiyon buz banyosunda yüksek hızlı homojenizatörle 13500 rpm'de, dış su fazı olan 15 mL %2 (a/h) polivinil alkol (PVA) çözeltisi içerisinde

dağıtılmış ve ultrasonik prob (Bandelin Sonoplus HD 2070, Bandelin Elec., Almanya) ile %80 genlikte 8 dakika sonike edilmiştir. Oluşan S/Y/S emülsiyonu oda sıcaklığında 4 saat 800 rpm’de manyetik karıştırıcıda karıştırılarak organik çözücünün uzaklaşması sağlanmıştır. 4 saat sonunda oluşan nanopartiküller 30 dakika 20000 rpm’de santrifüjlenmiş (Sigma Laboratory Centrifuge 3KS30, Almanya) ve saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra saf suda disperse edilerek 1 gece boyunca -20°C’de dondurulan nanopartiküller liyofilize edilmiştir (Zirbus, VaCo 5 Lyophilizer, Almanya) (Şekil 2.1). Hazırlanan tüm formülasyonlarda organik çözücü olarak diklorometan (DCM) kullanılmıştır. Etkin maddenin enkapsülasyon miktarı üzerine etkisi olabileceği düşünülerek NP2 formülasyonunda PVA yerine farklı bir sürfaktan setil trimetil amonyum bromür (CTAB) kullanılmıştır. NP5 kodlu formülasyonda primer emülsiyon stabilitesini artırmak amacıyla iç su fazına PEG 2000 eklenmiştir.



Şekil 2.1. Karboplatin yüklü PCL ve PLGA nanopartiküllerin üretiminin şematik gösterimi

2.5.2. Karboplatin Yüklü Kitozan Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

Elde edilen bulgular doğrultusunda çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlanan karboplatin yüklü PCL ve PLGA nanopartiküllerin hedeflenen enkapsülasyon etkinliğine ulaşamaması, üretim yönteminin valide edilmemesi ve tekrarlanabilir sonuçlar alınamaması göz önüne alınarak çalışmalara farklı bir polimer

ve nanopartikül hazırlama yöntemi kullanılarak devam edilmiştir. Çalışmamızda, hidrofilik karakterli etkin maddelerin enkapsülasyonu için uygun bir polimer olan kitozan kullanılarak (Wang ve ark., 2011) yine hidrofilik etkin maddeler için uygulaması oldukça yaygın olan iyonik jelasyon yöntemi ile karboplatin yüklü nanopartiküler sistemler elde edilmeye çalışılmıştır (Li ve ark., 2011). İyonik jelasyon yöntemi, kitozanın pozitif yüklü primer amino grupları ile çapraz bağlayıcı olarak görev yapan negatif yüklü polianyon grupları arasındaki iyonik etkileşmelere dayanır (Ergin ve ark., 2019; Fan ve ark., 2012; Grenha, 2012; Tilkan ve Özdemir, 2017).

İyonik jelasyon yönteminde düşük molekül ağırlıklı kitozan %1 (h/h) asetik asit çözeltisi içerisinde 1 gece magnetik karıştırıcıda karıştırılarak çözölmüş ve 0,45 µm por açıklığına sahip selüloz asetat filtreden süzölmüştür. Ultra saf su içerisinde çözölen çapraz bağlayıcı, buz banyosunda ultrasonik prob (Bandelin Sonoplus HD 2070, Bandelin Elec., Almanya) ile %80 genlikte 3 dakika sonike edilerek, pH'sı 5'e ayarlanmış 10 mL kitozan çözeltisi ile karıştırılmıştır (Çizelge 2.2). Kitozanın pozitif yüklü grupları ile çapraz bağlayıcının negatif grupları arasında meydana gelen iyonik etkileşmeler sonucu oluşan nanopartiköller 30 dakika 20000 rpm'de santriföjlenmiş (Sigma Laboratory Centrifuge 3KS30, Almanya) ve saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra saf suda disperse edilerek 1 gece boyunca -20°C'de dondurulan nanopartiköller liyofilize edilmiştir (Zirbus, VaCo 5 Lyophilizer, Almanya) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Karboplatin yüklü kitozan nanopartikül üretiminin şematik gösterimi

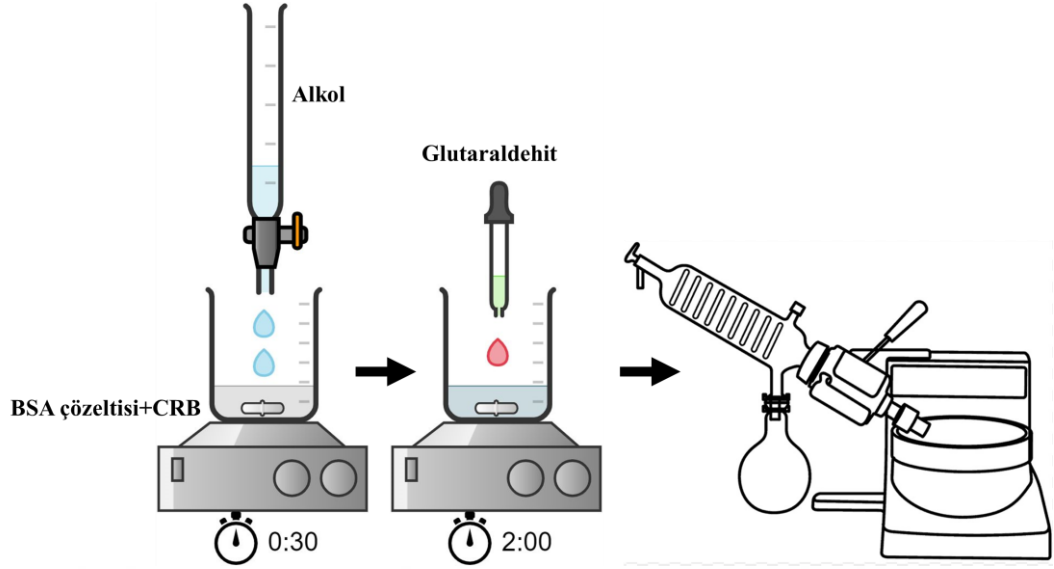
Çizelge 2.2 Karboplatin yüklü kitozan nanopartikül formülasyonlarının bileşimi

	C1boş	C2boş	C1	C2	C3	C4	C5	C6
KRB	-	-	10	10	5	5	5	5
Polimer çözeltisi (ml)	10	10	10	10	10	10	10	10
Kitozan (mg)	10	10	10	10	10	10	20	10
Çapraz bağlayıcı çözeltisi (ml)	5	5	5	5	5	5	10	10
Arap zamkı (mg/ml)	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	-	-
TPP (mg/ml)	-	-	-	-	-	-	1	1

2.5.3. Karboplatin Yüklü Albümin Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

PCL, PLGA ve kitozan gibi farklı polimerler ile çok sayıda formülasyon çalışması yapılmış; ancak karboplatinin enkapsülasyon etkinliği hedeflenen düzeye getirilememiş ve üretimlerde tekrarlanabilirlik sağlanamamıştır. Bu durum çalışmamızda kullanabileceğimiz polimerik materyale bir kısıtlama getirmiştir. Yapılan literatür araştırmaları sonucunda, albüminin suda çözünen etkin maddelerin nanosistemlere yüklenmesi için uygun bir materyal olduğu tespit edilmiş ve çalışmamızın çekirdek kısmını oluşturacak nanopartiküllerin hazırlanması için desolvasyon yöntemi ile albümin nanopartiküllerin üretilmesine çalışılmıştır (Dubey ve ark., 2015; Li ve ark., 2009; Merodio ve ark., 2001; Shome ve ark., 2009).

Çalışmamızda öncelikle bovin serum albüminin (BSA) sudaki çözünürlüğü magnetik karıştırıcıda sürekli karıştırılarak 1 ml/dk sabit hızda damla damla etanol eklenmesiyle azaltılmış ve albümin agregatları oluşturulmuştur. Oluşan agregatlar ise 151 ya da glutaraldehit uygulaması ile çapraz bağlanarak stabilize edilmiştir. Elde edilen nanopartikül dispersiyonu 30 dk 4°C’de 30000 rpm’de santrifüjlenerek (Sigma Laboratory Centrifuge 3KS30, Almanya) saflaştırılmış ardından -20°C’de dondurulan nanopartiküller 24 saat boyunca liyofilize edilmiştir (Zirbus, VaCo 5 Lyophilizer, Almanya) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Albümin nanopartikülleri hazırlanmasının şematik gösterimi

Albümin nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında albümin nanopartiküllerin oluşumu sırasında anahtar rolleri oynayan formülasyon ve işlem değişkenleri ayrı ayrı incelenerek sonuçlar değerlendirilmiştir. 47,04 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 18,80 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ve 9,40 $\mu\text{g}/\text{mg}$ glutaraldehit:BSA oranı kullanılarak elde edilen nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve karboplatinin enkapsülasyon etkinliği üzerine etkileri incelenmiştir (Çizelge 2.3). Literatürde yer alan protein nanopartiküllerin *in vitro* özelliklerinin kullanılan dispersiyon ortamından önemli oranda etkilendiği belirtilmiştir. Bu sebeple çalışmamızda dispersiyon ortamı olarak su ve sodyum klorür çözeltisi kullanılarak karboplatin yüklü albümin nanopartiküller hazırlanmış ve elde edilen nanopartiküler sistemler değerlendirilmiştir (Çizelge 2.3). Tüm matris yapıları ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında kullanılan taşıyıcı materyalin konsantrasyonu başta partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinliği olmak üzere elde edilen nanopartiküler sistemlerin özelliklerini etkilemektedir. Bu nedenle çalışmamız kapsamında %2, %2,5 ve %5 olmak üzere farklı konsantrasyonlarda BSA çözeltisi kullanılarak BSA konsantrasyonunun hazırlanan nanopartiküller üzerindeki etkisi araştırılmıştır (Çizelge 2.4). Desolvasyon işleminde albümin moleküllerinin çözünme ortamındaki çözünürlüğü bir desolvasyon ajanı kullanılarak azaltılmakta ve nanopartiküllerin oluşumu sağlanmaktadır. Bu işlem basamağında 2:1, 3:1 ve 4:1 olmak üzere üç farklı oranda etanol kullanılarak kullanılan desolvasyon ajanı miktarının etkileri incelenmiştir (Çizelge 2.5). Albümin molekülleri desolvasyon

işlemi ile albümin agregatları oluşturduktan sonra çeşitli yöntemlerle stabilize edilmelidir. Çalışmamızda stabilizasyon işlemi 70°C’de 30 dk boyunca ısı uygulaması ya da glutaraldehit ile çapraz bağlama şeklinde gerçekleştirilerek bu iki farklı yöntemin elde edilen nanopartiküller üzerine etkisi incelenmiştir (Çizelge 2.6). Protein moleküllerinin çözünürlüğünü ve yüzey yükünü etkileyen temel değişkenlerden biri çözeltilerinin pH’sıdır. Bu bilgiye dayanarak çalışmamızda farklı pH’larda (pH 5,0, pH 7,2 ve pH 11,0) BSA çözeltisi kullanılarak albümin nanopartiküller hazırlanmış ve *in vitro* özellikleri incelenmiştir (Çizelge 2.7). Yüzey etkin madde varlığı matris yapıli sistemlere etkin madde yüklenmesini ve çözünme hızını etkileyen parametrelerden biridir. Çalışmamızda farklı konsantrasyonlarda poloksamer 188 kullanılarak albümin nanopartiküller hazırlanmış ve kullanılan bu yüzey etkin maddenin karboplatin enkapsülasyonu ve çözünme hızına etkisi değerlendirilmiştir (Çizelge 2.8). Kanser tedavisinde kullanılan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin partikül büyüklükleri hedef dokuda birikimlerini sağlayan en önemli özelliklerinden biridir. Çalışmamızda albümin nanopartiküllerin hazırlandığı karıştırma hızı değiştirilerek partikül büyüklükleri (Çizelge 2.9) incelenmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

Çizelge 2.3. Farklı Glutaraldehit:BSA oranları ve dispersiyon ortamları kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonları.

Kod	Dispersiyon ortamı	BSA konsantrasyonu (%)	BSA çözeltisi (ml)	Glutaraldehit: BSA oranı	pH	Desolvasyon ajanı: sulu faz oranı (h:h)
AF1	Sulu ortam	2,5	2	47,04 µg/mg	11	4:1
AF2	Sulu ortam	2,5	2	18,80 µg/mg	11	4:1
AF3	Sulu ortam	2,5	2	9,40 µg/mg	11	4:1
AF4	NaCl çözeltisi	2,5	2	47,04 µg/mg	11	4:1
AF5	NaCl çözeltisi	2,5	2	18,80 µg/mg	11	4:1
AF6	NaCl çözeltisi	2,5	2	9,40 µg/mg	11	4:1

Çizelge 2.4. Farklı BSA konsantrasyonlarında hazırlanan albümin nanopartikül formülasyonları.

Kod	BSA konsantrasyonu (%)	BSA çözeltisi (ml)	pH	Desolvasyon ajanı:sulu faz oranı (h:h)	Çapraz bağlama yöntemi
AF7	5	2	11	4:1	1,56 µg/mg BSA
AF8	2,5	2	11	4:1	1,56 µg/mg BSA
AF9	2	2	11	4:1	1,56 µg/mg BSA

Çizelge 2.5. Farklı desolvasyon ajanı:sulu faz oranı ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları.

Kod	Desolvasyon ajanı:sulu faz oranı (h:h)	BSA konsantrasyonu (%)	BSA çözeltisi (ml)	pH	Çapraz bağlama yöntemi
AF10	2:1	2	2	11	1,56 µg/mg BSA
AF11	3:1	2	2	11	1,56 µg/mg BSA
AF9	4:1	2	2	11	1,56 µg/mg BSA

Çizelge 2.6. Farklı çapraz bağlama yöntemleri ile hazırlan nanopartikül formülasyonları.

Kod	Çapraz bağlama yöntemi	BSA konsantrasyonu (%)	BSA çözeltisi (ml)	pH	Desolvasyon ajanı:sulu faz oranı (h:h)
AF11	1,56 µg/mg BSA	2	2	11,0	3:1
AF12	70°C	2	2	11,0	3:1
AF13	1,56 µg/mg BSA	2	2	7,2	2:1
AF14	70°C	2	2	7,2	2:1

Çizelge 2.7. Farklı pH'larda BSA çözeltisi ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları.

Kod	BSA çözeltisinin pH'sı	BSA konsantrasyonu (%)	BSA çözeltisi (ml)	Glutaraldehit:BSA oranı	Desolvasyon ajanı:sulu faz oranı (h:h)
AF15	5,0	2	2	1,56 µg/mg BSA	2:1
AF13	7,2	2	2	1,56 µg/mg BSA	2:1
AF10	11,0	2	2	1,56 µg/mg BSA	2:1

Çizelge 2.8. Farklı konsantrasyonda yüzey etkin maddeler ile nanopartikül formülasyonları.

Kod	Yüzey etkin madde	BSA konsantrasyonu (%)	pH	Çapraz bağlama yöntemi	Desolvasyon ajanı:sulu faz oranı (h:h)
AF13	-	2	7,2	1,56 µg/mg BSA	2:1
AF16	%0,2 Poloksamer 188	2	7,2	1,56 µg/mg BSA	2:1
AF17	%0,5 Poloksamer 188	2	7,2	1,56 µg/mg BSA	2:1
AF18	%1 Poloksamer 188	2	7,2	1,56 µg/mg BSA	2:1

Çizelge 2.9. Farklı iki karıştırma hızında hazırlanan albümin nanopartikül formülasyonları.

Kod	Karıştırma hızı	BSA konsantrasyonu (%)	BSA çözeltisi (ml)	pH	Çapraz bağlama yöntemi	Desolvasyon ajanı:sulu faz oranı (h:h)
AF13	600 rpm	2	2	7,2	1,56 µg/mg BSA	2:1
AF19	1200 rpm	2	2	7,2	1,56 µg/mg BSA	2:1

2.5.4. Optimum Karboplatin Yüklü Albümin Nanopartikül Formülasyonunun Belirlenmesi

Çalışmamızda karboplatin yüklü albümin nanopartikül formülasyonlarının optimizasyonu için daha az deney sayısı ile sonuç alabilmek amacıyla Box-Behnken tasarımı (BBD) kullanılmıştır. Deneysel tasarım, Design Expert 7.0 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. BBD, bağımsız değişken kombinasyonlarının üç seviyede ele alındığı, işlem alanı ve merkez kenarlarının orta noktaları, bağımsız bir ikinci dereceden tasarımıdır (Vozza ve ark., 2018). Bağımsız değişken olarak çalışmamızda albümin nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerini önemli oranda etkilediğini belirlediğimiz ve Zu ve ark. (2009) tarafından da uygulanan BSA konsantrasyonu (X_1), desolvasyon ajanı:su fazı oranı (X_2) ve BSA:Glutaraldehit oranı (X_3) seçilerek üç değişkenin üç seviyesi kullanılmak üzere 12 deney gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.10 ve Çizelge 2.12). Partikül büyüklüğü (Y_1) ve partikül büyüklüğü dağılımının (Y_2) en düşük, enkapsülasyon etkinliğinin (Y_3) ise en yüksek seviyede olması hedeflenmiştir (Çizelge 2.11). Matematiksel modellerin uygunluğu p değerleri ve determinasyon katsayıları esas alınarak belirlenmiştir. Optimizasyon istenilen hedefe ulaşma (desirability) fonksiyonu kullanılarak önceden belirlenen sınırlar göz önüne alınarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.10. Box-Behnken tasarımındaki bağımsız değişkenler ve seviyeleri

Bağımsız değişkenler		Seviyeler		
		Düşük	Orta	Yüksek
BSA konsantrasyonu (%)	X_1	2	3	4
Desolvasyon ajanı:su fazı oranı	X_2	2:1	3:1	4:1
BSA:Glutaraldehit oranı ($\mu\text{g.mg}^{-1}$)	X_3	1,56	4,68	7,80

Çizelge 2.11. Box-Behnken tasarımındaki bağımlı değişkenler ve hedeflenen değerler

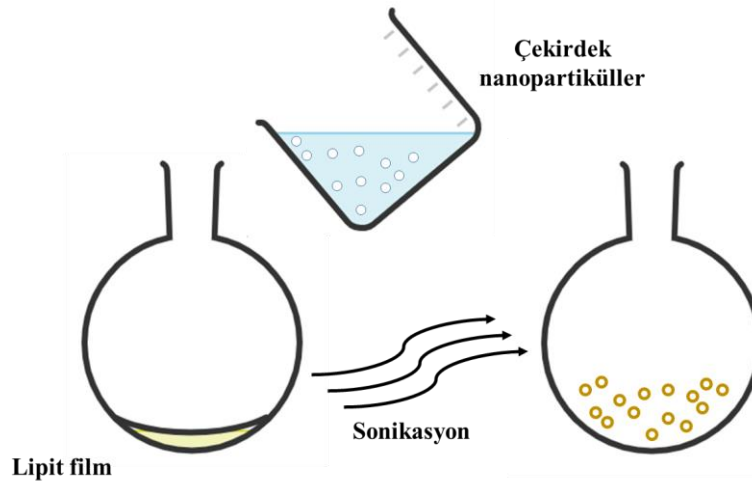
Bağımlı değişkenler		Hedeflenen değerler
Partikül büyüklüğü (nm)	Y_1	En düşük
Partikül büyüklüğü dağılımı	Y_2	En düşük
Enkapsülasyon etkinliği (%)	Y_3	En yüksek

Çizelge 2.12. Box-Behnken tasarımı

X ₁	X ₂	X ₃
4	3	1,56
2	4	4,68
3	4	1,56
3	4	7,80
4	2	4,68
4	4	4,68
3	2	1,56
2	3	1,56
4	3	7,80
3	2	7,80
2	3	7,80
2	2	4,68

2.5.5. Karboplatin Yüklü Albümin Nanopartiküllerin Lipit Tabaka ile Kaplanması

Projemizde üretilen çekirdek albümin nanopartiküllerin; hücrelerle etkileşimini artırmak, hücre membranına benzer yapısı nedeniyle biyouyumluluğunu artırmak, dolaşımda kalış süresini uzatmak, suda çözünürlüğü yüksek olan etkin maddelerin dışarı sızmasını engellemek gibi avantajlara sahip olmaları nedeniyle lipit yapılı bir kabuk tabakasıyla kaplanmaları planlanmıştır (Hadinoto ve ark., 2013). Bu amaçla farklı formülasyon ve proses parametrelerinin değiştirilmesiyle elde edilen optimum karboplatin yüklü albümin nanopartikül formülasyonunun, farklı lipit bileşenlerden oluşan bir kabuk materyali ile kaplanmasına çalışılmış, ikinci etkin maddemiz olan desitabin bu tabakaya yüklenmiştir. Lipit kaplama işlemi lipit film hidrasyonu yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Li ve ark., 2015; Meng ve ark., 2015; Sengupta ve ark., 2005; Wang ve ark., 2010; Zhao ve ark., 2015) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Lipit kaplı albümin nanopartikül üretiminin şematik gösterimi.

Bu yöntemle göre kullanılacak lipidler 2 ml kloroformda çözülmüş ve 50 ml'lik bir balona alınmıştır. Balon çeperinde düzgün bir lipid film elde edebilmek amacıyla organik çözücü rotavaporda (Buchi Rotavapor RII) 40°C'de 60 rpm'lik sabit dönü hızında uçurulmuştur. Elde edilen lipid film, 30 mg karboplatin yüklü albümin nanopartikül ve PBS pH 7,4 içerisindeki desitabin çözeltisi ile ultrasonik banyoda kullanılan lipidlerin faz geçiş sıcaklıklarının 5°C üzerinde 10 dk sonike edilerek hidrate edilmiştir. Lipit filmin ultrason yardımıyla nanopartiküllerin yüzeyinde yeniden oluşumu sağlandıktan sonra oluşan lipid kaplı albümin nanopartiküller 1 saat boyunca 30000 rpm'de 4°C'de santrifüjlenerek ayrılmıştır. Ayrılan partiküller saf su içerisinde disperse edilip -20 °C'de dondurulmuş ve 24 saat boyunca liyofilize edilmiştir. Lipit kaplama yapılırken farklı lipid:nanopartikül oranı ve farklı lesitin:kolesterol oranları kullanılarak lipid kaplama işlemi optimize edilmeye çalışılmıştır (Çizelge 2.13). Lipit kaplama işleminin başarılı şekilde gerçekleştirildiği oranlar belirlendikten sonra farklı dispersiyon ortamı hacimleri (Çizelge 2.14) ve farklı lipid bileşimleri (Çizelge 2.15) kullanılarak çekirdek albümin nanopartiküllerden dispersiyon ortamına sızan karboplatin oranı azaltılmaya, lipid kaplamaya yüklenen desitabin miktarı artırılmaya ve optimum partikül büyüklüğü, partikül büyüklüğü dağılımı ve zeta potansiyele sahip lipid kaplı albümin nanopartiküllerin hazırlanması amaçlanmıştır.

Çizelge 2.13. Farklı lipit:nanopartikül oranı ve farklı lipit oranlarının lipit kaplı albümin nanopartikül formülasyonları üzerine etkisi.

Kod	Lipit: nanopartikül oranı (a/a)	Lipit bileşimi (Lesitin:Kolesterol) (a:a)	Dispersiyon hacmi (ml)	DES (mg)
LA1	1:1	1:1	10	X
LA2	1:1	1:0,5	10	X
LA3	0.5:1	1:1	10	X
LA4	0.5:1	1:0,5	10	X

Çizelge 2.14. Lipit kaplama işlemi sırasında dispersiyon ortamına sızan karboplatin miktarını azaltmaya yönelik çalışmalar.

Kod	Lipit: nanopartikül oranı (a/a)	Lipit bileşimi (Lesitin:Kolesterol) (a:a)	Dispersiyon hacmi (ml)	KRB (mg)	DES (mg)
LA5	1:1	1:0,5	5	5	1
LA6	1:1	1:0,5	2	5	1

Çizelge 2.15. Farklı lipit bileşimlerinin lipit kaplı albümin nanopartiküller üzerine etkisi.

Kod	Lipit: nanopartikül oranı (a:a)	Lipit bileşimi (Fosfolipit:Kolesterol :Oleik asit) (a:a:a)	Dispersiyon hacmi (ml)	KRB (mg)	DES (mg)
LA6	1:1	1(Lesitin):0,5	2	5	1
LA7	1:1	1(Lesitin):0,5:0,4	2	5	1
LA7-D	1:1	1(Lesitin):0,5:0,4	2	5	5 mg çekirdek 1 mg kabuk
LA8	1:1	1(Lesitin):0,5:0,4	2	20	1 mg kabuk
LA8-D	1:1	1(Lesitin):0,5:0,4	2	20	5 mg çekirdek 1 mg kabuk
LA9	1:1	1(Lesitin):0,5:0,4	2	5 mg çekirdek 20 mg kabuk	1
LA10	1:1	1(DPPC):0,5	2	5	1
LA11	1:1	1(DPPC):0,5:0,4	2	5	1
LA12	1:1	1(DSPC):0,5	2	5	1
LA13	1:1	1(DSPC):0,5:0,4	2	5	1
LA14	1:1	1(DMPC):0,5	2	5	1
LA15	1:1	1(DMPC):0,5:0,4	2	5	1

2.5.6. Hazırlanan Nanopartiküler Sistemlerin Karakterizasyonu

2.5.6.1. Partikül Büyüklüğü ve Partikül Büyüklüğü Dağılımı

Hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımını tanımlayan polidispersite indeksleri Malvern Mastersizer ZS (Malvern Instruments, İngiltere) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Liyofilize toz halindeki nanopartiküller ultrasaf su ile disperse edildikten sonra ölçümler oda sıcaklığında ve ardışık altı ölçüm şeklinde gerçekleştirilmiştir.

2.5.6.2. Zeta Potansiyeli Ölçümü

Nanopartiküler sistemlerin yüzey yükleri hakkında bilgi veren zeta potansiyel değerinin ölçümü için Malvern Mastersizer ZS (Malvern Instruments, İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Deneysel çalışma Bölüm 2.5.6.1’de anlatılan şekilde yürütülmüştür.

2.5.6.3. Formülasyonlara Yüklenen Etkin Madde ve Enkapsülasyon Etkinliği Tayini

Polimerik nanopartiküllerin etkin madde miktar tayinleri indirekt yöntem ile süpernatandan yapılmıştır. Nanopartiküllerin üretimi sırasında elde edilen süpernatant 0,22 µm por açıklığına sahip selüloz asetat filtreden süzülüp saf su ile seyreltilerek geliştirilen HPLC miktar tayini yöntemi ile analiz edilmiştir. Nanopartiküllere yüklenen etkin madde miktarı (YK) ile enkapsülasyon etkinliği (EE) aşağıdaki eşitlikler ile hesaplanmıştır (n=6).

$$\%YK = \left(\frac{\text{Nanopartiküle yüklenen etkin madde miktarı}}{\text{Nanopartikül miktarı}} \right) \times 100$$

Eşitlik 2.3.

$$\%EE = \left(\frac{\text{Toplam etkin madde miktarı} - \text{Serbest etkin madde miktarı}}{\text{Toplam em miktarı}} \right) \times 100$$

Eşitlik 2.4.

2.5.6.4. *In Vitro* Çözünme Hızı Çalışmaları

Etkin maddelerin nanopartikül formülasyonlarından *in vitro* çözünme hızı çalışmaları diyaliz membran yöntemi kullanılarak yapılmıştır. *In vitro* çözünme hızı çalışmaları karboplatin içeren çekirdek nanopartiküller ile karboplatin ve desitabin içeren lipid kaplı nanopartikül formülasyonlarında gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan nanopartiküller 2 ml çözünme ortamında (%0,1 Tween 80 içeren pH 5,5 fosfat tamponu) disperse edilerek diyaliz membrana (Sigma, 12000 Da MWCO) yerleştirilmiştir. Membranlar 10 mL %0,1 Tween 80 içeren pH 5,5 fosfat tamponu çözünme ortamına konulmuş, $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ 'de, yatay çalkalayıcılı su banyosunda (Jeio Tech SI-300 (Jeio Tech Co. Ltd, Güney Kore)) 100 rpm çalkalama hızında çalışılmıştır. Belirli zaman aralıklarında çözünme ortamı eşit hacimde taze çözünme ortamı ile değiştirilmiştir. Alınan örnekler 0,22 µm selüloz asetat filtreden süzülüp HPLC'de analiz edilmiştir. Deneysel çalışma her bir nanopartikül formülasyonu için üç paralel olarak gerçekleştirilmiş ve formülasyonlardan açığa çıkan karboplatin ve desitabinin yüzde miktarları zamana karşı grafiğe geçirilerek salım profilleri elde edilmiştir.

pH 5,5 Fosfat Tamponu (Avrupa Farmakopesi 6) hazırlanması

Çözelti A:

Potasyum dihidrojen fosfat R	13,61 g
Distile su R y.m.	1000,0 mL

Çözelti B:

Disodyum hidrojen fosfat R	35.81 g
Distile su R y.m.	1000.0 mL

*Çözelti A ve Çözelti B Avrupa Farmakopesi 6,0'da yer alan yukarıdaki formüle hazırlanarak 96,4 mL Çözelti A ve 3,6 mL Çözelti B karıştırılmış ve pH 5,5'e ayarlanmıştır.

2.5.6.5. Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) Analizi

Kaplanmamış ve lipit kaplanmış albümin nanopartiküllerin morfolojik özelliklerinin tayini için partiküllerin TEM (FEI Tecnai G2 TEM) ile görüntülenmesi yapılmıştır. Çalışma Li ve ark.'nın çalışmasında belirtilen prosedür uygulanarak gerçekleştirilmiştir (F. Li ve ark., 2015). Nanopartiküller saf su içerisinde disperse edildikten sonra karbon kaplı grid üzerine damlatılmış ve oda sıcaklığında kuruması sağlanmıştır. Görüntülemenin daha net yapılabilmesi ve kaplama tabakasının görülebilmesi için nanopartiküller %2 (a/h) uranil asetat çözeltisi ile 2 dakika boyunca negatif boyandıktan sonra tekrar oda sıcaklığında kurutulmuş ve TEM cihazı ile görüntülenmiştir.

2.5.6.6. Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM) Analizi

Geliştirilen karboplatin yüklü albümin nanopartiküller ile karboplatin ve desitabin yüklü lipit kaplı albümin nanopartiküllerin yapısal şekillerinin ve yüzey morfolojileri ile üç boyutlu görüntülerinin tayin edilebilmesi için AFM analizleri yapılmıştır. AFM analizinde yüzeyin atomik boyutlara kadar sivriltilmiş bir iğne ucunun örnek yüzeyi üzerindeki hareketleri yardımıyla, yüksek çözünürlükte, üç boyutlu görüntülenmesini sağlamaktadır. Görüntüleme, iğne ucu ile örnek yüzeyi arasındaki itme-çekme kuvvetleri şeklindeki etkileşiminin incelenmesi sonucunda gerçekleştirilir. Analiz; iğnenin örnek yüzeyine temas ettiği temas yöntemi, iğnenin örnek yüzeyine temas etmediği temassız yöntem ve iğnenin örnek yüzeyine vurularak yaptığı vurma yöntemi olmak üzere üç farklı şekilde yürütülebilir.

Çalışmamızda Veeco MultiMode V markalı AFM cihazı kullanılmıştır. Analizi için seyreltik sulu dispersiyonu hazırlanan örnekler 1 cm x 1 cm boyutlarında kesilen lamalar üzerine damlatılmış, düşük bir elektrik akımı ile yüksek hızda döndürülen lamaların üzerindeki suyun merkezkaç kuvveti etkisiyle savrulması sağlanmış, ardından vurma yöntemi kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir.

2.5.6.7. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizleri

BSA, karboplatin yüklü albümin ve lipid kaplı karboplatin ve desitabin yüklü albümin nanopartiküller ile çalışmamızda kullanılan lipidlerin diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) (Shimadzu DSC-60, Japan) analizi yapılarak formülasyonda herhangi bir geçimsizlik olup olmadığı ve enkapsüle edilen etkin maddenin ilaç taşıyıcı sistem içerisindeki fizikokimyasal durumu değerlendirilmiştir. Bu amaçla DSC cihazının analiz bölmesine içinde toz halde yaklaşık 2 mg numune bulunan alüminyum numune kabı yerleştirilerek, numuneler 25°C'den 300°C'ye dakikada 10°C sıcaklık artışı ile ısıtılarak bu sıcaklık aralığında termogramları alınmıştır.

2.5.6.8. X-ışını Kırınımı (XRD) Analizi

Etkin maddelerimiz olan karboplatin ve desitabinin formülasyon bileşenleri ile geçimsizliği olup olmadığı karboplatin ve desitabinin yanında seçilen lipid kaplı albümin nanopartikül formülasyonunun X ışını difraktogramı alınarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla LA7 kodlu lipid kaplı albümin Nanopartikül formülasyonu bakır kaynaklı X ışını tüpüne sahip X-ışını Toz Difraktometresi ile 3-80°C aralığında 2 θ difraksiyon açısı ile analiz edilerek x-ışın toz difraktogramı alınmıştır.

2.6.Stabilite Çalışmaları

LA7 kodlu karboplatin ve desitabin kombinasyonu yüklü lipid kaplı albümin nanopartikül formülasyonunun stabiliteyi farklı sıcaklık değerlerinde incelenmek üzere teste tabi tutulmuş ve saklama sıcaklığının nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri üzerine etkisi incelenmiş ve nanopartikül formülasyonlarındaki olası değişimler DSC termogramları ve TEM görüntüleri ile değerlendirilmiştir.

Bu amaçla hazırlanan nanopartikül formülasyonları liyofilize halde 5°C’de ve 25°C’de %60 bağıl nem varlığında bekletilmiştir. Üçüncü ay sonunda belirtilen analizler yapılarak nanopartikül formülasyonlarının stabilitesi incelenmiştir. Stabilité çalışmaları halen devam etmektedir.

2.7.Nanopartiküllerin Sterilizasyonu

2.7.1.Nanopartiküllerin Sterilizasyon Yöntemi

Hazırlanan çekirdek albümin nanopartikülleri ve lipit kaplı albümin nanopartiküllerin sterilizasyonu, Türkiye Atom Enerjisi Kurumu’nda Şekil 2.5’te görülen Cobalt-60 kaynağı kullanılarak 25 kGy gama radyasyon uygulaması ile gerçekleştirilmiştir.

2.7.2.Sterilizasyon Sonrasında Yapılan Kontroller

Gama radyasyon ile sterilize edilen çekirdek albümin nanopartikül ve lipit kaplı albümin nanopartikül formülasyonlarında sterilizasyon işleminin formülasyonların *in vitro* özellikleri üzerine etkisinin araştırılması amacıyla partikül büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyel ölçümleri ile TEM analizleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.5. TAEK'te sterilizasyon işleminin gerçekleştirildiği Cobalt-60 kaynağı Gama-Cell cihazı.

2.8. *In vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmamızda saf etkin maddeler ile geliştirilen nanopartikül formülsiyonlarının sitotoksik etkileri, hücresel alımları, apoptoz ve direncin modülasyonu ile ilgili çalışmalar platin bazlı kemoterapiye duyarlı A2780 ve dirençli A2780cis hücre dizileri üzerinde yapılan hücre kültürü çalışmaları ile değerlendirilmiştir.

2.8.1. Hücre Dizisi ve Hücre Kültürü Koşulları

Çalışma kapsamında, A2780 insan over kanseri ve A2780cis sisplatin dirençli insan over kanseri hücre dizileri kullanılmıştır. Hücreler 25 cm² hücre kültürü flasks içerisinde, %10' luk fetal dana serumu (FBS), antibiyotik (Penisilin/Streptomisin) ve %1 L-glutamin içeren RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) tam besiyeri ortamında 37°C'de %5 CO₂'lik etüvde çoğaltılmıştır. Her 3 günde bir besi yeri değiştirilerek tek tabaka halinde büyüyen hücreler haftada bir defa tripsinizasyon işlemi ile pasajlanmıştır. A2780 hücre dizileri 70 saatlik inkübasyon sonucu %80-85 yoğunluğa ulaşarak deneye hazır hale getirilmiştir.

2.8.2. Sitotoksosite çalışmaları

Serbest karboplatin ve desitabin, boş nanopartikül formülasyonu ve nanopartiküler sistemlere yüklenmiş etkin maddelerin sitotoksosite çalışmaları MTT (3-(4,5-dimethyltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. MTT yöntemi, canlı hücrelerin mitokondriyal süksinat dehidrogenazları aracılığıyla çözünür metil-tiyazol-tetrazolyum tuzunu, çözünmeyen formazana dönüştürmesi ve çözünmeyen bu kristallerin sodyumdodesil sülfat (SDS) ile suda çözünür hale getirilmesi ile oluşan renk şiddetinin kolorimetrik olarak ölçümü esasına dayanan bir sitotoksosite testidir.

Sitotoksosite çalışmaları saf etkin maddeler için Çizelge 2.16’da gösterilen deney gruplarında belirtilen tedavi protokolü ile ve geliştirilen karboplatin ve desitabin yüklü lipit kaplı albümin nanopartikül formülasyonları üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.16. Deney grupları

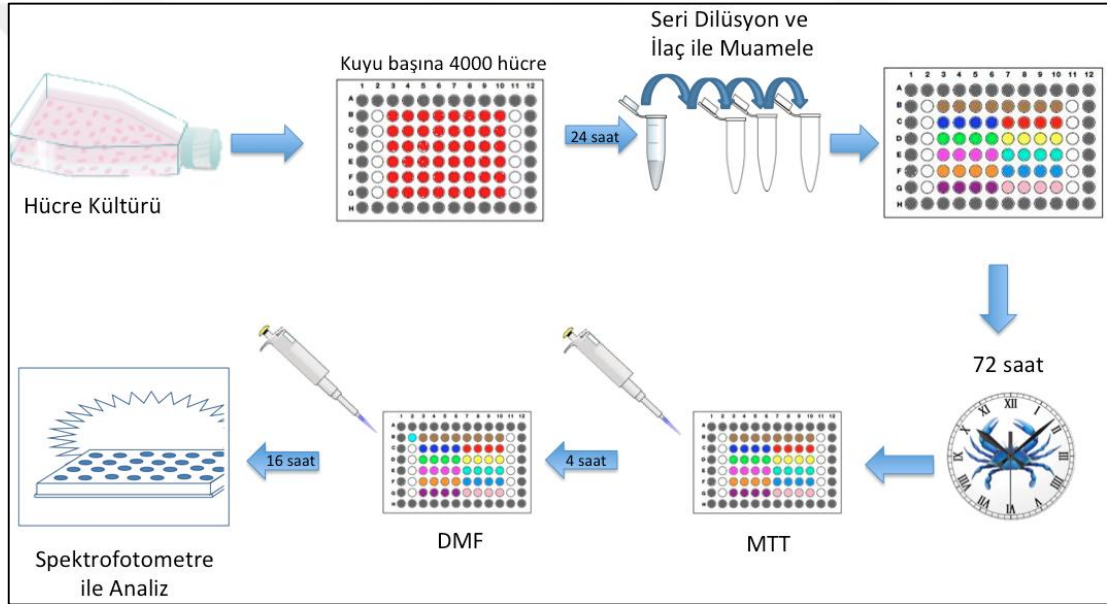
Grup	Uygulanan tedavi (Toplam 72 saat)
I. Grup	Desitabin (24 saat)
II. Grup	- Karboplatin (48 saat)
III. Grup	Desitabin (24 saat) Karboplatin (48 saat)
IV. Grup	- Desitabin + Karboplatin (48 saat)
V. Grup	Desitabin (24 saat) Desitabin + Karboplatin (48 saat)
VI. Grup	Boş Nanopartikül
VII. Grup	LA7
VIII. Grup	LA7D
IX. Grup	LA8
X. Grup	LA8D
XI. Grup	LA9

MTT deneyi protokolü doğrultusunda hücreler plak kuyularına kuyu başına 4000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin kuyu tabanına yapışmaları için 24 saatlik inkübasyondan sonra belirlenen dozlarda ve tedavi protokolüne göre serbest etkin maddeler, boş nanopartikül formülasyonu ya da etkin madde yüklü nanopartikül formülasyonları kuyulara eklenmiştir. Her bir doz için 4 bağımsız deneme yapılmıştır (n=4). Hücre canlılığı analizi için sadece besiyeri eklenen kontrol örnekleri ile 8 bağımsız deneme yapılmıştır (n=8). Belirlenmiş olan sürelerin sonunda ise kuyulara 5

mg.mL⁻¹ konsantrasyonda hazırlanan 50 µL MTT eklenmiş ve 4 saat inkübe edilmiştir. 4 saat sonunda %45 DMF (Dimetilformamid) içinde çözülmüş %23 SDS çözeltisi (pH 4,7) eklenerek bir gece etüvde bekletilmiş ve oluşan renk değişimleri plak okuyuculu spektrofotometre cihazından 570 nm dalga boyunda okunmuştur (Şekil 2.6). Analiz sonucunda elde edilen absorbans (OD) değerleri sonuçlarından yola çıkılarak Eşitlik 2.5 ile % hücre canlılığı hesaplanmıştır. Buna göre, %50 ve üzerinde hücre ölümü görülmesi ilaca duyarlı cevap olarak değerlendirilmiştir.

$$1 - \frac{\text{Ortalama OD (etkin madde ya da etkin madde yüklü formülasyon)}}{\text{Ortalama OD(kontrol kuyusu)}} \times 100 = \% \text{Hücre ölümü}$$

Eşitlik 2.5.



Şekil 2.6. MTT sitotoksosite testi deney protokolü

2.8.3. Hücresel Alımın Konfokal Görüntüleme ile Belirlenmesi

Çekirdek albümin nanopartiküller ile lipit kaplı albümin nanopartiküllerin A2780 ve A2780cis hücrelerine alımı konfokal mikroskop görüntülemesi ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla nanopartiküler sistemlere etkin maddeler yerine floresan özellik gösteren rodamin B yüklenmiştir. A2780 hücreleri 10000 hücre/kuyu A2780cis hücreleri ise 15000 hücre/kuyu olacak şekilde 8-kuyulu plaklara (Lab-Tek™, Nunc™, Thermo Scientific™) ekilmiş ve hücrelerin kuyu tabanına yapışması

için RPMI-1640 (Biological Industries) besiyeri içerisinde etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatlik sürenin sonunda rodamin B yüklü lipit kaplı albümin nanopartiküller plaklara eklenmiş, ardından 8 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda kuyulardaki besiyeri çekilmiştir. Her bir kuyu 3 kez 300 µL soğuk PBS ile yıkanmıştır. Bu aşamadan sonra kuyu tabanındaki hücreler %4 paraformaldehit ile oda sıcaklığında 20 dakika fikse edilmiştir. Fiksasyon aşamasından sonra kuyular 3 kez soğuk PBS ile yıkanmış ve 5 µg/ml konsantrasyonda DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ile 5 dakika inkübe edilmiştir. Plaklar 3 defa daha soğuk PBS ile yıkandıktan sonra lam üzerine %70 gliserol damlatılarak lamel ile kapatılmıştır. Rodamin B yüklü lipit kaplı albümin nanopartiküllerin 8 saatlik inkübasyon süresi sonunda gerçekleşen hücre alımları konfokal mikroskop (Zeiss LSM 880, AxioObserver) ile görüntülenmesi ile değerlendirilmiştir. Örnekler 40x objektifte görüntülenmiş (Rodamin B Eksitasyon dalga boyu/Emisyon dalga boyu= 543/626, DAPI Eksitasyon dalga boyu/Emisyon dalga boyu = 405/476) ve elde edilen mikroskop görüntüleri ImageJ ve Zen Blue (ver 3.1) programları kullanılarak işlenmiştir.

2.8.4. Hücresel Alımın Akım Sitometrisi ile Belirlenmesi

Rodamin B yüklü lipit kaplı albümin nanopartiküllerin A2780 ve A2780cis hücrelerine alımı konfokal mikroskop görüntülemesinin yanı sıra akım sitometrisi yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir.

A2780 hücreleri 365000 hücre/kuyu A2780cis hücreleri ise 470000 hücre/kuyu olacak şekilde 6-kuyulu plaklara (Costar®, Corning) ekilmiştir. Hücrelerin kuyu tabanına yapışması için RPMI-1640 (Biological Industries) besiyeri içerisinde etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatlik sürenin sonunda rodamin B yüklü lipit kaplı albümin nanopartiküller plaklara eklenmiş, ardından 8 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda kuyulardaki besiyeri çekilmiştir. 8 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda hücreler tripsin ile kuyu tabanından kaldırılmıştır. Besiyeri ile enzim aktivitesi inhibe edilen örnekler 15 ml'lik tüplere aktararak 2000 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant atılmış, tüp tabanında pellet halinde bulunan

hücreler 5 ml hacimde PBS ile resüspande edilerek, akım sitometri cihazında [FacsAria™II (BD Biosciences)] FSC:310, SSC:340, PE:437 voltaj değerleri kullanılarak analiz edilmiştir. Alınan veriler FlowJo™ (ver 10.6.1) programı ile analiz edilmiştir. İstatistiksel analizi GraphPad Prism 7 programı ile gerçekleştirildi (n=3, p<0,05).

2.8.5. Apoptoz ve Direncin Modülasyonunun Western Blot Yöntemi ile Değerlendirilmesi

A2780 insan over kanseri hücrelerinde ve platin dirençli A2780/cis hücrelerinde apoptotik yolak proteinlerinin ekspresyonları Western Blot yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

Hücrelerin kültür ortamında çoğaltılması aşamasından sonra 6 kuyulu plakların her birine 2×10^6 hücre eklenmiş ve hücrelerin kuyu zeminlerine yapışması için 37 °C'de %5 CO₂'lik etüvde 24 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. 24 saat sonra kuyu içerisinde bulunan tam besiyerleri çekilmiş ve serumsuz besiyeri eklenmiştir. 37 °C'de %5 CO₂'lik etüvde 24 saat inkübasyon ile hücrelerin aynı fazda (G0 fazı) kalmaları sağlanmıştır. Serum starvasyon işlemi sonrasında serumsuz besiyeri kuyulardan uzaklaştırılmıştır. Kuyudaki hücelere, farklı deney gruplarına göre tedavi uygulanarak inkübasyonları gerçekleştirilmiştir. Belirlenen süreler sonunda besiyeri kuyulardan uzaklaştırılmış ve lizis tamponu ile plak içerisinde bulunan hücreler parçalanıp hücre lizatları elde edilmiştir.

Western Blot deneyinde kullanılan protein lizatlarının, protein miktarlarının tayini amacıyla protein kantitasyonu yapılmıştır. Kantitasyonda kullanılan ve içerdiği protein miktarları bilinen protein standartları sayesinde, 1 ml lizat içerisinde bulunan proteinin mg cinsinden miktarı belirlenmiştir. Protein kantitasyonu ile belirlenen protein miktarları, %10'luk SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi) jelin her kuyusuna eşit miktarda protein için eklenen hacmin hesaplanmasında kullanılmıştır. Protein kantitasyonundan sonra lizatlar 95 °C'ye

getirilmiş olan kuru ısıtma bloğu içerisinde 5 dakika bekletilerek proteinlerin denatürasyonu sağlanmıştır. Protein denatürasyonu aşamasından sonra, lizat içerisinde bulunan farklı ağırlığa (kDa) sahip proteinlerin SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile yürütülerek ayrışması sağlanmıştır. Örnekler 100 voltta 2 saat yürütülmüştür. Bu aşama tamamlandıktan sonra, jel içerisinde ağırlıklarına göre ayrışan proteinler, jelden PVDF membrana transfer edilmiştir. Kuru transfer sistemi ile 20 volt akımda 7 dakikada transfer işlemi gerçekleştirilmiştir. Transfer aşamasından sonra membranın, yağsız süt tozu solüsyonu içerisinde 1-1,5 saat süresince, oda sıcaklığında ve 100 rpm hıza ayarlanmış çalkalayıcı üzerinde blokasyonu gerçekleştirilmiştir. Süt tozunda bulunan kazein, proteinlerin epitoplarına tutunarak blokasyon aşamasından sonra uygulanacak antikor inkübasyonunun spesifitesini arttırmasını sağlamaktadır. Blokasyon işlemi bittikten sonra 1X PBS-T ile membran 3 defa 10'ar dakika 100 rpm hızda çalkalayıcıda yıkanarak süt tozu kalıntıları membran yüzeyinden temizlenmiştir. Bu aşamadan sonra, membran primer antikor ile muamele edilmiştir. Denatüre olmuş proteinlerin tek bir determinantını yüksek afinite ve özgüllükte tanıyan monoklonal antikorlar hedeflediğimiz proteinlerin tayini için kullanılmıştır.

Apoptozisin değerlendirilmesi açısından her gruptan hazırlanan lizatları kesilmiş kaspaz protein komponentini tanıyan kırılmış kaspaz 3 (Asp175), kırılmış kaspaz 7 (Asp 197), kırılmış kaspaz 9 (Asp330), kırılmış PARP (Asp214) ve total (kesilmiş+kesilmemiş=total) hedef proteinlere bağlanan kaspaz 3, kaspaz 7, kaspaz 9 ve PARP primer antikorları; platin direncinin değerlendirilmesi için ise direnç oluşumu durumunda metilenmiş olan hMLH1 geninin susuturulması nedeniyle ekspresyonu azalan MLH1 proteinini tanıyan primer antihuman fare monoklonal antikor (Clone G168-15, Pharmingen, San Diego, CA) ile inkübasyonu sağlanmıştır. Kontrol proteini olarak β -aktin kullanılmıştır. Primer antikor inkübasyonundan sonra primer antikorun görüntülenebilmesi için HRP (Horseradish Peroksidaz) konjuge primer antikorun üretildiği organizmaya karşı üretilmiş sekonder antikor ile inkübasyon aşamasına geçilmiştir. Sekonder antikor olarak Polyclonal Goat Anti-rabbit immunoglobulins/HRP kullanılmıştır. Son olarak sekonder antikorun bağlanmış olduğu proteinlerin kemoluminesans ışımaya yapabilmesi için, sekonder

antikora konjuge HRP’de bulunan peroksidaz enziminin substratı olan luminol içeren ECL (Enhanced chemiluminescence) solüsyonu kullanılmıştır.

2.9.İstatistiksel Veri Analizi

Tüm analizlerde veriler ortalama±standart hata şeklinde gösterilmiştir. Tüm çalışmada hazırlanan nanopartiküler sistemlerin enkapsülasyon etkinliği, yükleme kapasitesi, partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel gibi *in vitro* özellikleri ile sterilizasyon ve stabilite testlerinin nanopartikül formülasyonları üzerindeki etkileri ve hücre kültürü çalışmalarında yer alan sitotoksosite, hücresel alım ve protein ekspresyon verilerinin istatistiksel analizleri GraphPad Prism 6.0 yazılımı kullanılarak ANOVA testi ile gerçekleştirilmiştir.

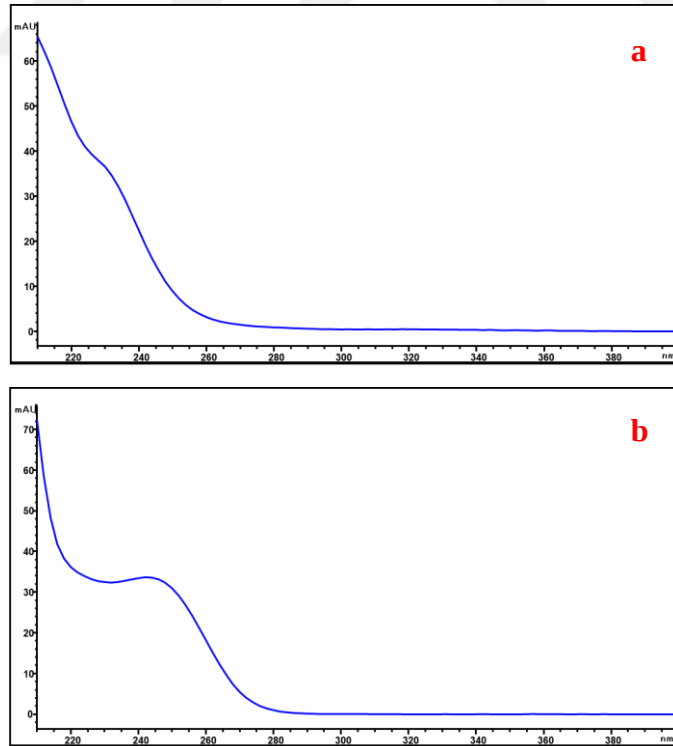
3. BULGULAR

3.1.Karboplatin ve Desitabinin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Karboplatin ve desitabinin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla etkin maddelerin UV ve FT-IR spektrumları, XRD desenleri ve DSC termogramları incelenmiştir.

3.1.1.Karboplatin ve Desitabinin Ultraviyole (UV) Spektrumunun Alınması

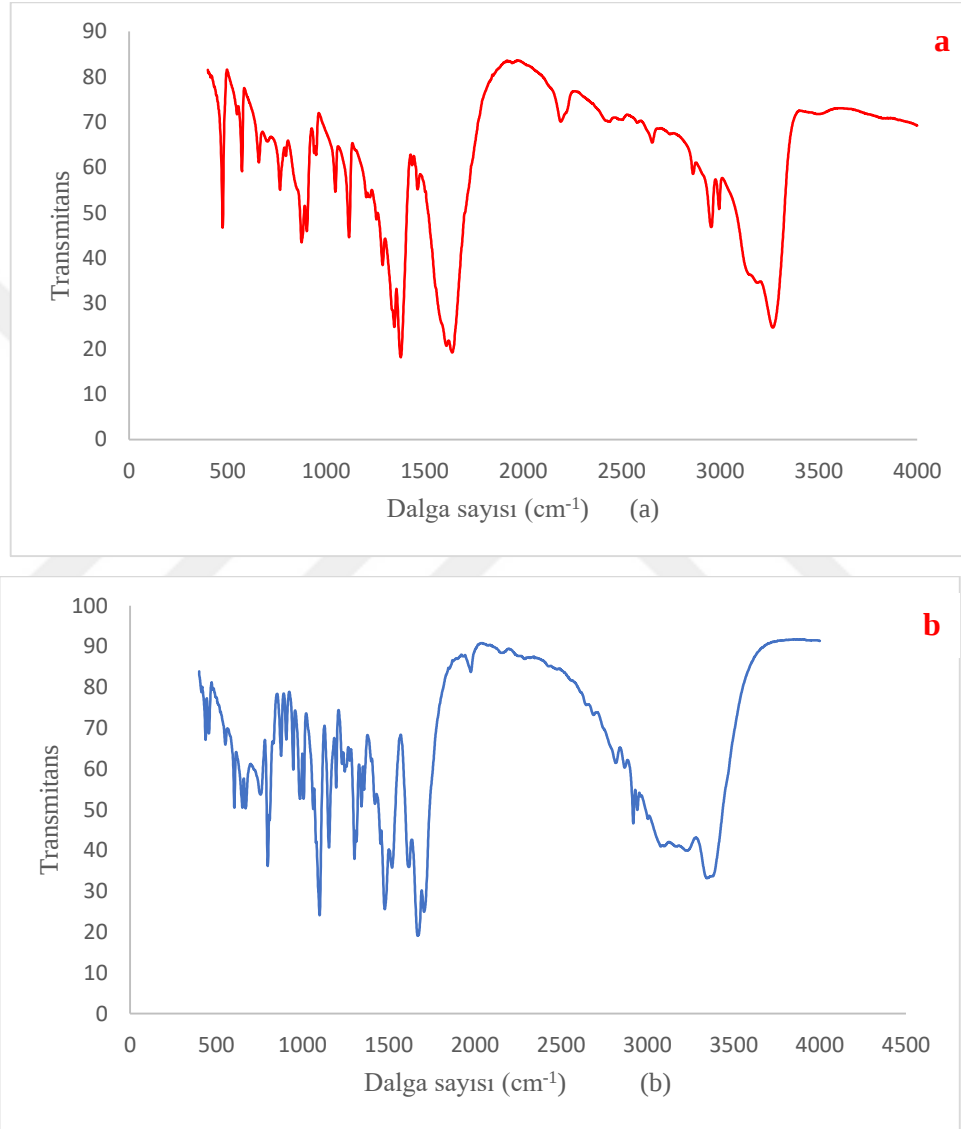
Karboplatin ve desitabinin ayrı ayrı $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda stok çözeltilerinden hareketle $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda çözeltilerinin 200-400 nm dalga boyları arasında alınan spektrumları Şekil 3.1’de görülmektedir.



Şekil 3.1. Karboplatin (a) ve desitabinin (b) 200-400 nm arasında alınan UV spektrumları.

3.1.2. Karboplatin ve Desitabinin Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared - FT-IR) Spektrumunun Alınması

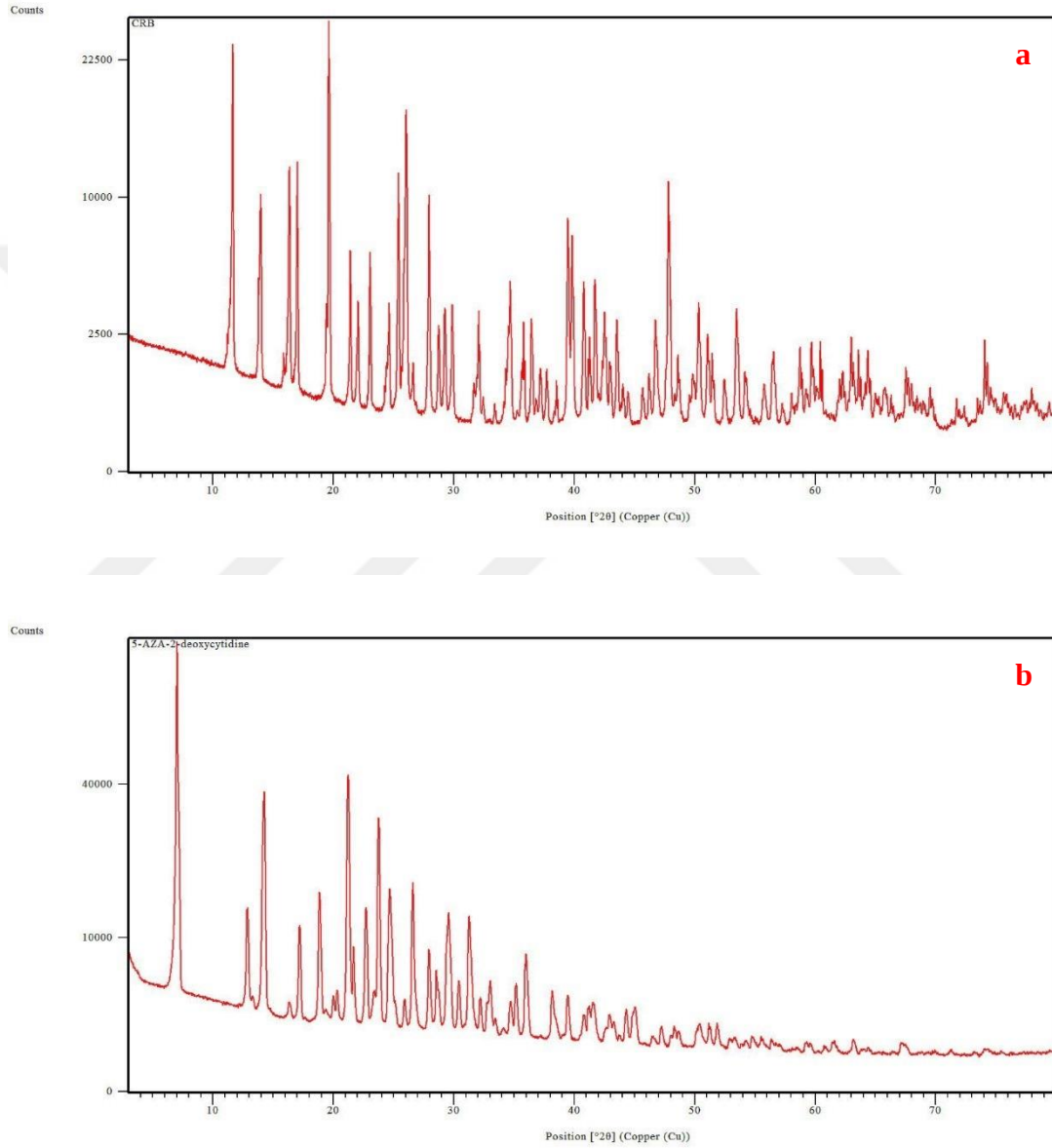
Karboplatin ve desitabinin IR spektrumundaki fonksiyonel gruplarına ait bantlar Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Karboplatin (a) ve desitabine ait (b) FT-IR spektrumları.

3.1.3. Karboplatin ve Desitabinin X-Işını Toz Difraktometrisi

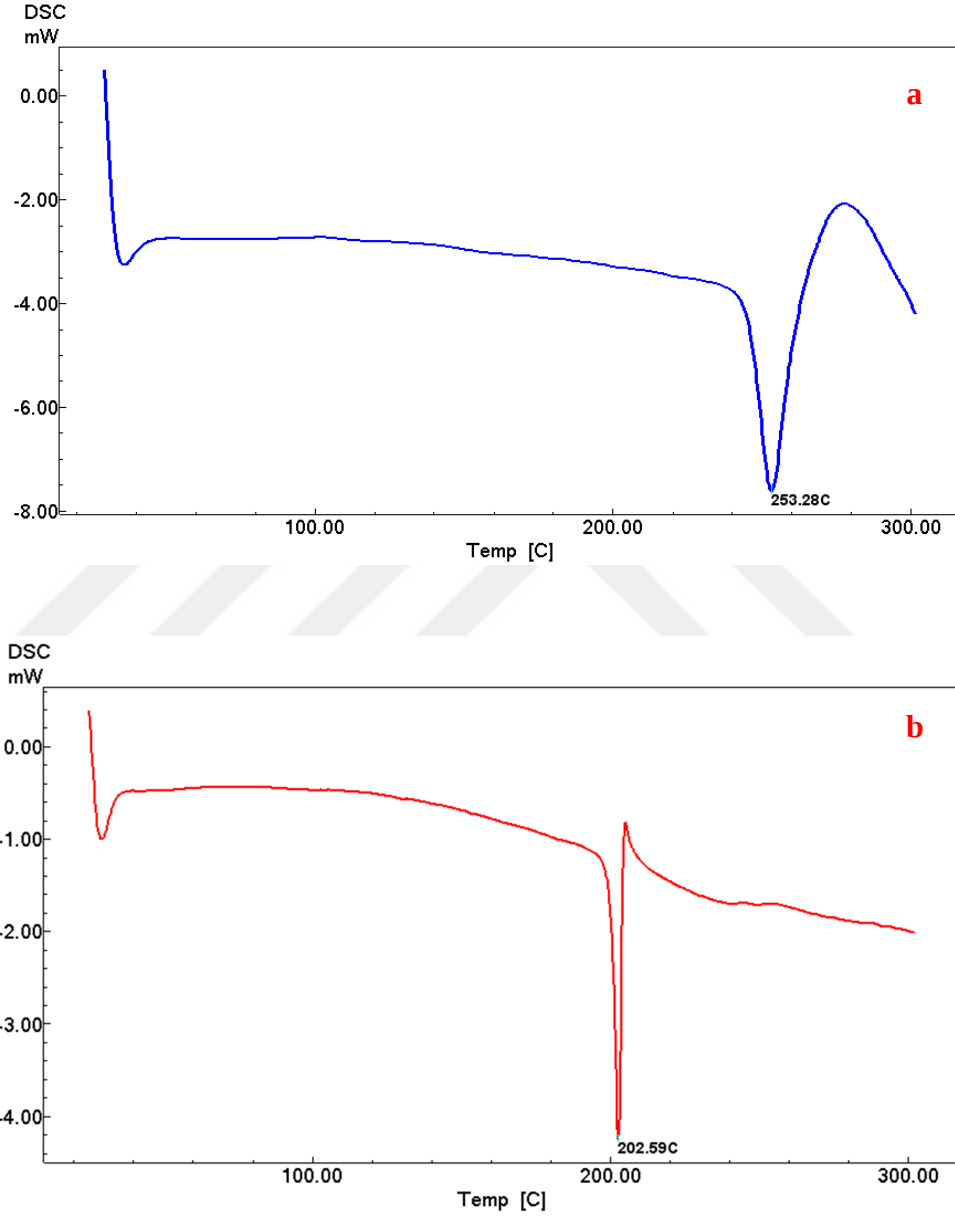
Karboplatin ve desitabin 3-80°C aralığında 2 θ difraksiyon açısı ile analiz edilerek alınan x-ışını toz difraktogramları Şekil 3.3'te gösterilmektedir.



Şekil 3.3. Karboplatin (a) ve desitabine ait (b) XRD difraktogramları

3.1.4. Karboplatin ve Desitabinin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ile Analizi

Karboplatin ve desitabine ait DSC termogramları Şekil 3.4’te sunulmuştur.



Şekil 3.4. Karboplatin (a) ve desitabine (b) ait DSC termogramları

3.2.Karboplatin ve Desitabinin Aynı Anda Miktar Tayini İçin Analitik Yöntem Geliştirilmesi

Karboplatin ve desitabinin, desitabinin olası parçalanma ürünlerinin varlığında aynı anda tayin edilebilmesi için bir analitik yöntem geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla çalışmalara XSelect (C18 4.6x250 mm; 5 µm), XBridge™ C18 (4.6x250 mm; 5 µm), XTerra RP18 (4.6x250 mm; 5 µm) (Waters Corp., Millford, USA) olmak üzere 3 farklı kolon kullanılarak başlanmıştır. Bu üç farklı kolon kullanılarak yapılan analizlerden elde edilen sistem uygunluk parametreleri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Farklı sabit fazlar kullanılarak gerçekleştirilen analizlere ait sistem uygunluk testi sonuçları

	XSelect C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm; 5 µm)		XBridge C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm; 5 µm)		XTerra RP ₁₈ (250 mm x 4,6 mm; 5 µm)	
	KRB	DES	KRB	DES	KRB	DES
t_r	5,24	8,11	5,11	7,02	3,57	4,45
k	1,07	2,15	1,04	1,81	0,41	0,71
α	-	1,23	-	1,21	-	1,11
T_f	0,88	0,94	0,69	0,90	0,76	0,86
R_s	-	6,88	-	6,27	-	2,00
N	15929	17748	14828	17018	6174	6163

*Alıkonma zamanı (t_r), kapasite faktörü (k), seçicilik faktörü (α), kuyruklanma faktörü (T_f), rezolüsyon (R_s), teorik tabaka sayısı (N)

Uygun kolonun seçiminden sonra hareketli fazda asetonitril (ACN) ve metanol (MeOH) olmak üzere iki farklı organik çözücü ve bu organik çözücülerin farklı konsantrasyonları kullanılarak etkin maddelerin ayrımının iyileştirilmesine çalışılmıştır. Farklı hareketli fazlar kullanılarak yapılan analizlerden elde edilen sistem uygunluk parametreleri Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Farklı hareketli fazlar kullanılarak gerçekleştirilen analizlere ait sistem uygunluk testi sonuçları.

	Hareketli faz bileşimi (v/v)							
	ACN:su (%0,1 H ₃ PO ₄) (5:95)		ACN:su (%0,1 H ₃ PO ₄) (3:97)		MeOH:su (%0,1 H ₃ PO ₄) (5:95)		MeOH:su (%0,1 H ₃ PO ₄) (3:97)	
	KRB	DES	KRB	DES	KRB	DES	KRB	DES
t_r	4,66	4,91	5,65	6,48	6,17	8,37	6,95	10,63
k	0,80	0,97	0,88	1,16	0,76	1,08	1,01	2,07
α	-	1,02	-	1,15	-	1,19	-	1,23
T_f	1,05	0,86	0,50	0,91	0,76	0,93	0,89	0,95
R_s	-	0,79	-	4,39	-	6,05	-	7,35
N	15765	17138	13430	19929	17662	19351	19462	20831

Tampon çözeltisinin konsantrasyonu %0,05, %0,1 ve 0,2 (h/h) H₃PO₄, kolon fırını sıcaklığı 25, 35 ve 45 °C, hareketli faz akış hızı ise 0,75 ve 1 mL.min⁻¹ olmak üzere farklı seviyelerde değerlendirilerek etkin maddeler ve bozunma ürünlerinin etkin bir şekilde ayrılmasına çalışılmıştır. Analizlerden elde edilen sistem uygunluk testi sonuçları Çizelge 3.3 ve 3.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Hareketli faz konsantrasyonu ve hareketli faz akış hızındaki değişiklikler sonrasında gerçekleştirilen analizlere ait sistem uygunluk testi sonuçları.

	Hareketli faz konsantrasyonu						Hareketli faz akış hızı (mL.min ⁻¹)	
	%0,05 H ₃ PO ₄		%0,1 H ₃ PO ₄		%0,2 H ₃ PO ₄		0.75	1
	KRB	DES	KRB	DES	KRB	DES	KRB	DES
t_r	5,21	8,02	5,24	8,11	5,12	7,74	6,95	10,63
k	1,02	1,97	1,07	2,15	1,03	1,97	1,01	2,07
α	-	1,18	-	1,23	-	1,17	-	1,23
T_f	0,90	0,96	0,88	0,90	0,78	0,95	0,89	0,95
R_s	-	4,78	-	6,27	-	4,33	-	7,35
N	16071	18178	15929	17018	14922	17353	19462	20831

Çizelge 3.4. Farklı kolon fırın sıcaklıkları kullanılarak gerçekleştirilen analizlere ait sistem uygunluk testi sonuçları.

	Kolon fırını sıcaklığı (°C)					
	25		35		45	
	KRB	DES	KRB	DES	KRB	DES
t_r	5,11	7,72	4,92	6,74	4,43	5,34
k	1,05	2,09	0,99	1,74	0,84	1,21
α	-	1,51	-	1,18	-	1,13
T_f	0,87	0,93	0,86	0,91	0,98	0,87
R_s	-	13,01	-	5,67	-	4,15
N	15497	17231	16844	18281	16621	19000

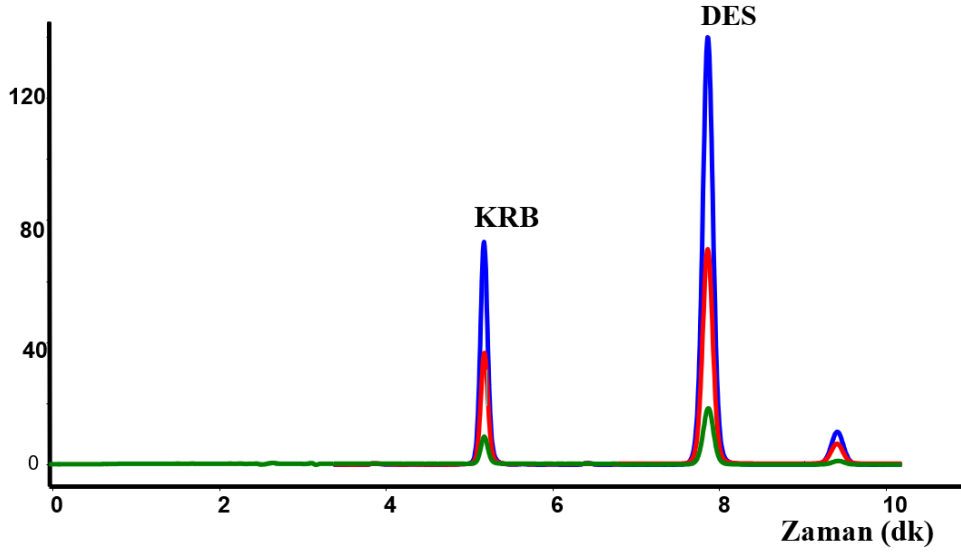
Çizelge 3.5. Karboplatin ve desitabinin aynı anda analizi için belirlenen optimum analiz koşulları.

Analitik Kolon	XSelect C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m)
Mobil faz	%0,1 H ₃ PO ₄ :Metanol
Kolon sıcaklığı	25°C
Akış hızı	1 mL/dk
Enjeksiyon hacmi	10 μ L
Dedektör	DAD
Dalga boyu	220 nm
Alıkonma zamanı (dk) (KRB)	5,11 dakika
Alıkonma zamanı (dk) (DES)	7,72 dakika

Optimizasyon çalışmaları sırasında belirlenen optimum analiz koşullarında (Çizelge 3.5) elde edilen kromatogram Şekil 3.5'te, sistem uygunluk testi sonuçları ile ilgili FDA ve ICH kılavuzlarında yer alan kabul edilebilir sınırlar Çizelge 3.6'da yer almaktadır.

Çizelge 3.6. Optimum koşullarda gerçekleştirilen analizlerden elde edilen sistem uygunluk testi sonuçları (FDA, 2000).

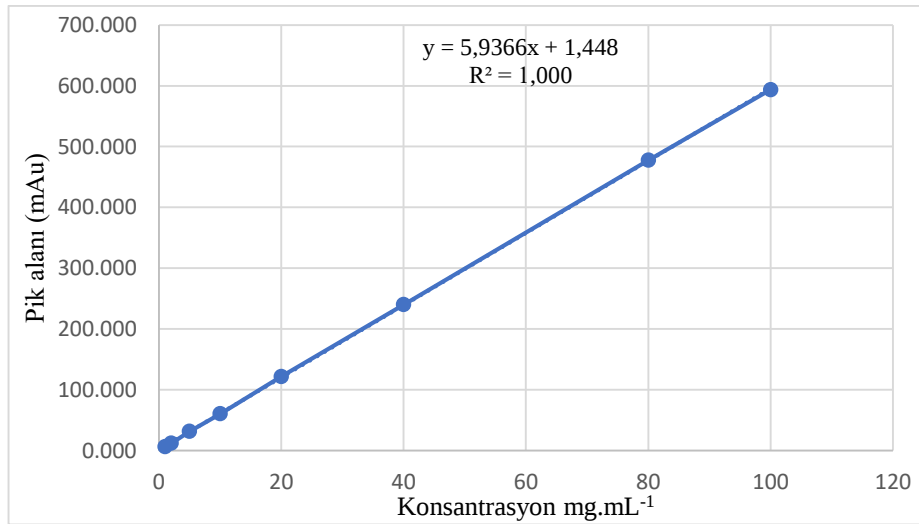
	KRB	DES	Kabul edilebilir sınırlar
Alıkonma zamanı (dk)	5,14	7,77	-
Kapasite faktörü (k)	1,07	2,15	>1
Çözünürlük (R _s)	-	13,13	>2
Teorik tabaka sayısı (N)	15680	17473	>2000
Seçicilik faktörü (α)	-	2,06	>1
Kuyruklanma faktörü (T _f)	0,93	0,98	<2



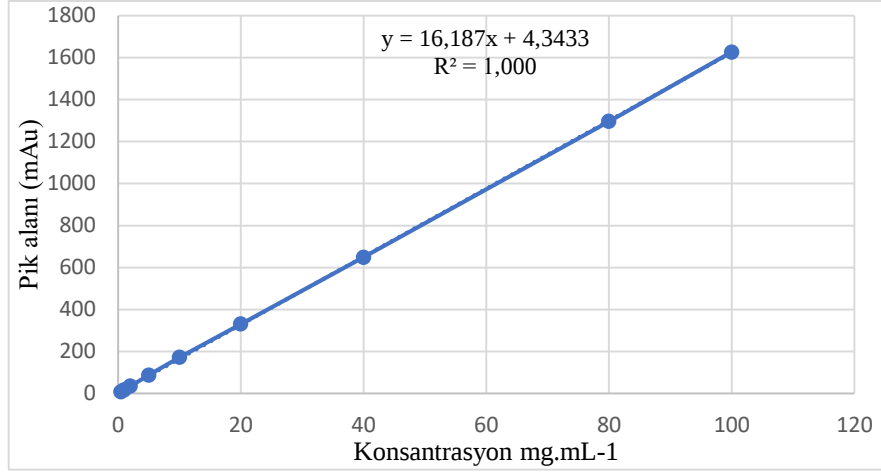
Şekil 3.5. 10, 40 ve 80 µg.mL⁻¹ konsantrasyonda KRB ve DES kombinasyonunun geliştirilen HPLC yöntemi ile gerçekleştirilen analizinden elde edilen kromatogram.

3.2.1. Kalibrasyon Doğrularının Hazırlanması

0,5-100 µg.mL⁻¹ konsantrasyon aralığında karboplatin ve desitabin kombinasyonu içeren çözeltiler analiz edilerek her bir konsantrasyona karşılık gelen pik alanı kullanılarak oluşturulan kalibrasyon doğruları Şekil 3.6 ve 3.7’de verilmiştir.



Şekil 3.6. Karboplatine ait kalibrasyon doğrusu.



Şekil 3.7. Desitabine ait kalibrasyon doğrusu

3.2.2. Karboplatin ve Desitabinin HPLC ile Miktar Tayini Yönteminin Analitik Validasyonu

ICH Q2R1 (2005) kılavuzu gereği doğrusallık ve aralığı, doğruluk ve geri elde, kesinlik, seçicilik, teşhis ve tayin sınırları gibi parametreler tek tek değerlendirilmiştir.

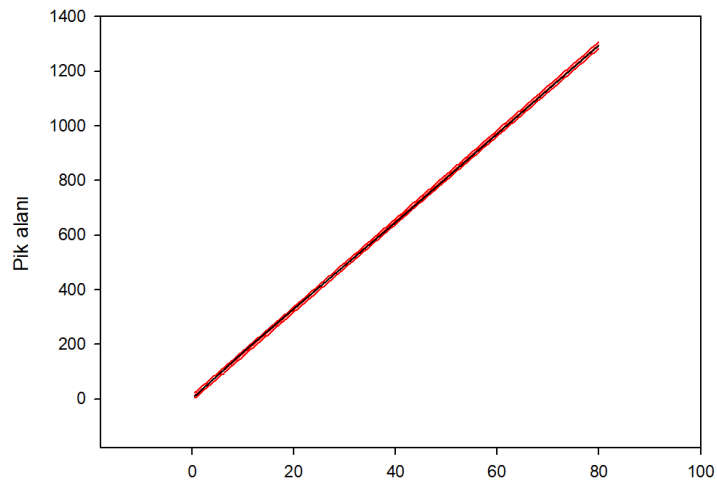
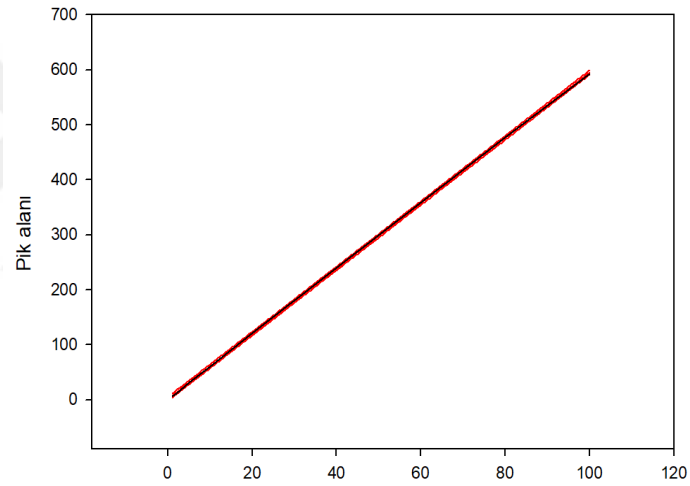
3.2.2.1. Doğrusallık ve Aralığı

Karboplatin ve desitabinin 0,5-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ aralığındaki 8 farklı konsantrasyondaki çözeltileri geliştirilen HPLC yöntemi ile analiz edilerek konsantrasyona karşı elde edilen eğri altında kalan alan değerleri Şekil 3.8 ve Çizelge 3.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. Karboplatin ve desitabinin doğrusallık parametreleri (n=5)

	KRB	DES
Eğim±SS*	5,937±0,013	16,190 ± 0,036
Eğim güven sınırları	5,905 - 5,968	16,100 - 16,270
Eğimin standart hatası	0,046	5,724
Tanımlayıcılık (Determinasyon) katsayısı (r ²)	1,000	1,000
Tanımlayıcılık Doğrusundan Sapmaların Standart Hatası (Sy.x)	1,314	3,798
Kesişim (n) ± SS	1,448 ± 0,626	4,343±1,635
Kesişimin standart hatası	0,512	1,535
Gün içi tekrar edilebilirlik % BSS*	1,075	1,874
Günler arası tekrar edilebilirlik % BSS*	1,943	3,338

* SS: standart sapma; BSS: bağıl standart sapma



Şekil 3.8. Karboplatin (a) ve desitabinin (b) doğrusallık grafikleri.

3.2.2.2. Doğruluk ve Geri Elde

Karboplatin ve desitabinin 10, 40 ve 80 µg.mL⁻¹ konsantrasyondaki 3 farklı çözeltisinin analizi yapılmış ve yüzde geri eldeleri, standart sapmaları ve bağıl standart sapmaları hesaplanarak Çizelge 3.8 ve 3.9’da gösterilmiştir.

Çizelge 3.8. Karboplatinin doğruluk ve geri elde verileri.

	10 µg/ml			40 µg/ml			80 µg/ml		
	Pik alanı (mAu)	C (µg.mL ⁻¹)	Geri elde (%)	Pik alanı (mAu)	C (µg.mL ⁻¹)	Geri elde (%)	Pik alanı (mAu)	C (µg.mL ⁻¹)	Geri elde (%)
	59,5	9,779	97,79	239,1	40,03	100,1	473,4	79,50	99,37
	58,7	9,644	96,44	235,7	39,46	98,65	487,2	81,82	102,3
	61,9	10,18	101,83	236,0	39,51	98,77	479,2	80,48	100,6
	60,1	9,880	98,80	242,3	40,57	101,4	476,3	79,99	99,98
	60,4	9,930	99,30	237,2	39,71	99,28	477,8	80,24	100,3
	59,7	9,812	98,12	239,9	40,17	100,4	482,5	81,03	101,3
x	60,05	10,07	100,7	238,37	40,72	101,8	479,40	80,51	100,6
SS			1,813			1,073			1,026
BSS			0,018			0,011			0,010
%BSS			1,801			1,054			1,019

* X: ortalama; SS: standart sapma; BSS: bağıl standart sapma

Çizelge 3.9. Desitabinin doğruluk ve geri elde verileri.

	10 µg/ml			40 µg/ml			80 µg/ml		
	Pik alanı (mAu)	C (µg.mL ⁻¹)	Geri elde (%)	Pik alanı (mAu)	C (µg.mL ⁻¹)	Geri elde (%)	Pik alanı (mAu)	C (µg.mL ⁻¹)	Geri elde (%)
	171,9	10,35	103,5	650,2	39,90	99,75	1297,1	79,86	99,83
	167,8	10,10	100,1	648,9	39,82	99,55	1253,0	77,14	96,42
	169,9	10,23	102,3	679,0	41,68	104,2	1319,7	81,26	101,6
	173,1	10,43	104,3	658,7	40,43	101,1	1313,2	80,86	101,1
	170,2	10,25	102,5	653,3	40,09	100,3	1305,0	80,35	100,4
	177,3	10,69	106,9	641,5	39,36	98,41	1284,2	79,07	98,83
x	171,7	10,34	103,4	655,3	40,21	100,5	1295,4	79,76	99,70
SS			2,031			1,996			1,868
BSS			0,020			0,020			0,019
%BSS			1,965			1,985			1,874

3.2.2.3. Kesinlik

Karboplatin ve desitabinin bölüm 2.4.2.3'te belirtilen analitik yöntem ile miktar tayininin kesinliğinin belirlenmesinde tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik parametreleri incelenmiştir.

- Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik tayini 10, 40 ve 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olmak üzere 3 farklı konsantrasyondaki karboplatin ve desitabin kombinasyon çözeltisinin ardarda 6 kez analizi ile gerçekleştirilmiş ve analizler sonucunda hesaplanan konsantrasyon değerlerinin ortalama (X), standart sapma (SS), bağıl standart sapma (BSS) ve % BSS değerleri Çizelge 3.10 ve 3.11'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.10. Karboplatinin tekrarlanabilirlik verileri.

	10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	
	Pik alanı (mAu)	C ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Pik alanı (mAu)	C ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Pik alanı (mAu)	C ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
	59,5	9,779	239,1	40,03	473,4	79,50
	58,7	9,644	235,7	39,46	487,2	81,82
	61,9	10,18	236,0	39,51	479,2	80,48
	60,1	9,880	242,3	40,57	476,3	79,99
	60,4	9,930	237,2	39,71	477,8	80,24
	59,7	9,812	239,9	40,17	482,5	81,03
x		9,871		39,91		80,51
SS		0,181		0,429		0,821
BSS		0,018		0,011		0,010
%BSS		1,837		1,075		1,019

Çizelge 3.11. Desitabinin tekrarlanabilirlik verileri.

	10 $\mu\text{g/ml}$		40 $\mu\text{g/ml}$		80 $\mu\text{g/ml}$	
	Pik alanı (mAu)	C ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Pik alanı (mAu)	C ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Pik alanı (mAu)	C ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
	171,9	10,35	650,2	39,90	1297,1	79,86
	167,8	10,10	648,9	39,82	1253,0	77,14
	169,9	10,23	679,0	41,68	1319,7	81,26
	173,1	10,43	658,7	40,43	1313,2	80,86
	170,2	10,25	653,3	40,09	1305,0	80,35
	177,3	10,69	641,5	39,36	1284,2	79,07
x		10,34		40,21		79,76
SS		0,203		0,799		1,494
BSS		0,019		0,019		0,019
%BSS		1,965		1,984		1,874

- Ara Kesinlik

Ara kesinlik tayinleri 10, 40 ve 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olmak üzere 3 farklı konsantrasyondaki karboplatin ve desitabin kombinasyon çözeltisinin 3 farklı günde 6'şar kez analizi ile gerçekleştirilmiş ve analizler sonucunda hesaplanan konsantrasyon değerlerinin ortalama (X), standart sapma (SS), bağıl standart sapma (BSS) ve % BSS değerleri Çizelge 3.12 ve 3.13'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.12. Karboplatinin ara kesinlik verileri.

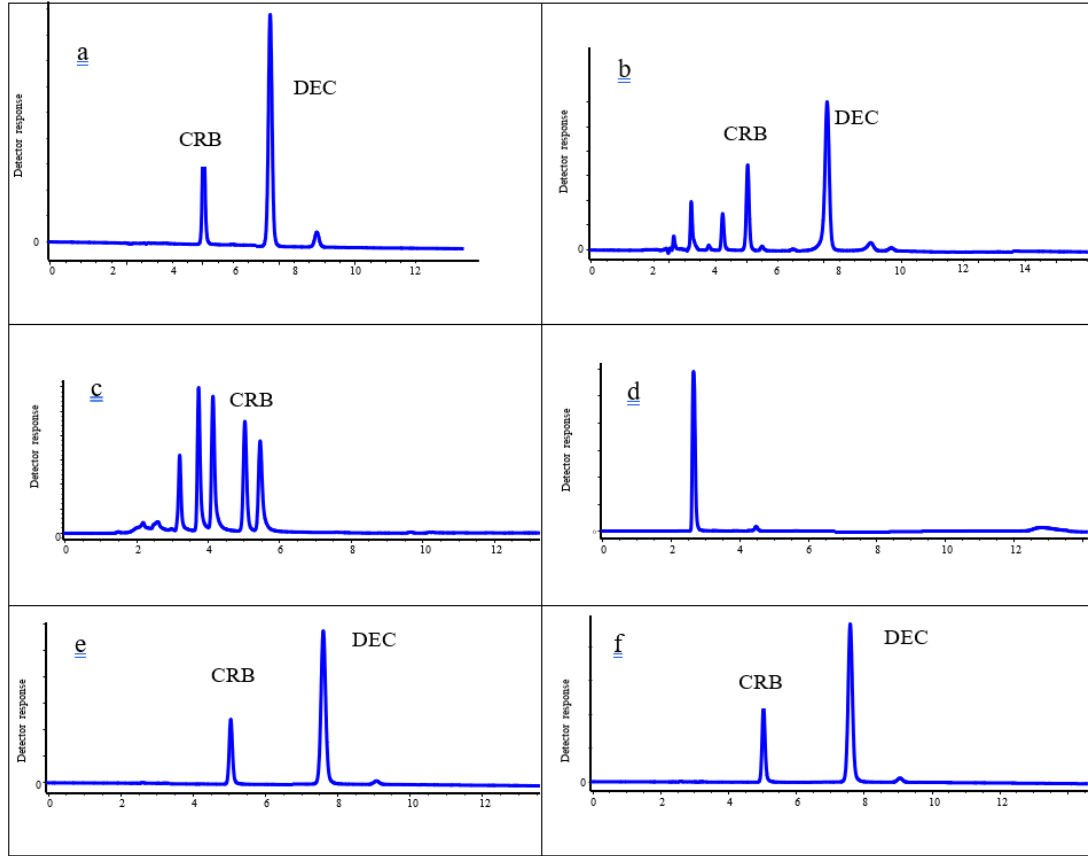
Teorik konsantrasyon	10 $\mu\text{g/ml}$		40 $\mu\text{g/ml}$		80 $\mu\text{g/ml}$	
	Pik alanı (mAu)	C ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Pik alanı (mAu)	C ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Pik alanı (mAu)	C ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
1. gün	59,5	9,779	239,1	40,03	473,4	79,50
	58,7	9,644	235,7	39,46	487,2	81,82
	61,9	10,18	236,0	39,51	479,2	80,48
	60,1	9,880	242,3	40,57	476,3	79,99
	60,4	9,930	237,2	39,71	477,8	80,24
	59,7	9,812	239,9	40,17	482,5	81,03
	61,1	10,05	241,0	40,35	500,9	84,13
2. gün	62,3	10,25	246,8	41,33	501,8	84,28
	61,7	10,15	251,7	42,15	501,7	84,27
	62,0	10,20	239,2	40,05	486,9	81,77
	61,2	10,07	243,7	40,81	487,3	81,84
	59,8	9,829	238,5	39,93	489,1	82,14
	59,3	9,745	234,6	39,27	492,1	82,65
3. gün	59,3	9,745	235,0	39,34	498,3	83,69
	59,4	9,762	234,9	39,32	485,7	81,57
	59,5	9,779	236,0	39,51	482,6	81,05
	59,5	9,779	236,0	39,51	478,4	80,34
	58,8	9,661	236,0	39,51	482,5	81,03
		9,902		40,03		81,77
x		0,196		0,778		1,510
SS		1,978		1,942		1,847
%BSS						

Çizelge 3.13. Desitabinin ara kesinlik verileri.

Teorik konsantrasyon	10 µg/ml		40 µg/ml		80 µg/ml	
	Pik alanı (mAu)	C (µg.mL ⁻¹)	Pik alanı (mAu)	C (µg.mL ⁻¹)	Pik alanı (mAu)	C (µg.mL ⁻¹)
1. gün	171,9	10,35	650,2	39,90	1297,1	79,86
	167,8	10,10	648,9	39,82	1253,0	77,14
	169,9	10,23	679,0	41,68	1319,7	81,26
	173,1	10,43	658,7	40,43	1313,2	80,86
	170,2	10,25	653,3	40,09	1305,0	80,35
	177,3	10,69	641,5	39,36	1284,2	79,07
2. gün	162,1	9,746	618,8	37,96	1206,1	74,24
	162,7	9,783	622,7	38,20	1247,7	76,81
	159,1	9,561	616,6	37,82	1237,9	76,21
	157,2	9,443	618,8	37,96	1222,8	75,27
	155,2	9,320	606,8	37,22	1210,7	74,53
	157,2	9,443	604,5	37,08	1211,3	74,56
3. gün	152,1	9,128	605,3	37,13	1197,2	73,70
	151,0	9,060	598,7	36,72	1196,6	73,66
	149,7	8,980	590,8	36,23	1198,3	73,76
	148,2	8,887	583,6	35,79	1199,6	73,84
	146,7	8,795	576,2	35,33	1195,7	73,60
	146,1	8,757	568,2	34,83	1199,8	73,85
x		9,617		37,98		76,25
SS		0,633		1,964		2,809
%BSS		6,578		5,171		3,684

3.2.2.4. Özgünlük (Seçicilik)

Karboplatin ve desitabinin analiz şartlarındaki diğer maddeler ve etkin maddelerin bozunma ürünlerinden ayırt edilebilme yeteneğinin gösterilmesi için yapılan seçicilik çalışmalarından elde edilen kromatogramlar Şekil 3.9’da gösterilmiştir.



Şekil 3.9. Seçicilik çalışmaları kapsamında $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ KRB ve DES kullanılarak gerçekleştirilen bozunma koşullarında elde edilen kromatogramlar (a) $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ kontrol çözeltileri (b) 0,1 M HCl (2 saat) (c) 0,1 M NaOH (2 saat) (d) %3 H₂O₂ (2 saat) (e) 80°C sıcaklık (24 saat) (f) 254 nm UV ışık (24 saat).

3.2.2.5. Teşhis (LOD) ve Tayin Sınırlarının (LOQ) Belirlenmesi

Karboplatin ve desitabin için Eşitlik 2.1 ve 2.2 ile hesaplanan teşhis ve tayin sınırları Çizelge 3.14’te gösterilmiştir.

Çizelge 3.14. Karboplatin ve desitabinin teşhis ve tayin sınırları.

	KRB	DES
Teşhis Sınırı (LOD) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,041	0,125
Tayin sınırı (LOQ) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,100	0,305

3.3. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları

3.3.1. Karboplatin Yüklü PCL ve PLGA Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

Çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak PCL ve PLGA gibi sentetik polimerler ile hazırlanan karboplatin yüklü polimerik nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri Çizelge 3.15’te verilmiştir.

Çizelge 3.15. Karboplatin yüklü PCL ve PLGA nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonu

Kod	PB (nm)	PDI	ZP (mV)	EE (%)	YK (%)
NP1	218,2±9,471	0,106±0,032	-3,530±0,703	20,56±0,491	1,918±0,123
NP2	-	-	-	-	-
NP3	210,6±3,557	0,112±0,020	-0,426±0,317	48,50±0,380	3,797±0,030
NP4	230,1±1,881	0,096±0,023	-7,490±0,264	39,23±0,821	3,326±0,056
NP5	194,9±0,800	0,074±0,024	-5,430±0,401	27,93±0,984	3,554±0,125

*PB: partikül büyüklüğü, PDI: polidispersite indeksi, ZP: Zeta Potansiyel, EE: Enkapsülasyon etkinliği, YK: Yükleme kapasitesi

** Sonuçlar ortalama±standart hata olarak değerlendirilmiştir.

3.3.2. Karboplatin Yüklü Kitozan Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

İyonik jelasyon yöntemiyle Bölüm 2.5.2’de anlatılan şekilde hazırlanan Kitozan Nanopartikül formülasyonlarının fizikokimyasal özellikleri Çizelge 3.16’da verilmiştir.

Çizelge 3.16. Karboplatin yüklü kitozan nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonu.

Kod	PB (nm)	PDI	ZP (mV)	EE (%)
C1boş	253,4±1,811	0,138±0,011	22,8±2,83	-
C2boş	255,6±3,350	0,111±0,008	21,5±0,40	-
C1	253,9±1,796	0,148±0,020	25,6±1,61	7,099±0,093
C2	255,5±2,008	0,169±0,014	24,5±2,05	7,221±0,423
C3	267,7±3,728	0,154±0,011	23,8±3,27	7,530±0,402
C4	256,9±2,185	0,146±0,018	19,4±6,84	9,412±0,905
C5	228,2±8,559	0,284±0,012	19,1±1,93	8,336±0,205
C6	725,8±71,43	0,756±0,191	19,8±2,51	24,82±0,360

3.3.3. Karboplatin Yüklü Albümin Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

3.3.3.1.Farklı Glutaraldehit:BSA Oranları ile Farklı Dispersiyon Ortamlarının Etkisi

Farklı oranlarda çapraz bağlanan albümin nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerini incelemek amacıyla pH 11’de %2,5 (a/h) BSA çözeltisine desolvasyon ajanı:sulu faz oranı 4:1 olacak şekilde etanol eklemesiyle oluşan albümin agregatlarına albüminin içerdiği amino gruplarını çapraz bağlamaya yetecek teorik glutaraldehit miktarının %20, %40 ve %100’ü oranında glutaraldehit eklenmiş ve elde edilen nanopartiküllerin *in vitro* özellikleri Çizelge 3.17’de incelenmiştir.

Dispersiyon ortamının iyonik gücünün elde edilen albümin nanopartiküller üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla AF1-AF3 kodlu formülasyonlarda %2,5 (a/h) konsantrasyondaki BSA suda, AF4-AF6 kodlu formülasyonlarda ise 10 mM NaCl çözeltisi içerisinde çözündürülüp final çözeltinin pH’sı 11’e ayarlanmış 4:1 desolvasyon ajanı sulu faz oranı ile desolve edilen albümin farklı oranlarda glutaraldehit ile çapraz bağlanmıştır. Elde edilen albümin nanopartiküllerin *in vitro* özellikleri Çizelge 3.17’de verilmiştir.

Çizelge 3.17. Farklı glutaraldehit:BSA oranları ve dispersiyon ortamının nanopartiküllerin *in vitro* özelliklerine etkisi

Kod	Dispersiyon ortamı	Glutaraldehit :BSA oranı	PB (nm)	PDI	ZP (mV)	EE (%)	YK (%)
AF1	Sulu ortam	47,04 µg/mg	261,9±3,155	0,067±0,023	-19,2±2,850	16,58±0,831	2,274±0,114
AF2	Sulu ortam	18,8 µg/mg	269,9±2,846	0,060±0,023	-14,6±0,389	29,75±1,730	4,772±0,278
AF3	Sulu ortam	9,4 µg/mg	368,1±7,567	0,049±0,034	-11,2±0,405	32,35±0,086	5,976±0,016
AF4	NaCl çözeltisi	47,04 µg/mg	>1000 nm	1,000	-4,8±0,69	30,32±0,374	4,035±0,050
AF5	NaCl çözeltisi	18,8 µg/mg	>1000 nm	1,000	-2,7±0,98	25,89±0,012	3,898±0,002
AF6	NaCl çözeltisi	9,4 µg/mg	>1000 nm	1,000	-4,6±0,74	31,51±0,992	6,517±0,205

3.3.3.2.BSA Konsantrasyonunun İncelenmesi

Farklı BSA konsantrasyonlarının albümin nanopartiküllerin *in vitro* özellikleri üzerine etkisi, pH11'de %2, %2,5 ve %5 (a/h) konsantrasyonda BSA çözeltileri kullanılarak 4:1 desolvasyon ajanı:sulu faz oranı ile hazırlanıp 1,56 µg/mg BSA oranında glutaraldehit ile çapraz bağlanan albümin nanopartikül formülasyonları üzerinde incelenmiş ve bulgular Çizelge 3.18'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.18. BSA konsantrasyonunun albümin nanopartiküllerin *in vitro* özellikleri üzerine etkisi.

Kod	BSA konsantrasyonu (%)	PB (nm)	PDI	ZP (mV)	EE (%)	YK (%)
AF7	5	-	-	-	-	-
AF8	2,5	462,0±8,493	0,124±0,044	-18,3±0,387	29,09±1,391	4,112±0,197
AF9	2	255,4±7,756	0,256±0,058	-15,1±3,54	26,02±0,149	4,893±0,028

3.3.3.3.Desolvasyon Ajanı:Sulu Faz Oranının Etkisinin İncelenmesi

Çalışmamızda desolvasyon ajanı olarak albümin nanopartikül üretimi için en çok kullanılan desolvasyon ajanı olan etanol tercih edilmiştir. Formülasyonlar hazırlanırken pH 11’de %2 (a/h) konsantrasyondaki albümin çözeltisi üzerine manyetik karıştırıcı ile sürekli karıştırılarak damla damla sabit hızda (1ml/dk) etanol eklenmiş ve elde edilen albümin agregatları 1,56 µg/mg BSA oranında glutaraldehit ile çapraz bağlanmıştır. Oluşan partiküllerin *in vitro* özellikleri üzerine etkisi Çizelge 3.19’da gösterilmiştir.

Çizelge 3.19. Farklı desolvasyon ajanı:sulu faz oranı ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonu

Kod	Desolvasyon ajanı:sulu faz oranı (h:h)	PB (nm)	PDI	ZP (mV)	EE (%)	YK (%)
AF10	2:1	363,3±3,570	0,145±0,017	-11,3±2,37	26,35±0,449	3,334±0,174
AF11	3:1	252,7±4,635	0,214±0,013	-13,1±1,67	25,20±0,898	3,895±0,238
AF9	4:1	255,4±7,756	1,000	-15,1±3,54	26,02±0,149	4,893±0,028

3.3.3.4.Çapraz Bağlama Yönteminin Etkisi

Albümin nanopartiküllerinin hazırlanması sırasında desolvasyon ajanının eklenmesiyle oluşan albümin agregatları glutaraldehit gibi bir çapraz bağlayıcı ya da ısı uygulaması yardımıyla çapraz bağlanarak stabilize edilmektedir. Çalışmamız sırasında bu iki farklı çapraz bağlama yönteminin oluşan partiküller üzerindeki etkileri iki farklı pH değerinde (pH 7,2 ve 11,0) araştırılmıştır. %2 (a/h) konsantrasyondaki BSA çözeltileri etanol eklenmesiyle desolve edilmiş, oluşan albümin agregatları 1,56 µg/mg BSA oranında glutaraldehit ya da 30 dk 70°C ısı uygulamasıyla çapraz bağlanmıştır. İki farklı formülasyon grubuna ait elde edilen veriler Çizelge 3.20’de sunulmuştur.

Çizelge 3.20. Farklı çapraz bağlama yöntemleri ile hazırlan nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonu.

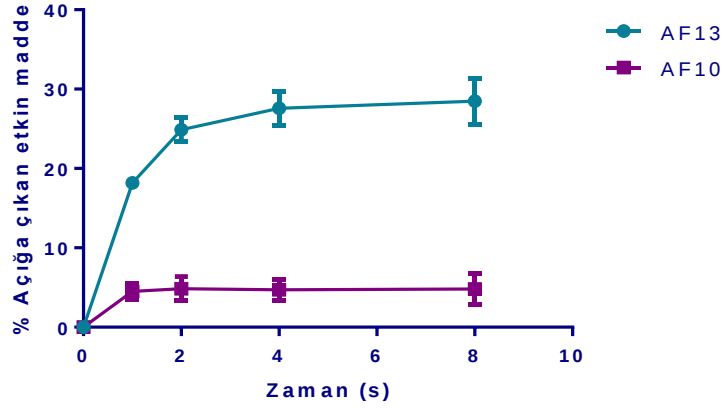
Kod	Çapraz bağlama yöntemi	pH	PB (nm)	PDI	ZP (mV)	EE (%)	YK (%)
AF11	1,56 µg/mg BSA	11	252,7±4,635	0,214±0,013	-13,1±1,67	25,20±0,898	3,895±0,238
AF12	70°C	11	278,4±4,431	0,138±0,022	-12,8±0,187	24,80±1,397	4,174±0,182
AF13	1,56 µg/mg BSA	7,2	396,2±5,743	0,142±0,027	-8,1±0,258	28,22±0,487	2,987±0,052
AF14	70°C	7,2	>1000 nm	1,000	-9,7±0,284	29,48±1,197	6,030±0,245

3.3.3.5.BSA Çözeltisi pH'sının Etkisi

BSA çözeltisinin pH'sının nanopartiküller üzerindeki etkilerinin incelenmesi amacıyla pH 5, 7,2 ve 11'de %2 (a/h) BSA çözeltisine desolvasyon ajanı:sulu faz oranı 2:1 olacak şekilde etanol eklenmiş, oluşan albümin agregatları 1,56 µg/mg BSA oranında glutaraldehit ile çapraz bağlanmıştır. Elde edilen nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri Çizelge 3.21'de, çözünme hızı profilleri ise Şekil 3.10'da yer almaktadır.

Çizelge 3.21. Farklı pH'larda BSA çözeltisi ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonu.

Kod	BSA çözeltisinin pH'sı	PB (nm)	PDI	ZP (mV)	EE (%)	YK (%)
AF15	5,0	-	-	-	-	-
AF13	7,2	396,2±5,743	0,142±0,027	-8,13±0,258	28,22±0,487	2,987±0,052
AF10	11,0	363,3±3,570	0,145±0,017	-11,3±2,37	26,35±0,449	3,334±0,174



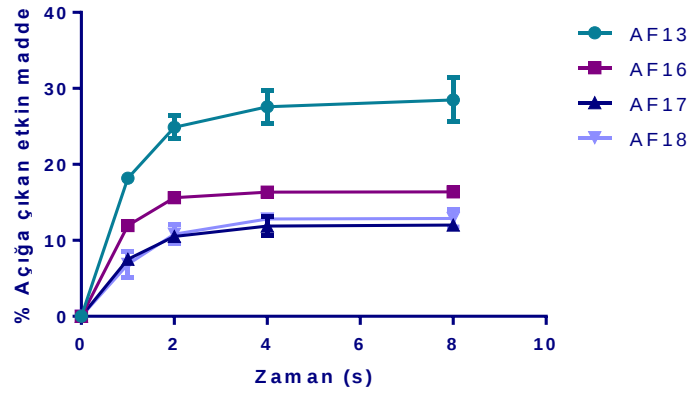
Şekil 3.10. Farklı pH'larda BSA çözeltileri ile hazırlanan albümin nanopartiküllerin in vitro çözünme hızı profilleri.

3.3.3.6.Yüzey Etkin Madde Varlığının Etkisi

Dispersiyon ortamında yüzey etkin madde varlığının farklı konsantrasyonlarının karboplatinin albümin nanopartiküller içerisinde enkapsülasyonu üzerine etkilerinin araştırılması için pH 7,2'de %2 (a/h) BSA çözeltisi %0,2, 0,5 ve 1 konsantrasyonlarda poloksamer 188 çözeltisi içerisinde çözülerek albümin nanopartiküller üretilmiş ve yüzey etkin madde varlığının nanopartiküller üzerine etkileri Çizelge 3.22 ve Şekil 3.11'de incelenmiştir.

Çizelge 3.22. Farklı konsantrasyonda yüzey etkin maddeler ile nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonu.

	Yüzey etkin madde konsantrasyonu (a/h)	PB (nm)	PDI	ZP (mV)	EE (%)	YK (%)
AF13	-	396,2±5,743	0,142±0,027	-8,13±0,258	28,22±0,487	2,987±0,052
AF16	%0,2 Poloksamer 188	415,3±3,032	0,107±0,022	-9,45±0,301	26,42±1,390	3,716±0,196
AF17	%0,5 Poloksamer 188	556,6±9,457	0,165±0,043	-6,74±0,060	34,14±1,175	6,595±0,227
AF18	%1 Poloksamer 188	585,5±7,772	0,046±0,044	-6,32±0,366	31,90±1,205	4,775±0,180



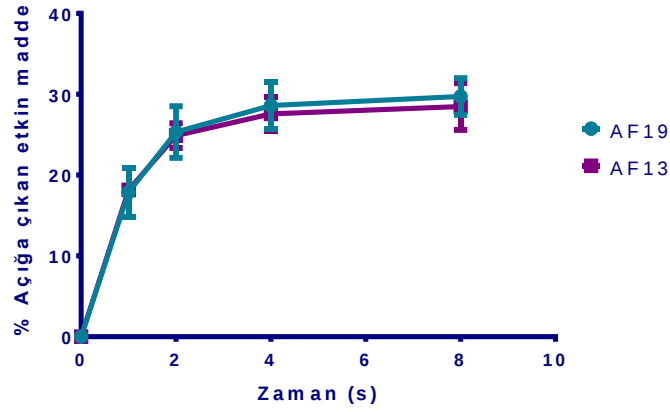
Şekil 3.11. Farklı konsatrasyonda yüzey etkin madde içeren formülasyonların in vitro çözünme hızı profilleri.

3.3.3.7.Karıştırma Hızının Etkisi

Formülasyon çalışmalarımızda elde edilen 396 nm partikül büyüklüğü, 0,142 PDI, yaklaşık %28 enkapsülasyon etkinliği ve 8 saat içerisinde yaklaşık %28 karboplatin salımı gösteren AF14 kodlu formülasyonumuzda karıştırma hızı değiştirilerek 600 rpm'den 1200 rpm'e çıkarılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.23'te ve Şekil 3.12'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.23. Farklı iki karıştırma hızında hazırlanan albümin nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonu.

	Karıştırma hızı	PB (nm)	PDI	ZP (mV)	EE (%)	YK (%)
AF13	600 rpm	396,2±5,743	0,142±0,03	-8,13±0,258	28,22±0,487	2,987±0,052
AF19	1200 rpm	207,9±14,616	0,186±0,02	-11,9±2,717	31,82±0,442	3,544±0,442



Şekil 3.12. Farklı karıştırma hızlarında hazırlanan formülasyonların in vitro çözünme hızı profilleri.

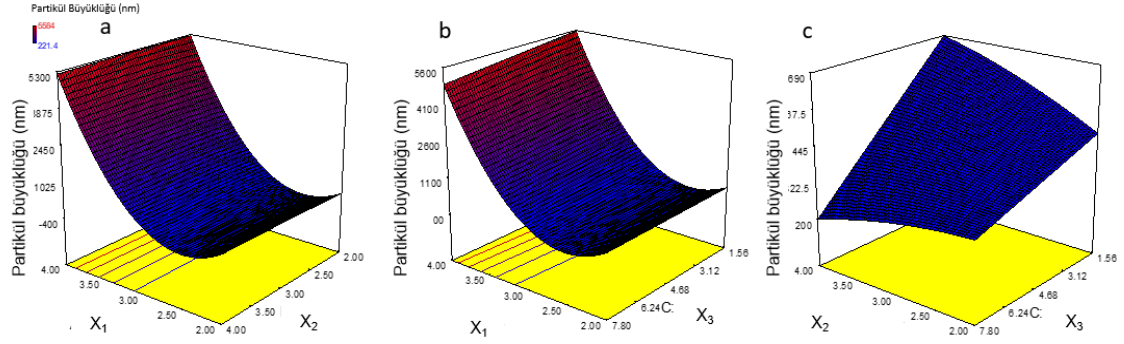
3.3.4. Optimum Karboplatin Yüklü Albümin Nanopartikül Formülasyonunun Belirlenmesi

Optimum karboplatin yüklü albümin nanopartikül formülasyonunu belirlemek amacıyla oluşturulan Box-Behnken tasarımı sonucunda elde edilen veriler Çizelge 3.24'te sunulmaktadır.

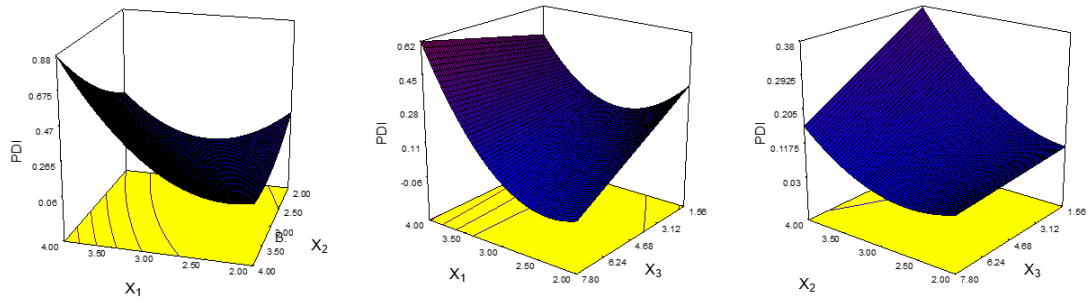
Çizelge 3.24. Box-Behnken tasarımı sonucu elde edilen veriler

	X ₁ (BSA konsantrasyonu) (a/h)	X ₂ (Desolvasyon ajanı:sulu faz oranı) (h/h)	X ₃ (Glutaraldehit:BSA oranı) (µg.mg ⁻¹)	Y ₁ (Partikül büyüklüğü) (nm)	Y ₂ (PDI)	Y ₃ (Enkapsülasyon etkinliği) (%)	Yükleme kapasitesi (%)
1	4	3	1,56	5584	0,337	35,77	3,219
2	2	4	4,68	226,3	0,067	22,12	1,871
3	3	4	1,56	714,9	0,380	35,93	5,626
4	3	4	7,80	253,8	0,078	40,94	2,697
5	4	2	4,68	5340	0,421	49,71	4,482
6	4	4	4,68	5178,5	1,000	37,09	2,306
7	3	2	1,56	350,1	0,119	31,94	1,746
8	2	3	1,56	344,9	0,439	26,73	1,273
9	4	3	7,80	4870	0,534	30,31	2,792
10	3	2	7,80	283,8	0,056	31,41	2,943
11	2	3	7,80	248,3	0,097	29,62	2,614
12	2	2	4,68	221,3	0,175	20,50	1,823

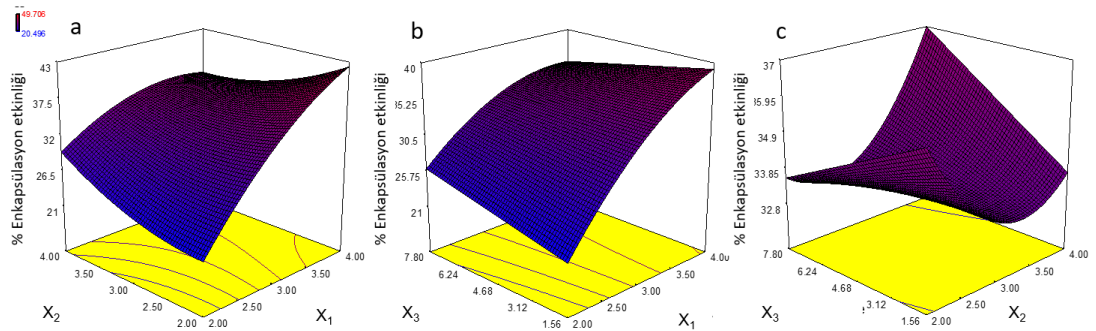
Box-Behnken tasarımına göre BSA konsantrasyonu, desolvasyon ajanı:su fazı oranı ve glutaraldehit:BSA oranının partikül büyüklüğü, PDI ve enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi Şekil 3.13, Şekil 3.14 ve Şekil 3.15'te gösterilmiştir.



Şekil 3.13. Box-Behnken tasarımına göre bağımsız değişkenlerin partikül büyüklüğü üzerine etkisi.

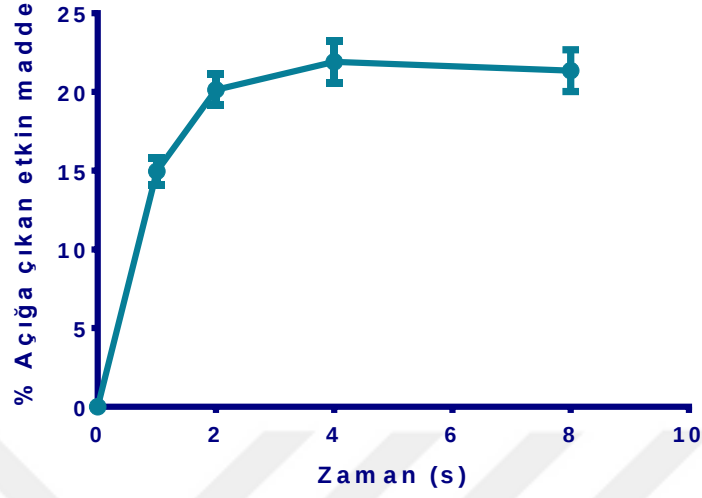


Şekil 3.14. Box-Behnken tasarımına göre bağımsız değişkenlerin PDI üzerine etkisi.



Şekil 3.15. Box-Behnken tasarımına göre bağımsız değişkenlerin enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi.

Design Expert 7.0 yazılımı kullanılarak yapılan tasarımda bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenler üzerine etkilerinin matematiksel ifadeleri Çizelge 3.25'te, optimum formülasyon olarak belirlenen F4 formülasyonuna ait *in vitro* çözünme hızı profili ise Şekil 3.16'da gösterilmiştir.



Şekil 3.16. F4 formülasyonuna ait *in vitro* çözünme hızı profili.

Çizelge 3.25. Box-Behnken tasarımına göre bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenler üzerine etkilerinin matematiksel ifadeleri.

Bağımlı değişken	Matematiksel ifade
Partikül Büyüklüğü	$2326,3X_1^2 - 20,125X_2^2 - 41,725X_1X_2 - 154,35X_1X_3 - 83,975X_2X_3 + 2491,3875X_1 + 29,7X_2 - 159,8875X_3 + 435,5$
PDI	$0,24525X_1^2 + 0,064X_2^2 + 0,17175X_1X_2 + 0,13475X_1X_3 - 0,0475X_2X_3 + 0,18925X_1 + 0,100375X_2 - 0,05763X_3 + 0,1065$
Enkapsülasyon etkinliği	$-2,7005X_1^2 + 1,74875X_2^2 - 3,55775X_1X_2 - 2,087X_1X_3 + 1,38725X_2X_3 + 6,739625X_1 + 0,31775X_2 + 0,236625X_3 + 33,307$

3.3.5. Karboplatin Yüklü Albümin Nanopartiküllerin Lipit Tabaka ile Kaplanması

Karboplatin ve desitabin yüklü lipit kaplı nanopartiküler sistemlerde çekirdeği oluşturması planlanan karboplatin yüklü albümin nanopartiküllerin hazırlanmasına yönelik yapılan ön çalışmaların ardından Box-Behnken tasarımı ile nanopartiküllerin optimizasyonu sağlanmış ve sonuçlar değerlendirildiğinde F4 kodlu formülasyon lipit kaplama aşamasında kullanılacak olan çekirdek formülasyon olarak seçilmiştir. Seçilen optimum çekirdek formülasyonun final formülü oluşturmak üzere lipit

kaplama işlemi sırasında farklı lipit:nanopartikül oranları, farklı lipit bileşimleri kullanılarak optimum lipit kaplı albümin nanopartikül formülasyonuna ulaşılmaya çalışılmıştır.

Farklı lipit:nanopartikül oranları ile farklı lipit oranlarının kaplama işleminin başarısı üzerine etkisi incelenerek Çizelge 3.26’da lipit kaplı albümin nanopartiküllerin *in vitro* özelliklerine ait sonuçlar verilmiştir.

Çizelge 3.26. Farklı lipit:nanopartikül oranı ve farklı lipit oranlarının lipit kaplı albümin nanopartikül formülasyonları üzerine etkisi.

Kod	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyel (mV)	Kaplama sırasında dispersiyon ortamına sızan KRB (%)
LA1	266,8±26,92	0,223±0,071	-27,6±1,704	78,14±0,943
LA2	220,6±21,29	0,075±0,014	-27,1±0,502	79,61±1,004
LA3	253,8±34,45	0,192±0,102	-25,1±4,596	76,36±0,788
LA4	224,7±15,65	0,078±0,032	-25,5±0,191	79,03±0,708

Ön çalışmalar doğrultusunda lipit kaplama için lipit: nanopartikül oranının 1:1 olmasına karar verilmiş ve karboplatin yüklü albümin nanopartiküllerin desitabin yüklü lipit kabuk ile kaplama işleminin optimizasyonu için çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla öncelikle nanopartiküllerin lipit filme eklenme yöntemi değiştirilerek çekirdek albümin nanopartiküllere yüklenmiş olan karboplatinin rehidrasyon tamponuna sızıntısı en aza indirilmeye çalışılmış ve dispersiyon ortamının hacmi değiştirilerek elde edilen sonuçlar Çizelge 3.27’de gösterilmiştir.

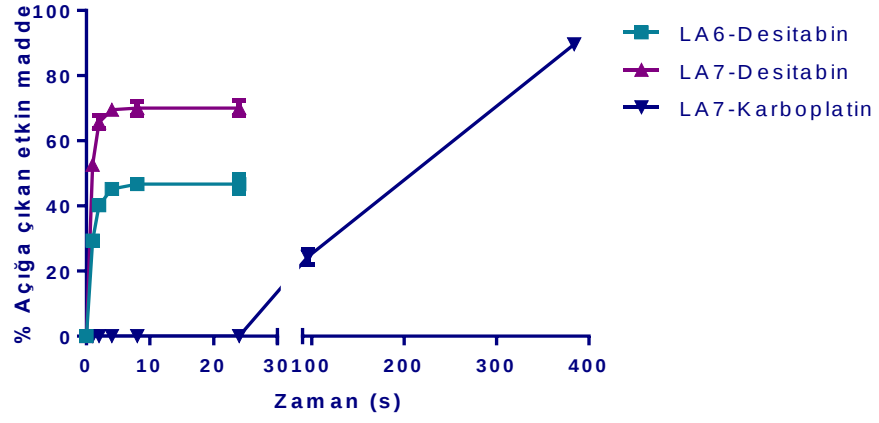
Çizelge 3.27. Lipit kaplama işlemi sırasında dispersiyon ortamına sızan karboplatin miktarını azaltmaya yönelik çalışmalar.

Kod	PB (nm)	PDI	ZP (mV)	Kaplamada dispersiyon ortamına sızan KRB (%)	EE-DES (%)	YK-KRB (%)	YK-DES (%)
LA5	281,5±13,03	0,584±0,098	-14,7±0,728	57,98±2,597	22,34±2,312	0,340±0,030	0,853±0,088
LA6	272,3±3,787	0,298±0,036	-10,9±2,700	13,65±0,088	36,59±0,512	1,228±0,004	1,146±0,016

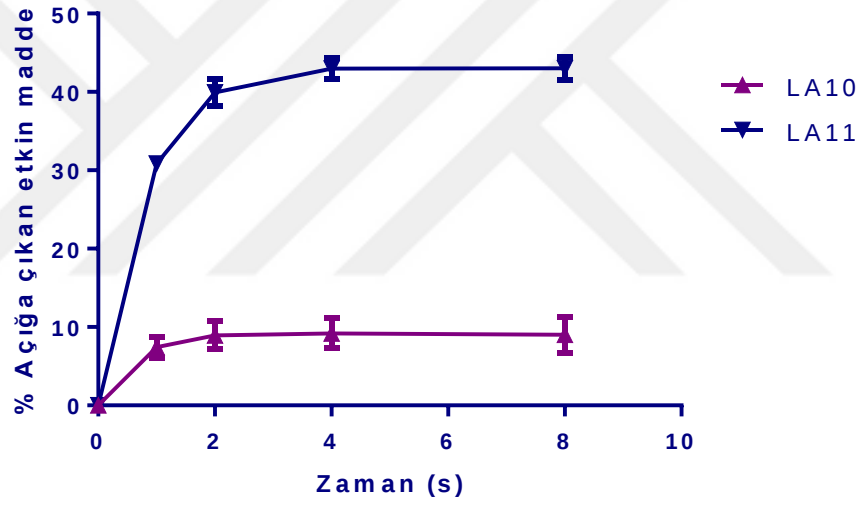
Farklı lipid bileşimlerinin karboplatin ve desitabin kombinasyonu yüklü lipid kaplı nanopartiküler sistemlerin *in vitro* özellikleri üzerine etkisinin incelenmesi için farklı zincir uzunluklarına sahip fosfolipitler ile oleik asit kullanılmış ve elde edilen lipid kaplı albümin nanopartiküllerin *in vitro* özellikleri Çizelge 3.28’de çözünme hızı profilleri ise Şekil 3.17 – Şekil 3.20’de sunulmuştur. Şekil 3.21’de ise çekirdek F4 formülasyonu ile kaplanmış LA7 formülasyonu arasındaki partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel farklılıkları gösterilmiştir.

Çizelge 3.28 Farklı lipid bileşimlerinin lipid kaplı albümin nanopartiküller üzerine etkisi.

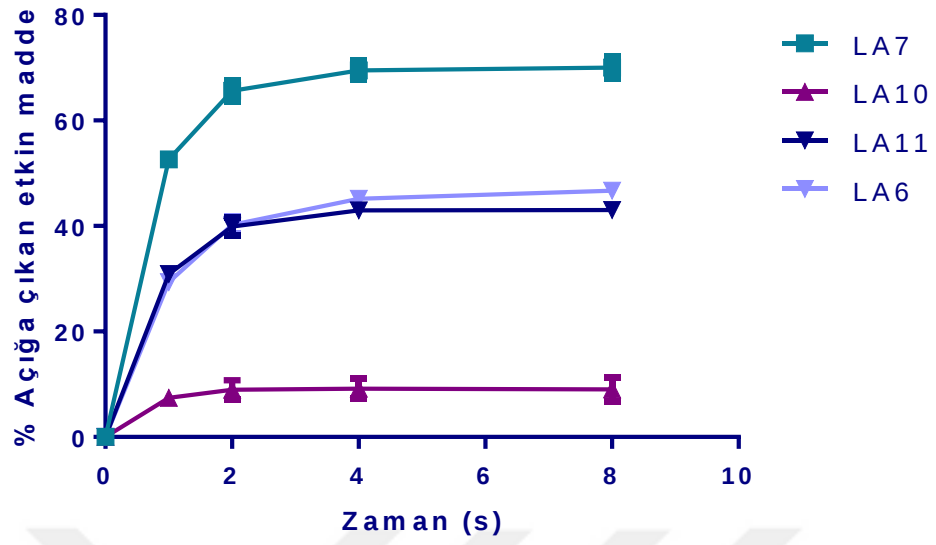
Kod	PB (nm)	PDI	ZP (mV)	Kaplama sırasında dispersiyon ortamına sızan KRB (%)	EE-DES (%)	YK-KRB (%)	YK-DES (%)
LA6	272,3±3,787	0,298±0,036	-10,9±2,70	13,65±0,088	36,59±0,512	1,228±0,034	1,146±0,016
LA7	306,9±4,790	0,298±0,015	-69,9±8,39	9,232±0,910	29,39±0,869	1,597±0,008	0,757±0,022
LA7D	310,3±3,012	0,383±0,125	-65,2±3,91	15,95±1,023	27,43±0,780	1,008±0,038	0,695±0,013
LA8	394,3±10,77	0,544±0,013	-56,5±1,60	15,95±0,371	19,94±0,365	4,483±0,103	0,516±0,015
LA8D	408,2±12,38	0,512±0,081	-51,7±2,38	11,89±0,371	21,41±0,419	3,389±0,103	0,491±0,015
LA9	350,4±12,53	0,558±0,088	-57,1±2,27	-	20,28±1,237	17,445±0,97	0,522±0,093
LA10	289,9±37,42	0,520±0,063	-4,30±0,310	13,66±0,185	29,94±0,108	2,089±0,072	1,105±0,004
LA11	420,3±22,8	0,627±0,119	-7,42±2,72	13,58±0,511	23,62±1,493	1,745±0,014	0,701±0,044
LA12	830,0±58,61	1,000	-15,1±3,67	10,79±1,930	26,51±0,691	1,484±0,025	0,794±0,021
LA13	313,9±15,01	0,559±0,131	-63,4±8,39	15,28±2,223	26,54±3,368	1,005±0,042	0,612±0,078
LA14	1050±308,0	0,977±0,021	-12,8±3,24	8,523±0,426	33,77±0,446	1,530±0,031	1,019±0,013
LA15	269,9±9,700	0,618±0,119	-64,6±8,38	12,72±2,805	32,72±0,876	1,095±0,006	0,795±0,021



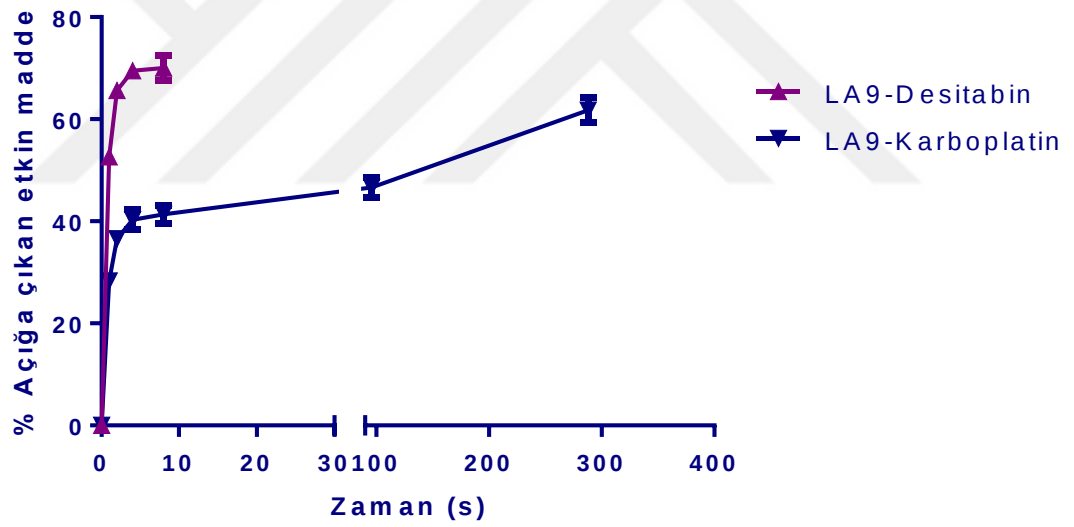
Şekil 3.17. Lesitin ile hazırlanan formülasyonlarda oleik asitin desitabinin *in vitro* çözünme hızına etkisi.



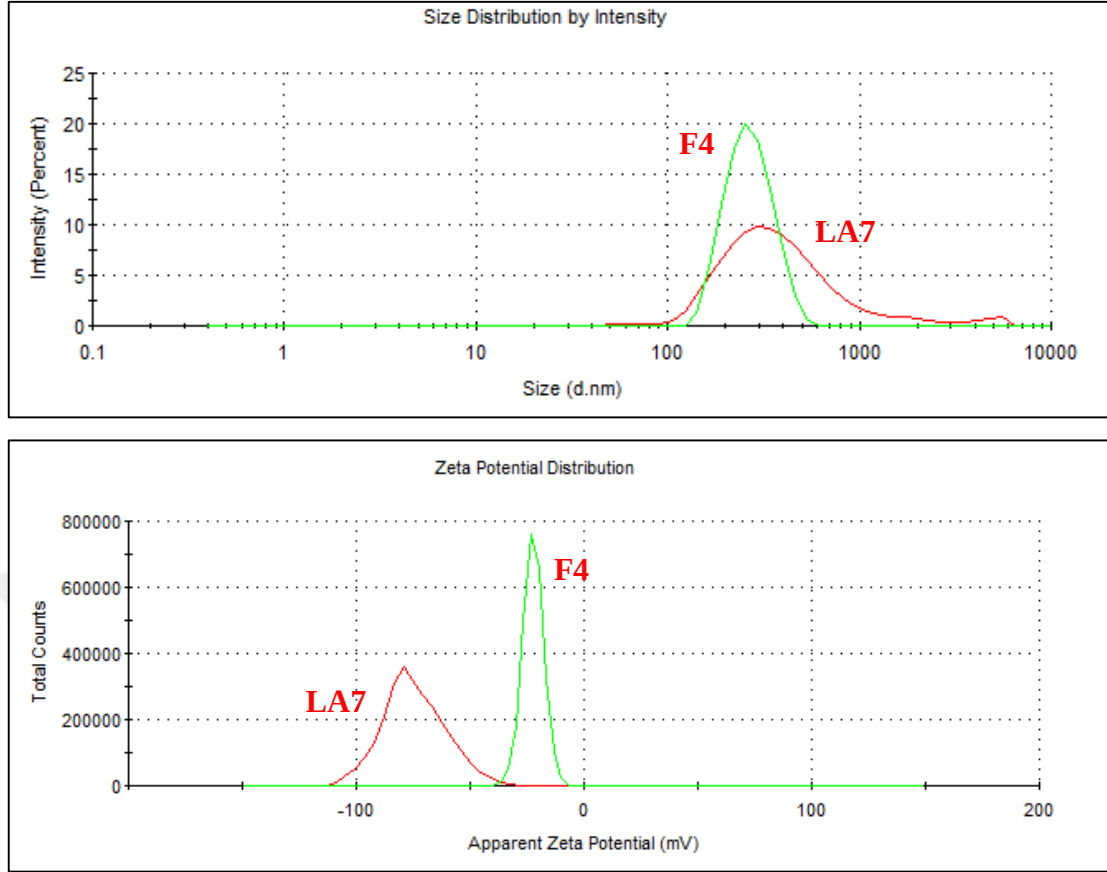
Şekil 3.18. DPPC ile hazırlanan formülasyonlarda oleik asitin desitabinin *in vitro* çözünme hızına etkisi.



Şekil 3.19. Farklı lipid bileşimlerinin desitabinin in vitro çözünme hızına etkisi.



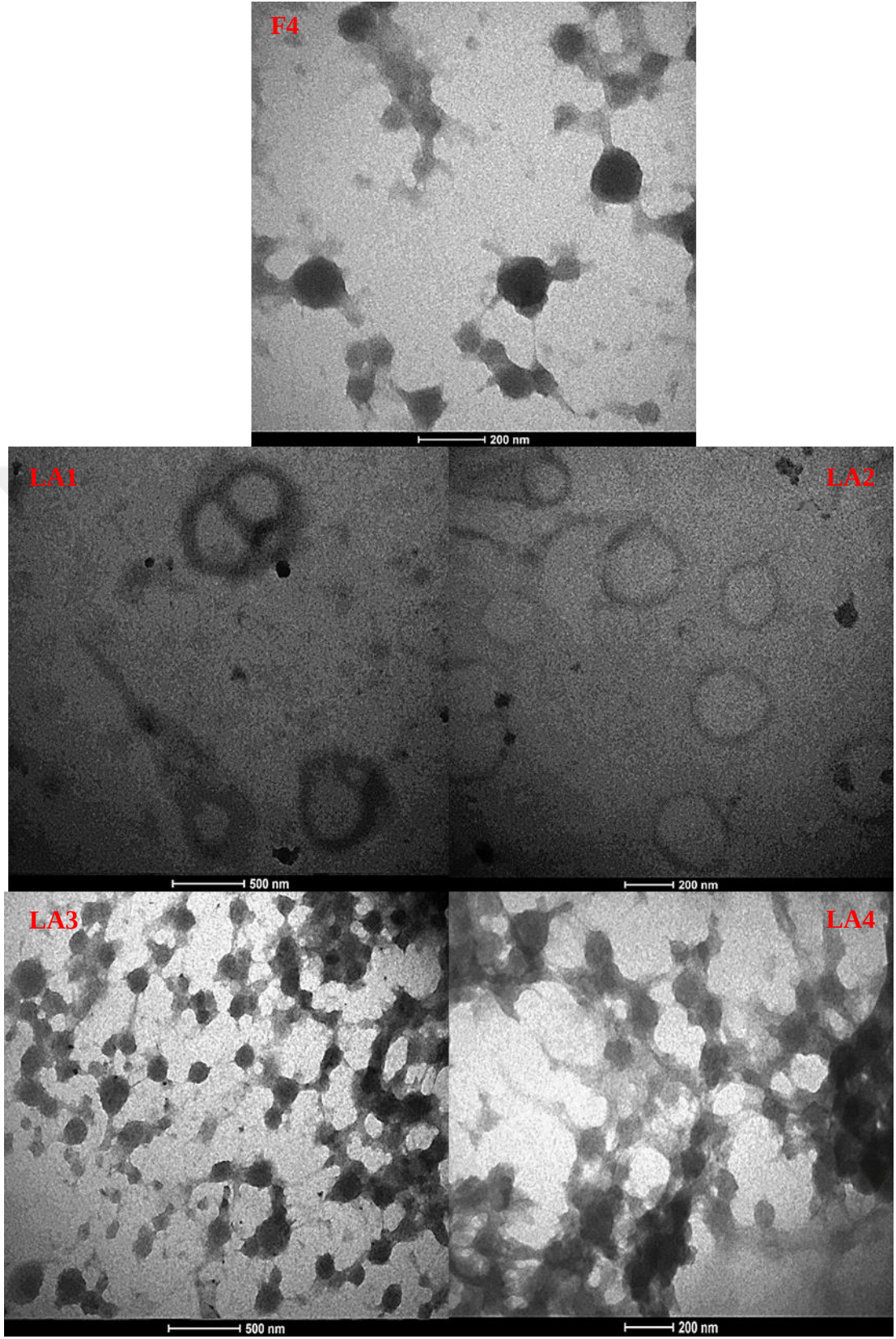
Şekil 3.20. Kabuk kısmında desitabin ile birlikte karboplatin içeren LA9 formülasyonunun in vitro çözünme hızı.



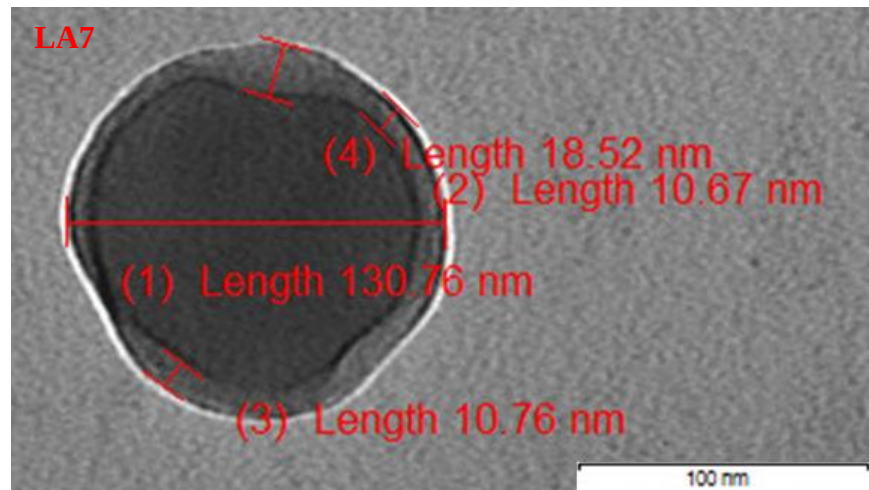
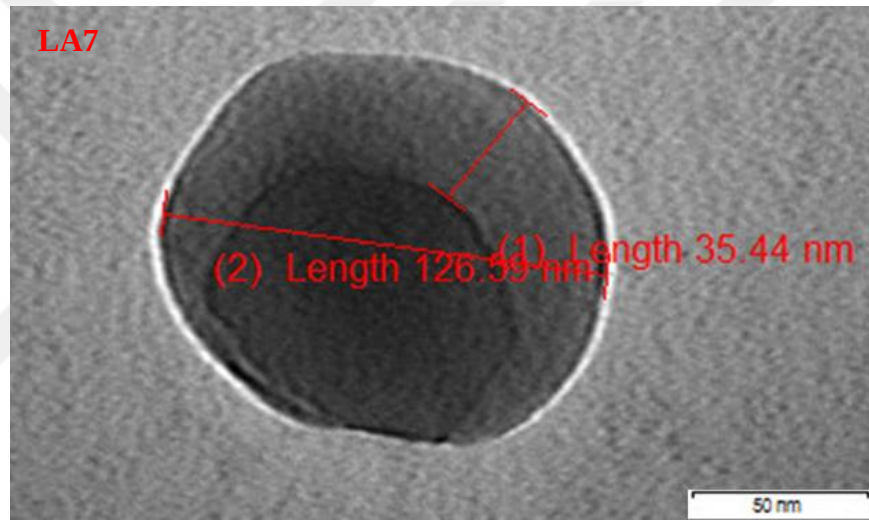
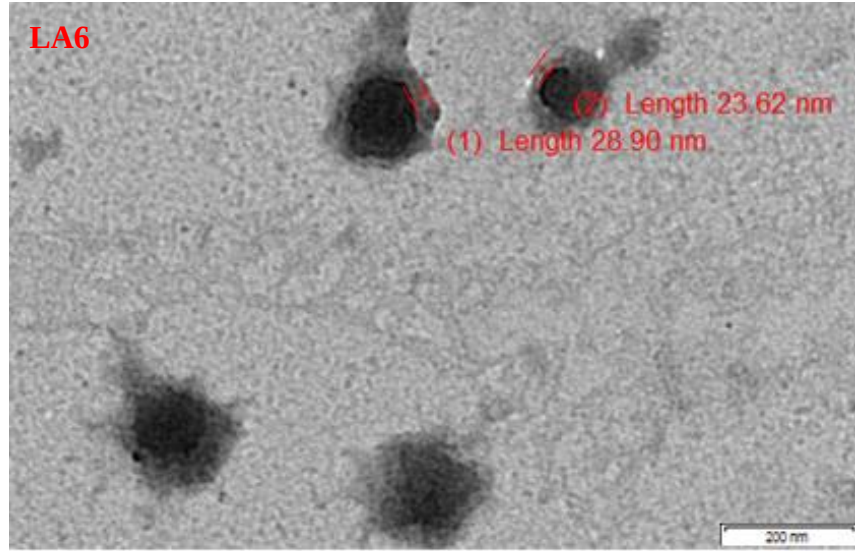
Şekil 3.21. F4 kodlu çekirdek formülasyon ve kaplı LA7 kodlu formülasyon arasındaki partikül büyüklüğü, polidispersite ve zeta potansiyel farklılıkları

3.3.6. Geçirimli Elektron Mikroskopi (TEM) Analizi

Karboplatin yüklü çekirdek albümin nanopartikül formülasyonları ile lipit kaplı albümin nanopartikül formülasyonlarına ait TEM görüntüleri Şekil 3.22 ve 3.23'te sunulmuştur.



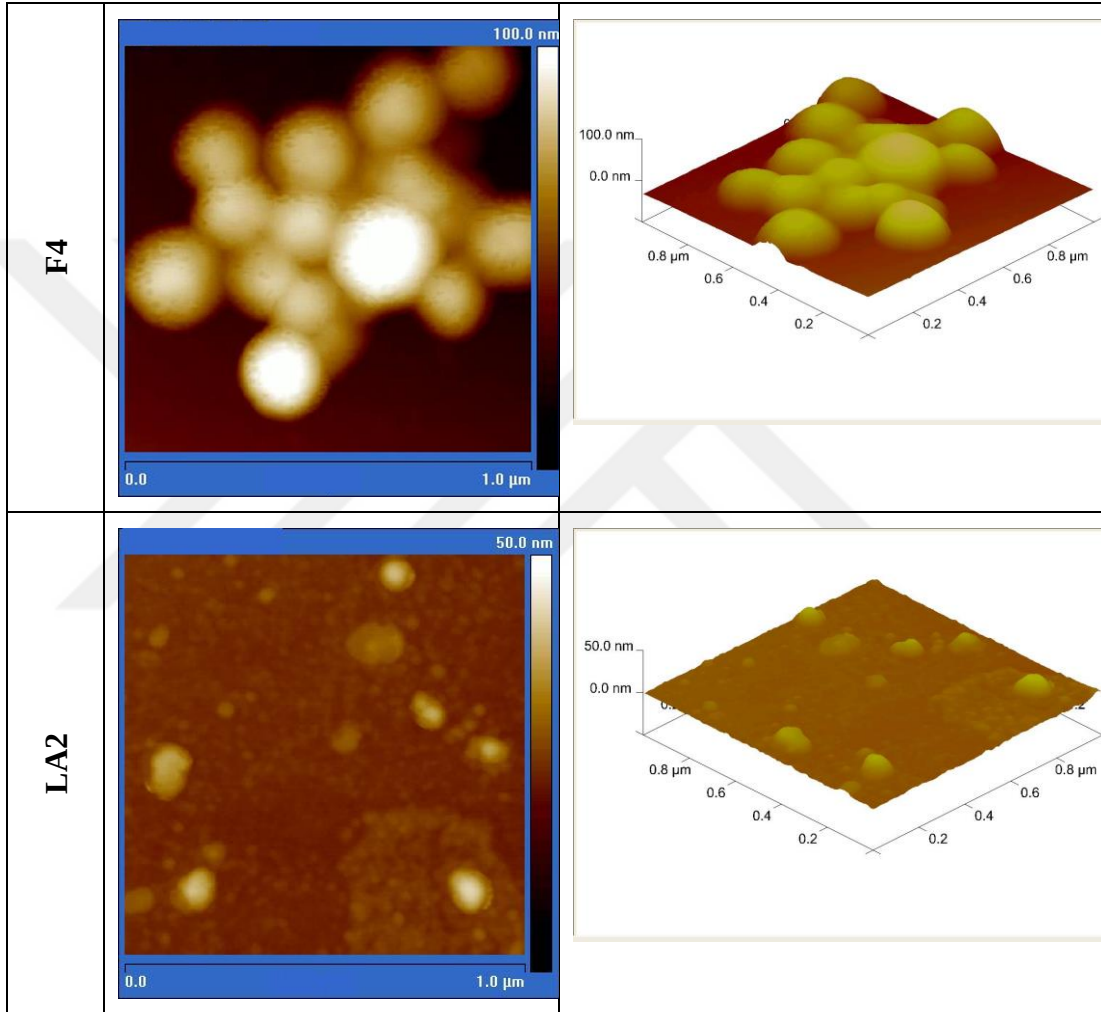
Şekil 3.22. F4 kodlu karboplatin yüklü albümin nanopartikül ile LA1, LA2, LA3, LA4 kodlu lipit kaplı albümin nanopartiküllere ait TEM görüntüleri



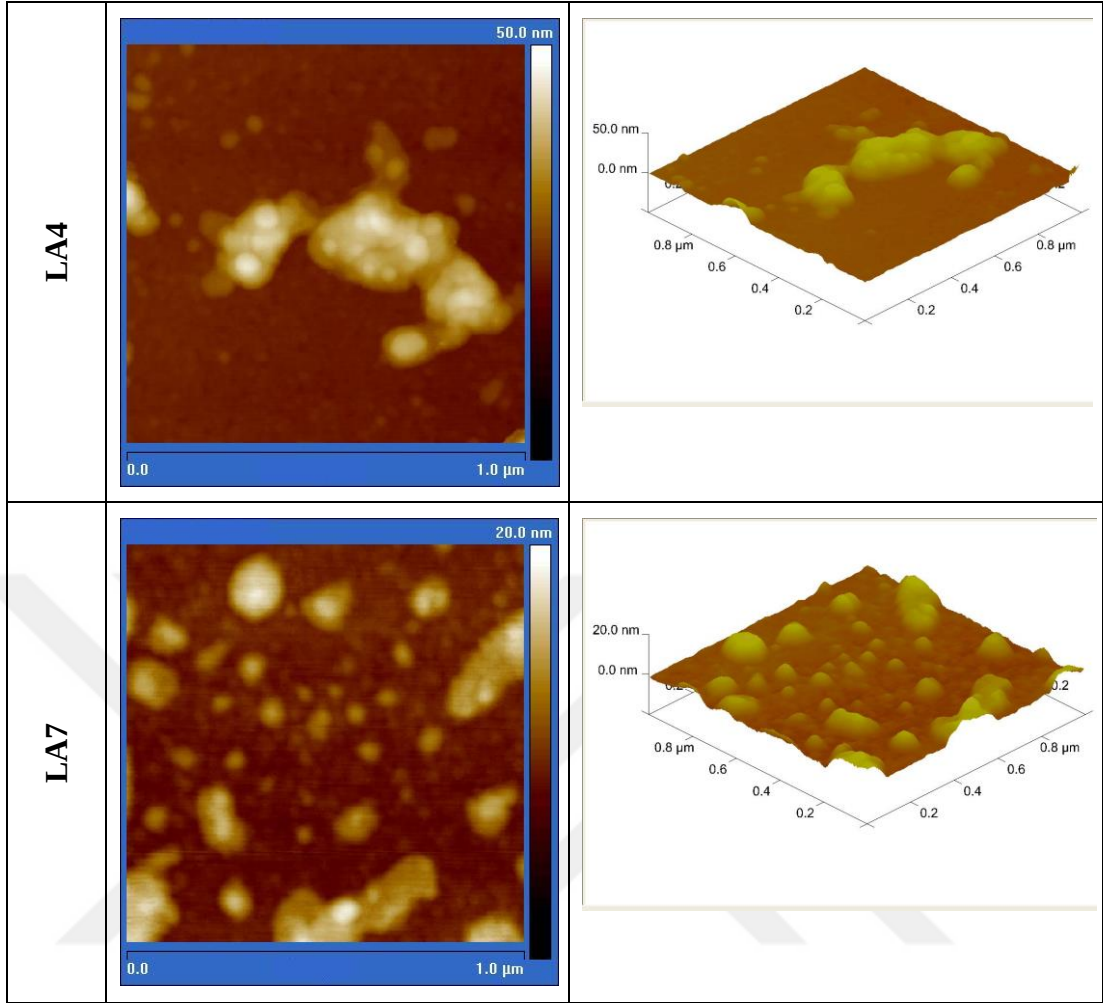
Şekil 3.23. LA6 ve LA7 kodlu formülasyonlara ait TEM görüntüleri.

3.3.7. Atomik Kuvvet Mikroskobisi (AFM) Analizi

Geliştirilen karboplatin yüklü albümin nanopartiküller ile desitabin ve/veya karboplatin yüklü lipit kaplı albümin nanopartiküllere ait 2 boyutlu ve 3 boyutlu AFM görüntüleri Şekil 3.24’te gösterilmektedir.



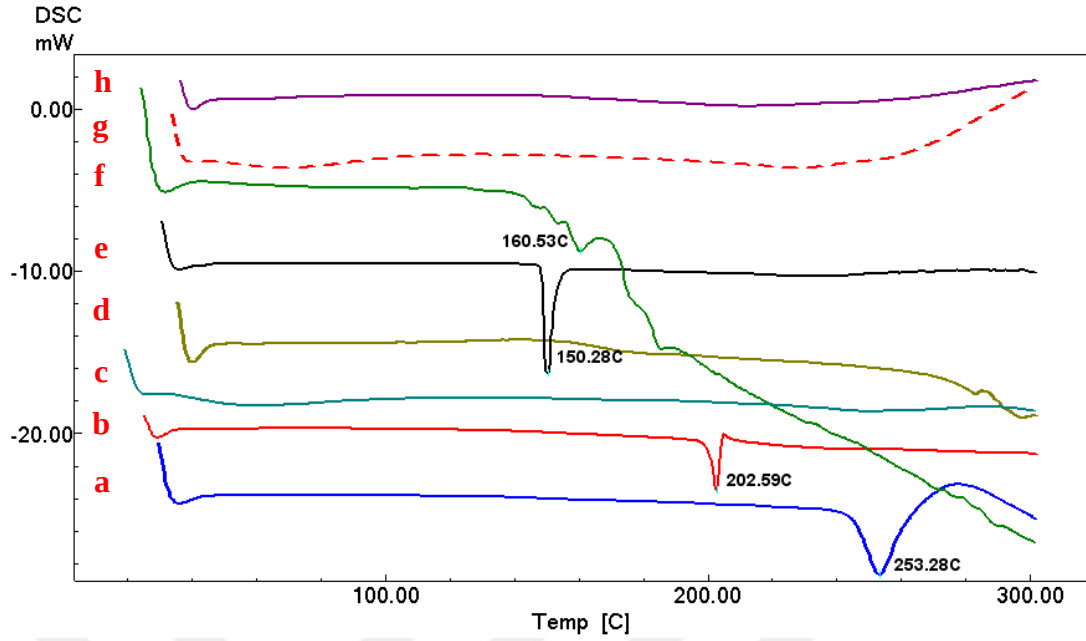
Şekil 3.24. F4 kodlu karboplatin yüklü albümin nanopartikül ve LA2, LA4 ve LA7 kodlu lipit kaplı albümin nanopartikül formülasyonlarına ait AFM görüntüleri.



Şekil 3.24 Devam. F4 kodlu karboplatin yüklü albümin nanopartikül ve LA2, LA4 ve LA7 kodlu lipid kaplı albümin nanopartikül formülasyonlarına ait AFM görüntüleri.

3.3.8. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizleri

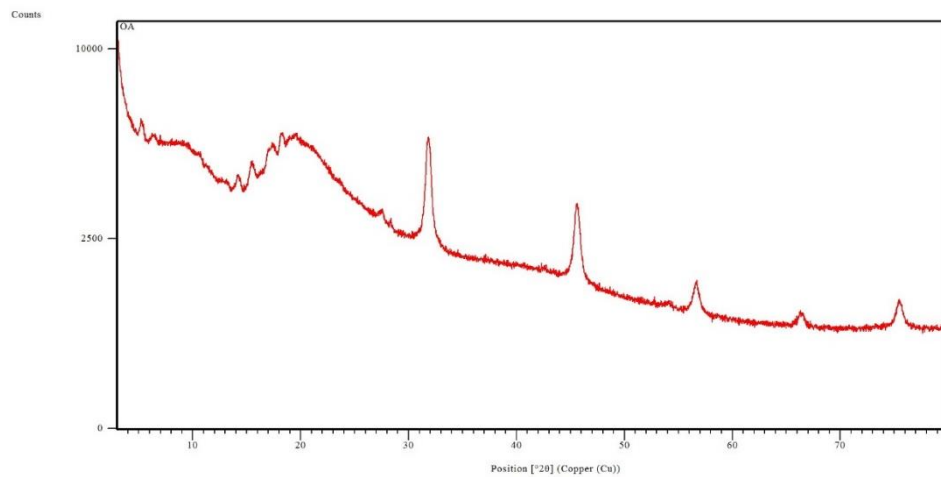
Saf karboplatin ve desitabin ile BSA, lesitin, kolesterol, oleik asit, karboplatin yüklü albümin nanopartikül formülasyonu (F4) ve desitabin-karboplatin kombinasyonu yüklü lipid kaplı albümin nanopartiküllerin (LA7) diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizleri yapılmış ve elde edilen termogramlar Şekil 3.25'te gösterilmiştir.



Şekil 3.25. DSC termogramları a)Karboplatin b) Desitabin c)BSA d)Oleik asit e)Kolesterol f)Lesitin g)F4 kodlu formülasyon h)LA7 kodlu formülasyon

3.3.9. X-ışını Kırınımı (XRD) Analizi

Karboplatin ve desitabin yüklü lipit kaplı albümin nanopartikül formülasyonunun 3-80°C aralığında 2θ difraksiyon açısı ile analiz edilerek alınan x-ışını toz difraktogramları Şekil 3.26’da gösterilmektedir.



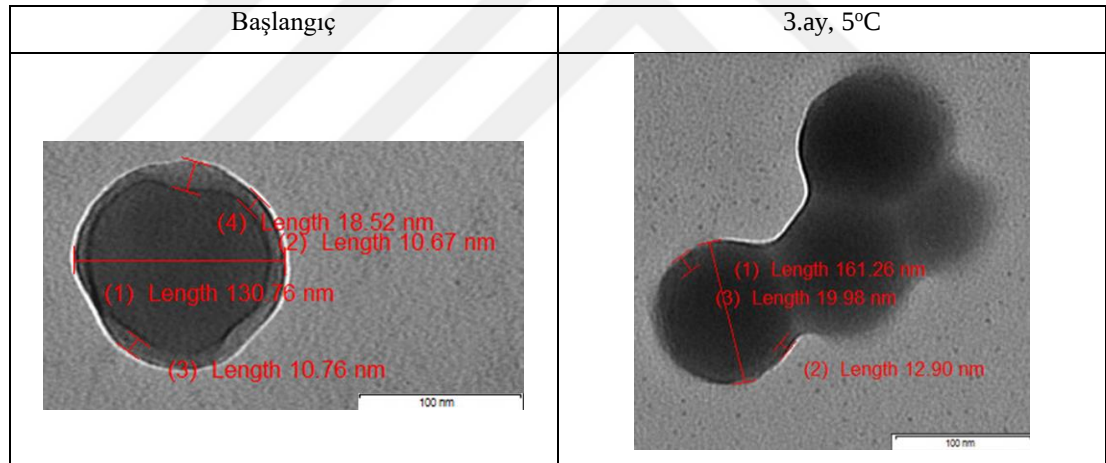
Şekil 3.26. Karboplatin ve desitabin yüklü LA7 kodlu lipit kaplı albümin nanopartikül formülasyonuna ait XRD difraktogramları

3.4.Stabilite Çalışmaları

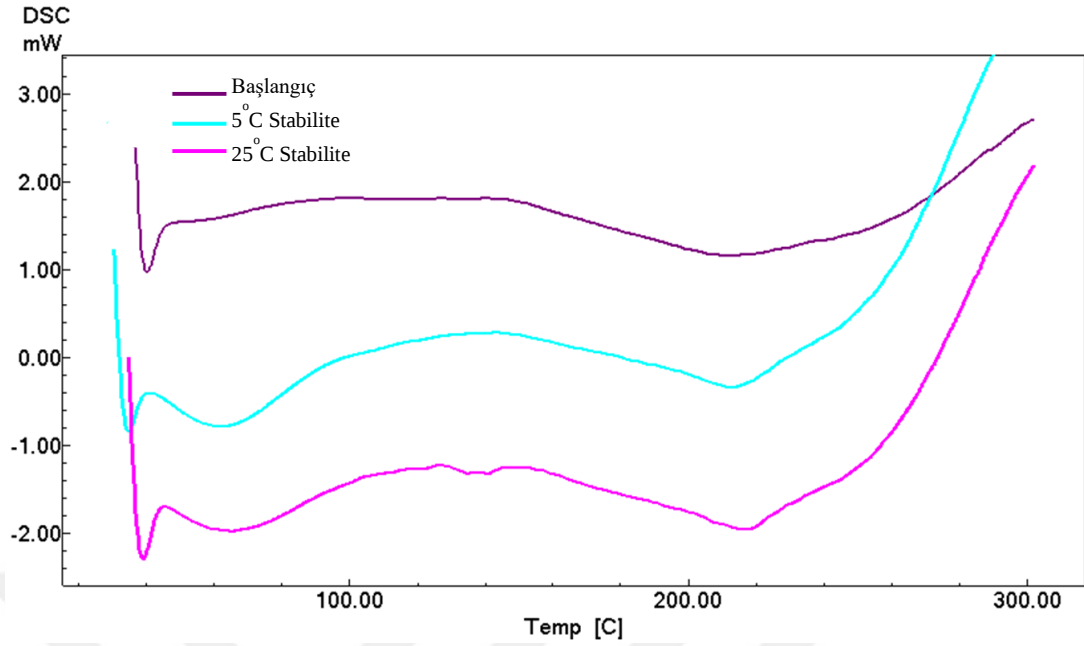
Karboplatin ve desitabin yüklü lipit kaplı albümin nanopartikül formülasyonunda Bölüm 2.6’da belirtilen şekilde farklı sıcaklık değerleri baz alınarak gerçekleştirilen stabilite testlerine tabi tutulduktan sonra elde edilen partikül büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyel sonuçları Çizelge 3.29’da, TEM görüntüsü Şekil 3.27’de ve DSC termogramı Şekil 3.28’de sunulmuştur.

Çizelge 3.29. Karboplatin ve desitabin yüklü lipit kaplı nanopartikül formülasyonunun stabilite testi sonuçları.

	PB (nm)	PDI	ZP (mV)
Başlangıç	310,9±6,451	0,516±0,072	-69,7±1,70
3. ay, 5°C	315,7±3,412	0,568±0,021	-70,1±3,51
3. ay, 25°C, %60 bağıl nem	392,4±10,64	0,700±0,040	-80,6±2,17



Şekil 3.27. Başlangıç ve 3. ay 5°C’de stabilite değerlendirmesi sonucu elde edilen TEM görüntüsü



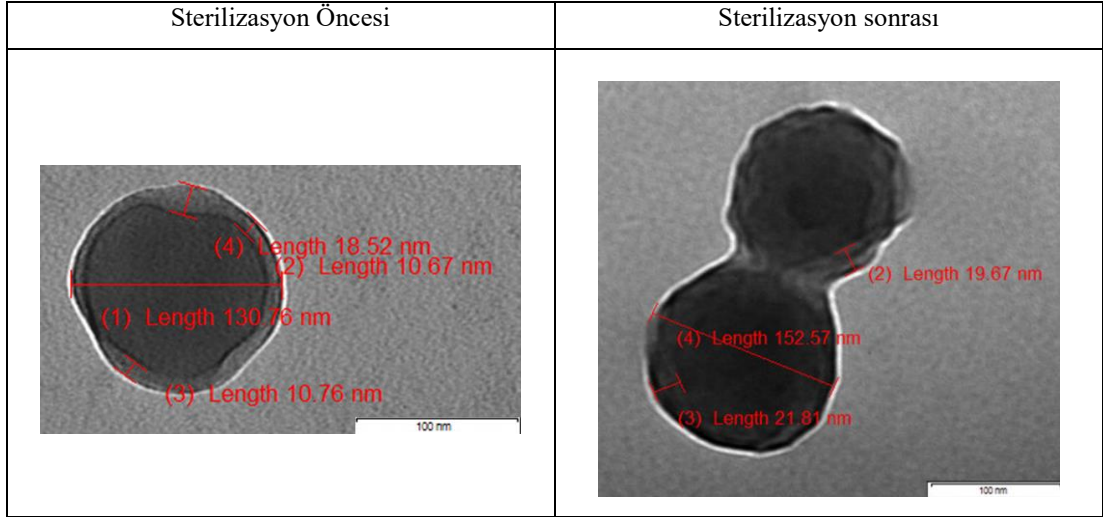
Şekil 3.28. Başlangıç ve 3. ay stabilite değerlendirmesi sonucu elde edilen DSC termogramları.

3.5. Sterilizasyon çalışmaları

Hücre kültürü çalışmaları için lipid kaplı nanopartikül formülasyonlarının gama radyasyon ile sterilizasyon işleminden nasıl etkilendiğinin anlaşılması için formülasyonların partikül büyüklüğü, partikül büyüklüğü dağılımı, zeta potansiyeli, TEM görüntüleri değerlendirilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra elde edilen partikül büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyel sonuçları Çizelge 3.30’da, TEM görüntüsü Şekil 3.29’da sunulmuştur.

Çizelge 3.30. Sterilizasyon işleminin karboplatin ve desitabin yüklü nanopartikül formülasyonunun in vitro özellikleri üzerine etkisi.

	PB (nm)	PDI	ZP (mV)
Başlangıç	334,7±11,13	0,512±0,067	-69,9±8,39
Sterilizasyon sonrası	355,3±15,35	0,697±0,154	-40,0±7,93



Şekil 3.29. Sterilizasyon işlemi sonrasında hücre kültürü çalışmaları için seçilen lipid kaplı nanopartikül formülasyonu ile elde edilen TEM görüntüleri

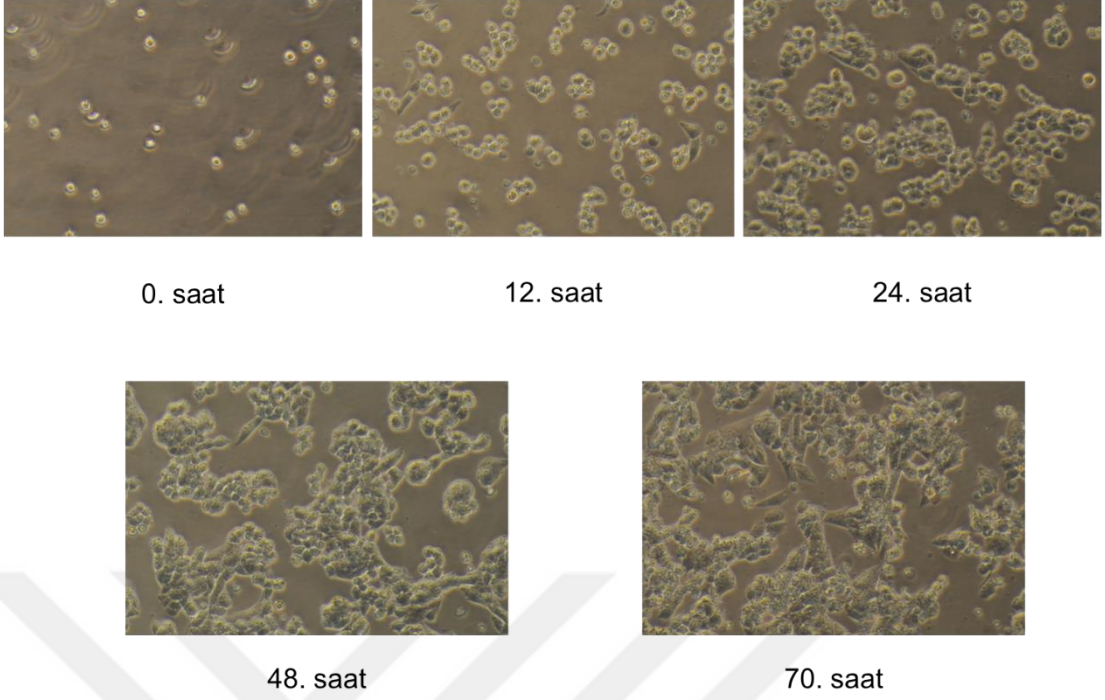
3.6. *In vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında geliştirilen lipid kaplı albümin nanopartikül formülasyonlarının *in vitro* özellikleri değerlendirildiğinde LA7, LA7D, LA8, LA8D ve LA9 kodlu formülasyonların hücre kültürü çalışmaları ile sitotoksisitelerinin, hücresel alımlarının, apoptotik etkilerinin ve ilaç direnci üzerindeki etkinliklerinin değerlendirilmesi uygun bulunmuştur.

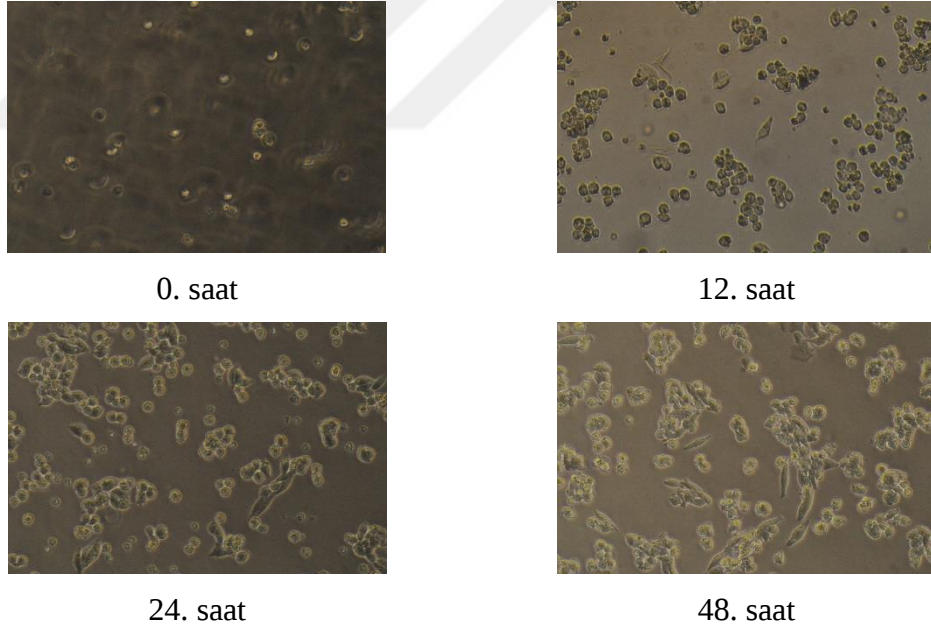
A2780 ve A2780cis hücre dizileri üzerinde gerçekleştirilen *in vitro* hücre kültürü çalışmalarından elde edilen veriler aşağıda sunulmuştur.

3.6.1. Hücre Dizisi ve Hücre Kültürü Koşulları

A2780 insan over kanseri hücre dizisine ait 0, 12, 24, 48 ve 70. saatte alınan hücre kültürü görüntüleri Şekil 3.30’da; A2780cis platin dirençli insan over kanseri hücre dizilerine ait 0, 12, 24 ve 48. saatte alınan hücre kültürü görüntüleri Şekil 3.31’de yer almaktadır. A2780 ve A2780cis hücre dizileri %80-85 yoğunluğa ulaştığında deneye hazır hale gelmiştir.



Şekil 3.30. A2780 hücre dizisinin mikroskop görüntüleri.

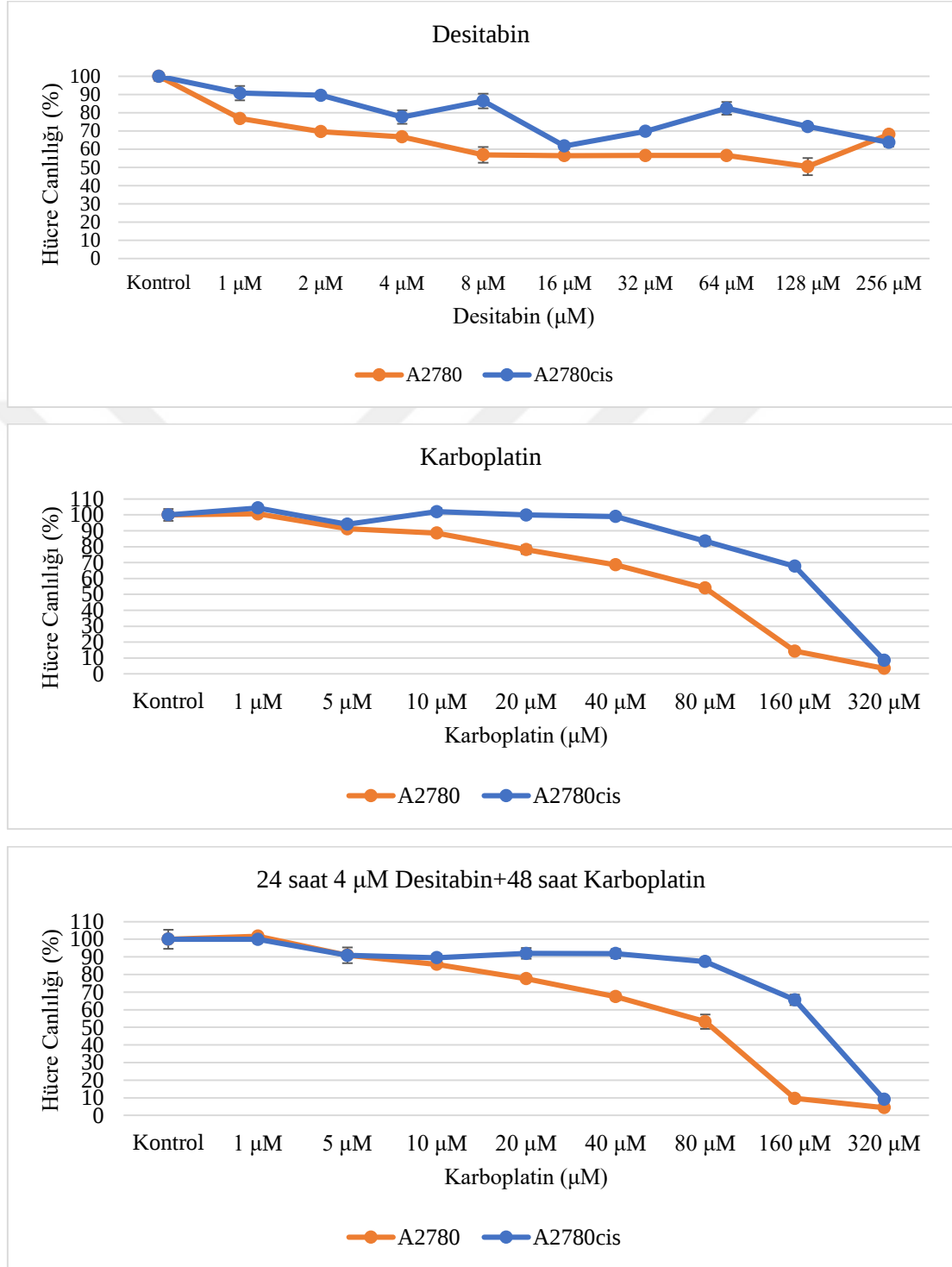


Şekil 3.31. A2780cis hücre dizisinin mikroskop görüntüleri

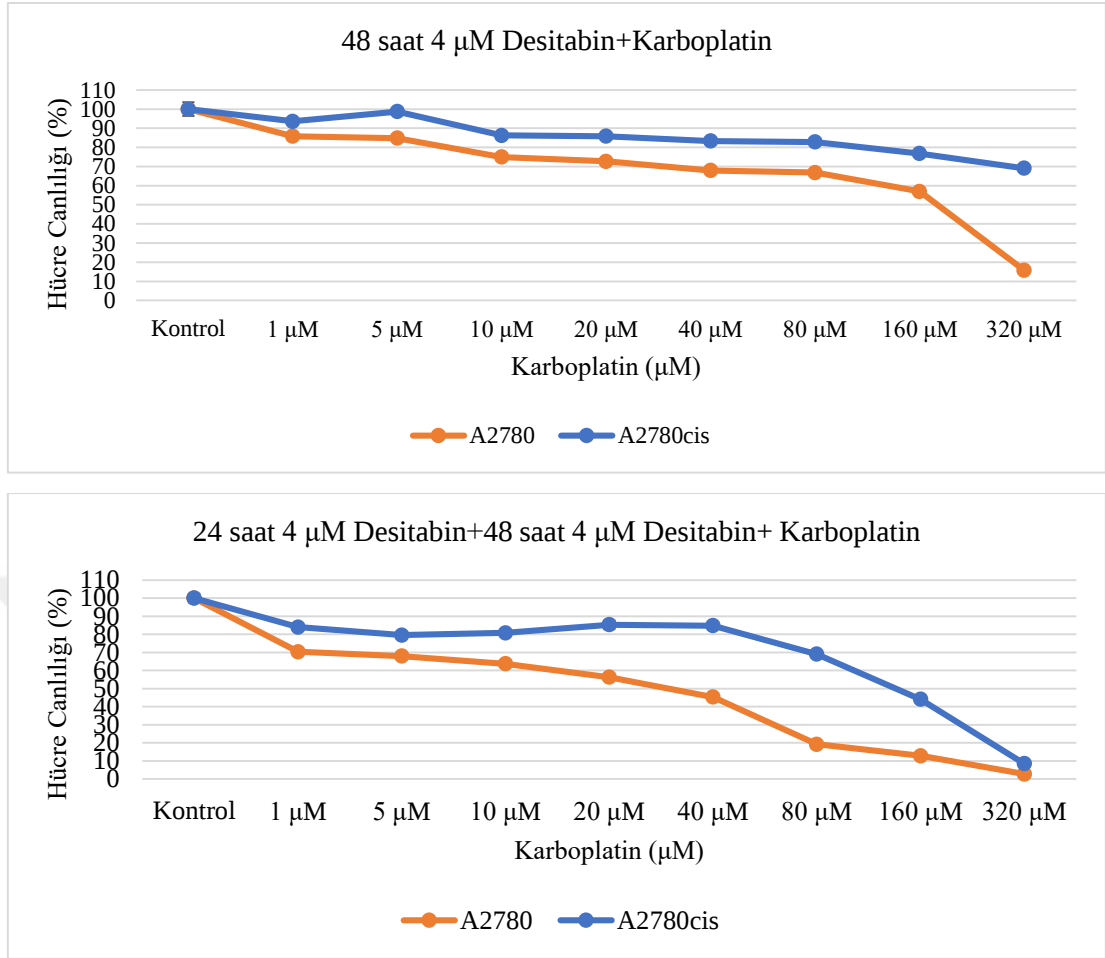
3.6.2. Karboplatin ve Desitabinin Sitotoksosite çalışmaları

Çalışmamızda Bölüm 2.8.2’de anlatılan şekilde MTT yöntemi kullanılarak Çizelge 2.6’da belirtilen deney grupları için gerçekleştirilen ve Eşitlik 2.5’e göre

hesaplanan karboplatin ve desitabinin A2780 ve A2780cis hücre dizileri üzerindeki sitotoksosite çalışmalarına ilişkin bulgular Şekil 3.32’de görülmektedir.



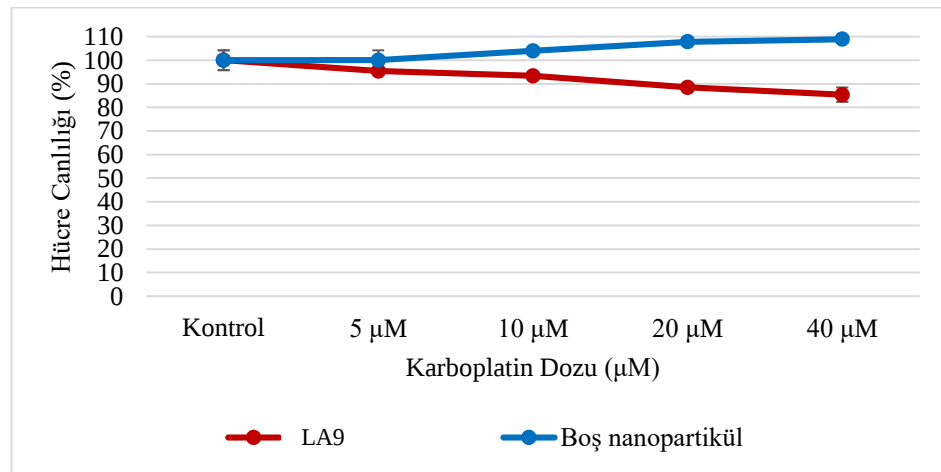
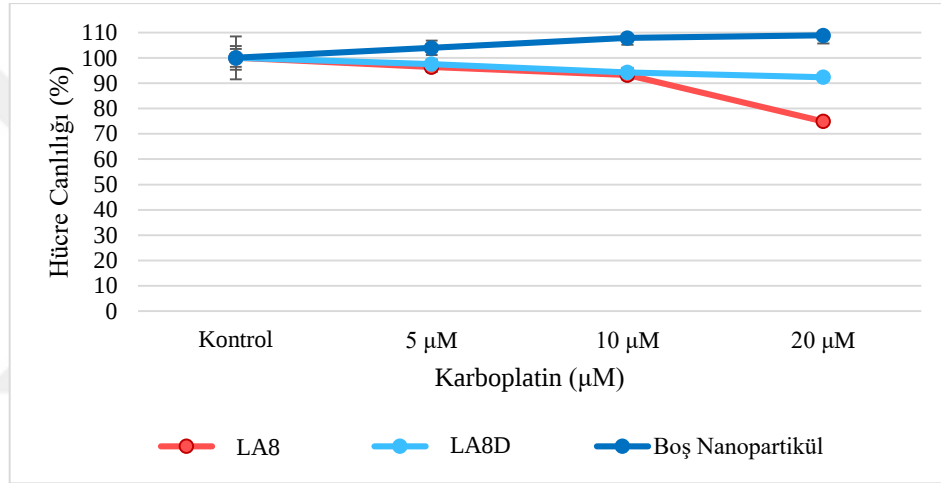
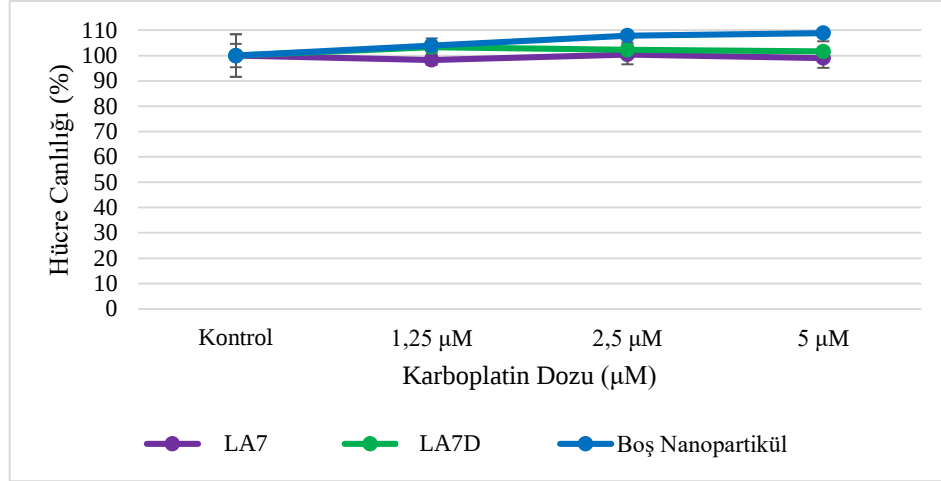
Şekil 3.32. Karboplatin ve desitabinin A2780 ve A2780cis hücre dizilerinin canlılığı üzerine etkileri



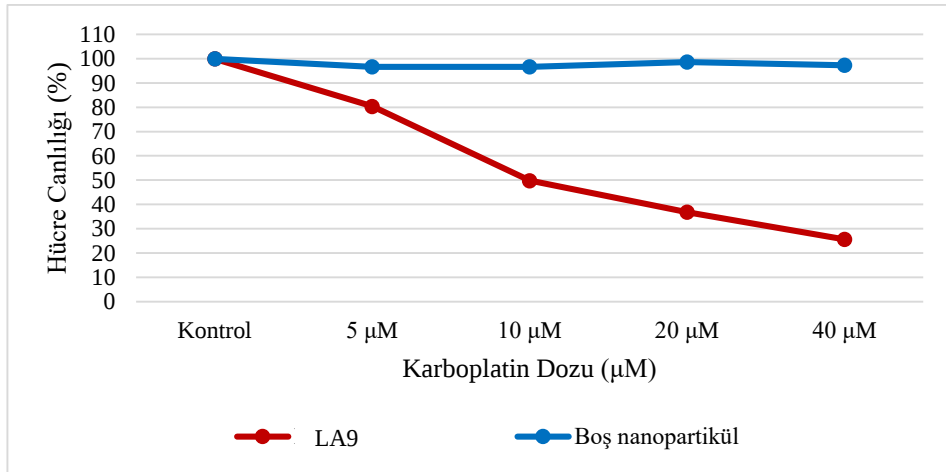
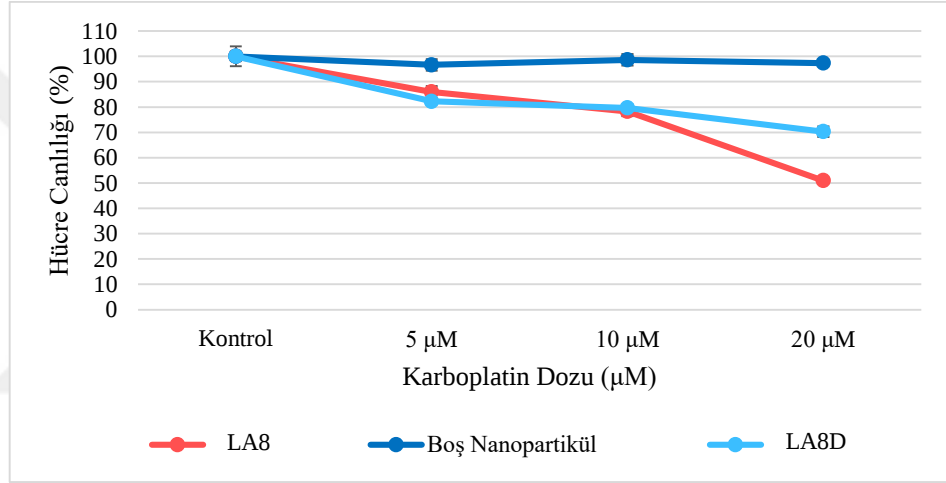
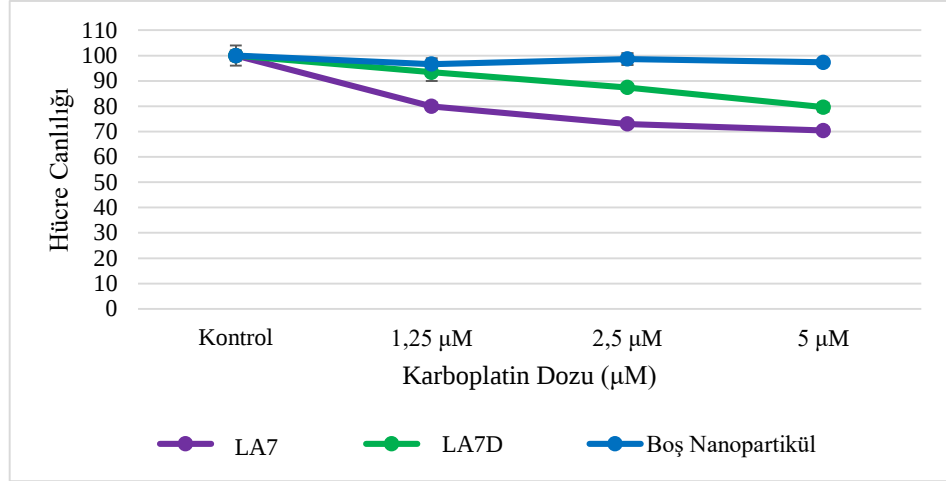
Şekil 3.32 Devam. Karboplatin ve desitabinin A2780 ve A2780cis hücre dizilerinin canlılığı üzerine etkileri

3.6.3. Karboplatin ve Desitabin Yüklü Nanopartiküler Sistemlerin Sitotoksisite Çalışmaları

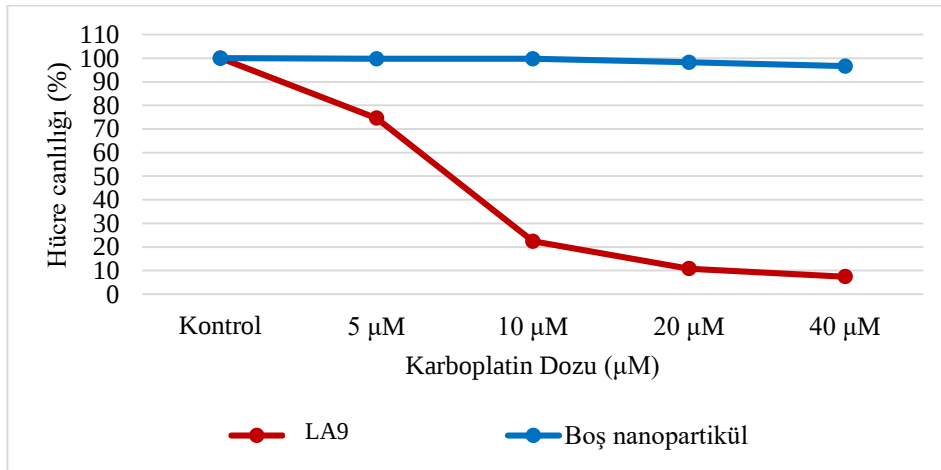
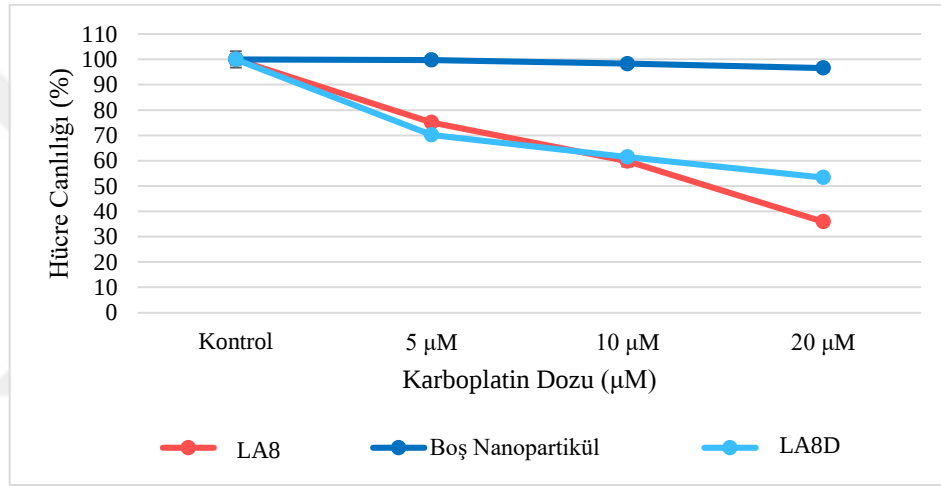
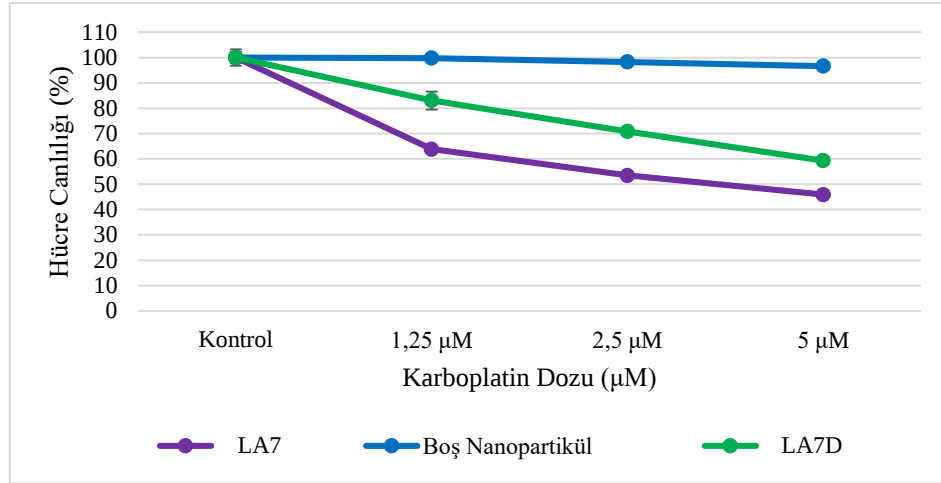
Bölüm 2.8.2’de anlatılan şekilde boş nanopartiküller ile LA7, LA7D, LA8, LA8D ve LA9 kodlu nanopartiküllerin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda A2780 ve A2780cis hücre dizilerinin hücre canlılığına etkisi değerlendirilmiş ve elde edilen veriler Şekil 3.33-Şekil 3.38’de sunulmuştur.



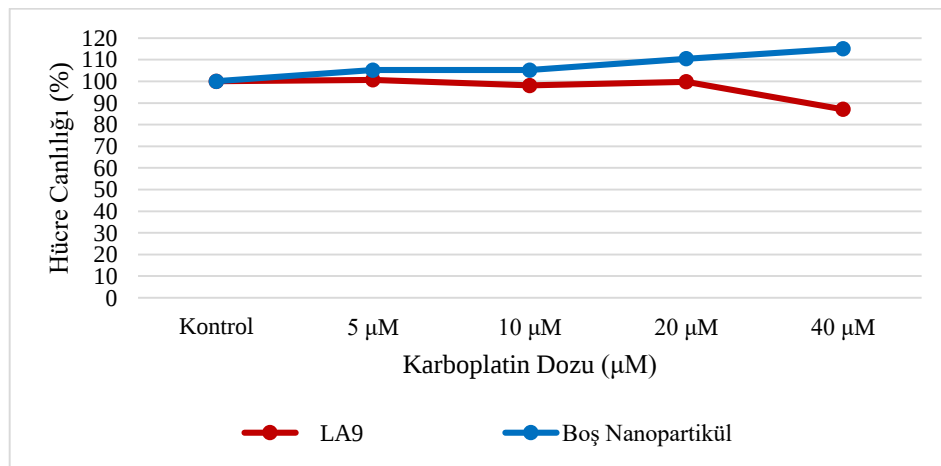
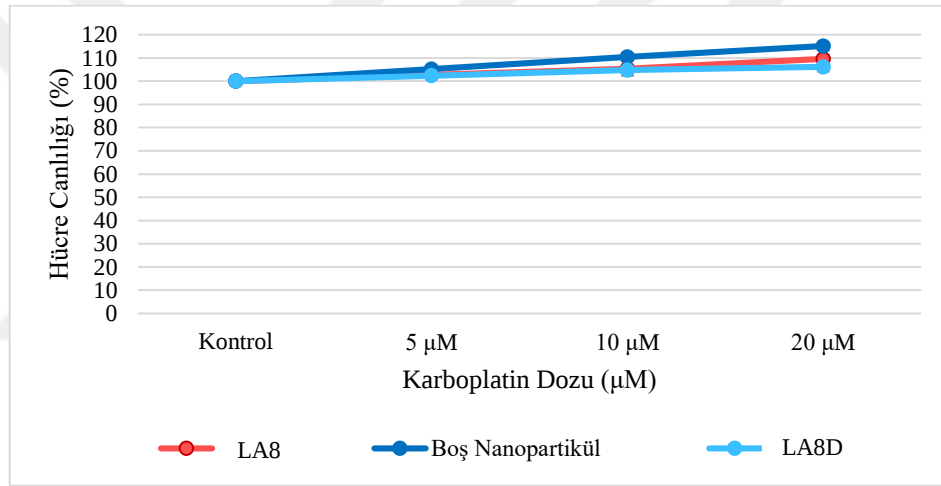
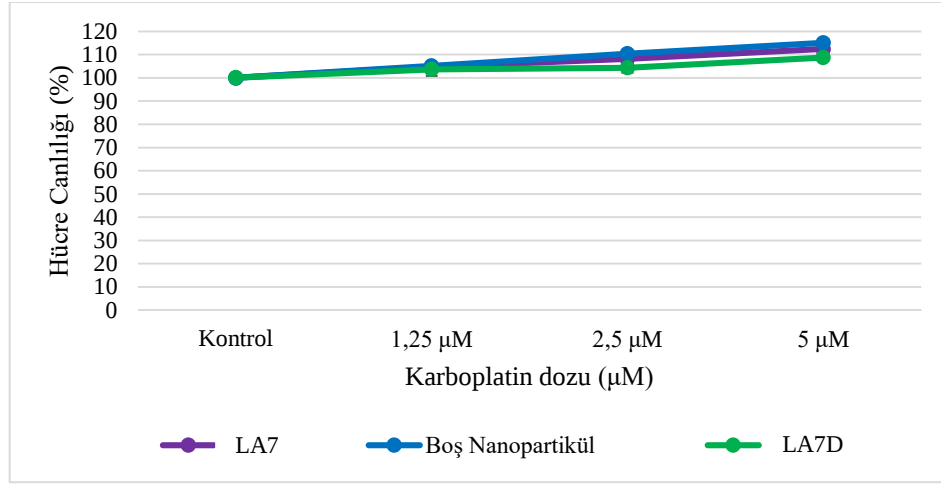
Şekil 3.33. Boş nanopartikül formülasyonu, LA7, LA7D, LA8, LA8D ve LA9 kodlu formülasyonlarının A2780 hücre dizisi üzerindeki 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda sitotoksik etkileri.



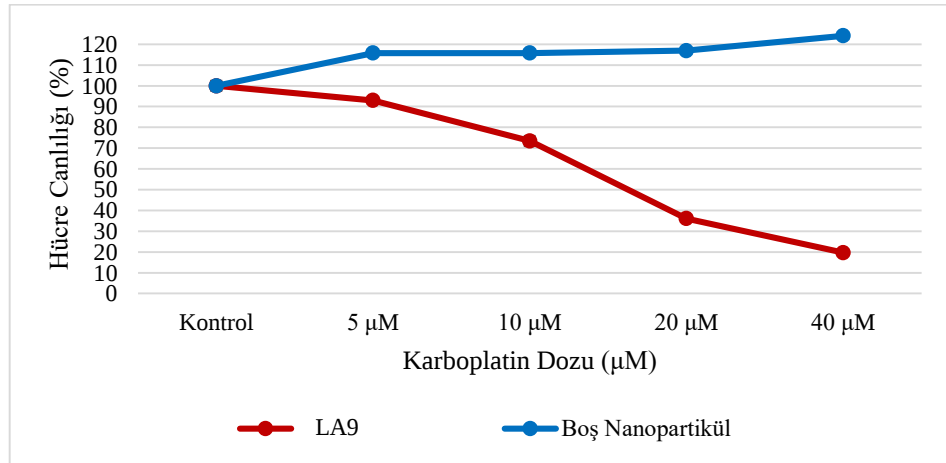
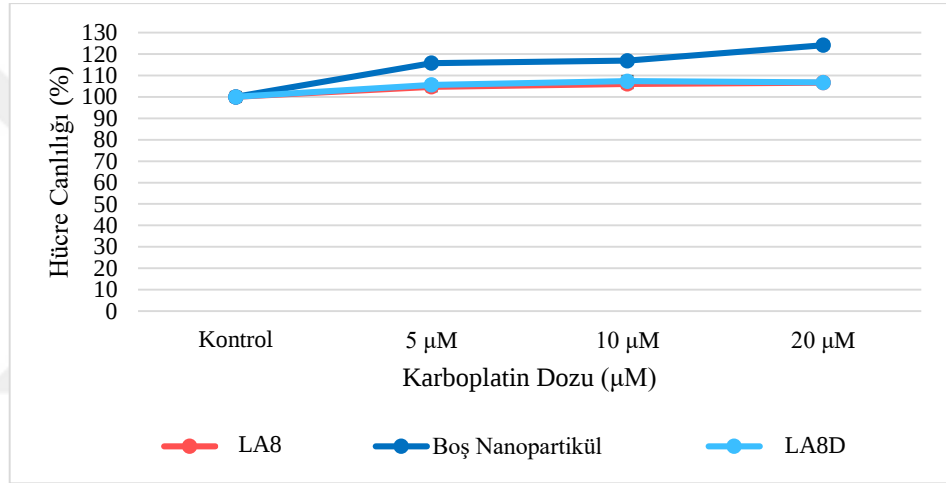
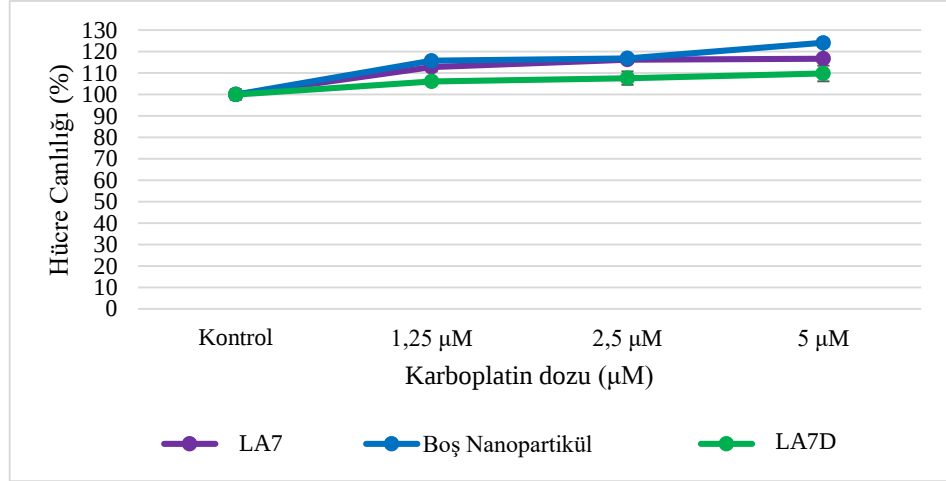
Şekil 3.34. Boş nanopartikül formülasyonu LA7, LA7D, LA8, LA8D ve LA9 kodlu formülasyonların A2780 hücre dizisi üzerindeki 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda sitotoksik etkileri.



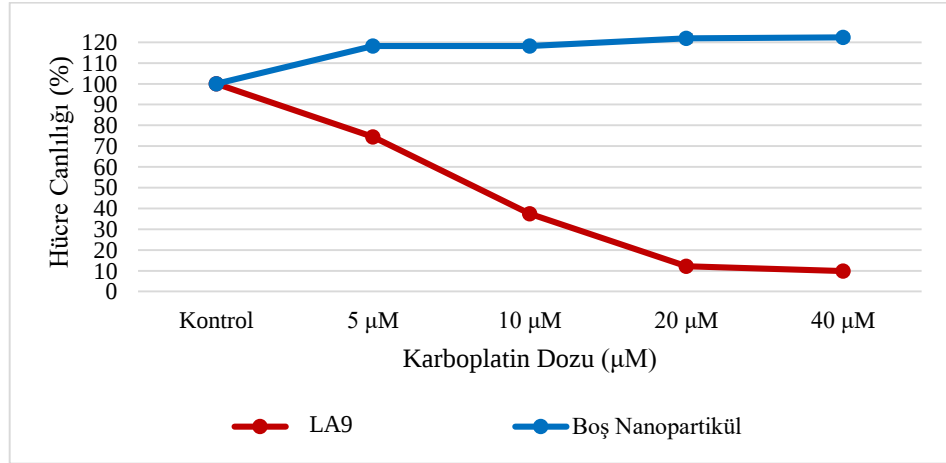
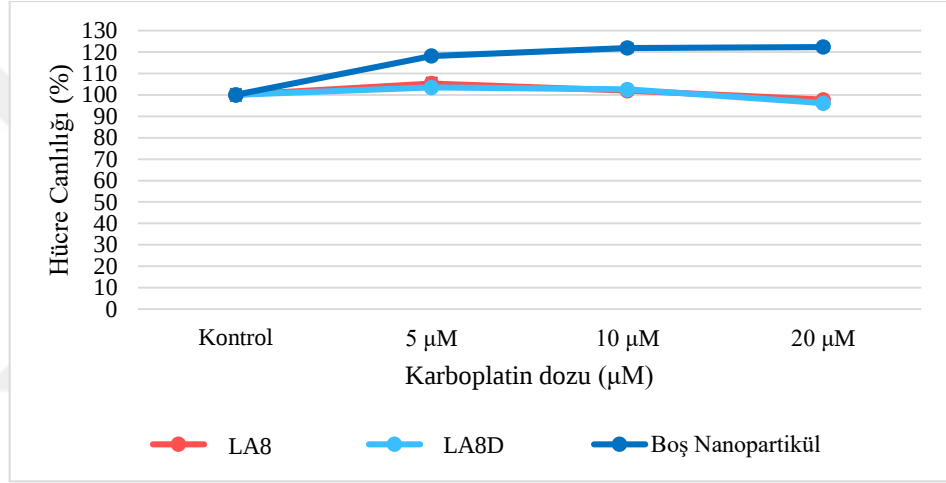
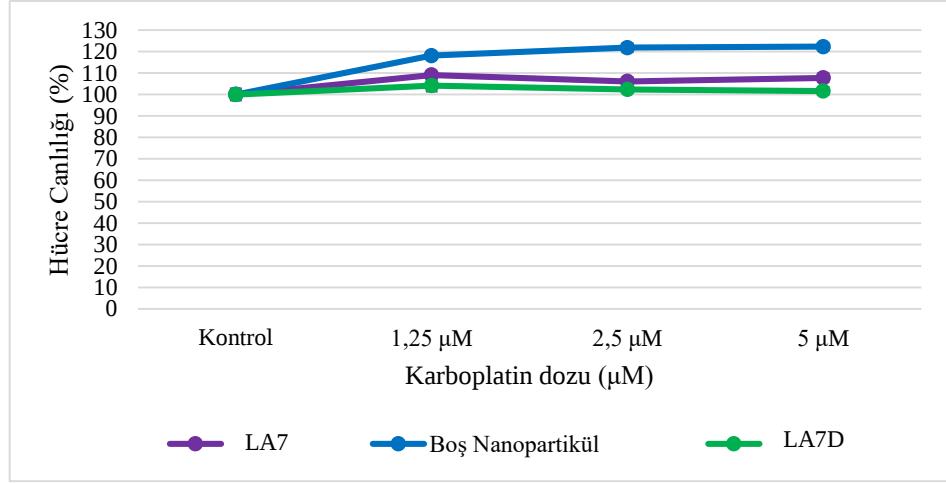
Şekil 3.35. Boş nanopartikül formülasyonu LA7, LA7D, LA8, LA8D ve LA9 kodlu formülasyonların A2780 hücre dizisi üzerindeki 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda sitotoksik etkileri.



Şekil 3.36. Boş nanopartikül formülasyonu, LA7, LA7D, LA8, LA8D ve LA9 kodlu formülasyonlarının A2780cis hücre dizisi üzerindeki 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda sitotoksik etkileri.



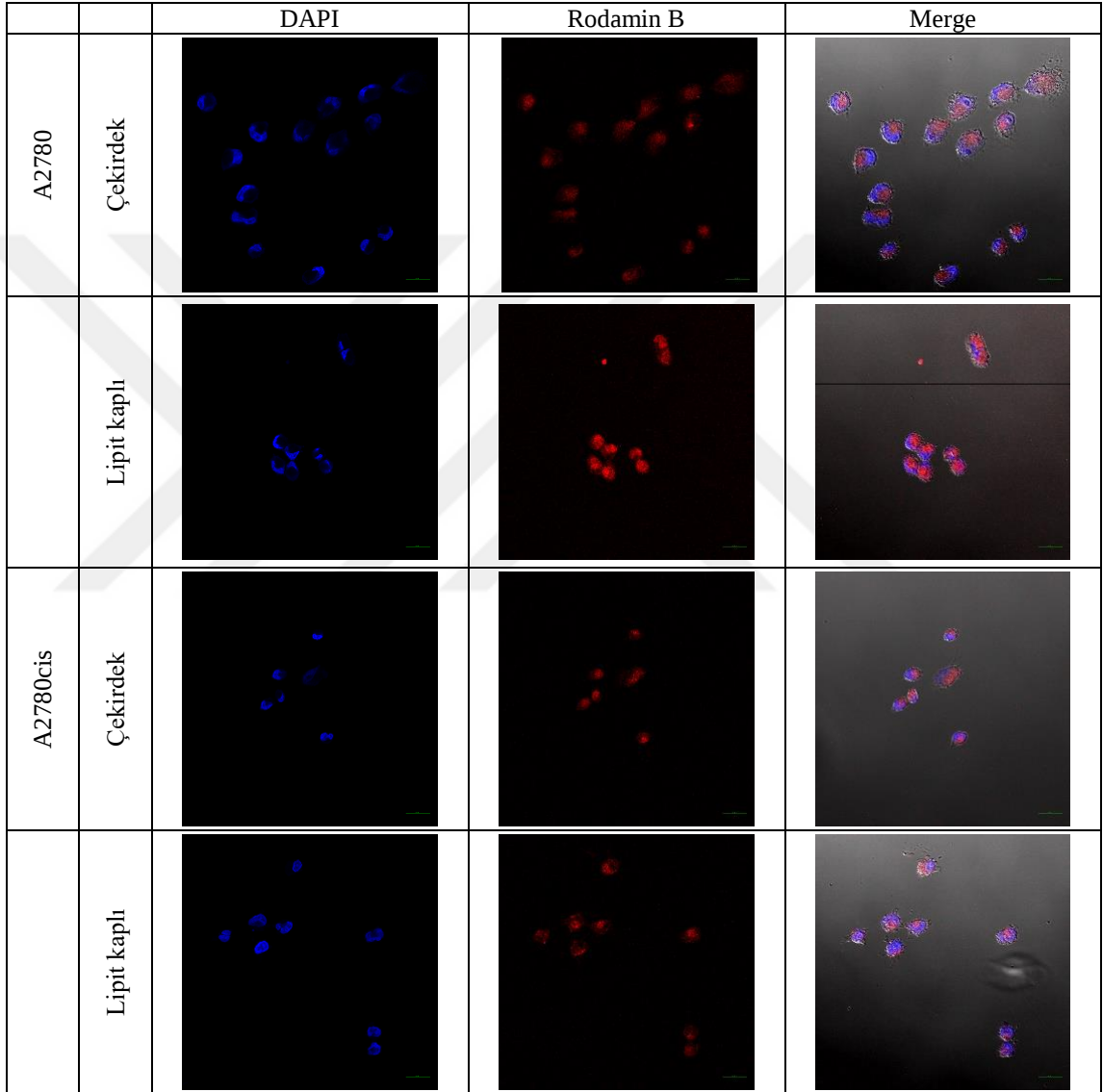
Şekil 3.37. Boş nanopartikül formülasyonu, LA7, LA7D, LA8, LA8D ve LA9 kodlu formülasyonlarının A2780cis hücre dizisi üzerindeki 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda sitotoksik etkileri.



Şekil 3.38. Boş nanopartikül formülasyonu, LA7, LA7D, LA8, LA8D ve LA9 kodlu formülasyonlarının A2780cis hücre dizisi üzerindeki 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda sitotoksik etkileri

3.6.4. Hücresel Alımın Konfokal Görüntüleme ile Belirlenmesi

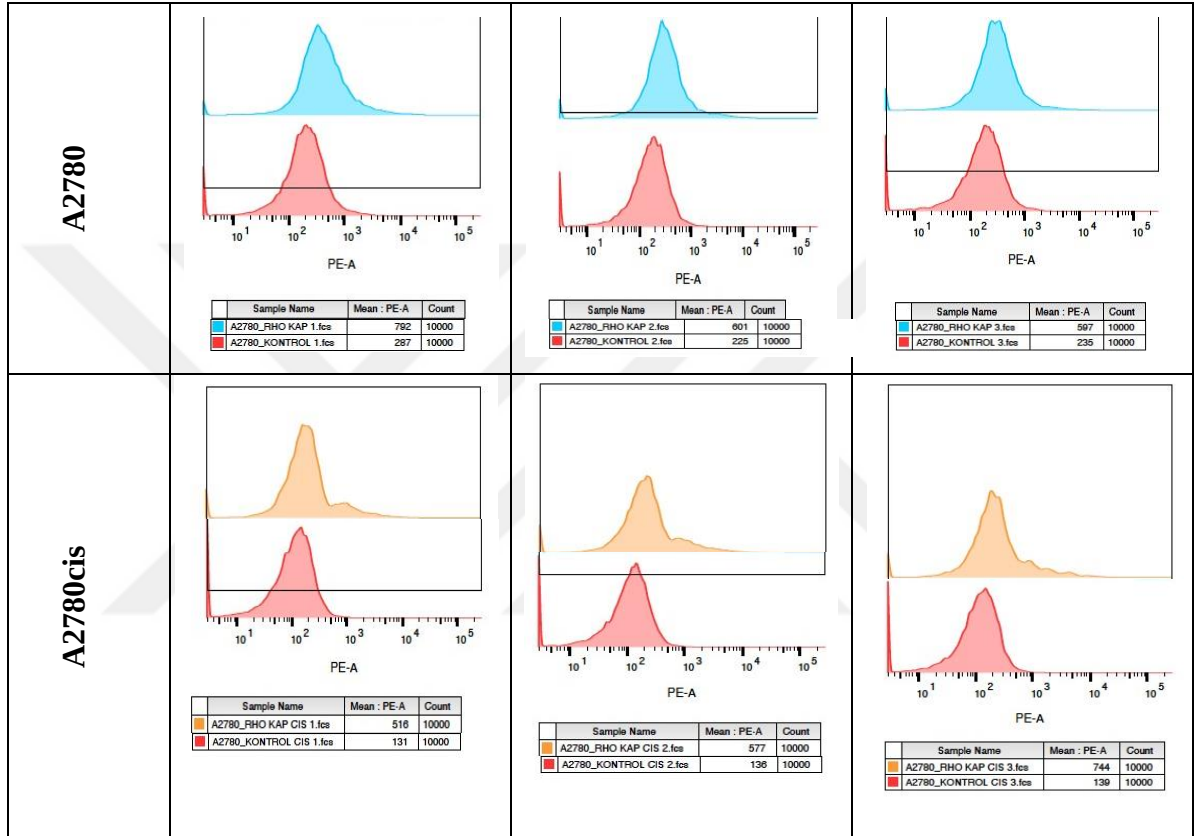
Bölüm 2.8.3'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen analizde rodamin B yüklü çekirdek ve lipit kaplı albümin nanopartiküllerin A2780 ve A2780cis hücre hatlarına alımlarına ait konfokal görüntüleri Şekil 3.39'da sunulmuştur.



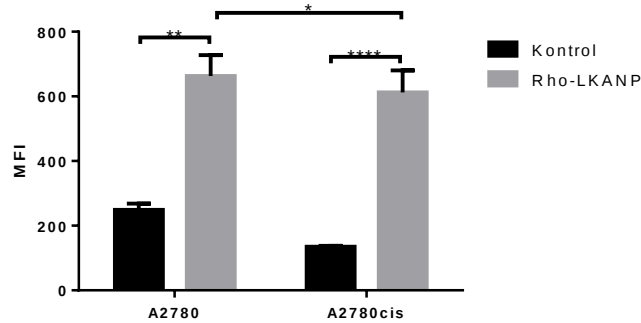
Şekil 3.39. Rodamin B yüklü albümin nanopartiküller ile lipit kaplı albümin nanopartiküllerin A2780 ve A2780cis hücre hatlarına alımının konfokal mikroskop ile görüntülenmesine ait bulgular.

3.6.5. Hücresel Alımın Akım Sitometrisi ile Belirlenmesi

Bölüm 2.8.4’te belirtilen şekilde gerçekleştirilen analizde rodamin B yüklü albümin ve lipid kaplı albümin nanopartiküllerin A2780 ve A2780cis hücre hatlarına alımının akım sitometrisi yöntemi ile belirlenmesine dair bulgular Şekil 3.40 ve Şekil 3.41’de sunulmuştur.



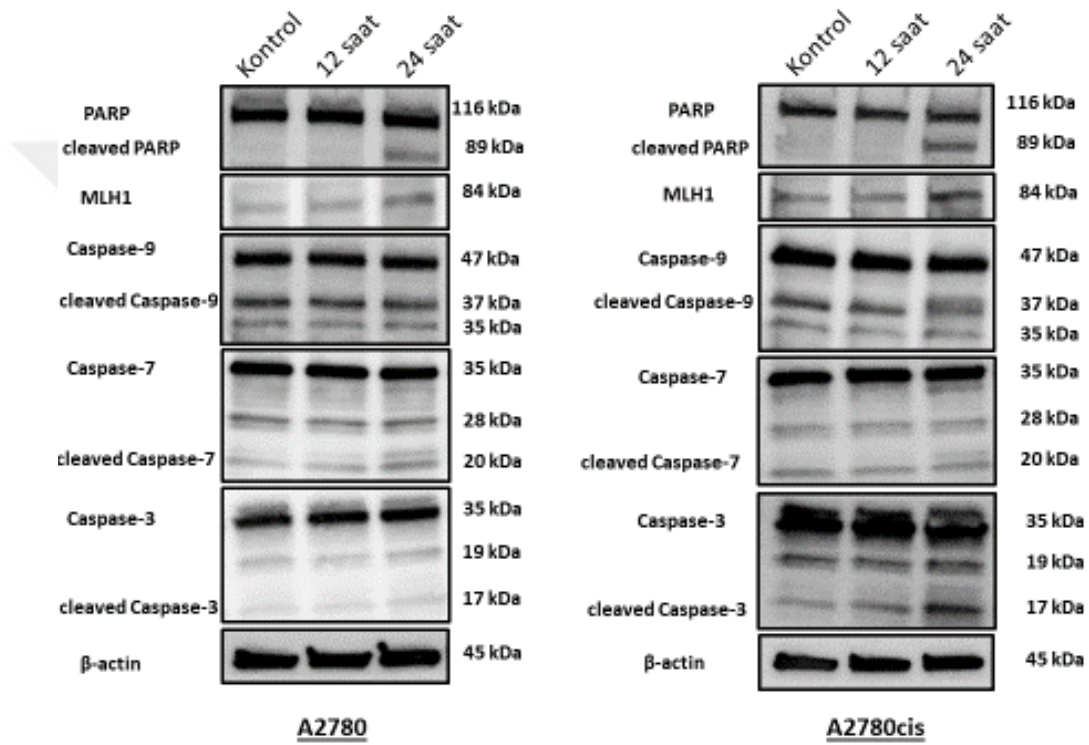
Şekil 3.40. Rodamin B yüklü albümin ve lipid kaplı albümin nanopartiküllerin A2780 ve A2780cis hücre hatlarına alımının akım sitometrisi yöntemi ile belirlenmesine dair bulgular.



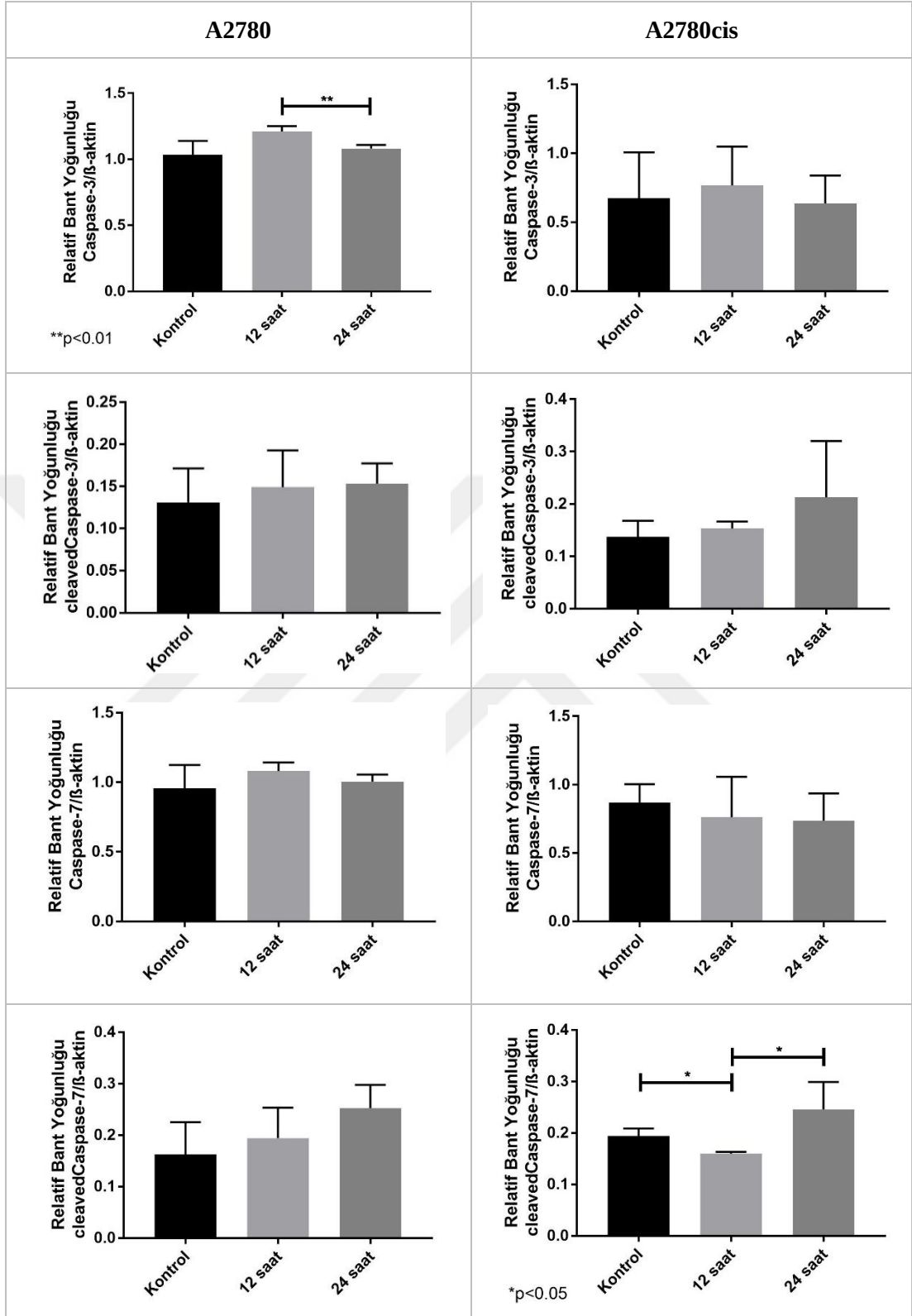
Şekil 3.41. A2780 ve A2780cis hücre hatlarına rodamin B yüklü lipid kaplı nanopartikül ve serbest rodamin B alımına ait akım sitometri deneyi sonuçları.

3.6.6. Apoptoz ve Direncin Modülasyonunun Western Blot Yöntemi ile Değerlendirilmesi

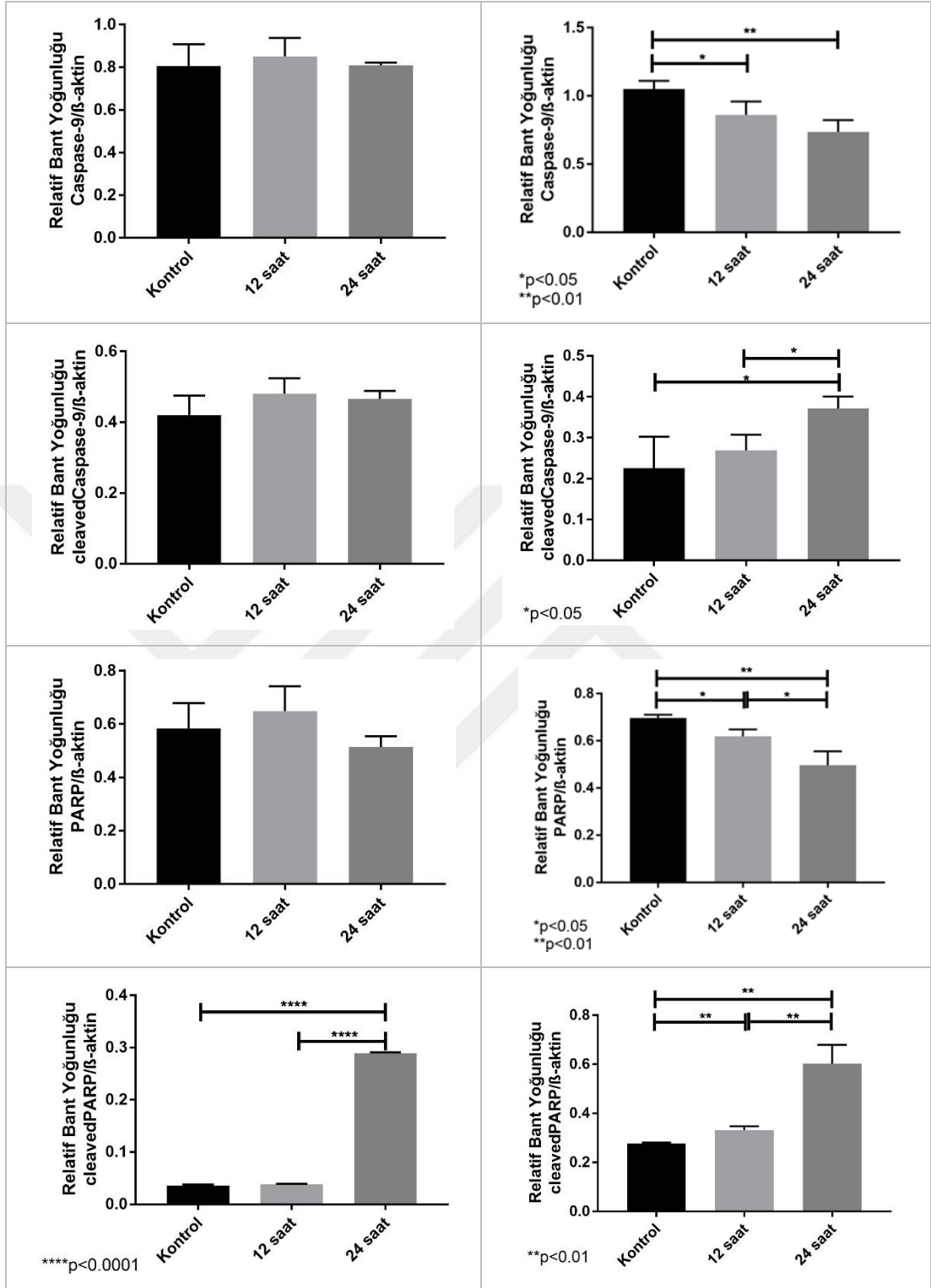
Western Blot yöntemi kullanılarak Bölüm 2.8.5'te anlatılan şekilde yapılan analizde A2780 insan over kanseri hücrelerinde ve platin dirençli A2780/cis hücrelerinde apoptotik yolak proteinleri ile MLH1 ekspresyonlarındaki değişikliklere dair sonuçlar Şekil 3.42-Şekil 3.44'te verilmiştir.



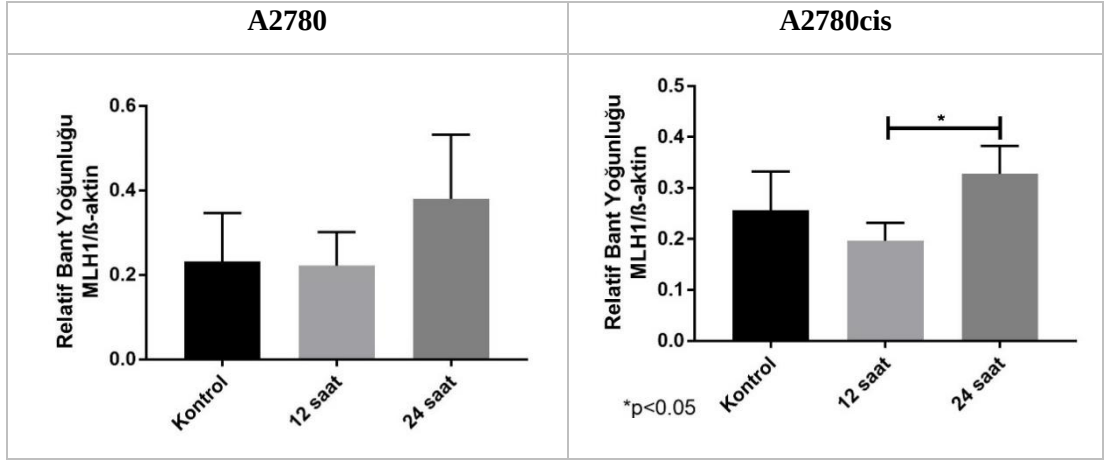
Şekil 3.42. A2780 ve A2780cis hücre dizilerinde LA9 kodlu formülasyon uygulamasından 12 ve 24 saat sonra Western Blot analizi ile elde edilen protein bantlarının görüntüsü.



Şekil 3.43. A2780 ve A2780cis hücre dizilerinde LA9 kodlu formülasyon uygulamasından 12 ve 24 saat sonra apoptotik yolak proteinlerinin Western Blot analiz sonuçları.



Şekil 3.43 Devam A2780 ve A2780cis hücre dizilerinde LA9 kodlu formülasyon uygulamasından 12 ve 24 saat sonra apoptotik yolak proteinlerinin Western Blot analiz sonuçları.



Şekil 3.44. A2780 ve A2780cis hücre dizilerinde LA9 kodlu formülasyon uygulamasından 12 ve 24 saat sonra MLH1 proteininin Western Blot analiz sonuçları

4. TARTIŞMA

4.1.Karboplatin ve Desitabinin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

4.1.1.Karboplatin ve Desitabinin Ultraviyole (UV) Spektrumunun Alınması

Karboplatin ve desitabinin ayrı ayrı $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda çözeltilerinin 200-400 nm dalga boyları arasında spektrumları alındığında Şekil 3.1’de görüldüğü gibi literatür ile uyumlu veriler elde edilmiştir. Di Pascua ve ark. (2006) ile Gozlan ve ark.’nın (2014) yaptığı çalışmalarda karboplatin; Lu ve ark.’nın (2014) yaptığı çalışmalarda ise desitabin için elde edilen spektrumlar Şekil 3.1’de yer alan spektrumlar ile paralellik göstermektedir.

4.1.2.Karboplatin ve Desitabinin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fouirer Transform Infrared - FT-IR) Spektrumunun Alınması

Karboplatin ve desitabinin kimyasal yapılarının aydınlatılması için 400-4000 cm^{-1} dalga sayıları arasında alınan FT-IR spektrumları (Şekil 3.2) Ahmed ve ark. (2014) ile Wysokiński ve ark. (2006) tarafından karboplatin için yapılan FT-IR analizleri ile; Neupane ve ark. (2013) tarafından desitabin için yapılan FT-IR analizleri ile paralellik göstermektedir.

4.1.3.Karboplatin ve Desitabinin X-Işını Toz Difraktometrisi

Karboplatin, Şekil 3.3a’da gösterildiği gibi $11,60^\circ$, $16,34^\circ$, $17,00^\circ$, $19,60^\circ$ ve $26,05^\circ\text{C}$ ’lerde beş temel pike sahiptir. Elde edilen difraktogram literatür ile paralellik göstermiştir (Mahmud ve ark., 2017). Desitabin ise Şekil 3.3b’de bulunun difraktogramda görüldüğü gibi $7,00^\circ$, $14,27^\circ$, $21,20^\circ$ ve $23,78^\circ\text{C}$ ’lerde 4 keskin pik

vermektedir. Elde edilen bu pikler literatür verileri ile uyumludur (Brus ve ark., 2016; Neupane ve ark., 2014).

4.1.4. Karboplatin ve Desitabinin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ile Analizi

Saf karboplatin ve desitabinin Şekil 3.4'te yer alan DSC termogramları incelendiğinde karboplatinin 253,28°C'de desitabinin 202,59°C'de erime piki verdiği ve bu piklerin literatürde yer alan karboplatin (Yang ve ark., 2015) ve desitabinin (Neupane ve ark., 2014) erime noktalarına ait termogramlar ile paralellik gösterdiği görülmüştür.

4.1.5. Karboplatin ve Desitabinin Aynı Anda Miktar Tayini İçin Analitik Yöntem Geliştirilmesi

Etkin maddelerimiz olan karboplatin ve desitabinin bozulma ürünlerinin varlığında uygun pik şekilleri ve uygun bir analiz süresiyle eş zamanlı olarak belirlenmesi için yeni bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Bu nedenle, sabit faz, hareketli faz bileşimi, hareketli faz konsantrasyonu, hareketli fazın pH'sı, akış hızı ve kolon fırın sıcaklığı gibi çeşitli parametreler değiştirilerek yeterli seçicilik ile ayırma sağlayabilen bir yöntem geliştirmeye çalışılmıştır. Başlangıç noktası olarak, XSelect (C18 4,6x250 mm; 5µm), XBridge™ (C18 4,6x250 mm; 5 µm), XTerra RP18 (4,6x250 mm; 5 µm) (Waters Corp., Millford, USA) gibi çeşitli analitik kolonlar test edilmiştir. Çizelge 3.1'de listelenen sistem uygunluk test sonuçları düşünüldüğünde yüksek ayırım etkinliği ve seçiciliği nedeniyle ileriki çalışmalar için XSelect (C18 4.6x250 mm; 5µm) kolonu seçilmiştir.

Sabit faz olarak kullanılacak uygun kolonun seçilmesinin ardından hareketli faz bileşiminde tampon çözeltisi ile birlikte iki farklı organik çözücü, asetonitril, metanol ve bunların farklı oranları denenmiştir. Organik çözücü olarak kullanılan asetonitrilin

metanol ile karşılaştırıldığında analiz süresi daha kısa olmasına rağmen pik şekilleri ve rezolüsyonları kabul edilebilir sınırlar içerisinde olmadığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla, karboplatin, desitabin ve bunların muhtemel bozunma ürünleri arasındaki daha iyi seçiciliği nedeniyle hareketli faz içerisindeki organik çözücü olarak metanol seçilmiştir. Hareketli faz içerisindeki metanol oranının analiz üzerindeki etkileri incelendiğinde ise artan metanol oranının sadece analiz süresini kısalttığı, ancak ayırımın etkinliğini azalttığı görülmüştür. Bu nedenlerle hareketli fazda %3 (h/h) metanol kullanılmasına karar verilmiştir (Çizelge 3.2).

Tampon çözeltisindeki H_3PO_4 konsantrasyonu, %0,05 ile %0,2 (h/h) arasında değiştirildiğinde ise rezolüsyonun tampon çözeltisinin konsantrasyonu ile ters orantılı olduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan, tampon konsantrasyonu %0,05'e düşürüldüğünde kuyruk faktörünün artması nedeniyle daha uygun bir seçiciliğe ulaşılabilmesi için, %0,1 H_3PO_4 konsantrasyonunda tampon çözeltisi kullanılmasına karar verilmiştir (Çizelge 3.3).

Analiz süresinin kısaltılabilmesi amacıyla hareketli fazın akış hızı, 0,75 ve 1 mL.dk⁻¹ olarak değiştirilmiş; ancak yüksek geri basınç değerleri nedeniyle, 1 mL.dk⁻¹'nin üzerine çıkılamamış, ileriki çalışmalar için 1 mL.min⁻¹ akış hızı tercih edilmiştir (Çizelge 3.3).

Araştırılan son parametre ise kolon fırını sıcaklığı olmuştur. Sıcaklık 25 ila 45 °C arasında değiştirildiğinde beklendiği gibi, kolon sıcaklığındaki artışla birlikte analiz süresi azalmış; ancak seçicilik ve rezolüsyon bu durumdan olumsuz etkilenmiştir. Bu nedenle sıcaklığın 25 °C'de sabit tutulmasına karar verilmiştir (Çizelge 3.4).

Yukarıdaki bilgiler ışığında Çizelge 3.5' te belirtilen optimum koşullar altında gerçekleştirilen analize ait sistem uygunluk test parametreleri (Çizelge 3.6) değerlendirildiğinde geliştirilen analitik yöntemin ilgili FDA ve ICH kılavuzlarına göre uygun olduğu görülmüştür (FDA, 2000; ICH Q2R1 Guideline, 2005).

4.1.6. Karboplatin ve Desitabinin Kalibrasyon Doğrularının Hazırlanması ve Analitik Validasyonu

Geliştirilen analitik yöntem ile karboplatin ve desitabin kombinasyonunun 0,5-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ aralığında 9 farklı konsantrasyonunda miktar tayinleri yapılarak konsantrasyona karşı elde edilen pik alanı verileri ile kalibrasyon doğruları çizilmiş (Şekil 3.6 ve 3.7) ve elde edilen kalibrasyon denklemleri kullanılarak yapılan tekrarlı analizler ile ICH Q2R1 kılavuzunda belirtildiği şekilde doğrusallık ve aralığı, doğruluk ve geri elde, kesinlik, seçicilik, teşhis ve tayin sınırları parametreleri değerlendirilerek analitik yöntemin validasyonu sağlanmıştır.

Etkin maddelerimizin kalibrasyon denklemleri göz önüne alındığında hem karboplatin hem de desitabine ait determinasyon katsayısının (R^2) 1,000 olduğu görülmektedir (Şekil 3.6 ve 3.7; Çizelge 3.7). Determinasyon katsayılarının 1 olması ise elde edilen pik alanlarına dayalı olarak hesaplanan konsantrasyon değerlerinin güvenilir olduğunu ve pik alanları ve konsantrasyon arasında doğrusal bir ilişki bulunduğunu göstermektedir (Şekil 3.8).

Doğruluk ve geri elde çalışmaları, düşük, orta ve yüksek olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda ve 6 tekrarlı şekilde gerçekleştirilmiştir. Karboplatin ve desitabin için hesaplanan % geri elde verilerine ait bağıl standart sapma oranlarının %2'den düşük olması hesaplanan konsantrasyon sonuçlarının doğruluğunu göstermiştir (Çizelge 3.8 ve 3.9).

Belirlenen koşullarda aynı stoktan hazırlanan birden fazla örneğin bir seri ölçümünün birbirine yakınlığını ifade eden kesinlik parametresi tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik şeklinde değerlendirilmiştir. Tekrarlanabilirliğin incelenmesi için üç farklı konsantrasyonda karboplatin ve desitabin içeren çözelti 6 tekrarlı olarak analiz edilmiş ve hesaplanan konsantrasyon verilerine ait bağıl standart sapma değerleri her iki etkin maddemiz için de %2'den düşük bulunmuştur (Çizelge 3.10 ve 3.11). Ara kesinlik çalışmalarında ise üç farklı konsantrasyondaki karboplatin ve desitabin çözeltisi ardışık günlerde 6 tekrarlı olacak şekilde analiz edilmiştir. Karboplatin için hesaplanan bağıl standart sapma değerleri tüm konsantrasyonlar için %2'den düşük bulunurken

(Çizelge 3.12), sulu çözeltisinin stabilitesinin zayıf olduğu bilinen desitabin (Wu ve ark., 2015) için tüm konsantrasyonlarda elde edilen bağıl standart sapma değerleri %2'den yüksektir (Çizelge 3.13). Bu sonuçlar ışığında analiz yönteminin karboplatin için kesin sonuçlar verdiği görülmektedir. Ancak desitabinin sulu çözeltideki stabilitesinin düşük olması ara kesinlik sonuçlarını olumsuz yönde etkilemiştir.

Seçicilik parametresinin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen bozunma çalışmaları (Şekil 3.9) ile lipit kaplı nanopartiküler sistemlerin üretim ve çözünme hızı çalışmaları sırasında yapılan analizlere ait kromatogramlar değerlendirildiğinde olası bozunma ürünlerinin ya da formülasyonlara ait herhangi bir bileşenin karboplatin ve desitabin pikleri ile girişim yapmadığı tespit edilmiştir. Bu durum, HPLC kullanılarak gerçekleştirilen analizlerin her iki etkin madde için de seçici olduğunu kanıtlamaktadır.

İncelenen son parametre olan teşhis ve tayin sınırlarının ise kalibrasyon doğrusundaki en küçük konsantrasyon olan 0,5'ten küçük olması ise etkin maddelerimizin uygulanan kalibrasyon aralığında tayin edilebileceğini göstermektedir (Çizelge 3.14).

Miktar tayin yönteminin, amaçlanan uygulama bakımından güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini kanıtlamak amacıyla uygulanan analitik yöntem validasyonuna ait tüm parametreler değerlendirildiğinde geliştirilen analitik yöntemin karboplatin ve desitabinin aynı anda analizi için uygun bir yöntem olduğu ve her iki etkin madde için de doğru ve kesin sonuçlar elde edilebildiği gösterilmiştir.

4.2. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları

Kanser kemoterapisinde tedavinin başarısızlığına sebep olan en önemli etkenlerden biri tedaviye gelişen dirençtir (Park ve ark., 2018). Tek bir kemoterapötik ajanın tümör tedavisinde etkili olamadığı bu durumda kombinasyon tedavisi olarak adlandırılan farklı etki mekanizmalarına sahip iki veya daha fazla ilacın aynı anda veya sırayla kullanımı günümüzde yaygın bir strateji haline gelmiştir (Hu ve ark., 2016).

Ancak kombinasyon tedavisi sırasında farklı etkin maddelerin sinerjik oranlarının korunamaması, hedef dokuya optimum zamanlama ile ulaşılabilmesi ya da etkin maddelerin farklı fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak farklı farmakokinetik profil ve biyodağılım göstermeleri tedavinin başarısızlıkla sonuçlanmasına veya beklenen etkinin elde edilememesine neden olmaktadır. Kombinasyon tedavisi ile yüklü nano-boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler ise serbest ilaçların kombinasyonu ile oluşan bu sınırlamaların önüne geçebilecek potansiyele sahiptir (Chen ve ark., 2017).

Antikanser bir etkin madde ile ilaç direncini inhibe edecek bir etkin maddenin dirençli tümör hücrelerine aynı nanotaşıyıcı sistem içerisinde bir arada verilmesi, etkin maddelerin oluşturduğu sinerjik etki ile ilaç direncinin üstesinden gelmek için önemli bir avantaj oluşturmaktadır (Zeng ve ark., 2017). Lipit kaplı polimerik nanopartiküller ise sahip oldukları farklı yapısal bölümler sayesinde farklı özellikteki birden çok etkin maddenin aynı anda taşınmasına olanak sağlamaktadırlar. Ayrıca nanoboyuttaki ilaç taşıyıcı sistemlerin pasif hedeflendirilmesi ile düşük dozla konvansiyonel tedavilere eşdeğer yüksek antikanserojen etki sağlanabilmekte ve sağlıklı doku ve hücrelerde minimum yan etki oluşumu gözlenmektedir (Garg ve ark., 2017; Li ve ark., 2015; Sengupta ve ark., 2005; Zhang ve ark., 2017; Zhao ve ark., 2015).

Çalışmamızda over kanseri gibi katı tümörlerin tedavisinde kullanılan geleneksel bir kemoterapötik olan karboplatin ile çeşitli çalışmalar vasıtasıyla epigenetik mekanizmalarla kazanılan ilaç direncinin geri çevrilmesinde etkili olduğu kanıtlanan desitabin sinerjik dozları korunarak lipit kaplı albümin nanopartiküllerin farklı bölümlerine enkapsüle edilmiş ve bu amaçla çift basamaklı üretim yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir.

4.2.1. Karboplatin Yüklü PCL ve PLGA Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

Nanopartikül hazırlama yöntemleri monomerlerin polimerizasyonuna dayanan yöntemler ve emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma, emülsiyon oluşturma-

çözücü difüzyonu, nanopresipitasyon, püskürterek kurutma gibi fizikokimyasal yöntemler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Iqbal ve ark., 2015; Reis ve ark., 2006). Emülsiyon oluşturma çözücü buharlaştırma yöntemi daha çok farmasötik endüstride kontrollü salım elde etmek amacıyla kullanılmaktadır. Nanopartikül içerisine enkapsüle edilebilecek etkin madde miktarı ise maddenin hidrofilik ya da hidrofobik oluşuna göre değişmektedir. S/Y tipi tekli emülsiyon yöntemi suda çözünürlüğü zayıf olan etkin maddeler için uygun olurken; çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi, tekli emülsiyon kullanıldığında hızla dış su fazına sızma eğilimi olan hidrofilik etkin maddelerin nanopartiküller içerisine enkapsülasyonu için yaygın olarak kullanılmakta ve suda çözünürlüğü yüksek etkin maddelerin yüksek oranda enkapsülasyonu sağlanmaktadır (Iqbal ve ark., 2015).

Suda çözünürlüğü yüksek bir etkin madde olan karboplatinin nanopartiküler sistem içerisine yüklenmesi çalışmalarında öncelikle hedeflenen partikül büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği, *in vitro* salım hızı gibi formülasyon özellikleri dikkate alındığında en uygun yöntemin S/Y/S çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi olduğu düşünülmüştür.

Formülasyon çalışmalarına polimer olarak PCL kullanılarak başlanmıştır (Çizelge 2.1). NP1 kodlu formülasyonda uygun partikül büyüklüğü elde edilmiş; enkapsülasyon etkinliği sadece %20,56'ya ulaşabilmiştir. Etkin maddenin enkapsülasyon miktarı üzerine etkisi olabileceği düşünülerek NP2 kodlu formülasyonda PVA yerine ayrı oranda farklı bir sürfaktan CTAB kullanılmıştır; ancak primer emülsiyon oluşmadığı için nanopartiküler bir sistem elde edilememiştir.

Song ve ark.'ları ile Govender ve ark.'nın yaptıkları çalışmalara göre dış su fazının pH'sının değiştirilmesi suda çözünürlüğü yüksek etkin maddelerin enkapsülasyon etkinliğini değiştirmektedir (Govender ve ark., 1999; Song ve ark., 2008). Bu bilgi ışığında, dış faz pH'sı, 6'dan karboplatinin çözünürlüğünün daha az olduğu bilinen pH 10'a çıkarılarak, karboplatinin nanopartikül formülasyonu üretim aşamasında dış su fazına sızma eğilimi en aza indirilmeye çalışılmıştır. Bu yöntemle pH 10'da hazırlanan NP3 ve NP4 kodlu formülasyonlarda enkapsülasyon etkinliği pH

6,0'da hazırlanan NP1 kodlu formülasyonda yaklaşık 2 katına, NP5 kodlu formülasyonda ise yaklaşık 1,5 katına çıkarılmıştır (Çizelge 3.15).

NP4 kodlu formülasyonda polimer olarak PCL yerine PLGA kullanıldığında partikül büyüklüğünde bir artış görülmesinin yanı sıra enkapsülasyon etkinliğinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür ($p<0,05$) (Çizelge 3.15).

NP5 kodlu formülasyonda yağ fazına primer emülsiyon stabilitesini artırmak amacıyla PEG 2000 eklenmiştir. PEG 2000 ilavesi yoluyla partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımı PEG 2000 kullanılmayan NP3 kodlu formülasyona kıyasla azalmış; ancak beklenenin aksine enkapsülasyon etkinliğinde ciddi bir düşme elde edilmiştir (Çizelge 3.15).

4.2.2. Karboplatin Yüklü Kitozan Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

Pozitif yüklü kitozan ile negatif yüklü çapraz bağlayıcıların fiziksel etkileşmelerine dayanan iyonik jelasyon yöntemiyle toksik kimyasal çapraz bağlayıcılar ve yüzey etkin maddelerin kullanımının önlenmesinin yanı sıra tamamen hidrofilik bir ortamda, organik çözücülerden ve yüksek stres koşullarından uzak gerçekleşen hazırlama süreci etkin maddelerin stabilitesine katkıda bulunmaktadır.

Karboplatin yüklü kitozan nanopartikül formülasyon çalışmalarında öncelikle polimer olarak farklı molekül ağırlıklı (düşük ve yüksek) kitozan kullanılmıştır. Yüksek molekül ağırlıklı kitozan ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında hedeflenen partikül büyüklüğü ve dağılımına ulaşamaması nedeniyle polimer olarak düşük molekül ağırlıklı kitozan seçilmiştir (Çizelge 2.2).

C2 ve C3 kodlu formülasyonlarda yüksek hidrofilik özelliğe sahip karboplatinin daha fazla etkileşime girerek partikül içerisinde daha fazla karboplatinin enkapsüle

olmasını sağlamak amacıyla PEG 2000 kullanılmış; ancak karboplatinin enkapsülasyonu üzerine olumlu bir etki sağlanamamıştır (Çizelge 3.16).

Formülasyonlarda diğer bir parametre olarak karboplatin miktarının değiştirilmesi düşünülmüş; fakat formülasyona ilave edilen karboplatin miktarı elde edilen nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerinde bir farklılık yaratmamıştır. Bu nedenle 5 mg karboplatin kullanılarak çalışmaya devam edilmiştir (Çizelge 3.16).

Formülasyonlarda çapraz bağlayıcı olarak arap zmkı ve sodyum tripolifosfat (TPP) kullanılmıştır. Her iki ajan ile de hedeflenen enkapsülasyon etkinliğine sahip nanopartikül formülasyonları elde edilememiştir (Çizelge 3.16).

Formülasyonların hazırlanma aşamasında etkin maddenin formülasyona ilave edilme aşaması değiştirilmiş ve karboplatinin enkapsülasyon etkinliği değerlendirilmiştir. Etkin madde C1, C2, C3, C5 kodlu formülasyonlarda çapraz bağlayıcı ajan içeren çözeltiye; C4, C6 kodlu formülasyonlarda ise kitozan çözeltisine eklenmiştir. Ancak sadece etkin maddenin kitozan çözeltisine eklendiği C6 formülasyonunda enkapsülasyon etkinliği diğer formülasyonların yaklaşık 3 katına ulaşmasına rağmen partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımı hedeflenen değerlerin çok üzerinde elde edilmiştir (Çizelge 3.16).

4.2.3. Karboplatin Yüklü Albümin Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

Desolvasyon yöntemi albümin nanopartiküllerin hazırlanması için yaygın olarak kullanılan bir yöntem olmakla birlikte hazırlama prosedürü pek çok farklı değişkenden etkilenir ve farklı fizikokimyasal özelliklere sahip nanopartiküller elde edilir. Çalışmamızda uygulanan desolvasyon yöntemini optimize edebilmek amacıyla glutaraldehit:BSA oranı, dispersiyon ortamının iyonik şiddeti, BSA çözeltisinin konsantrasyonu, desolvasyon ajanı/sulu faz oranı, farklı çapraz bağlama yöntemleri, BSA çözeltisinin pH'sı, yüzey etkin madde varlığı ve karıştırma hızı gibi formülasyon

ve işlem parametreleri değiştirilerek bu değişkenlerin elde edilen karboplatin yüklü albümin nanopartiküller üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

4.2.3.1.Farklı Glutaraldehit:BSA Oranlarının Etkisi

Desolvasyon yönteminde BSA çözeltisi üzerine alkol eklenmesiyle birlikte morfolojik olarak oluşan albümin partikülleri henüz stabil değildirler ve bir çapraz bağlama işlemi ile stabilize edilmeye ihtiyaç duyarlar. BSA proteini lizin kalıntılarındaki 60 amino grubu içerir. Oluşan albümin partiküllerindeki bu grupların glutaraldehit gibi aldehit grubu taşıyan bir ajan ile girdiği kondensasyon reaksiyonu sonucunda partiküller stabilize olurlar. Proteinin amino gruplarının çapraz bağlanma derecesi elde edilen partiküllerin stabilitesini, partikül büyüklüğünü, zeta potansiyelini, enkapsülasyon etkinliğini ve aynı zamanda etkin madde salım kinetiklerini etkiler (Li ve ark., 2008).

Çalışmamızda BSA miktarına oranla kullanılan farklı miktardaki glutaraldehitin elde edilen albümin nanopartiküller üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla BSA proteininin içerdiği amino gruplarını çapraz bağlamaya yetecek glutaraldehit miktarının %100, 40 ve 20'si kadar glutaraldehit kullanılarak AF1-AF3 kodlu albümin nanopartiküller hazırlanmıştır (Langer ve ark., 2008; Langer ve ark., 2003; Weber ve ark., 2000). Çizelge 3.17'de görüldüğü gibi Li ve ark.'nın çalışmasına paralel olarak eklenen glutaraldehit oranı arttıkça partikül büyüklüğü, enkapsülasyon etkinliği, yükleme kapasitesi azalmış, zeta potansiyel ise artmıştır. Artan glutaraldehit oranıyla birlikte albüminin çapraz bağlanma derecesinin artması sonucunda daha kompakt ve yüksek yoğunluklu, istatistiksel olarak anlamlı derecede küçük partiküller elde edilmiştir ($p<0,05$). Enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasitesindeki azalma ($p<0,05$) ise çapraz bağlama derecesiyle birlikte albümin nanopartikülün artan hidrofobik eğilimi nedeniyle hidrofilik özellikteki karboplatinin su fazına kaçma eğilimine bağlanmıştır (Li ve ark., 2008). Artan glutaraldehit miktarının enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasitesini olumsuz etkilemesi ve glutaraldehitin toksik etkileri göz önünde bulundurulduğunda Merodio ve ark.'nın (2001) yapmış

olduğu çalışmada da uygulandığı gibi 1,56µg/mg BSA oranında glutaraldehit kullanılarak çalışmalara devam edilmiştir.

4.2.3.2. Dispersiyon Ortamının Etkisi

Dispersiyon ortamının iyonik gücünün protein-protein etkileşmelerini önemli derecede etkilemesi finalde elde edilen nanopartiküllerin özelliklerini de etkilemektedir. Dispersiyon ortamındaki iyonik gücün, sodyum klorür (NaCl) gibi bir elektrolit eklenmesiyle artması, protein molekülleri arasındaki elektrostatik itme kuvvetlerini azaltacağı için partikül büyüklüğünün de artmasına neden olmaktadır (Galisteo-Gonzalez ve Molina-Bolivar, 2014; Langer ve ark., 2003). Tarhini ve ark.'nın (2018) BSA kullanarak yaptıkları çalışmada dispersiyon ortamının iyonik gücü 10 mM'dan 20 mM'a çıkarıldığında eklenen elektrolitin pozitif iyonları protein yüzeyindeki negatif yüklere tutunarak proteinin net yükünün azalmasına neden olmuş; bu durumda protein molekülleri arasındaki itme kuvvetleri azalarak spesifik olmayan etkileşimler yoluyla amorf agregatlar oluşturmuşlardır.

Çalışmamızda dispersiyon ortamının oluşan nanopartiküllerin *in vitro* özellikleri üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla AF1-AF3 kodlu formülasyonlar, dispersiyon ortamı olarak su yerine 10 mM NaCl çözeltisi kullanılarak AF4-AF6 kodlu formülasyonlar tekrar hazırlanmıştır. Tarhini ve ark.'nın (2018) çalışmasına benzer şekilde Çizelge 3.17'de ifade edildiği gibi tüm glutaraldehit:BSA oranlarında beklenildiği gibi dispersiyon ortamının iyonik gücünün artmasının partikül büyüklüğünü artırdığı, zeta potansiyelini azalttığı görülmüştür ($p < 0,05$). Ancak enkapsülasyon etkinliği iyonik güçten etkilenmemiştir. Elektrolit çözeltisinin karboplatin yüklü albümin nanopartiküllerin özellikle partikül büyüklüğü üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle çalışmaya dispersiyon ortamı olarak su kullanımı ile devam etme kararı alınmıştır.

4.2.3.3.BSA Konsantrasyonunun İncelenmesi

BSA konsantrasyonunun albümin nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri üzerine etkisi 1,56 µg/mg BSA oranında glutaraldehitte çapraz bağlanan pH 11'e ayarlanmış %5, 2,5 ve 2 (a/h) konsantrasyondaki BSA çözeltisiyle hazırlanmış AF7-AF9 kodlu albümin nanopartiküller formülasyonları üzerinde değerlendirilmiştir (Çizelge 3.18). Yapılan çalışmada BSA konsantrasyonu arttıkça partikül büyüklüğünün artma ve polidispersite indeksinin azalma eğilimi gösterdiği belirlenmiştir. BSA konsantrasyonu %2' den %2,5'a çıkarıldığında partikül büyüklüğü 255,4 nm'den 462,0 nm'ye çıkmış; bunun yanında PDI değeri 0,256'dan 0,124'e düşmüştür. Konsantrasyon %5'e çıkarıldığında ise alkol eklenmesinin ardından BSA'nın hızla agrege olarak çöktüğü görülmüş; bu nedenle nanopartikül oluşumu gerçekleşmemiştir. Galisteo-Gonzalez ve ark. yaptığı çalışmada BSA konsantrasyonu %1,2'den %10'a çıkarıldığında partikül büyüklüğü 75 nm'den 135 nm'ye çıkmış; PDI değeri ise azalmıştır. Bu durum klasik nükleasyon teorisi ile açıklanmıştır. Bu teoriye göre BSA konsantrasyonu arttıkça çözeltinin viskozitesi de artmakta ve proteinin su ile alkol arasındaki hareketi ise azalmaktadır. Böylece nükleasyon hızı azalarak daha büyük partiküllerin oluşumuna neden olmaktadır. Diğer yandan, daha yüksek bir BSA konsantrasyonu daha yüksek bir süpersatürasyon derecesine neden olarak, daha fazla ve daha küçük çekirdekler oluştururken aynı zamanda da, partiküllerin çarpışarak daha büyük nanopartiküller oluşturmak üzere aglomere olma ihtimalini artırmaktadır (Galisteo-Gonzalez ve Molina-Bolivar, 2014). Diğer yandan BSA konsantrasyonunun %2'den %2,5'a çıkması ile karboplatinin enkapsülasyon etkinliği %26,02'den %29,09'a çıkarak küçük bir artış göstermiştir ($p>0,05$).

4.2.3.4.Desolvasyon Ajanı:Sulu Faz Oranının Etkisinin İncelenmesi

Albümin nanopartiküllerin desolvasyon yöntemi ile üretiminde kullanılan etanol miktarı desolve edilen albümin miktarını doğrudan etkileyeceği için final ürün üzerinde de önemli etkilere sahiptir (Taneja ve Singh, 2018).

Desolvasyon kavramı, çözücü yer değiştirmesi sırasında oluşan ara yüzey türbülansına dayanmaktadır. İki çözücünün birbiriyle karışabilirliği sayesinde, eklenen nonsolvent hızla difüze olmaktadır. Bu difüzyon sırasında, protein termodinamik çözünürlük sınırını aşmakta ve sistem, protein nanopartiküllerinin çekirdeklenmesini indükleyecek şekilde davranmaktadır. Bir diğer deyişle, nanopartikül oluşumu eklenen nonsolvent hacmine bağlıdır. Desolvasyon ajanının hacmi, çözünenin süpersatürasyona ulaşması için yeterli değilse, çökme oluşmaz veya geniş bir dağılım gösteren düzensiz nanopartiküller oluşmaktadır (Tarhini ve ark., 2018). Diğer yandan gerekenden daha fazla etanol eklendiğinde ise düşen çözünürlüğe bağlı olarak albüminin tamamı büyük agregatlar halinde çökmektedir.

Görsel olarak değerlendirildiğinde sabit miktarda sulu faza eklenen etanol miktarı artırıldıkça sistemin opaklığı artmaktadır. 1:1 oranında etanol eklenmiş olan formülasyon transparan bir dispersiyon halinde iken etanol miktarı arttıkça daha opak beyaz bir görünümde dispersiyonlar elde edilmiştir. Formülasyonların bulanıklığındaki bu değişiklik ise oluşan partikül sayısına, partikül büyüklüğüne ve partikül büyüklüğü dağılımına bağlıdır (Tarhini ve ark., 2018). Weber ve ark.'nın çalışmasına göre desolvasyon işlemi iki ana kısımdan oluşur. Birincisi desolvasyon ajanının eklenmeye başladığı anda partikül büyüklüğünün arttığı kısım, ikincisi ise partikül büyüklüğünün sabit kaldığı; ancak oluşan partikül sayısının arttığı kısımdır (Weber ve ark., 2000). İlk aşamadaki artışın nedeni düşük konsantrasyonda etanol eklendiğinde protein moleküllerindeki hidrofobik zincirlerin etkileşimi sonucu oluşan agregasyondur. Etanol konsantrasyonu %50'nin (h:h) üstüne çıktığında ise daha küçük partikül büyüklüğüne ve daha dar bir partikül büyüklüğü dağılımına sahip albümin nanopartiküller oluşmaya başlamaktadır. Bunun nedeni ise ilk desolvasyon basamağında oluşan agregatların daha küçük partiküller oluşturmak üzere parçalanmasıdır (Taneja ve Singh, 2018).

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada Tarhini ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmaya paralel olarak formülasyonda kullanılan etanol oranı AF10 kodlu formülasyonda 2:1 iken AF11 kodlu formülasyonda 3:1'e artırıldığında partikül

büyükülüğü azalmış; ancak PDI artmış, yani partikül büyükülüğü dağılımı genişlemiştir ($p < 0,05$). Kullanılan etanol oranı AF9 kodlu formülasyonda 4:1'e çıkarıldığında Weber ve ark.'nın çalışmasına benzer şekilde partikül büyükülüğü, zeta potansiyel, enkapsülasyon etkinliği gibi parametreler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilememiştir (Çizelge 3.19).

4.2.3.5.Çapraz Bağlama Yönteminin Etkisi

Albümin gibi proteinlerin bir organik çözücü ile desolve edilmesinin ardından partikül yüzeyindeki amino gruplarının glutaraldehit ile çapraz bağlanması protein nanopartiküllerin hazırlanması için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Ancak partiküllerin termal yöntem kullanılarak (Steinhauser ve ark., 2008; Taneja ve Singh, 2018; Yu ve ark., 2014) protein nanopartiküllerin stabilize edilmesi de alternatif bir yol oluşturmaktadır. Termal denatürasyon yönteminde proteinin içerdiği karboksilik asit ve amino grupları kondensasyon reaksiyonuna girerek nanopartikülü stabilize etmektedirler. Reaksiyonun 50-60°C'de 24-48 saat boyunca sürmesi gerekirken, 70°C ve üzerinde kısa reaksiyon sürelerinde nanopartiküllerin stabilizasyonu gerçekleştirilebilmektedir (Weber ve ark., 2000).

Çalışmamızda farklı çapraz bağlama yöntemlerinin partiküller üzerindeki etkileri iki farklı pH'daki (pH 11,0 ve 7,2) formülasyon grupları üzerinde incelenmiştir (Çizelge 2.6). Desolvasyon basamağının ardından etanolla çözünürlüğü azaltılan albüminin oluşturduğu agregatlar 30 dk 70°C ısı uygulamasıyla (AF12 ve AF14 kodlu formülasyonlar) ya da 1,56 µg/mg BSA oranında glutaraldehit ile çapraz bağlanarak (AF11 ve AF13 kodlu formülasyonlar) stabilize edilmiştir (Çizelge 3.20). Her iki pH'da da elde edilen nanopartiküllerin partikül büyükülüğü ve polidispersite indeksi karşılaştırıldığında Yu ve ark.'nın çalışmasıyla paralel şekilde ısı uygulaması ile stabilize edilen albümin nanopartiküllerin partikül büyükülüğü glutaraldehit ile çapraz bağlanan formülasyonlardan daha yüksek bulunmuştur (Yu ve ark., 2014).

4.2.3.6.BSA Çözeltisi pH'sının Etkisi

BSA çözeltisinin pH'sı protein moleküllerinin yükünü etkileyerek albümin nanopartiküllerin *in vitro* özelliklerini, özellikle de partikül büyüklüğünü etkileyen en önemli formülasyon parametrelerinden biridir. İzoelektrik noktası 4,4 olan BSA için izoelektrik noktasından uzaklaştıkça partikül büyüklüğünün düşmesi beklenir (Galisteo-Gonzalez ve Molina-Bolivar, 2014). Yüksek pH'larda protein moleküllerinin negatif yükünün artması ile oluşan moleküller arası elektrostatik itme kuvveti, moleküllerin koagülasyonunu azaltmaktadır. Bunun sonucunda yüksek pH'larda partikül büyüklüğü azalmaktadır (Elzoghby ve ark., 2012; Galisteo-Gonzalez ve Molina-Bolivar, 2014; Langer ve ark., 2003; Li ve ark., 2009). Bunun aksine pH değeri izoelektrik noktaya yaklaştıkça (pH 5-6) proteinin net yükünde yaşanan azalmaya bağlı olarak BSA molekülleri arasındaki koagülasyon ve çekirdek oluşumu hızlanır (Galisteo-Gonzalez ve Molina-Bolivar, 2014).

BSA çözeltisinin pH'sının final ürün üzerine etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla BSA çözeltisinin doğal pH'sının (pH 7,2) yanında düşük (pH 5,0) ve yüksek pH'lara (pH 11,0) ayarlanmış BSA çözeltileriyle çalışılmıştır. AF15 kodlu formülasyonda pH 5,0'daki BSA çözeltisine alkol eklenmeye başlandığında albümin hızla çökerek makroskopik agregatlar oluşturmuş, nanopartikül oluşumuna izin vermemiştir. Diğer yandan Çizelge 3.21'de de görüldüğü gibi literatür verilerine uygun olarak pH 11,0'da hazırlanan AF10 kodlu albümin nanopartiküllerin büyüklüğü, pH 7,2'de hazırlanan AF13 kodlu nanopartiküllerden istatistiksel açıdan anlamlı ölçüde küçük bulunmuştur ($p < 0,05$). Sebak ve ark.'nın yaptığı çalışmada benzer şekilde pH 5,0-7,0 arasındaki partiküllerin pH 8,0'ın üzerinde hazırlanan partiküllerden daha büyük bir partikül büyüklüğüne ve daha geniş bir partikül büyüklüğü dağılımına sahip oldukları görülmüştür (Sebak ve ark., 2010). Pan ve ark. (2007) tarafından bir başka protein olan kazein ile yapılan çalışmada da aynı şekilde pH 5,0'da 300 nm, pH 10,0'da ise 100 nm partikül büyüklüğüne sahip partiküller elde edilmiştir. Bunun yanında literatür verileri ışığında BSA çözeltisinin pH'sındaki değişikliğin elde edilen nanopartiküllerin zeta potansiyelini de önemli ölçüde

etkilemesi beklenmiştir (Langer ve ark., 2003; Sebak ve ark., 2010; Tarhini ve ark., 2018). Ancak, çalışmamızda pH değişikliği zeta potansiyelde ve karboplatinin enkapsülasyon etkinliğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmamıştır.

BSA çözeltisinin pH'sı partikül büyüklüğünün yanı sıra elde edilen partiküllerin çözünme hızı profillerini de önemli ölçüde etkilemektedir. pH'sı 7,2'den büyük olan BSA çözeltisi ile hazırlanan karboplatin yüklü AF10 kodlu albümin nanopartiküllerden ilk 8 saat içerisinde ancak %5 karboplatin salımı gerçekleşirken, pH 7,2'de hazırlanan AF13 kodlu formülasyondan karboplatin salımı ilk 4 saatte %20'nin üzerine çıkmaktadır (Şekil 3.10).

4.2.3.7.Yüzey Etkin Madde Varlığının Etkisi

Matriks yapılı ilaç taşıyıcı sistemler için hidrofobik etkileşimler etkin maddenin sistem içerisine yüklenmesini ve daha sonrasında salımını etkilemektedir. Albümin gibi proteinlerin çapraz bağlanma sonucu artan hidrofobik eğilimleri suda çözünen etkin maddelerin enkapsülasyonunu kısıtlamaktadır. Yüzey etkin maddeler ise çapraz bağlanan hidrofobik taşıyıcı ve suda çözünürlüğü yüksek etkin madde arasında bir köprü görevi yaparak çapraz bağlayıcıdan kaynaklanan hidrofobik eğilimi dengelemektedir (Li ve ark., 2008). Su ve ark., suda çözünürlüğü yüksek olan sodyum ferulatın albümin nanopartiküller içerisine enkapsülasyonunu artırabilmek için enkapsülasyon prosedürünü %0,2 (a/h) poloksamer 188 varlığında gerçekleştirmişlerdir (Su ve ark., 2005). Taneja ve ark. ise terapötik ürünlerde çözünürlük artırmak ve stabilizasyonu sağlamak amacıyla yaygın olarak yer verilen polisorbat 80 kullanarak insan serum albümini (HSA) nanopartiküllerini stabilize etmeyi ve protein moleküllerinin hidrofilik eğilimini artırmayı amaçlamışlardır. Polisorbat 80'in hidrofobik kuyruk kısmı ile proteinin apolar aminoasitleri arasındaki etkileşimler sonucunda polisorbat 80-HSA kompleksinin çözünürlüğü artmış, alkol eklenmesiyle etkin madde olan irinotekanın çökmesi engellenmiş; aynı zamanda artan polisorbat 80 konsantrasyonuyla birlikte elde edilen partikül büyüklüğünde azalma gözlenmiştir (Taneja ve Singh, 2018).

Çalışmamızda %2 (a/h) BSA çözeltisi kullanılarak hazırlanan partiküllerin *in vitro* özellikleri incelenmiş ve yüzey etkin madde olarak Li ve ark.'nın çalışması baz alınarak poloksamer 188 tercih edilmiştir. Ancak beklenenin aksine artan poloksamer 188 konsantrasyonu ile birlikte enkapsülasyon etkinliğinde anlamlı bir artış gözlenmemiş; ancak partikül büyüklüğü 396 nm'den 585 yükselmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 3.22). *In vitro* çözünme hızı çalışmalarında elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde ise artan yüzey etkin madde konsantrasyonunun *in vitro* etkin madde çözünme hızını azalttığı belirlenmiştir (Şekil 3.11).

4.2.3.8.Karıştırma hızının etkisi

AF13 kodlu formülasyonun karıştırma hızı 600 rpm'den 1200 rpm'e çıkarıldığında elde edilen AF19 kodlu formülasyona ait *in vitro* özellikler Çizelge 3.23'te görülmektedir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde karıştırma hızının artırılmasının etkisiyle partikül büyüklüğü 396 nm'den 207 nm'ye kadar düştüğü ($p<0,05$); PDI değeri ve enkapsülasyon etkinliğinde anlamlı bir değişiklik olmadığı ($p>0,05$) görülmüştür. Bunun yanında Şekil 3.12'de görüldüğü gibi karıştırma hızının değiştirilmesi karboplatinin *in vitro* çözünme hızında herhangi bir değişikliğe sebep olmamıştır.

4.2.4.Optimum Karboplatin Yüklü Albümin Nanopartikül Formülasyonunun Belirlenmesi

Karboplatin yüklü albümin nanopartiküllerin optimizasyonu için öncelikle OFAT yaklaşımı kullanılarak elde edilen ürün üzerinde etkili olan değişkenler ön çalışmalarla belirlenmiş; daha sonra ise bu bağımsız değişkenlerin elde edilen ürün üzerindeki etkileri Box-Behnken tasarımı (BBD) ile incelenmiştir. Optimize edilen karboplatin yüklü albümin nanopartikül formülasyonu ise lipit kaplama işleminde çekirdek olarak seçilmiştir.

Literatürde farklı uygulamalara sahip birçok deneysel tasarım mevcuttur. Ancak en az sayıda deneme kullanılarak işlemleri optimize edebilmek için BBD tasarımı tercih edilmektedir. BBD, çoğaltılmış merkez noktalarından ve küpün her yüzeyinin orta noktasında bulunan ve ilgilenilen bölgeyi tanımlayan noktalardan oluşmaktadır (Şekil 1.9). BBD tasarımı, 3 veya daha fazla bağımsız değişkenle diğer tasarım şekillerine oranla daha az deney yapmayı gerektirmektedir. Bu nedenle, karboplatin yüklü albümin nanopartiküllerin optimizasyonu için BBD kullanılması tercih edilmiştir (Shaikh ve ark., 2017). Kullanılacak bağımsız değişkenler ve bunların seviyeleri daha önce belirtilen ön deneyler sonucunda belirlenmiştir. Ön deneylerin sonucuna göre bağımsız değişken olarak uygulanan BSA konsantrasyonu (X_1), desolvasyon ajanı:su fazı oranı (X_2) ve BSA:Glutaraldehit oranı (X_3) seçilmiş ve bunların Çizelge 2.10'da belirtilen 3 farklı seviyesi kullanılarak Çizelge 2.12'de yer alan 12 deney gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar ise bağımlı değişken olarak belirlenen partikül büyüklüğü (Y_1), partikül büyüklüğü dağılımı (Y_2) ve enkapsülasyon etkinliğinin (Y_3) Çizelge 2.11'de belirtilen hedefleri doğrultusunda değerlendirilmiş ve Çizelge 3.24'te yer alan sonuçlar elde edilmiştir.

Partikül büyüklüğü açısından; albümin konsantrasyonu, glutaraldehit:BSA oranı ve albümin oranının karesinin partikül büyüklüğü üzerinde anlamlı etkisi olduğu gösterilmiştir ($p<0,05$). Model grafikleri incelendiğinde hem glutaraldehit:BSA hem de etanol:sulu faz oranı sabit tutulduğunda albümin konsantrasyonunun %2'den %3'e çıkmasıyla partikül büyüklüğünün azaldığı; ancak %3'ten %4'e çıktığında yüksek oranda arttığı görülmüştür. Şekil 3.13a ve Şekil 3.13b incelendiğinde BSA konsantrasyonu sabit tutulduğunda etanol:sulu faz oranı ya da glutaraldehit:BSA oranındaki değişimin partikül büyüklüğünde anlamlı değişiklik yaratmadığı görülmektedir. Ayrıca Çizelge 3.25'te yer alan matematiksel eşitliklere bakıldığında da partikül büyüklüğü üzerine en çok etkisi olan bağımsız değişkenin BSA konsantrasyonu olduğu anlaşılmaktadır. Ancak Şekil 3.13c'de görüldüğü gibi sabit BSA konsantrasyonunda glutaraldehit ve etanol oranı değişimleri incelendiğinde düşük glutaraldehit oranında etanol oranındaki artış partikül büyüklüğünde artışa neden olurken yüksek glutaraldehit oranında etanol oranındaki artış partikül büyüklüğünde düşüşe neden olmaktadır. Bunun nedeninin düşük glutaraldehit

oranlarında albümin partiküllerinin yüzeyinde yer alan ve glutaraldehit ile çapraz bağlanmamış olan amin grupları nedeniyle yeteri kadar stabilize olamayan partiküllerin agrege olmaları; yüksek glutaraldehit seviyesinde ise albümin nanopartiküllerinin yeteri kadar stabilize olabilmesine bağlı olduğu düşünülmüştür. Diğer yandan hem düşük hem de yüksek etanol oranlarında hem yapılmış olan ön deneylere hem de Li ve ark. çalışmalarına paralel olarak glutaraldehit oranı azaldıkça partikül büyüklüğünde artış görülmüştür (Li ve ark., 2008).

Sonuçlar polidispersite indeksi açısından değerlendirildiğinde partikül büyüklüğünde olduğu gibi polidispersiteyi etkileyen en önemli değişkenin BSA konsantrasyonu olduğu görülmüştür (Çizelge 3.25). BSA konsantrasyonundaki artışın polidispersite indeksini artırdığı tespit edilmiş, BSA konsantrasyonu ile birlikte etanol:sulu faz oranının ya da glutaraldehit:BSA oranının bir arada artırılmasıyla polidispersite indeksinin tasarım sınırları içerisinde iken yüksek değere ulaştığı görülmüştür (Şekil 3.14a ve Şekil 3.14b). BSA oranı sabit tutulduğunda ise etanol:sulu faz oranındaki artışın oluşan partikül sayısındaki artışa bağlı olarak polidispersiteyi artırırken, glutaraldehit oranındaki artışın stabilitedeki artışa bağlı olarak polidispersite indeksini düşürdüğü saptanmıştır (Şekil 3.14c).

Enkapsülasyon etkinliği incelendiğinde ise, BSA konsantrasyonu arttıkça karboplatinin enkapsülasyon etkinliğinin arttığı; ancak düşük BSA konsantrasyonlarında hem glutaraldehit oranı sabit tutulup etanol:sulu faz oranı artırıldığında hem de etanol:sulu faz oranı sabit tutulup glutaraldehit oranı artırıldığında enkapsülasyon etkinliğinin arttığı tespit edilmiştir. Yüksek BSA konsantrasyonlarında ise hem glutaraldehit oranı sabit tutulup etanol:sulu faz oranı artırıldığında hem de etanol:sulu faz oranı sabit tutulup glutaraldehit oranı artırıldığında enkapsülasyon etkinliğinin azaldığı gözlenmiştir (Şekil 3.15). Bunun nedeninin artan glutaraldehit ile birlikte hidrofobik eğilimi artan albümin nanopartiküllerin suda çözünürlüğü yüksek olan karboplatin ile etkileşiminin azalması olduğu düşünülmüştür (Li ve ark., 2008).

Bağımsız değişkenlerin hazırlanan albümin nanopartikülleri üzerine etkileri incelendikten sonra tasarım sınırları içerisinde yer alan optimum formülasyonun seçilmesi için bağımlı değişkenlerden olan partikül büyüklüğünün ve polidispersite indeksinin en az, enkapsülasyon etkinliğinin ise en fazla olduğu noktalar Design Expert 7,0 yazılımı kullanılarak tespit edilmiş ve yazılım tarafından en uygun formülasyonun 7,80µg/mg glutaraldehit:BSA oranı, %3 BSA konsantrasyonu, 4:1 etanol:sulu faz oranı kullanılarak hazırlanabileceği saptanmış ve lipit kaplama işlemi çekirdek formülasyonlar belirtilen bağımsız değişken seviyeleri kullanılarak hazırlanan F4 kodlu formülasyonu ile gerçekleştirilmiştir.

4.2.5. Karboplatin Yüklü Albümin Nanopartiküllerin Lipit Tabaka ile Kaplanması

Çalışmamızda formülasyon geliştirme çalışmaları iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada albümin nanopartiküller hazırlanmış, ikinci aşamada final ürüne ulaşabilmek amacıyla çekirdek olarak adlandırılan albümin nanopartiküller uygun bir lipit tabaka ile kaplanmıştır. Finalde çekirdek içerisinde karboplatin, lipit tabaka içerisinde ise desitabin yüklü lipit kaplı kompleks bir nanopartiküler sistem hazırlanmıştır.

Çalışmamızda karboplatin yüklü albümin nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında yapılan ön çalışmalar ve optimizasyon çalışmaları değerlendirildiğinde optimum olarak belirlenen F4 formülasyonu kullanılarak gerçekleştirilen ön lipit kaplama çalışmalarında yapılan partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçümleri sonucunda lipit kaplı albümin nanopartiküllerinin partikül büyüklüklerinin ($p < 0.05$) ve zeta potansiyellerinin çekirdek albümin nanopartiküllere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.26). Bu durum çekirdek nanopartiküllerin başarıyla kaplandığının bir göstergesi olarak düşünülmüştür. Lesitin:kolesterol oranı 1:0.5 olan LA2 ve LA4 kodlu formüllerin partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksleri lesitin:kolesterol oranının 1:1 olduğu LA1 ve L3 kodlu formüllere göre daha düşük bulunmuştur. Formülasyonların partikül büyüklüğü ve

polidispersite indeksi değerlerindeki azalmanın, kaplama materyali olarak kullanılan amfifilik bir lipit olan lesitin daha yüksek oranda kullanılmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (Yan ve ark., 2017) (Çizelge 3.26). Şekil 3.22’de yer alan TEM görüntülemeleri göz önüne alındığında ise LA1 ve LA2 kodlu formülasyonlarda çekirdek albümin nanopartikülleri açık renkli küresel yapılar olarak görülürken lipit kaplama tabakası çekirdek çevresini kaplayan koyu renkli bir katman olarak görülmektedir. Ancak LA3 ve LA4 kodlu formülasyonların TEM görüntülerinde ise çekirdek albümin nanopartikülleri ile benzer şekilde koyu renkli küresel yapılar yer almaktadır. Bu durum zeta potansiyel ve partikül büyüklüğündeki değişime rağmen LA3 ve LA4 kodlu formülasyonlarda kaplamanın başarı ile gerçekleştirilemediğini, kullanılan lipit materyal miktarının var olan çekirdek nanopartikülleri kaplamak için yeterli olmadığını göstermiştir. Diğer yandan lipit membran yapısı içerisinde yer alan kolesterolün hidrokarbon zincirlerinin rotasyonel hareketi kısıtladığı, hidrokarbon zincirleri arasına su penetrasyonunu azalttığı aynı zamanda lipit tabaka içerisinde yer alan fosfolipitlerin yerleşimini sıkılaştırarak membranın akışkanlığını ve geçirgenliğini azalttığı bilinmektedir (Briuglia ve ark., 2015). Briuglia ve ark.’nın (2015) çalışmasında DPMC, DPPC ve DSPC kullanılan lipozomlarda lipit tabakada 1:1 (fosfolipit:kolesterol) oranında kolesterol içeren formülasyonlar ile 2:1 kolesterol içeren formülasyonlar kıyaslanmıştır. Partikül büyüklüğü, AFM, enkapsülasyon etkinliği ve *in vitro* çözünme hızı profilleri karşılaştırıldığında diğer pek çok çalışmada olduğu gibi 2:1 oranında kolesterol içeren formülasyonların ilaç taşınması için daha uygun karakteristik özelliklere sahip olduğu görülmüştür (Dadashzadeh ve ark., 2010; Guimaraes Sa Correia ve ark., 2017). Bu veriler ışığında lipit kaplama işleminin optimizasyon çalışmalarına LA2 formülasyonu kullanılarak devam edilmesine karar verilmiştir.

Lipit kaplı nanopartiküler sistemlerin çift basamaklı yöntem ile üretilmesinin en büyük sakıncası özellikle suda çözünürlüğü yüksek olan etkin maddeler için çekirdeğe yüklenmiş olan etkin maddenin kaplama işlemi sırasında dispersiyon ortamına sızmasıdır (Mandal ve ark., 2013). Çizelge 3.26’ya bakıldığında LA1-LA4 kodlu formülasyonlarda kaplama işlemi sırasında albümin nanopartiküle yüklenmiş olan karboplatinin %75’inden fazlasının nanopartiküllerin dispersiyon ortamına sızdığı

görülmüştür. Bu nedenle LA5 ve LA6 formülasyonlarında rehidrasyon çözeltisinin hacminin değiştirilmesi yolu ile karboplatin kaybının azaltılması hedeflenmiştir (Çizelge 3.27). Bu amaçla LA5 kodlu formülasyonda 10 ml yerine 5 ml dispersiyon ortamı kullanılarak karboplatin kaybı %79,61'den %57,98'e indirilmiştir ($p<0,05$). LA6 formülasyonunda ise dispersiyon ortamı hacmi 2 ml'ye indirilerek kaybedilen karboplatin oranı %13,65'a düşürülmüş ($p<0,05$), aynı zamanda lipit tabakaya yüklenen desitabin miktarı %36,59'a çıkarılmıştır. Bu durumda çalışmalara LA6 formülasyonu ile devam edilme kararı alınmıştır. Ayrıca LA5 ve LA6 formülasyonlarının tamamında partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri F4 formülasyonundan istatistiksel olarak anlamlı oranda farklı bulunmuştur ($p<0,05$) (Çizelge 3.27).

Farklı lipit bileşimlerinin lipit kaplamaya etkisi Çizelge 1.6'da zincir uzunlukları ve faz geçiş sıcaklıkları belirtilen fosfolipitler ve bu fosfolipitlerin yanında oleik asit kullanılarak değerlendirilmiştir.

Günümüzde giderek daha fazla ilgi çeken diğer bir yaklaşım ise içeriklerini ısı, ışık, ultrason ve manyetik alanlar gibi uyaranlara maruziyetleri sonrasında salan uyarana duyarlı ilaç taşıyıcı sistemlerdir (Lammers ve ark., 2012). Uyarana duyarlı nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemler, ışık ya da ultrason gibi dış uyaranlardan da etkilenebileceği gibi; kanser gibi spesifik hastalık durumlarında tümör ve tümör mikroçevresinde meydana gelen azalmış interstisyel pH, yüksek glutatyon konsantrasyonu veya matris metaloproteinazlar gibi belirli enzimlerin artan seviyeleri gibi spesifik endojen uyarıcılara da duyarlı olabilir ve içeriklerini salabilir (Mura ve ark., 2013). Zhao ve ark. (2018) romatoid artrit tedavisi için metotreksat yüklü pH-duyarlı lipit kaplı polimerik nanopartiküler sistemler geliştirmişler ve *in vitro* çözünme hızı çalışmalarında metotreksatın enflamasyonlu eklemlerin pH'sını taklit eden pH 5,0 fosfat tamponlu çözeltisinde, pH 7,4 PBS'den daha hızlı salındığını göstermişlerdir. Kanser fizyolojisi göz önüne alındığında ise tümör dokusu iskemik olduğunda hücrelerarası sıvı pH'sı anormal şekilde asitleşerek genellikle 6,5-6,7 arasında düştüğü bilinmektedir. Bununla birlikte, lizozomlar ile tümör hücrelerinin endozomları biraraya geldiğinde, hücre içi pH 5,0-6,5'e ve lizozom pH'sı ise 4,0-5,0'e düşmektedir.

Tümör mikroçevresi ile sağlıklı dokular arasındaki bu belirgin pH farkı, pH duyarlı nanopartiküler sistemler kullanılarak antikanser etkin maddelerin salımının kontrol edilmesinin etkili bir strateji olduğu kanıtlanmıştır (Tang ve ark., 2018). Örneğin Wang ve ark.'ları kanser hücrelerinin asidik ortamında içerdiği doksorubisini hızla salmak üzere hyaluronik asitle hedeflendirilmiş pH'ya duyarlı lipid kaplı mezoporöz silika nanopartiküller geliştirmişlerdir. pH'ya duyarlı lipid membran pH 7,4'te doksorubisinin hedef bölgesine ulaşmadan sızmasını engellemiş, pH 5,0'e düştüğünde ise doksorubisin salımı hızla gerçekleşmiştir. Hyaluronik asitle hedeflendirilmiş sistemler HeLa hücrelerinde aşırı eksprese edilen CD44 reseptörleri ile etkileşime girerek reseptör aracılı endositozla hücre içerisine etkin şekilde alınmış, buna bağlı olarak da sitotoksiteleri artmıştır (Wang ve ark., 2016). Bu pH değişiklikleri, pH'ya duyarlı lipozomlar düşünüldüğünde lipid tabakalarının morfolojik değişikliklerini tetikleyen fonksiyonel grupların protonasyonu/deprotonasyonu yoluyla lipozomal membranın geçirgenliğindeki değişiklikleri tetikleyebilir. Örneğin oleik asitin karboksil grubu, pH'ya bağlı olarak bir proton kaybedebilir veya alabilir ve bu şekilde moleküler yapısı değişir (Shu ve ark., 2014). Oleik asit gibi negatif yüklü bileşenlerin lipozom yapısına dahil edilmesi, membran yapısının faz dönüşümü yoluyla destabilize edilmesi sayesinde taşıdığı etkin maddenin seçici şekilde salınmasını sağlar (Lee ve Thompson, 2017). Oleik asit, doymuş lipid molekülleri ile etkileşerek ve jel fazındaki lipid membranların akışkanlığını artırmaktadır (Kurniawan ve ark., 2017). Torchilin ve ark. (1992) yaptıkları çalışmada oleik asit içerecek şekilde hazırladıkları pH-duyarlı lipozomlardan düşük pH'larda floresan boya salımının ve lipid membran permeabilitesinin oleik asit içermeyen lipozomlara göre önemli oranda arttığını göstermişlerdir.

Çalışmamızda karboplatin yüklü albümin nanopartikülleri kaplayan lipid tabakasına oleik asit eklenerek kanser hücrelerinde karboplatin ve desitabin salımının artırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla lipid film fosfolipit ve kolesterol ile birlikte Srisuk ve ark. (2012) uyguladığı 2,5:1 (fosfolipit:oleik asit) oranda oleik asit eklenerek oluşturulmuş ve oluşan film albümin nanopartiküller ile disperse edilmiştir. Oleik asit eklenmesi desitabinin enkapsülasyon etkinliğini etkilemezken fosfolipit olarak lesitin kullanıldığı LA7 formülasyonunda dispersiyon ortamına sızan karboplatin

miktarını azaltmış, DPPC kullanılan LA11 formülasyonunda etkili olmamış, DSPC ve DMPC kullanılan LA13 ve LA15 formülasyonlarında ise artırmıştır (Çizelge 3.28). Bunun yanında lesitin ve DPPC kullanılan formülasyonlarda partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksinin arttığı, DMPC ve DSPC kullanılan formülasyonlarda ise önemli miktarda azaldığı görülmüştür ($p<0,05$). Ayrıca oleik asit kullanılan ve kullanılmayan formülasyonlar karşılaştırıldığında negatif yüklü bir lipid olan oleik asit eklenmesiyle birlikte elde edilen lipid kaplı albümin nanopartiküllerin zeta potansiyellerinde ciddi bir düşüş olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Diğer yandan pH 5,5 fosfat tamponu kullanılarak gerçekleştirilen *in vitro* çözünme hızı çalışmalarında hem lesitin ile hazırlanan LA6 ve LA7 hem de DPPC kullanılarak hazırlanan LA10 ve LA11 kodlu formülasyonlardan kullanılan fosfolipit tipinden bağımsız olarak oleik asit varlığında benzer pek çok çalışmada olduğu gibi daha fazla miktarda desitabin salımı olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.17 ve Şekil 3.18) (Srisuk ve ark., 2012; Torchilin ve ark., 1992).

Kullanılan lipidlerin farklı uzunluktaki hidrofobik zincirleri farklı faz geçiş sıcaklıklarına sahip olmalarına neden olmaktadır. Fosfolipitin zincir uzunluğu arttıkça faz geçiş sıcaklığı da artmaktadır. Faz geçiş sıcaklığı, maddenin yarısının sıvı, diğer yarısının ise katı veya jel benzeri halde olduğu sıcaklık olarak tanımlanabilir. Lipitlerin zincir uzunluğu ve doymunluğu faz geçiş sıcaklığının yanı sıra oluşturulan lipid membranların geçirgenliğini de etkilemektedir. Artan zincir uzunluğu daha katı, daha stabil ve daha az sızıntıya neden olabilecek bir lipid membranlar oluşmasını sağlamaktadır (Anderson ve Omri, 2004). Çalışmamızda aynı oranda soya lesitini, DMPC, DPPC ve DSPC içeren formülasyonlar incelendiğinde literatür verilerine paralel şekilde kaplama işlemi sırasında en uzun zincir uzunluğu ve dolayısıyla en yüksek faz geçiş sıcaklığına sahip olan DSPC'nin kullanıldığı formülasyonda diğer formülasyonlara göre daha az karboplatinin dispersiyon ortamına sızdığı tespit edilmiştir (Çizelge 3.28).

Çalışmalarda DMPC gibi kısa zincir uzunluğuna sahip fosfolipitlerle oluşturulan lipozomların daha yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip olduğunu gösterilmesine (Chang ve Flanagan, 1995) rağmen, gerçekleştirmiş olduğumuz çalışmada DMPC

(LA14 kodlu formülasyon) kullanılarak yapılan kaplama işlemlerinde soya lesitini (LA6 kodlu formülasyon), DPPC (LA10 kodlu formülasyon) ve DSPC (LA12 kodlu formülasyon) kullanılarak yapılan kaplamaya göre desitabin için, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte ($p>0,05$), daha düşük enkapsülasyon etkinliği elde edilmiştir. Bunun yanında farklı lipit bileşimlerinin desitabinin çözünme hızı üzerine etkisi lesitin ile hazırlanan LA6 ve LA7 ile DPPC ile hazırlanan LA10 ve LA11 kodlu formülasyonlar üzerinde incelenmiştir. *In vitro* çözünme hızı çalışmalarının sonunda DPPC ile hazırlanan formülasyonlardan oleik asit varlığından bağımsız olarak lesitin ile hazırlanan formülasyonlara kıyasla daha az oranda desitabin salımı gerçekleşmiştir (Şekil 3.19).

4.2.6. Geçirimli Elektron Mikroskopu Analizleri

Çekirdek ve lipit kaplı nanopartiküllerin morfolojik incelemeleri TEM aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen TEM görüntülerinde hem çekirdek hem de lipit kaplı albümin nanopartiküllerin küresel şekle ve monodispers denilebilecek bir dağılıma sahip olduğu görülmüştür. Şekil 3.22’de pek çok çalışmada olduğu gibi çekirdek albümin nanopartiküller negatif boyama neticesinde koyu renkli küresel yapılar şeklinde görünürken, lipit kaplı formülasyonlarda kaplı partiküllerin çekirdek kısımları açık renkli, kaplama tabakası ise partiküllerin çevresindeki koyu renkli çeper şeklinde görüntülenmiş ve kaplama tabakasının varlığı literatür ile uyumlu şekilde görüntülenmiştir (Chan ve ark., 2009; Li ve ark., 2015; Meng ve ark., 2015). Şekil 3.23’te ise yapısında oleik asit içermeyen LA6 ve oleik asit içeren LA7 formülasyonları negatif boyama yapılmaksızın yüksek kontrast modunda görüntülenmiştir. Yapılan bu görüntüleme de lipit kaplama tabakasının kalınlığı net olarak ölçülebilmıştır. LA6 ve LA7 kodlu formülasyonlarda lipit kaplama kalınlığı yapılan DLS ölçümleri ile paralel şekilde 10-40 nm arasında değişmiştir. Ancak bunun yanında elde edilen tüm TEM görüntülerinde nanopartiküllerin partikül büyüklüğü literatürde yer alan pek çok çalışmada olduğu gibi DLS ile ölçülen hidrodinamik çaptan daha küçük bulunmuştur (Lee ve ark., 2013; Souza ve ark., 2016).

4.2.7. Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM) Analizi

Karboplatin yüklü çekirdek albümin nanopartiküller ve lipit kaplı albümin nanopartiküllerin morfolojik özellikleri TEM görüntülemelerinin yanı sıra AFM yöntemi kullanılarak da değerlendirilmiştir (Şekil 3.24). AFM görüntülerine bakıldığında çekirdek nanopartiküllerin düzgün küresel şekilli, monodispers denilebilecek bir dağılıma sahip olan partiküller olduğu, lipit kaplı nanopartiküllerin ise daha geniş bir partikül büyüklüğü dağılımı gösterdiği görülmüştür. Bu durum DLS yöntemi ile ölçülen PDI değerlerini destekler niteliktedir. Bunun yanında LA7 formülasyonunun LA2 ve LA4 kodlu formülasyonlara kıyasla daha düzgün bir dispersiyon oluşturduğu görülmüştür. Bu durumun ise LA7 kodlu formülasyonun LA2 ve LA4 formülasyonlarına göre daha yüksek olan zeta potansiyeli agregasyon oluşumuna daha az eğilimi olmasına bağlanmıştır.

4.2.8. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizleri

Çalışmamızda, final üründe kullandığımız polimer ve lipitler ile etkin maddelerimizin arasında herhangi bir etkileşimin olup olmadığının belirlenebilmesi ve etkin maddelerin nanopartiküler yapı içerisindeki fiziksel durumunun saptanabilmesi amacıyla DSC analizi yapılmıştır. Etkin maddelerimiz olan karboplatin ve desitabin ve formülasyon bileşenlerimizin yanı sıra BSA, lesitin, kolesterol, oleik asit ile birlikte çekirdek nanopartikül ve final formülasyon olan karboplatin ve desitabin yüklü lipit kaplı albümin nanopartiküllerinin 25-300°C arasında DSC termogramları çekilmiştir (Şekil 3.25). Bunun yanında hem albümin hem de lipit kaplı albümin nanopartikül formülasyonlarının DSC termogramları incelendiğinde saf karboplatin ve desitabine ait bir erime piklerinin görülmemesi nedeniyle karboplatin ve desitabinin formülasyonlar içerisinde amorf halde bulunduğu, homojen şekilde disperse edildiği ve bunun yanında formülasyonda herhangi bir geçimsizlik olmadığı tespit edilmiştir. Diğer yandan daha önce yapılmış çalışmalarla benzer şekilde 160°C’de lesitine (Amasya ve ark., 2019; Tahir ve ark., 2019) ve 150°C’de kolesterole (Patel ve ark., 2009) ait pikler elde edilmiştir.

4.2.9. X-ışını Kırınımı (XRD) Analizi

Karboplatin ve desitabinin x-ışını difraktogramlarında (Şekil 3.3) etkin maddelerin kristal yapıları nedeniyle keskin sivri pikler görülürken Şekil 3.26'da görülen karboplatin ve desitabin yüklü lipit kaplı albümin nanopartikül difraktogramında keskin piklere rastlanmamıştır. Bu durum DSC termogramlarını destekler şekilde etkin maddelerin partikül matrisi içerisinde amorf yapıda disperse olduğunu göstermektedir (P. Jain ve ark., 2016; Jose ve ark., 2016). Lipit kaplı albümin nanopartiküllerin kaplama tabakası kalınlığı XRD-SAXS (Small-Angle X-ray Scattering) yöntemi ile tayin edilmeye çalışılmış; ancak formülasyonlarda yer alan lipit kaplamanın işlem sırasında uygulanan yüksek voltaj nedeniyle erimesi ve formülasyonların SAXS analizi için uygun olmayan partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi nedeniyle analiz başarıyla sonuçlandırılmamış ve tekrarlanabilir bir tabaka kalınlığı verisi elde edilememiştir.

4.2.10. Stabilité Çalışmaları

Karboplatin ve desitabin yüklü lipit kaplı albümin nanopartikül formülasyonlarının stabilite çalışmaları 5 ve 25 °C olmak üzere iki farklı sıcaklık değerinde gerçekleştirilmiş ve 3 ay sonunda partikül büyüklüğü, polidispersite, zeta potansiyel ölçümleri ile TEM görüntülemeleri ve DSC analizleri yapılmıştır.

5°C'de yapılan stabilite çalışması sonucunda partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel ölçümleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark görülmezken, 25°C'de polidispersite indeksinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiş, ancak partikül büyüklüğü ($p<0,0001$) ve zeta potansiyel değeri ($p<0,001$) istatistiksel olarak anlamlı oranda artış göstermiştir (Çizelge 3.29). Bunun yanında 3. ay sonunda gerçekleştirilen TEM görüntüleri (Şekil 3.27) incelendiğinde başlangıç TEM görüntüleri ile önemli farklılıklar bulunmadığı, partikül büyüklüğü ve kaplama yapısının korunduğu görülmüştür. DSC analizleri (Şekil 3.28) değerlendirildiğinde ise başlangıç ve 3. ay DSC termogramları arasında herhangi bir farklılığın olmadığı tespit

edilmiştir. Bu veriler ışığında 3 ay sonunda 5°C’de karboplatin ve desitabin yüklü lipit kaplı albümin nanopartikül formülasyonlarının stabilitesini koruduğu sonucuna varılmıştır.

4.3.Sterilizasyon Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak olan lipit kaplı nanopartikül formülasyonları 25 kGy gama radyasyon ile sterilize edilmiştir. Uygulanan radyasyonun formülasyonlar üzerindeki etkileri partikül büyüklüğü, partikül büyüklüğü dağılımı, zeta potansiyeli, TEM görüntüleri ile değerlendirilmiştir.

Sterilizasyon işlemi sonrasında yapılan analizler sonucunda sterilizasyon işleminin hem partikül büyüklüğünde ($p<0,05$) hem de zeta potansiyelde ($p<0,0001$) istatistiksel olarak anlamlı oranda artışa neden olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.30). Ancak sterilizasyon işleminden sonra alınan TEM görüntüleri (Şekil 3.29) incelendiğinde başlangıç TEM görüntüleri ile önemli farklılıklar bulunmadığı, partikül büyüklüğü ve kaplama yapısının korunduğu tespit edilmiştir.

4.4.İn vitro Hücre Kültürü Çalışmaları

4.4.1.Sitotoksikite Çalışmaları

DNA yanlış eşleşme tamir yolağı karboplatin gibi antineoplastik etkin maddelerin etkinliği açısından önemli rol oynamaktadır. Hasarlı bir yanlış eşleşme tamir yolağına sahip olan hücrelerin platin bazlı kemoterapötiklere bu yolağın düzgün çalıştığı hücrelerden 2-4 kat daha dirençli olduğu bilinmektedir (O'Brien ve Brown, 2006). Serbest etkin maddelerimizle yaptığımız MTT analizlerinde de bu bilgiyle paralel olacak şekilde platin bazlı kemoterapötiklere dirençli A2780cis hücre dizisinde, duyarlı A2780 hücre dizine kıyasla daha yüksek dozlarda sitotoksik etki

göstermiştir. Saf karboplatin ile yapılan çalışmada A2780 hücre dizisinde literatür çalışması ile paralel şekilde 80 μM karboplatin dozunda sitotoksik etki görülürken (Hassanzadeganroudsari ve ark., 2019), A2780cis hücre dizisinde 160 μM dozda hücre canlılığı %83'e, 320 μM dozda ise %8'e gerilemiştir (Şekil 3.32). Saf desitabinin sitotoksikite profili incelendiğinde ise desitabinin A2780 hücre dizisinde 8-128 μM doz aralığında hücre canlılığının %50'ye gerilediği, 256 μM dozda ise canlılığın %63'e yükseldiği görülmektedir. Ancak A2780cis hücre dizisinde Balch ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada bir başka platin dirençli A2780 hücre dizisi olan A2780/CP hücre dizisinde olduğu gibi, 1-256 μM doz aralığında desitabin sitotoksik etki göstermemiştir. Bu veri ışığında kombinasyon çalışmalarında her iki hücre dizisinde de sitotoksik etki göstermeyen en yüksek desitabin dozu olan 4 μM kullanılması uygun bulunmuştur.

Desitabin ve karboplatin kombinasyonu Çizelge 2.16'da belirtilen ardışık desitabin ve karboplatin, aynı anda desitabin ve karboplatin, desitabin uygulamasının ardından aynı anda desitabin ve karboplatin uygulaması olmak üzere üç farklı tedavi stratejisi ile gerçekleştirilmiştir. Aynı anda desitabin ve karboplatin uygulamasında karboplatinin sitotoksik etkisini azalttığı, ardışık desitabin ve karboplatin uygulamasında ise desitabinin karboplatinin sitotoksik etkisine olumlu ya da olumsuz bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Desitabin uygulamasının ardından aynı anda desitabin ve karboplatin uygulamasında ise A2780 hücre dizisinde 40 μM karboplatin dozunda, A2780cis hücre dizisinde ise 160 μM dozda ise hücre canlılığının %45'e gerilediği görülmüştür (Şekil 3.32).

Desitabin ve karboplatin yüklü lipit kaplı albümin nanopartiküllerin sitotoksikite çalışmaları doza ve zamana bağlı olarak yürütülmüştür. Boş nanopartiküller ile LA7, LA7D, LA8, LA8D ve LA9 kodlu formülasyonların 4 μM desitabin ve 1,25-40 μM doz aralığında karboplatin içerecek şekilde değişik dozlarının sitotoksik etkileri 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde değerlendirilmiştir. Boş nanopartiküller A2780 hücre dizisinde hücre canlılığını en az %95'e geriletirken, A2780cis hücre dizisinde ise hücre canlılığını azaltmamıştır. Bu veriler ışığında boş nanopartiküllerin A2780 ve A2780cis hücre dizileri üzerinde sitotoksik etki oluşturmadığı sonucuna varılmıştır.

Lipit kabuk kısmında desitabin ve çekirdek kısmında ise karboplatin içeren LA7 kodlu formülasyonun sitotoksikite profili değerlendirildiğinde LA7 kodlu nanopartikül formülasyonun platine duyarlı A2780 hücre dizisinde 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığını sadece %1 azalttığı görülürken, 48 saatin sonunda doza bağlı olarak hücre canlılığının %70'e kadar gerilediği tespit edilmiştir (Şekil 3.33- Şekil 3.34). 72. saatlik inkübasyonun sonucuna bakıldığında ise hücre canlılığının 2,5 μ M karboplatin dozunda %53'e, 5 μ M karboplatin dozunda ise % 45'e düştüğü görülmüştür (Şekil 3.35). Bu sonuçlar değerlendirildiğinde 72 saatin sonunda desitabin ve karboplatin kombinasyonu yüklü lipit kaplı albümin nanopartikül formülasyonunun saf karboplatine oranla yaklaşık 32 kat daha düşük karboplatin dozunda sitotoksik etki oluşturduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında çekirdek kısmında karboplatin ile birlikte desitabin içeren LA7D kodlu formülasyonun sitotoksikite profili incelendiğinde ise 72 saatin sonunda A2780 hücre dizisinde hücre canlılığının sadece %60'a gerilediği görülmüştür.

LA7 ve LA7D kodlu formülasyonların A2780cis hücre dizisindeki sitotoksik etkisi A2780 hücre dizisinde olduğu gibi 1,25, 2,5 ve 5 μ M karboplatin dozunda 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde değerlendirilmiştir (Şekil 3.36- Şekil 3.38). Ancak uygulanan her üç dozda ve üç inkübasyon süresinde hücre canlılığının %100'ün üzerinde olduğu saptanmıştır. Bunun üzerine desitabinle birlikte lipit kaplı nanopartiküllere enkapsüle edilmiş karboplatinin daha yüksek dozlardaki sitotoksikitesinin incelenmesi amacıyla 4 μ M desitabin ile birlikte 10, 20 ve 40 μ M karboplatin içeren nanopartiküller hücrelere uygulanmış; fakat bu konsantrasyonlarda nanopartiküller kuyu yüzeyini kaplayarak ışık geçişini engellemiş ve güvenilir veriler alınmasını engellemiştir.

LA7 kodlu formülasyon ile karboplatin dozunun yeteri kadar artırılamaması nedeniyle formülasyon aşamasında kullanılan karboplatin miktarı artırılarak hazırlanan LA8 ve LA8D kodlu formülasyonlar kullanılarak 5, 10 ve 20 μ M karboplatin dozlarının sitotoksik etkileri araştırılmıştır. 72 saatin sonunda A2780 hücre dizisinde LA8 kodlu formülasyon 10 ve 20 μ M karboplatin dozları hücre canlılığının sırasıyla %61 ve %35'e düşmesine neden olurken; A2780cis hücre dizisinde sitotoksik

etki gözlenmemiştir. LA8D formülasyonuna bakıldığında da benzer şekilde 10 ve 20 µM karboplatin dozları hücre canlılığının sırasıyla %61 ve %53'e düşmesine neden olurken; A2780cis hücre dizisinde sitotoksik etki oluşturmamıştır.

A2780cis hücre dizisinde hedeflenen etkinin gözlenememesi nedeniyle lipit kabuk kısmında desitabin ve karboplatin, albümin çekirdek kısmında karboplatin içeren LA9 kodlu formülasyonunun sitotoksik etkisi incelenmiştir. A2780 hücre dizisinde 24 saat sonunda sitotoksik etki gözlenmezken, 48 saat sonunda 10, 20 ve 40 µM karboplatin dozlarında doza bağlı olarak artan şekilde sitotoksik etki görülmüştür. 72 saatin sonunda ise 10, 20 ve 40 µM karboplatin dozları ile hücre canlılığının sırasıyla %22, %10 ve %7'ye gerilediği saptanmıştır. A2780cis hücre dizisi incelendiğinde ise A2780 hücre dizisine benzer şekilde hücre canlılığı 48 saatin sonunda 20 ve 40 µM karboplatin dozlarında sırasıyla %36 ve %19'a, 72 saatin sonunda ise 10, 20 ve 40 µM karboplatin dozlarında sırasıyla %37, %12 ve %9'a düşmüştür. Bu sonuca göre A2780 hücre dizisinde 8, A2780cis hücre dizisinde ise 16 kat daha düşük karboplatin dozunda sitotoksik etki gözlenmiş; A2780 ve A2780cis hücre dizilerinde birbirine benzer bir sitotoksikite profili oluşmuştur. Kullanılan aynı karboplatin dozlarında LA8 ve LA8D kodlu formülasyonlarda sitotoksik etki görülmezken LA9 kodlu formülasyonda sitotoksik etki görülmesinin nedeninin iki formülasyon arasındaki karboplatin salım profili farkı olduğu düşünülmüştür. *In vitro* çözünme hızı çalışmalarında LA8 kodlu formülasyonda karboplatin salımı desitabin salımının ardından belirli bir sürenin sonunda başlarken; LA9 kodlu formülasyonda karboplatin salımı lipit kabuk kısmında yer alan karboplatin nedeniyle desitabin ile birlikte başlamış ve çekirdek kısmında yer alan karboplatin sayesinde devam etmiştir (Şekil 3.20). LA9 formülasyonunda MTT analizinde gösterdiği sitotoksik etkinin *in vitro* çözünme hızı çalışmalarında görülen bu karboplatin salımından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.4.2. Hücresel Alımın Konfokal Görüntüleme ile Belirlenmesi

Rodamin B yüklü çekirdek albümin nanopartikülleri ile lipit kaplı albümin nanopartiküllerinin A2780 ve A2780cis hücre dizilerine hücresel alımı konfokal mikroskop ile görüntülenmiştir. Şekil 3.39’da görüldüğü gibi hücre çekirdeği DAPI ile boyanarak mavi renkli görüntülenirken rodamin B yüklü nanopartiküller sistemler kırmızı renkli görüntülenmiştir. Şekil 3.39 incelendiğinde A2780 ve A2780cis hücre dizilerinde çekirdek çevresinde yüksek oranda rodamin B ışıması görülmesi hem rodamin yüklü çekirdek albümin nanopartiküllerin hem de rodamin yüklü lipit kaplı albümin nanopartiküllerin hücre içerisine etkili şekilde alındığını göstermektedir.

4.4.3. Hücresel Alımın Akım Sitometrisi ile Belirlenmesi

Rodamin B yüklü lipit kaplı albümin nanopartiküllerin A2780 ve A2780cis hücre hatlarına alımı konfokal mikroskop yanı sıra akım sitometrisi yöntemi kullanılarak da belirlenmiştir. Şekil 3.40 ve 3.41’de yer alan akım sitometri analizinin sonuçları incelendiğinde lipit kaplı albümin nanopartiküllerin hem A2780 hem de A2780cis hücre dizilerine etkili şekilde alındığı saptanmıştır. Ancak geliştirilen nanopartiküller sistemlerin A2780 hücre dizisine alımı, A2780cis hücre dizisine alımı ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı oranda daha fazla olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Bu sonuçlar hem sitotoksitesite çalışmaları hem de konfokal mikroskop görüntüleri ile uyumludur. Aynı zamanda lipit kaplı nanopartiküllerin hücre içine etkin madde girişini artırdığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Hadinoto ve ark., 2013; Li ve ark., 2017; Mukherjee ve ark., 2019; Tan ve ark., 2013; Zhang ve Zhang, 2010).

4.4.4. Apoptoz ve Direncin Modülasyonunun Western Blot Yöntemi ile Değerlendirilmesi

4.4.4.1. Apoptozun Western Blot Yöntemi ile Değerlendirilmesi

Karboplatin gibi platin bazlı kemoterapötikler, DNA ile farklı tipte DNA-platin ürünleri oluşturarak etki göstermektedir. Platin bazlı kemoterapötikler komşu guaninler ya da guanin ve adeninler arasında zincir içi ya da daha az olmak üzere karşılıklı DNA zincirlerinin guaninleri arasında zincirler arası çapraz bağlar kurarak DNA-platin ürünleri oluşturmaktadır. Oluşan bu DNA ürünleri hücre döngüsünün G₂ evresinde durdurulmasına neden olmaktadır (Koberle ve ark., 2010). Bu DNA ürünlerinin MMR proteinlerine bağlanması, DNA hasarının nükleotit eksizyon tamir (NER) yolağı ile tamir edilmesini inhibe ederek apoptozun tetiklenmesini sağlamaktadır (Pani ve ark., 2007). Platin türevi bileşiklere direnç gelişimi hücre içi ilaç birikiminde azalma, glutatyon ve/veya metallothioneinler yoluyla ilaç detoksifikasyonu, DNA hasar toleransı mekanizmalarındaki değişiklikler, DNA hasar tamir mekanizmalarındaki (MMR) değişiklikler ve apoptotik hücre ölüm yollarındaki değişiklikler gibi farklı mekanizmalarla gerçekleşebilmektedir (Koberle ve ark., 2010).

Apoptoz adı verilen programlanmış hücre ölümü, doku homeostazının korunması, uygun doku gelişimi ve istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırılması için gerekli olan genetik kontrol mekanizmadır. Apoptoz, moleküler düzeyde ölüm sinyalleri veya mitokondri yoluyla yayılan sinyaller ile başlatılmaktadır. Biyokimyasal düzeyde, apoptoz süreci, kaspaz adı verilen bir dizi sistein proteazının düzenli etkinleştirilmesine dayanmaktadır. Kaspazlar, spesifik aspartat kalıntılarından sonra proteolitik kırılma ile etkinleştirilmesi gereken proenzimlerdir. Kaspazlar apoptoz işlemindeki rollerine bağlı olarak başlatıcı kaspazlar ve uygulayıcı kaspazlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Kaspaz 8, 9 ve 10 başlatıcı kaspazlar sınıfında yer alırken, kaspaz 3, 6 ve 7 uygulayıcı kaspazlar sınıfında yer almaktadır (Wu ve Ding, 2002). DNA hasarı yoluyla etki eden ilaçlar genellikle mitokondriler aracılığı ile apoptotik yolları aktive ederler. Bu apoptotik yollar iki protein grubunun

katılımıyla gerçekleşir. Bunlardan BCL-2 protein ailesi mitokondri tarafından sitoplazmaya sitokrom-c salınmasına ve böylece kaspaz 9'un kırılarak aktive edilmesine neden olmaktadır. Aktifleşen bu kaspaz ise uygulayıcı kaspazların kırılmasını ve aktifleşmesini sağlamaktadır (Topping ve ark., 2009). DNA hasarına bağlı apoptotik ölüm süreçlerini etkinleştiren uygulayıcı kaspazlardan en çok araştırılan kaspaz 3 ve 7 hücrelerde aktif olmayan formları halinde bulunurlar ve kaspaz 9 tarafından tetiklenen proteolitik parçalanma ile kırılmış aktif formlarına dönüşürler (Brentnall ve ark., 2013; Donzelli ve ark., 2004). Kaspaz 9 ile aktivasyondan sonra kaspaz 3 apoptozun etkili bir şekilde yürütülmesini sağlarken, kaspaz 7 apoptotik hücre ayrılmasını sağlamaktadır (Brentnall ve ark., 2013). İlaçların tetiklediği apoptozun temel belirteçlerinden biri ise poli(ADP-riboz) polimeraz (PARP)'ın kırılarak etkinleştirilmiş kaspaz 3 aracılığı ile 89 ve 24 kDa'luk parçalara kırılmasıdır. Bu kırılma enzimi etkisiz forma dönüştürerek DNA hasarlarına cevap verebilme yeteneğine son vermektedir (Boulares ve ark., 1999; Donzelli ve ark., 2004).

Yukarıdaki bilgiler ışığında A2780 ve A2780cis hücre dizilerinde ideal formülasyon olarak belirlenen LA9 kodlu formülasyonun apoptoz üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi için kaspaz 3, 7, 9 ve PARP ile kırılmış kaspaz 3, 7, 9 ve PARP protein ekspresyonları 12 ve 24 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda Western Blot yöntemi ile incelenmiş ve sonuçlar tedavi uygulanmayan gruplarla birlikte Şekil 3.42 ile 3.43'te sunulmuştur.

A2780 hücre dizisinde 24 saatin sonunda kaspaz 3 ekspresyonu 12 saate kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,01$). Diğer yandan kaspaz 7 ve kaspaz 9 ekspresyonlarında azalma ve kırılmış kaspaz 3, kaspaz 7 ve kaspaz 9 ekspresyonlarında artma eğilimi görülmüş; ancak ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik bulunamamıştır. A2780cis hücre dizisinde ise 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda kaspaz 3 ve kaspaz 7 ekspresyonu azalma eğilimi gösterirken kaspaz 9 ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı oranda düşmüştür ($p<0,01$). Bunun yanında kırılmış kaspaz 7 ve kırılmış kaspaz 9 seviyelerinde anlamlı bir azalma ($p<0,05$) gösterirken kırılmış kaspaz seviyesindeki düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. A2780 ve A2780cis hücre dizilerinin

protein ekspresyon seviyelerindeki bu değişiklikler hücrelerin canlılığını apoptoz ile yitirdiğini göstermektedir (Topping ve ark., 2009).

Kanser hücrelerinde kırılmış PARP varlığı, apoptozun saptanması için yaygın olarak kullanılan biyobelirteçlerden biridir (Bernabeu ve ark., 2016). LA9 kodlu formülasyon uygulanan A2780 hücre dizisinde 24 saatin sonunda PARP protein ekspresyonu azalma eğilimi göstermiş, kırılmış PARP protein ekspresyonu ise 24 saatin sonunda kontrole ($p<0,0001$) ve 12 saatlik inkübasyona ($p<0,0001$) oranla istatistiksel olarak anlamlı oranda artış göstermiştir. A2780cis hücre dizisinde PARP proteinekspresyonu kontrole kıyasla 12 ve 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda zamana bağlı olarak istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma ($p<0,0001$) gösterirken, kırılmış PARP protein ekspresyonu ise zamana bağlı olarak istatistiksel açıdan anlamlı bir artış ($p<0,05$) göstermiştir. Bu durum her iki hücre dizinde de hücre ölümünün apoptotik yolak aracılığı ile gerçekleştiğini göstermektedir (Bernabeu ve ark., 2016).

4.4.4.2. İlaç Direncinin Western Blot Yöntemi ile Değerlendirilmesi

MMR sistemi, DNA replikasyonunun doğru işleyişinde önemli rol oynamaktadır. DNA replikasyonu sırasında ortaya çıkan baz-baz uyumsuzluklarını ve ekleme / silme döngülerini tanıyabilen ve onarabilen MLH1, MMR sisteminin temel bileşenlerinden biridir. Bunun yanında, MLH1 bazı DNA lezyonlarına bağlanarak DNA hasarı ile uyarılan apoptoz mekanizmasının tetiklenmesinde de önemli bir rol oynamaktadır (Li ve ark., 2018; Yanamadala ve Ljungman, 2003). MLH1'in hücreleri apoptozu uğramak üzere duyarlılaştıran temel proteinlerden biri olduğu gösterilmiştir (Fukuhara ve ark., 2014). Genetik ya da epigenetik mekanizmalarla MLH1 eksikliği oluşan hücreler, DNA hasarı ile etki gösteren platin bazlı kemoterapötikler gibi antikanser etkin maddelere direnç gösterirler (Li ve ark., 2018; Yanamadala ve Ljungman, 2003). Bir tümör baskılayıcı gen olan hMLH1'in bir metilasyon yolu ile susturulması platin dirençli over kanserlerinde sıkça görülmektedir (Nguyen ve ark., 2014)

Çalışmamızda metilasyon mekanizması ile epigenetik değişikliğe uğramış olan platine dirençli over kanserinin tedavisi için geliştirilen bu nanopartiküler sistemin platine duyarlı A2780 ve platine dirençli A2780cis hücre dizilerinde MLH1 ekspresyonunda meydana getirdiği değişiklikler incelenmiştir. Western Blot ile gerçekleştirilen protein analizinde A2780 hücre dizisinde MLH1 ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken, A2780cis hücre dizisinde MLH1 ekspresyonu 12 ile 24 saatlik inkübasyon sonrasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir ($p<0,05$) (Şekil 3.44). Aird ve ark. tarafından yapılan çalışmada desitabin uygulaması A2780 hücre dizisinde MLH1 ekspresyonunda herhangi bir değişikliğe neden olmazken A2780cis hücre dizisinde MLH1 protein düzeyinde artış sağlamıştır (Aird ve ark., 2002). MLH1 ekspresyonunda görülen bu artışın pek çok literatür çalışmasında kanıtlandığı gibi demetilasyon ajanı desitabinin metile haldeki hMLH1 genini demetile etmesine bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmüştür. Desitabin uygulaması metile haldeki hMLH1 genini demetile ederek susturulmuş genin tekrar MLH1 proteini eksprese etmesini sağlamak ve platin direncini geri çevirmektedir (Plumb ve ark., 2000; Qin ve ark., 2015; Steele ve ark., 2009).

Alınan bu sonuçlar LA9 kodlu formülasyonun sitotoksosite çalışmalarında elde edilen A2780 hücre dizisi için 8, A2780cis hücre dizisi için 16 kat daha düşük karboplatin dozunda sitotoksosite sağlanması ile paralellik göstermekte ve daha düşük dozda elde edilen sitotoksiteyi açıklamaktadır. MLH1 protein ekspresyonundaki değişiklikler aynı zamanda Western Blot yöntemi ile belirlenen apoptotik yolak proteinlerinin ekspresyonundaki değişikliklerle de paralellik göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Platine dirençli over kanserinde platin direncinin modülasyonu ve over kanserinin tedavisinin sağlanması amacıyla gerçekleştirilen tez çalışmasından aşağıda yer alan sonuçlar elde edilmiştir.

- Karboplatin ve desitabinin *in vitro* koşullarda HPLC yöntemi ile hassas ve güvenilir bir miktar tayini yöntemi geliştirilmiş ve miktar tayini yönteminin analitik validasyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir.
- Desolvasyon yöntemi kullanılarak hedeflenen partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımına, enkapsülasyon etkinliğine ve zeta potansiyele sahip karboplatin yüklü albümin bazlı nanopartiküller başarıyla hazırlanmış ve Box Behnken yöntemi kullanılarak lipit kaplama prosesi için F4 kodlu optimum çekirdek formülasyonu seçilmiştir.
- Lipit kaplı nanopartiküler sistemler çift basamaklı yöntem kullanılarak lipit film hidrasyonu yolu ile hazırlanmış ve 1:1 lipit nanopartikül oranı ve 1:0,5:0,4 lesitin:kolesterol:oleik asit oranı ile yaklaşık 300 nm partikül büyüklüğüne sahip lipit kaplı nanopartiküler sistemler elde edilmiş, desitabin lipit tabakaya başarıyla yüklenmiştir .
- Karboplatin ve desitabin kombinasyonu içeren lipit kaplı nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler fiziko-kimyasal özellikleri açısından değerlendirilerek LA7, LA7D, LA8, LA8D ve LA9 kodlu formülasyonların hücre kültürü çalışmalarında kullanılmasına karar verilmiştir.
- Gerçekleştirilen stabilite çalışmaları sonucunda lipit kaplı nanopartikül formülasyonlarının 5°C’de stabil olarak saklanabileceği belirlenmiştir.

- Hücre kültürü çalışmaları için seçilen formülasyonlar gama sterilizasyon ile sterilize edilmiş; sterilizasyon işleminin nanopartiküller üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığı yapılan analizler sonucunda belirlenmiştir.
- Hücre kültürü çalışmalarında platine duyarlı A2780 ve platine dirençli A2780cis hücre dizilerinde saf desitabinin öncelikle 24 saat desitabin sonrasında 48 saat desitabin ve karboplatin kombinasyonu uygulanan tedavi gruplarında karboplatinin etkinliğini önemli ölçüde artırdığı görülmüştür.
- Boş nanopartiküllerin hem A2780 hem de A2780cis hücre dizileri üzerinde sitotoksik etki göstermediği gözlenmiştir.
- Sitotoksikite testlerinde lipit kabuk kısmında desitabin çekirdek kısmında karboplatin bulunan LA7 formülasyonunun 5µM karboplatin 4 µM desitabine eşdeğer dozda A2780 hücre dizisinde hücre canlılığını 72 saatlik bir inkübasyon sonucunda %45'e geriletmediği; ancak A2780cis hücre hattında bu formülasyonun sitotoksik etki göstermediği görülmüştür.
- Lipit kabuk kısmında 10µM karboplatin ve 4 µM desitabin kombinasyonu çekirdek kısmında 1,25µM karboplatin bulunan LA9 formülasyonunun ise A2780 hücre dizisinde hücre canlılığını 72 saatlik bir inkübasyon sonucunda %22'ye; ancak A2780cis hücre dizisinde ise hücre canlılığının %45'e düştüğü tespit edilmiştir.
- LA9 kodlu desitabin ve karboplatin kombinasyonu yüklü lipit kaplı nanopartikül formülasyonunun A2780 hücre dizisinde saf karboplatine oranla 8 kat, A2780cis hücre dizisinde ise 16 kat daha düşük karboplatin dozunda sitotoksik etki oluşturduğu belirlenmiştir.
- Lipit kaplı nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin A2780 ve A2780cis hücre dizilerinde etkin bir şekilde hücrenin çekirdek ve sitoplazmasına alındıkları gözlenmiştir.

- Apoptotoik yolak proteinlerinin ekspresyonlarındaki değişiklikler LA9 kodlu formülasyonun hücre canlılığını apoptoz yolu ile azalttığını göstermiştir.
- Yapılan protein analizlerinde platin direnci durumunda ekspresyonu azalan MLH1 proteini ekspresyonunun desitabin uygulaması ile arttığı belirlenmiş, A2780cis hücre dizisinde platin direnci bu yolla kırılarak karboplatinin etkinliği artırılmıştır.
- Yapılan tüm *in vitro* karakterizasyon ve hücre kültürü çalışmaları sonucunda optimum formülasyon olarak belirlenen LA9 formülasyonu ile tez çalışmamızın hedeflerine uygun olarak platine dirençli over kanseri tedavisi için başarılı sonuçlar elde edilmiştir.
- Çalışmanın devamında hayvan deneyleri gerçekleştirilerek platine duyarlı ve platine dirençli hücre dizileri üzerinde olumlu sonuçlar alınan LA9 kodlu karboplatin ve desitabin kombinasyonu yüklü lipit kaplı albümin nanopartikül formülasyonun over kanseri modeli oluşturulan hayvan modellerinde *in vivo* koşullardaki etkinliğinin araştırılması planlanmaktadır.

ÖZET

Platine Dirençli Over Kanseri Tedavisine Yönelik Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve Değerlendirilmesi

En ölümcül jinekolojik kanserlerden biri olan over kanserinin birinci basamak tedavisini cerrahi operasyon ve platin bazlı kemoterapi oluşturmaktadır. Over kanserinde platin bazlı kemoterapötiklere cevap başlangıçta iyi olsa da ilerleyen süreçlerde hastaların büyük çoğunda kemoterapiye direnç gelişmektedir.

DNA metilasyonu, gen susturulmasını sağlayan temel epigenetik mekanizmalardan biridir. Over kanseri hücrelerinde hMLH1 tümör baskılayıcı genindeki metilasyona bağlı susturulma, tedavi sırasında gelişen ve platin bileşiklerine duyarlılıkta belirleyici olan bir süreçtir. Dolayısıyla, DNA metil transferaz inhibitörleri ile tümör baskılayıcı genlerin yeniden ekspresyonunu sağlamak, over kanseri hücrelerini kemoterapötiklere duyarlı hale getirilebileceği ve bu inhibitörlerin karboplatin ile kombinasyon halinde uygulanmasının over kanserinde ilaç direncinin aşılması için yeni bir yöntem olacağı düşünülmektedir.

Platin direncine yönelik uygulanan yeni tedavi yaklaşımlarından bir diğeri de kemoterapötik ajanların nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler ile etki ya da absorpsiyon bölgesine seçici olarak hedeflendirilmesi ve ilaç konsantrasyonunun tümöral alanda sağlıklı dokuya oranla artırılması, aynı zamanda nanopartiküllerin endositozla hücre içerisine alınması nedeniyle hücre içi etkin madde konsantrasyonunun artırılmasıdır.

Bu tez çalışmasında, over kanserinin standart tedavisinde kullanılan karboplatin, bir DNA metil transferaz inhibitörü olan desitabin ile birlikte nanopartiküler ilaç taşıyıcı bir sistemde enkapsüle edilerek uygulanan kombine nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem ile platin direncinin modülasyonu amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında, desitabin ve karboplatin yüklü lipit kaplı albümin nanopartikül formülasyonları hazırlanmış, hazırlanan formülasyonların in vitro özellikleri tayin edilerek optimum formülasyonu belirlenmiş ve serbest ilaçlar ile etkin madde yüklü nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin sitotoksik etkileri, hücresel tutulum düzeyleri ile apoptotik yolak proteinleri ve MLH1 proteini ekspresyonundaki değişiklikler platine duyarlı A2780 ve platine dirençli A2780cis hücre hatları üzerinde gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmaları ile değerlendirilmiştir.

Anahtar Sözcükler: DNA metil transferaz inhibitörü, Karboplatin, Lipit kaplı nanopartikül, Over kanseri, Platin direnci

SUMMARY

Development and Evaluation of Nanoparticulate Drug Delivery Systems for Platinum Resistant Ovarian Cancer Therapy

Ovarian cancer is one of the most lethal gynecological cancers. The first-line treatment of ovarian cancer consists of surgical operation and platinum-based chemotherapy. Although the response to platinum-based chemotherapeutics in ovarian cancer is initially good, resistance to chemotherapy is evident in the majority of patients in later stages.

DNA methylation is one of the main epigenetic mechanisms enabling gene silencing. Silencing of the hMLH1 tumor suppressor gene in ovarian cancer cells is a process which develops during treatment and is determinative in the sensitivity to platinum compounds. Therefore, enabling the re-expression of tumor suppressor genes with DNA methyltransferase inhibitors makes ovarian cancer cells sensitive to chemotherapeutics. The application of these inhibitors in combination with carboplatin is considered a novel method for overcoming drug resistance in ovarian cancer.

Another new treatment approach towards platinum resistance is to selectively target chemotherapeutic agents to the area of effect or absorption with nanoparticulate drug delivery systems, and to increase the drug concentration in the tumoral region while increasing the intracellular active substance concentration due to enhanced the uptake of nanoparticles into the cell through endocytosis.

Within this thesis, it is aimed to develop a combination drug delivery system which is co-loaded with carboplatin, first-line chemotherapeutic of ovarian cancer treatment, and decitabine, a DNA methyltransferase inhibitor, for modulating the platinum resistance. For this purpose, a lipid-coated nanoparticulate system containing decitabine together with carboplatin were prepared, the optimum formulation was determined according to the *in vitro* properties of the formulations and cellular internalization levels of the selected formulations in the cell, cytotoxic effects, change in apoptotic pathway proteins and MLH1 protein expression on platinum-sensitive A2780 and platinum-resistant A2780cis cell lines.

Key Words: Carboplatin, DNA methyltransferase inhibitor, Lipid-coated nanoparticle, Ovarian cancer, Platinum resistance,

KAYNAKLAR

- AGARWAL R, KAYE SB (2003). Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, **3(7)**: 502-516. doi:10.1038/nrc1123
- AGENCY EM. (2019). *Guideline on the sterilisation of the medicinal product, active substance, excipient and primary container*.
- AHMED F, ALI MJ, KONDABI AK (2014). Carboplatin loaded protein nanoparticles exhibit improve anti-proliferative activity in retinoblastoma cells. *Int J Biol Macromol*, **70**: 572-582. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.07.041
- AIRD RE, CUMMINGS J, RITCHIE AA, MUIR M, MORRIS RE, CHEN H, SADLER PJ, JODRELL DI (2002). In vitro and in vivo activity and cross resistance profiles of novel ruthenium (II) organometallic arene complexes in human ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, **86**: 1652-1657. doi:10.1038/sj/bjc/6600290
- AKSU B. (2013). İlaçta Kalite Tasarımı (QbD) ve İlgili Yasal Düzenlemeler. (Ed.). İstanbul: Neta Matbaacılık.
- ALEX AT, JOSEPH A, SHAVI G, RAO JV, UDUPA N (2016). Development and evaluation of carboplatin-loaded PCL nanoparticles for intranasal delivery. *Drug Deliv*, **23(7)**: 2144-2153. doi:10.3109/10717544.2014.948643
- ALEXIS F, RHEE JW, RICHIE JP, RADOVIC-MORENO AF, LANGER R, FAROKHZAD OC (2008). New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. *Urol Oncol*, **26(1)**: 74-85. doi:10.1016/j.urolonc.2007.03.017
- ALLEN C, HER S, JAFFRAY DA (2017). Radiotherapy for Cancer: Present and Future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **109**: 1-2. doi:https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.01.004
- ALLEN DD, CAVIEDES R, CARDENAS AM, SHIMAHARA T, SEGURA-AGUILAR J, CAVIEDES PA (2005). Cell lines as in vitro models for drug screening and toxicity studies. *Drug Dev Ind Pharm*, **31(8)**: 757-768. doi:10.1080/03639040500216246
- AMASYA G, AKSU B, BADILLI U, ONAY-BESIKCI A, TARIMCI N (2019). QbD guided early pharmaceutical development study: Production of lipid nanoparticles by high pressure homogenization for skin cancer treatment. *Int J Pharm*, **563**: 110-121. doi:10.1016/j.ijpharm.2019.03.056
- American Cancer Society. (2014). Ovarian Cancer
- ANDERSON M, OMRI A (2004). The effect of different lipid components on the in vitro stability and release kinetics of liposome formulations. *Drug Deliv*, **11(1)**: 33-39. doi:10.1080/10717540490265243
- APPLETON K, MACKAY HJ, JUDSON I, PLUMB JA, MCCORMICK C, STRATHDEE G, LEE C, BARRETT S, READE S, JADAYEL D, TANG A, BELLENGER K, MACKAY L, SETANOIANS A, SCHATZLEIN A, TWELVES C, KAYE SB, BROWN R (2007). Phase I and pharmacodynamic trial of the DNA methyltransferase inhibitor decitabine and carboplatin in solid tumors. *J Clin Oncol*, **25(29)**: 4603-4609. doi:10.1200/JCO.2007.10.8688
- ASLAN B, OZPOLAT B, SOOD AK, LOPEZ-BERESTEIN G (2013). Nanotechnology in cancer therapy. *J Drug Target*, **21(10)**: 904-913. doi:10.3109/1061186X.2013.837469

- BALCH C, HUANG TH, BROWN R, NEPHEW KP (2004). The epigenetics of ovarian cancer drug resistance and resensitization. *Am J Obstet Gynecol*, **191(5)**: 1552-1572. doi:10.1016/j.ajog.2004.05.025
- BALCH C, YAN P, CRAFT T, YOUNG S, SKALNIK DG, HUANG TH, NEPHEW KP (2005). Antimitogenic and chemosensitizing effects of the methylation inhibitor zebularine in ovarian cancer. *Mol Cancer Ther*, **4(10)**: 1505-1514. doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0216
- BERNABEU E, GONZALEZ L, CAGEL M, GERGIC EP, MORETTON MA, CHIAPPETTA DA (2016). Novel Soluplus(R)-TPGS mixed micelles for encapsulation of paclitaxel with enhanced in vitro cytotoxicity on breast and ovarian cancer cell lines. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **140**: 403-411. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.01.003
- BHATTACHARJEE S (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J Control Release*, **235**: 337-351. doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017
- BOULARES AH, YAKOVLEV AG, IVANOVA V, STOICA BA, WANG G, IYER S, SMULSON M (1999). Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J Biol Chem*, **274(33)**: 22932-22940. doi:10.1074/jbc.274.33.22932
- BREGOLI L, MOVIA D, GAVIGAN-IMEDIO JD, LYSAGHT J, REYNOLDS J, PRINA-MELLO A (2016). Nanomedicine applied to translational oncology: A future perspective on cancer treatment. *Nanomedicine*, **12(1)**: 81-103. doi:10.1016/j.nano.2015.08.006
- BRENTNALL M, RODRIGUEZ-MENOCAL L, DE GUEVARA RL, CEPERO E, BOISE LH (2013). Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *Bmc Cell Biology*, **14(32)**. doi:Artm 32
10.1186/1471-2121-14-32
- BRIUGLIA ML, ROTELLA C, MCFARLANE A, LAMPROU DA (2015). Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Deliv Transl Res*, **5(3)**: 231-242. doi:10.1007/s13346-015-0220-8
- BRUECKNER B, LYKO F (2004). DNA methyltransferase inhibitors: old and new drugs for an epigenetic cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci*, **25(11)**: 551-554. doi:10.1016/j.tips.2004.09.004
- BRUS J, CZERNEK J, KOBERA L, URBANOVA M, ABBRENT S, HUSAK M (2016). Predicting the Crystal Structure of Decitabine by Powder NMR Crystallography: Influence of Long-Range Molecular Packing Symmetry on NMR Parameters. *Crystal Growth & Design*, **16(12)**: 7102-7111. doi:10.1021/acs.cgd.6b01341
- BUNJES H, UNRUH T (2007). Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. *Adv Drug Deliv Rev*, **59(6)**: 379-402. doi:10.1016/j.addr.2007.04.013
- CAGDAS FM, ERTUGRAL N, BUCAK S, ATAY NZ (2011). Effect of preparation method and cholesterol on drug encapsulation studies by phospholipid liposomes. *Pharm Dev Technol*, **16(4)**: 408-414. doi:10.3109/10837451003774401
- CHAN JM, ZHANG L, YUET KP, LIAO G, RHEE JW, LANGER R, FAROKHZAD OC (2009). PLGA-lecithin-PEG core-shell nanoparticles for controlled drug delivery. *Biomaterials*, **30(8)**: 1627-1634. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.12.013
- CHANG HC, FLANAGAN DR (1995). Liposomal entrapment of suramin (II): interaction of suramin with phospholipids of various chain lengths. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **84(9)**: 1078-1082.

- CHEN D, XIE F, SUN D, YIN C, GAO J, ZHONG Y (2017). Nanomedicine-Mediated Combination Drug Therapy in Tumor. *Open Pharmaceutical Sciences Journal*, **4(1)**: 1-10. doi:10.2174/1874844901704010001
- CHEN JY, TSAI WS, SHAO HJ, WU JC, LAI JM, LU SH, HUNG TF, YANG CT, WU LC, CHEN JS, LEE WH, CHANG YC (2016). Sensitive and Specific Biomimetic Lipid Coated Microfluidics to Isolate Viable Circulating Tumor Cells and Microemboli for Cancer Detection. *PLoS One*, **11(3)**: e0149633. doi:10.1371/journal.pone.0149633
- CLAYTON KN, SALAMEH JW, WERELEY ST, KINZER-URSEM TL (2016). Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry. *Biomicrofluidics*, **10(5)**: 054107. doi:10.1063/1.4962992
- ÇELEBİ N. (2004). Koloitler. In: *Farmasötik Teknoloji: Temel Konular ve Dozaj Şekilleri* Ed.: Gürsoy, A. Z., İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği. Vol. 2, 245-255.
- DADASHZADEH S, MIRAHMADI N, BABAEI MH, VALI AM (2010). Peritoneal retention of liposomes: Effects of lipid composition, PEG coating and liposome charge. *J Control Release*, **148(2)**: 177-186. doi:10.1016/j.jconrel.2010.08.026
- DAMAGHI M, WOJTKOWIAK JW, GILLIES RJ (2013). pH sensing and regulation in cancer. *Front Physiol*, **4**: 370. doi:10.3389/fphys.2013.00370
- DANESHMAND S, GOLMOHAMMADZADEH S, JAAFARI MR, MOVAFFAGH J, REZAEI M, SAHEBKAR A, MALAEKEH-NIKOUEI B (2018). Encapsulation challenges, the substantial issue in solid lipid nanoparticles characterization. *J Cell Biochem*, **119(6)**: 4251-4264. doi:10.1002/jcb.26617
- DATE T, NIMBALKAR V, KAMAT J, MITTAL A, MAHATO RI, CHITKARA D (2018). Lipid-polymer hybrid nanocarriers for delivering cancer therapeutics. *J Control Release*, **271**: 60-73. doi:10.1016/j.jconrel.2017.12.016
- DE MIGUEL I, IMBERTIE L, RIEUMAJOU V, MAJOR M, KRAVTZOFF R, BETBEDER D (2000). Proofs of the Structure of Lipid Coated Nanoparticles (SMBVTM) Used as Drug Carriers. *Pharm Res*(**17**): 7.
- DEFRATES K, MARKIEWICZ T, GALLO P, RACK A, WEYHMLER A, JARMUSIK B, HU X (2018). Protein Polymer-Based Nanoparticles: Fabrication and Medical Applications. *Int J Mol Sci*, **19(6)**. doi:10.3390/ijms19061717
- DEHAINI D, FANG RH, LUK BT, PANG Z, HU CM, KROLL AV, YU CL, GAO W, ZHANG L (2016). Ultra-small lipid-polymer hybrid nanoparticles for tumor-penetrating drug delivery. *Nanoscale*, **8(30)**: 14411-14419. doi:10.1039/c6nr04091h
- DEMİR Ö, AKSU B, ÖZSOY Y (2017). İlaç Formülasyonu Geliştirilmesinde Deney Tasarımı (DoE) Seçimi ve Kullanımı. *Marmara Pharmaceutical Journal*, **21(2)**: 216-216. doi:10.12991/marupj.277719
- DESAI A, XU J, AYSOLA K, QIN Y, OKOLI C, HARIPRASAD R, CHINEMEREM U, GATES C, REDDY A, DANNER O (2014). Epithelial ovarian cancer: An overview. *World journal of translational medicine*, **3(1)**: 1.
- DI PASQUA AJ, GOODISMAN J, KERWOOD DJ, TOMS BB, DUBOWY RL, DABROWIAK JC (2006). Activation of Carboplatin by Carbonate. *Chem Res Toxicol*, **19**: 139-149.
- DICKENS E, AHMED S (2018). Principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surgery (Oxford)*, **36(3)**: 134-138. doi:10.1016/j.mpsur.2017.12.002
- DOĞAN AL, GÜÇ D (2004). Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi*, **35(1)**: 34-42.

- DONG S, ZHOU X, YANG J (2016). TAT modified and lipid - PEI hybrid nanoparticles for co-delivery of docetaxel and pDNA. *Biomed Pharmacother*, **84**: 954-961. doi:10.1016/j.biopha.2016.10.003
- DONZELLI E, CARFÌ M, MILOSO M, STRADA A, GALBIATI S, BAYSSAS M, GRIFFON-ETIENNE G, CAVALETTI G, PETRUCCIOLI MG, TREDICI G (2004). Neurotoxicity of platinum compounds: comparison of the effects of cisplatin and oxaliplatin on the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Journal of Neuro-oncology*, **67(1-2)**: 65-73.
- DORTUNÇ B. (2004). Kontaminasyon ve Sterilizasyon. In: *Farmasötik Teknoloji: Temel Konular ve Dozaj Şekilleri* Ed.: Gürsoy, A. Z., İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği. Vol. 2, 101-115.
- DUBEY RD, ALAM N, SANEJA A, KHARE V, KUMAR A, VAIDH S, MAHAJAN G, SHARMA PR, SINGH SK, MONDHE DM, GUPTA PN (2015). Development and evaluation of folate functionalized albumin nanoparticles for targeted delivery of gemcitabine. *Int J Pharm*, **492(1-2)**: 80-91. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.07.012
- ECKSTEIN N (2011). Platinum resistance in breast and ovarian cancer cell lines. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **30**: 91.
- ELOY JO, CLARO DE SOUZA M, PETRILLI R, BARCELLOS JP, LEE RJ, MARCHETTI JM (2014). Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies to enhance encapsulation and delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **123**: 345-363. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.09.029
- ELZOGHBY AO, SAMY WM, ELGINDY NA (2012). Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *J Control Release*, **157(2)**: 168-182. doi:10.1016/j.jconrel.2011.07.031
- ENGELBERTH SA, HEMPEL N, BERGKVIST M (2014). Development of Nanoscale Approaches for Ovarian Cancer Therapeutics and Diagnostics. *Critical Reviews™ in Oncogenesis*, **19(3-4)**: 281-315.
- ERGIN AD, SEZGIN BAYINDIR Z, YÜKSEL N (2019). Characterization and optimization of colon targeted S-adenosyl-L-methionine loaded chitosan nanoparticles. *Marmara Pharmaceutical Journal*, **23(5)**.
- ESTANQUEIRO M, AMARAL MH, CONCEICAO J, SOUSA LOBO JM (2015). Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: the state of the art. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **126**: 631-648. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.12.041
- FAN W, YAN W, XU Z, NI H (2012). Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **90**: 21-27. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.09.042
- FANG F, BALCH C, SCHILDER J, BREEN T, ZHANG S, SHEN C, LI L, KULESAVAGE C, SNYDER AJ, NEPHEW KP, MATEI DE (2010). A phase 1 and pharmacodynamic study of decitabine in combination with carboplatin in patients with recurrent, platinum-resistant, epithelial ovarian cancer. *Cancer*, **116(17)**: 4043-4053. doi:10.1002/cncr.25204
- FDA (2000). Analytical Procedures and Methods Validation, Draft Guidance for Industry.
- FOJO T, BATES S (2003). Strategies for reversing drug resistance. *Oncogene*, **22(47)**: 7512-7523. doi:10.1038/sj.onc.1206951
- FUKUHARA S, CHANG I, MITSUI Y, CHIYOMARU T, YAMAMURA S, MAJID S, SAINI S, HIRATA H, DENG G, GILL A (2014). DNA mismatch repair gene MLH1 induces apoptosis in prostate cancer cells. *Oncotarget*, **5(22)**: 11297.

- GALISTEO-GONZALEZ F, MOLINA-BOLIVAR JA (2014). Systematic study on the preparation of BSA nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **123**: 286-292. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.09.028
- GANTA S, SINGH A, RAWAL Y, CACACCIO J, PATEL NR, KULKARNI P, FERRIS CF, AMIJI MM, COLEMAN TP (2016). Formulation development of a novel targeted theranostic nanoemulsion of docetaxel to overcome multidrug resistance in ovarian cancer. *Drug Deliv*, **23(3)**: 968-980. doi:10.3109/10717544.2014.923068
- GAO DY, LIN TS T, SUNG YC, LIU YC, CHIANG WH, CHANG CC, LIU JY, CHEN Y (2015). CXCR4-targeted lipid-coated PLGA nanoparticles deliver sorafenib and overcome acquired drug resistance in liver cancer. *Biomaterials*, **67**: 194-203. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.07.035
- GARG NK, TYAGI RK, SHARMA G, JAIN A, SINGH B, JAIN S, KATARE OP (2017). Functionalized Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles Mediated Codelivery of Methotrexate and Aceclofenac: A Synergistic Effect in Breast Cancer with Improved Pharmacokinetics Attributes. *Mol Pharm*, **14(6)**: 1883-1897. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.6b01148
- GHANEMI A (2015). Cell cultures in drug development: Applications, challenges and limitations. *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, **23(4)**: 453-454. doi:10.1016/j.jsps.2014.04.002
- GONG YK, WINNIK FM (2012). Strategies in biomimetic surface engineering of nanoparticles for biomedical applications. *Nanoscale*, **4(2)**: 360-368. doi:10.1039/c1nr11297j
- GOVENDER T, STOLNIK S, GARNETT MC, ILLUM L, DAVIS SS (1999). PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *J Control Release*, **57(2)**: 171-185. doi:10.1016/s0168-3659(98)00116-3
- GOZLAN I, ROTSTEIN A, AVISAR D (2014). Carboplatin-Degradation Products Formed Under Deliberated and Non-deliberated Laboratory Experiments: Structural Elucidation. *Water, Air, & Soil Pollution*, **225(12)**. doi:10.1007/s11270-014-2196-2
- GÖKASLAN HH (2019). Over Kanseri: Evre I, Evre II, Evre III, Evre IV Epiteyal Over Kanserlerinde Tedavi. *Türkiye Klinikleri Gynecology Obstetrics-Special Topics*, **12(1)**:56-64
- GRENHA A (2012). Chitosan nanoparticles: a survey of preparation methods. *J Drug Target*, **20(4)**: 291-300. doi:10.3109/1061186X.2011.654121
- GUIMARAES SA CORREIA M, BRIUGLIA ML, NIOSI F, LAMPROU DA (2017). Microfluidic manufacturing of phospholipid nanoparticles: Stability, encapsulation efficacy, and drug release. *Int J Pharm*, **516(1-2)**: 91-99. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.11.025
- GUO Y, WANG L, LV P, ZHANG P (2015). Transferrin-conjugated doxorubicin-loaded lipid-coated nanoparticles for the targeting and therapy of lung cancer. *Oncol Lett*, **9(3)**: 1065-1072. doi:10.3892/ol.2014.2840
- GURUNATHAN S, KANG MH, QASIM M, KIM JH (2018). Nanoparticle-Mediated Combination Therapy: Two-in-One Approach for Cancer. *Int J Mol Sci*, **19(10)**. doi:10.3390/ijms19103264
- GÜNAKAN E, DURSUN P (2019). Over Kanseri: Nüks Epiteyal Over Kanserlerinde Tedavi. *Türkiye Klinikleri Gynecology Obstetrics-Special Topics*, **12(1)**:65-74
- HADINOTO K, SUNDARESAN A, CHEOW WS (2013). Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: a review. *Eur J Pharm Biopharm*, **85(3 Pt A)**: 427-443. doi:10.1016/j.ejpb.2013.07.002
- HASCICEK C, SENGELEK-TURK CT, GUMUSTAS M, OZKAN AS, BAKAR F, DAS-EVCIMEN N, SAVASER A, OZKAN Y (2017). Fulvestrant-loaded polymer-based nanoparticles for local

drug delivery: Preparation and in vitro characterization. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **40**: 73-82. doi:10.1016/j.jddst.2017.06.001

HASSANZADEGANROUDSARI M, HEYDARINASAB A, SOLTANI M, CHEN P, AKBARZADEH KHIYAVI A (2019). Enhancing anti-cancer efficacy of carboplatin by PEGylated poly(butyl cyanoacrylate) nano-particles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **54**: 101218. doi:https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101218

HOLLENBACH PW, NGUYEN AN, BRADY H, WILLIAMS M, NING Y, RICHARD N, KRUSHEL L, AUKERMAN SL, HEISE C, MACBETH KJ (2010). A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines. *PLoS One*, **5**(2): e9001. doi:10.1371/journal.pone.0009001

HOLMES D (2015). Ovarian Cancer Beyond Resistance. *Nature*, **527**: 217.

HOLOHAN C, VAN SCHAEYBROECK S, LONGLEY DB, JOHNSTON PG (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer*, **13**(10): 714-726. doi:10.1038/nrc3599

HOUSMAN G, BYLER S, HEERBOTH S, LAPINSKA K, LONGACRE M, SNYDER N, SARKAR S (2014). Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel)*, **6**(3): 1769-1792. doi:10.3390/cancers6031769

HU Q, SUN W, WANG C, GU Z (2016). Recent advances of cocktail chemotherapy by combination drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*, **98**: 19-34. doi:10.1016/j.addr.2015.10.022

ICH GUIDELINE . (2005). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*.

IQBAL M, ZAFAR N, FESSI H, ELAISSARI A (2015). Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. *Int J Pharm*, **496**(2): 173-190. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.10.057

JAIN A, SINGH SK, ARYA SK, KUNDU SC, KAPOOR S (2018). Protein Nanoparticles: Promising Platforms for Drug Delivery Applications. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, **4**(12): 3939-3961. doi:10.1021/acsbomaterials.8b01098

JAIN AK, THAREJA S (2019). In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, **47**(1): 524-539. doi:10.1080/21691401.2018.1561457

JAIN P, TIWARI M, KUMAR N, RAO JV, UDUPA N (2016). Orally Delivered Decitabine Loaded PLGA Nanoparticles Combined with Docetaxel Suppress Solid Tumours: an in vitro investigation. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, **7**(5): 417-424.

JOSE S, JUNA BC, CINU TA, JYOTI H, ALEYKUTTY NA (2016). Carboplatin loaded Surface modified PLGA nanoparticles: Optimization, characterization, and in vivo brain targeting studies. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **142**: 307-314. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.02.026

KANEV MO, GÖKALP MURANLI FD (2015). Flow Sitometri ve Kullanım Alanları. *SAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **20**(1). doi:10.16984/saufenbilder.45424

KARANAM V, MARSLIN G, KRISHNAMOORTHY B, CHELLAN V, SIRAM K, NATARAJAN T, BHASKAR B, FRANKLIN G (2015). Poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles of carboplatin: Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity evaluation in U-87 MG cell lines. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **130**: 48-52. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.04.005

KARIMI M, BAHRAMI S, RAVARI SB, ZANGABAD PS, MIRSEKARI H, BOZORGOMID M, SHAHREZA S, SORI M, HAMBLIN MR (2016). Albumin nanostructures as advanced drug delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv*, **13**(11): 1609-1623. doi:10.1080/17425247.2016.1193149

- KASTNER E, PERRIE Y. (2016). Particle Size Analysis of Micro and Nanoparticles. In: *Analytical Techniques in the Pharmaceutical Sciences. Advances in Delivery Science and Technology*. Ed.: Müllertz, A., Perrie, Y., Rades, T., New York, NY: Springer.
- KEMP JA, SHIM MS, HEO CY, KWON YJ (2016). "Combo" nanomedicine: Co-delivery of multi-modal therapeutics for efficient, targeted, and safe cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, **98**: 3-18. doi:10.1016/j.addr.2015.10.019
- KHAN MM, MADNI A, TORCHILIN V, FILIPCZAK N, PAN J, TAHIR N, SHAH H (2019). Lipid-chitosan hybrid nanoparticles for controlled delivery of cisplatin. *Drug Deliv*, **26(1)**: 765-772. doi:10.1080/10717544.2019.1642420
- KIM MW, KWON SH, CHOI JH, LEE A (2018). A Promising Biocompatible Platform: Lipid-Based and Bio-Inspired Smart Drug Delivery Systems for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*, **19(12)**. doi:10.3390/ijms19123859
- KOBERLE B, TOMICIC MT, USANOVA S, KAINA B (2010). Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim Biophys Acta*, **1806(2)**: 172-182. doi:10.1016/j.bbcan.2010.07.004
- KRATZ F (2008). Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J Control Release*, **132(3)**: 171-183. doi:10.1016/j.jconrel.2008.05.010
- KRISHNAMURTHY S, VAIYAPURI R, ZHANG L, CHAN JM (2015). Lipid-coated polymeric nanoparticles for cancer drug delivery. *Biomater Sci*, **3(7)**: 923-936. doi:10.1039/c4bm00427b
- KROON J, METSELAAR JM, STORM G, VAN DER PLUIJM G (2014). Liposomal nanomedicines in the treatment of prostate cancer. *Cancer Treat Rev*, **40(4)**: 578-584. doi:10.1016/j.ctrv.2013.10.005
- KUMAR A, DIXIT CK. (2017). Methods for characterization of nanoparticles. In: *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids* Ed.: Elsevier. 43-58.
- KURNIAWAN J, SUGA K, KUHL TL (2017). Interaction forces and membrane charge tunability: Oleic acid containing membranes in different pH conditions. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, **1859(2)**: 211-217. doi:10.1016/j.bbamem.2016.11.001
- LAMMERS T, KIESSLING F, HENNINK WE, STORM G (2012). Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *J Control Release*, **161(2)**: 175-187. doi:10.1016/j.jconrel.2011.09.063
- LANGER K, ANHORN MG, STEINHAUSER I, DREIS S, CELEBI D, SCHRICKEL N, FAUST S, VOGEL V (2008). Human serum albumin (HSA) nanoparticles: reproducibility of preparation process and kinetics of enzymatic degradation. *Int J Pharm*, **347(1-2)**: 109-117. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.06.028
- LANGER K, BALTHASAR S, VOGEL V, DINAUER N, VON BRIESEN H, SCHUBERT D (2003). Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, **257(1-2)**: 169-180. doi:10.1016/s0378-5173(03)00134-0
- LEE D-H, CHO G, LIM HM, KIM DS, KIM C, LEE S-H (2013). Comparisons of particle size measurement method for colloidal silica. *Journal of Ceramic Processing Research*, **14(2)**: 274-278.
- LEE ES, YOUN YS (2016). Albumin-based potential drugs: focus on half-life extension and nanoparticle preparation. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, **46(4)**: 305-315. doi:10.1007/s40005-016-0250-3

- LEE Y, THOMPSON DH (2017). Stimuli-responsive liposomes for drug delivery. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, **9(5)**. doi:10.1002/wnan.1450
- LI F, ZHAO X, WANG H, ZHAO R, JI T, REN H, ANDERSON GJ, NIE G, HAO J (2015). Multiple Layer-by-Layer Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles for Improved FOLFIRINOX Chemotherapy in Pancreatic Tumor Models. *Advanced Functional Materials*, **25(5)**: 788-798. doi:10.1002/adfm.201401583
- LI FQ, SU H, WANG J, LIU JY, ZHU QG, FEI YB, PAN YH, HU JH (2008). Preparation and characterization of sodium ferulate entrapped bovine serum albumin nanoparticles for liver targeting. *Int J Pharm*, **349(1-2)**: 274-282. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.08.001
- LI J, WANG X, ZHANG T, WANG C, HUANG Z, LUO X, DENG Y (2015). A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **10(2)**: 81-98. doi:10.1016/j.ajps.2014.09.004
- LI JM, CHEN W, WANG H, JIN C, YU XJ, LU WY, CUI L, FU DL, NI QX, HOU HM (2009). Preparation of albumin nanospheres loaded with gemcitabine and their cytotoxicity against BXP-3 cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin*, **30(9)**: 1337-1343. doi:10.1038/aps.2009.125
- LI L, ZHAO X, YANG C, HU H, QIAO M, CHEN D (2011). Preparation and optimization of doxorubicin-loaded albumin nanoparticles using response surface methodology. *Drug Dev Ind Pharm*, **37(10)**: 1170-1180. doi:10.3109/03639045.2011.563781
- LI P, WANG Y, PENG Z, SHE F, KONG L (2011). Development of chitosan nanoparticles as drug delivery systems for 5-fluorouracil and leucovorin blends. *Carbohydrate Polymers*, **85(3)**: 698-704. doi:10.1016/j.carbpol.2011.03.045
- LI Q, CAI T, HUANG Y, XIA X, COLE SPC, CAI Y (2017). A Review of the Structure, Preparation, and Application of NLCs, PNPs, and PLNs. *Nanomaterials (Basel)*, **7(6)**. doi:10.3390/nano7060122
- LI Y, HU W, SHEN DY, KAVANAGH JJ, FU S (2009). Azacitidine enhances sensitivity of platinum-resistant ovarian cancer cells to carboplatin through induction of apoptosis. *Am J Obstet Gynecol*, **200(2)**: 177 e171-179. doi:10.1016/j.ajog.2008.08.030
- LI Y, ZHANG S, WANG Y, PENG J, FANG F, YANG X (2018). MLH1 enhances the sensitivity of human endometrial carcinoma cells to cisplatin by activating the MLH1/c-Abl apoptosis signaling pathway. *BMC Cancer*, **18(1)**: 1294. doi:10.1186/s12885-018-5218-4
- LIU D, HE C, WANG AZ, LIN W (2013). Application of liposomal technologies for delivery of platinum analogs in oncology. *Int J Nanomedicine*, **8**: 3309-3319. doi:10.2147/IJN.S38354
- LIU F, MU J, XING B (2015). Recent advances on the development of pharmacotherapeutic agents on the basis of human serum albumin. *Curr Pharm Des*, **21(14)**: 1866-1888.
- LOHCHAROENKAL W, WANG L, CHEN YC, ROJANASAKUL Y (2014). Protein nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy. *Biomed Res Int*, **2014**: 180549. doi:10.1155/2014/180549
- LOKICH J, ANDERSON N (1998). Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: An analysis of the literature. *Annals of Oncology*, **9**: 13-21.
- LOUREIRO A, G. AZOIA N, C. GOMES A, CAVACO-PAULO A (2016). Albumin-Based Nanodevices as Drug Carriers. *Current Pharmaceutical Design*, **22(10)**: 1371-1390. doi:10.2174/1381612822666160125114900
- LU Y, WU P, YIN Y, ZHANG H, CAI C (2014). Aptamer-functionalized graphene oxide for highly efficient loading and cancer cell-specific delivery of antitumor drug. *J. Mater. Chem. B*, **2(24)**: 3849-3859. doi:10.1039/c4tb00521j

- LUCHINI A, VITIELLO G (2019). Understanding the Nano-bio Interfaces: Lipid-Coatings for Inorganic Nanoparticles as Promising Strategy for Biomedical Applications. *Frontiers in Chemistry*, **7**. doi:10.3389/fchem.2019.00343
- MAHMOOD T, YANG P-C (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, **4(9)**: 429-434. doi:10.4103/1947-2714.100998
- MAHMUD F, CHUNG SW, ALAM F, CHOI JU, KIM SW, KIM IS, KIM SY, LEE DS, BYUN Y (2017). Metronomic chemotherapy using orally active carboplatin/deoxycholate complex to maintain drug concentration within a tolerable range for effective cancer management. *J Control Release*, **249**: 42-52. doi:10.1016/j.jconrel.2017.01.020
- MANAIA EB, ABUCAFY MP, CHIARI-ANDREO BG, SILVA BL, OSHIRO JUNIOR JA, CHIAVACCI LA (2017). Physicochemical characterization of drug nanocarriers. *Int J Nanomedicine*, **12**: 4991-5011. doi:10.2147/IJN.S133832
- MANDAL B, BHATTACHARJEE H, MITTAL N, SAH H, BALABATHULA P, THOMA LA, WOOD GC (2013). Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. *Nanomedicine*, **9(4)**: 474-491. doi:10.1016/j.nano.2012.11.010
- MANDAL B, MITTAL NK, BALABATHULA P, THOMA LA, WOOD GC (2016). Development and in vitro evaluation of core-shell type lipid-polymer hybrid nanoparticles for the delivery of erlotinib in non-small cell lung cancer. *Eur J Pharm Sci*, **81**: 162-171. doi:10.1016/j.ejps.2015.10.021
- MARTIN LP, HAMILTON TC, SCHILDER RJ (2008). Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res*, **14(5)**: 1291-1295. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-2238
- MATEI D, FANG F, SHEN C, SCHILDER J, ARNOLD A, ZENG Y, BERRY WA, HUANG T, NEPHEW KP (2012). Epigenetic resensitization to platinum in ovarian cancer. *Cancer Res*, **72(9)**: 2197-2205. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3909
- MATEI DE, NEPHEW KP (2010). Epigenetic therapies for chemoresensitization of epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, **116(2)**: 195-201. doi:10.1016/j.ygyno.2009.09.043
- MENG H, WANG MY, LIU HY, LIU XS, SITU A, WU B, JI ZX, CHANG CH, NEL AE (2015). Use of a Lipid-Coated Mesoporous Silica Nanoparticle Platform for Synergistic Gemcitabine and Paclitaxel Delivery to Human Pancreatic Cancer in Mice. *ACS Nano*, **9(4)**: 3540-3557. doi:10.1021/acsnano.5b00510
- MERODIO M, ARNEDO A, RENEDO MJ, IRACHE JM (2001). Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: characterization and in vitro release properties. *Eur J Pharm Sci*, **12(3)**: 251-259.
- MIHANFAR A, FATTAHI A, NEJABATI HR (2019). MicroRNA-mediated drug resistance in ovarian cancer. *J Cell Physiol*, **234(4)**: 3180-3191. doi:10.1002/jcp.26060
- MOMENIMOVAHED Z, TIZNOBAIK A, TAHERI S, SALEHINIYA H (2019). Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. *Int J Womens Health*, **11**: 287-299. doi:10.2147/IJWH.S197604
- MORGAN SL, MEDINA JE, TAYLOR MM, DINULESCU DM (2014). Targeting Platinum Resistant Disease in Ovarian Cancer. *Current Medicinal Chemistry*, **21(26)**: 3009-3020.
- MUKHERJEE A, WATERS AK, KALYAN P, ACHROL AS, KESARI S, YENUGONDA VM (2019). Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a next-generation drug delivery platform: state of the art, emerging technologies, and perspectives. *Int J Nanomedicine*, **14**: 1937-1952. doi:10.2147/IJN.S198353

- MURA S, NICOLAS J, COUVREUR P (2013). Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nat Mater*, **12(11)**: 991-1003. doi:10.1038/nmat3776
- NAKAYAMA K, MIYAZAKI K, KANZAKI A, FUKUMOTO M, TAKEBAYASHI Y (2001). Expression and cisplatin sensitivity of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) in human solid carcinoma cell lines. *Oncology reports*, **8(6)**: 1285-1287.
- NANJWADE BK, SINGH J, PARIKH KA, MANVI FV (2010). Preparation and evaluation of carboplatin biodegradable polymeric nanoparticles. *Int J Pharm*, **385(1-2)**: 176-180. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.10.030
- NATIONAL OVARIAN CANCER COALITION, <http://ovarian.org>, Son erişim tarihi Ocak, 2020
- NEUPANE YR, SABIR MD, AHMAD N, ALI MJ, KOHLI K (2013). Lipid drug conjugate nanoparticle as a novel lipid nanocarrier for the oral delivery of decitabine: ex vivo gut permeation studies. *Nanotechnology*, **24(41)**: 415102.
- NEUPANE YR, SRIVASTAVA M, AHMAD N, KUMAR N, BHATNAGAR A, KOHLI K (2014). Lipid based nanocarrier system for the potential oral delivery of decitabine: formulation design, characterization, ex vivo, and in vivo assessment. *Int J Pharm*, **477(1-2)**: 601-612. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.11.001
- NGOUNE R, PETERS A, VON ELVERFELDT D, WINKLER K, PUTZ G (2016). Accumulating nanoparticles by EPR: A route of no return. *J Control Release*, **238**: 58-70. doi:10.1016/j.jconrel.2016.07.028
- NGUYEN HT, TIAN G, MURPH MM (2014). Molecular epigenetics in the management of ovarian cancer: are we investigating a rational clinical promise? *Front Oncol*, **4**: 71. doi:10.3389/fonc.2014.00071
- NIKOLAOU M, PAVLOPOULOU A, GEORGAKILAS AG, KYRODIMOS E (2018). The challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview. *Clin Exp Metastasis*, **35(4)**: 309-318. doi:10.1007/s10585-018-9903-0
- NOGUEIRA DR, TAVANO L, MITJANS M, PÉREZ L, INFANTE MR, VINARDELL MP (2013). In vitro antitumor activity of methotrexate via pH-sensitive chitosan nanoparticles. *Biomaterials*, **34(11)**: 2758-2772. doi:https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.005
- NOROUZI-BAROUGH L, SAROOKHANI MR, SHARIFI M, MOGHBELINEJAD S, JANGJOO S, SALEHI R (2018). Molecular mechanisms of drug resistance in ovarian cancer. *J Cell Physiol*, **233(6)**: 4546-4562. doi:10.1002/jcp.26289
- O'BRIEN V, BROWN R (2006). Signalling cell cycle arrest and cell death through the MMR System. *Carcinogenesis*, **27(4)**: 682-692. doi:10.1093/carcin/bgi298
- OBEROI HS, NUKOLOVA NV, KABANOV AV, BRONICH TK (2013). Nanocarriers for delivery of platinum anticancer drugs. *Adv Drug Deliv Rev*, **65(13-14)**: 1667-1685. doi:10.1016/j.addr.2013.09.014
- OLIVEIRA MS, ARYASOMAYAJULA B, PATTNI B, MUSSI SV, FERREIRA LAM, TORCHILIN VP (2016). Solid lipid nanoparticles co-loaded with doxorubicin and alpha-tocopherol succinate are effective against drug-resistant cancer cells in monolayer and 3-D spheroid cancer cell models. *Int J Pharm*, **512(1)**: 292-300. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.08.049
- OLUSANYA TOB, HAJ AHMAD RR, IBEGBU DM, SMITH JR, ELKORDY AA (2018). Liposomal Drug Delivery Systems and Anticancer Drugs. *Molecules*, **23(4)**. doi:10.3390/molecules23040907

- PALANGE AL, DI MASCOLO D, CARALLO C, GNASSO A, DECUZZI P (2014). Lipid-polymer nanoparticles encapsulating curcumin for modulating the vascular deposition of breast cancer cells. *Nanomedicine*, **10(5)**: 991-1002. doi:10.1016/j.nano.2014.02.004
- PALAZZOLO S, BAYDA S, HADLA M, CALIGIURI I, CORONA G, TOFFOLI G, RIZZOLIO F (2018). The Clinical Translation of Organic Nanomaterials for Cancer Therapy: A Focus on Polymeric Nanoparticles, Micelles, Liposomes and Exosomes. *Curr Med Chem*, **25(34)**: 4224-4268. doi:10.2174/0929867324666170830113755
- PAN X, YU S, YAO P, SHAO Z (2007). Self-assembly of β -casein and lysozyme. *Journal of Colloid and Interface Science*, **316(2)**: 405-412.
- PANI E, STOJIC L, EL-SHEMERLY M, JIRICNY J, FERRARI S (2007). Mismatch repair status and the response of human cells to cisplatin. *Cell Cycle*, **6(14)**: 1796-1802.
- PARK NH, CHENG W, LAI F, YANG C, FLOREZ DE SESSIONS P, PERIASWAMY B, WENHAN CHU C, BIANCO S, LIU S, VENKATARAMAN S, CHEN Q, YANG YY, HEDRICK JL (2018). Addressing Drug Resistance in Cancer with Macromolecular Chemotherapeutic Agents. *J Am Chem Soc*, **140(12)**: 4244-4252. doi:10.1021/jacs.7b11468
- PATEL RP, PATEL H, BARIA AH (2009). Formulation and Evaluation of Liposomes of Ketoconazole. *International Journal of Drug Delivery Technology*, **1(1)**: 16-23.
- PECORINO L. (2012). Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics Third Edition. (Ed.). Great Clarendon Street, Oxford, OX2 6DP, United Kingdom: Oxford University Press.
- PEREZ-HERRERO E, FERNANDEZ-MEDARDE A (2015). Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm*, **93**: 52-79. doi:10.1016/j.ejpb.2015.03.018
- PLUMB JA, STRATHDEE G, SLUDDEN J, KAYE SB, BROWN R (2000). Reversal of Drug Resistance in Human Tumor Xenografts by 2'-Deoxy-5-azacytidine-induced Demethylation of the hMLH1 Gene Promoter. *Cancer Research*, **60**: 6039-6044.
- POLITIS SN, COLOMBO P, COLOMBO G, D MR (2017). Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug Dev Ind Pharm*, **43(6)**: 889-901. doi:10.1080/03639045.2017.1291672
- QIN T, SI J, RAYNAL NJ, WANG X, GHARIBYAN V, AHMED S, HU X, JIN C, LU Y, SHU J, ESTECIO MR, JELINEK J, ISSA JP (2015). Epigenetic synergy between decitabine and platinum derivatives. *Clin Epigenetics*, **7(1)**: 97. doi:10.1186/s13148-015-0131-z
- REIS CP, NEUFELD RJ, RIBEIRO AJ, VEIGA F (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*, **2(1)**: 8-21. doi:10.1016/j.nano.2005.12.003
- RICHTER RP, BERAT R, BRISSON AR (2006). Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View. *Langmuir*, **22**: 3497-3050.
- RISS TL, MORAVEC RA (2004). Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay and drug development technologies*, **2(1)**: 51-62.
- RUIZ ME, GANTNER ME, TALEVI A (2014). Applications of Nanosystems to Anticancer Drug Therapy (Part II. Dendrimers, Micelles, Lipid-based Nanosystems). *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, **9(1)**.
- SADHUKHA T, PRABHA S (2014). Encapsulation in nanoparticles improves anti-cancer efficacy of carboplatin. *AAPS PharmSciTech*, **15(4)**: 1029-1038. doi:10.1208/s12249-014-0139-2

- SAKDISET P, OKADA A, TODO H, SUGIBAYASHI K (2018). Selection of phospholipids to design liposome preparations with high skin penetration-enhancing effects. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **44**: 58-64. doi:10.1016/j.jddst.2017.11.021
- SATO S, ITAMOUCHI H (2015). Ovarian Cancer and Drug Resistance. *Current Obstetrics and Gynecology Reports*, **4(1)**: 18-25. doi:10.1007/s13669-014-0111-x
- SAVASER A, ESIM O, KURBANOGU S, OZKAN SA, OZKAN Y. (2018). Current perspectives on drug release studies from polymeric nanoparticles. In: *Organic Materials as Smart Nanocarriers for Drug Delivery* Ed. 101-145.
- SCHOLFIELD CR (1981). Lecithin Symposium: Composition of soybean lecithin. *Journal of the American Oil Chemists' Society*: 889-891.
- SEBAK S, MIRZAEI M, MALHOTRA M, KULAMARVA A, PRAKASH S (2010). Human serum albumin nanoparticles as an efficient niosome drug delivery system for potential use in breast cancer: preparation and in vitro analysis. *International Journal of Nanomedicine*. doi:10.2147/ijn.S10443
- SENGEL-TURK CT, HASCICEK C (2017). Design of lipid-polymer hybrid nanoparticles for therapy of BPH: Part I. Formulation optimization using a design of experiment approach. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **39**: 16-27. doi:10.1016/j.jddst.2017.02.012
- SENGEL-TURK CT, HASCICEK C, DOGAN AL, ESENDAGLI G, GUC D, GONUL N (2012). Preparation and in vitro evaluation of meloxicam-loaded PLGA nanoparticles on HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Drug Dev Ind Pharm*, **38(9)**: 1107-1116. doi:10.3109/03639045.2011.641562
- SENGUPTA S, EAVARONE D, CAPILA I, ZHAO G, WATSON N, KIZILTEPE T, SASISEKHARAN R (2005). Temporal targeting of tumour cells and neovasculature with a nanoscale delivery system. *Nature*, **436(7050)**: 568-572. doi:10.1038/nature03794
- SEZGIN Z, YÜKSEL N, BAYKARA T (2003). Preparation and Characterization of Polymeric Micelles as Drug Carrier System. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, **32(2)**: 125-142.
- SHAIKH MV, KALA M, NIVSARKAR M (2017). Formulation and optimization of doxorubicin loaded polymeric nanoparticles using Box-Behnken design: ex-vivo stability and in-vitro activity. *Eur J Pharm Sci*, **100**: 262-272. doi:10.1016/j.ejps.2017.01.026
- SHEN J, BURGESS DJ (2013). In Vitro Dissolution Testing Strategies for Nanoparticulate Drug Delivery Systems: Recent Developments and Challenges. *Drug Deliv Transl Res*, **3(5)**: 409-415. doi:10.1007/s13346-013-0129-z
- SHI J, XU Y, XU X, ZHU X, PRIDGEN E, WU J, VOTRUBA AR, SWAMI A, ZETTER BR, FAROKHZAD OC (2014). Hybrid lipid-polymer nanoparticles for sustained siRNA delivery and gene silencing. *Nanomedicine*, **10(5)**: 897-900. doi:10.1016/j.nano.2014.03.006
- SHOME D, PODDAR N, SHARMA V, SHEOREY U, MARU GB, INGLE A, SARIN R, BANAVALI S, DIKSHIT R, JAIN V, HONAVAR S, BELLARE J (2009). Does a nanomolecule of Carboplatin injected periocularly help in attaining higher intravitreal concentrations? *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **50(12)**: 5896-5900. doi:10.1167/iovs.09-3914
- SHU X, MENG Y, WAN L, LI G, YANG M, JIN W (2014). pH-Responsive Aqueous Foams of Oleic Acid/Oleate Solution. *Journal of Dispersion Science and Technology*, **35(2)**: 293-300. doi:10.1080/01932691.2013.785363
- SONG X, ZHAO Y, HOU S, XU F, ZHAO R, HE J, CAI Z, LI Y, CHEN Q (2008). Dual agents loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *Eur J Pharm Biopharm*, **69(2)**: 445-453. doi:10.1016/j.ejpb.2008.01.013

- SOUZA TGF, CIMINELLI VST, MOHALLEM NDS (2016). A comparison of TEM and DLS methods to characterize size distribution of ceramic nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series*, **733**: 012039. doi:10.1088/1742-6596/733/1/012039
- SRISUK P, THONGNOPNUA P, RAKTANONCHAI U, KANOKPANONT S (2012). Physico-chemical characteristics of methotrexate-entrapped oleic acid-containing deformable liposomes for in vitro transepidermal delivery targeting psoriasis treatment. *Int J Pharm*, **427(2)**: 426-434. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.01.045
- STEELE N, FINN P, BROWN R, PLUMB JA (2009). Combined inhibition of DNA methylation and histone acetylation enhances gene re-expression and drug sensitivity in vivo. *Br J Cancer*, **100(5)**: 758-763. doi:10.1038/sj.bjc.6604932
- STEICHEN SD, CALDORERA-MOORE M, PEPPAS NA (2013). A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *Eur J Pharm Sci*, **48(3)**: 416-427. doi:10.1016/j.ejps.2012.12.006
- STEINHAUSER IM, LANGER K, STREBHARDT KM, SPANKUCH B (2008). Effect of trastuzumab-modified antisense oligonucleotide-loaded human serum albumin nanoparticles prepared by heat denaturation. *Biomaterials*, **29(29)**: 4022-4028. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.07.001
- STRESEMANN C, LYKO F (2008). Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer*, **123(1)**: 8-13. doi:10.1002/ijc.23607
- SU H, HU JH, LI FQ. (2005). Effects of surfactants on the pharmaceutical characteristics of bovine serum albumin nanoparticles of highly water-soluble drug sodium ferulate. (Ed. Vol. 5).
- SU X, WANG Z, LI L, ZHENG M, ZHENG C, GONG P, ZHAO P, MA Y, TAO Q, CAI L (2013). Lipid-polymer nanoparticles encapsulating doxorubicin and 2'-deoxy-5-azacytidine enhance the sensitivity of cancer cells to chemical therapeutics. *Mol Pharm*, **10(5)**: 1901-1909. doi:10.1021/mp300675c
- TAHIR N, MADNI A, BALASUBRAMANIAN V, REHMAN M, CORREIA A, KASHIF PM, MAKILA E, SALONEN J, SANTOS HA (2017). Development and optimization of methotrexate-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles for controlled drug delivery applications. *Int J Pharm*, **533(1)**: 156-168. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.09.061
- TAHIR N, MADNI A, CORREIA A, REHMAN M, BALASUBRAMANIAN V, KHAN MM, SANTOS HA (2019). Lipid-polymer hybrid nanoparticles for controlled delivery of hydrophilic and lipophilic doxorubicin for breast cancer therapy. *Int J Nanomedicine*, **14**: 4961-4974. doi:10.2147/IJN.S209325
- TAN Q, SAGGAR JK, YU M, WANG M, TANNOCK IF (2015). Mechanisms of Drug Resistance Related to the Microenvironment of Solid Tumors and Possible Strategies to Inhibit Them. *Cancer Journal*, **21(4)**: 254-262. doi:10.1097/Ppo.0000000000000131
- TAN S, LI X, GUO Y, ZHANG Z (2013). Lipid-enveloped hybrid nanoparticles for drug delivery. *Nanoscale*, **5(3)**: 860-872. doi:10.1039/c2nr32880a
- TANEJA N, SINGH KK (2018). Rational design of polysorbate 80 stabilized human serum albumin nanoparticles tailored for high drug loading and entrapment of irinotecan. *Int J Pharm*, **536(1)**: 82-94. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.11.024
- TANG Q, YU B, GAO L, CONG H, SONG N, LU C (2018). Stimuli Responsive Nanoparticles for Controlled Anti-cancer Drug Release. *Curr Med Chem*, **25(16)**: 1837-1866. doi:10.2174/0929867325666180111095913

- TARHINI M, BENLYAMANI I, HAMDANI S, AGUSTI G, FESSI H, GREIGE-GERGES H, BENTAHER A, ELAISSARI A (2018). Protein-Based Nanoparticle Preparation via Nanoprecipitation Method. *Materials (Basel)*, **11(3)**. doi:10.3390/ma11030394
- TEKARSLAN ŞAHİN ŞH, MESUT B, ÖZSOY Y (2017). Applications of Cell Culture Studies in Pharmaceutical Technology. *ACTA Pharmaceutica Scientia*, **55(3)**.
- TILKAN MGY, ÖZDEMİR N (2017). Investigation of the parameters affecting the release of flurbiprofen from chitosan microspheres. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **53(4)**.
- TOPPING RP, WILKINSON JC, SCARPINATO KD (2009). Mismatch repair protein deficiency compromises cisplatin-induced apoptotic signaling. *J Biol Chem*, **284(21)**: 14029-14039. doi:10.1074/jbc.M809303200
- TORCHILIN VP, LUKYANOV AN, KILIBANOV AL, OMEL'YANENKO VG (1992). Interaction between oleic-acid-containing pH-sensitive and plain liposomes. *Federation of European Biochemical Societies*, **305(3)**: 185-188.
- VAUPEL P (2004). Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiat Oncol*, **14(3)**: 198-206. doi:10.1016/j.semradonc.2004.04.008
- VERMA D, GULATI N, KAUL S, MUKHERJEE S, NAGAICH U (2018). Protein Based Nanostructures for Drug Delivery. *J Pharm (Cairo)*, **2018**: 9285854. doi:10.1155/2018/9285854
- VETTEN MA, YAH CS, SINGH T, GULUMIAN M (2014). Challenges facing sterilization and depyrogenation of nanoparticles: effects on structural stability and biomedical applications. *Nanomedicine*, **10(7)**: 1391-1399. doi:10.1016/j.nano.2014.03.017
- VOZZA G, DANISH M, BYRNE HJ, FRIAS JM, RYAN SM (2018). Application of Box-Behnken experimental design for the formulation and optimisation of selenomethionine-loaded chitosan nanoparticles coated with zein for oral delivery. *Int J Pharm*, **551(1-2)**: 257-269. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.08.050
- VURAL I, KAS H, ÖNER L, HINCAL A (1991). Cyclophosphamide loaded albumin microspheres. IV: Application of factorial design. *STP Pharma sciences*, **1(5)**: 318-320.
- WANG C, SU L, WU C, WU J, ZHU C, YUAN G (2016). RGD peptide targeted lipid-coated nanoparticles for combinatorial delivery of sorafenib and quercetin against hepatocellular carcinoma. *Drug Dev Ind Pharm*, **42(12)**: 1938-1944. doi:10.1080/03639045.2016.1185435
- WANG H, ZHAO P, SU W, WANG S, LIAO Z, NIU R, CHANG J (2010). PLGA/polymeric liposome for targeted drug and gene co-delivery. *Biomaterials*, **31(33)**: 8741-8748. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.07.082
- WANG JJ, ZENG ZW, XIAO RZ, XIE T, ZHOU GL, ZHAN XR, WANG SL (2011). Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *Int J Nanomedicine*, **6**: 765-774. doi:10.2147/IJN.S17296
- WANG L, WANG W, RUI Z, ZHOU D (2016). The effective combination therapy against human osteosarcoma: doxorubicin plus curcumin co-encapsulated lipid-coated polymeric nanoparticulate drug delivery system. *Drug Deliv*, **23(9)**: 3200-3208. doi:10.3109/10717544.2016.1162875
- WANG Q, ALSHAKER H, BOHLER T, SRIVATS S, CHAO Y, COOPER C, PCHEJETSKI D (2017). Core shell lipid-polymer hybrid nanoparticles with combined docetaxel and molecular targeted therapy for the treatment of metastatic prostate cancer. *Sci Rep*, **7(1)**: 5901. doi:10.1038/s41598-017-06142-x

- WANG Y, ZHANG H, HAO J, LI B, LI M, XIUWEN W (2016). Lung cancer combination therapy: co-delivery of paclitaxel and doxorubicin by nanostructured lipid carriers for synergistic effect. *Drug Deliv*, **23(4)**: 1398-1403. doi:10.3109/10717544.2015.1055619
- WANG Z, TIAN Y, ZHANG H, QIN Y, LI D, GAN L, WU F (2016). Using hyaluronic acid-functionalized pH stimuli-responsive mesoporous silica nanoparticles for targeted delivery to CD44-overexpressing cancer cells. *Int J Nanomedicine*, **11**: 6485-6497. doi:10.2147/IJN.S117184
- WATANABE Y, UEDA H, ETOH T, KOIKE E, FUJINAMI N, MITSUHASHI A, HOSHIAI H (2007). A change in promoter methylation of hMLH1 is a cause of acquired resistance to platinum-based chemotherapy in epithelial ovarian cancer. *Anticancer Research*, **27**: 1449-1452.
- WEBB PM, JORDAN SJ (2017). Epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, **41**: 3-14. doi:10.1016/j.bpobgyn.2016.08.006
- WEBER C, COESTER C, KREUTER J, LANGER K (2000). Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, **194**: 91-102.
- WONG HL, BENDAYAN R, RAUTH AM, WU XY (2006). Simultaneous delivery of doxorubicin and GG918 (Elacridar) by new polymer-lipid hybrid nanoparticles (PLN) for enhanced treatment of multidrug-resistant breast cancer. *J Control Release*, **116(3)**: 275-284. doi:10.1016/j.jconrel.2006.09.007
- WU FL, LI RT, YANG M, YUE GF, WANG HY, LIU Q, CUI FB, WU PY, DING H, YU LX, QIAN XP, LIU BR (2015). Gelatinases-stimuli nanoparticles encapsulating 5-fluorouridine and 5-aza-2'-deoxycytidine enhance the sensitivity of gastric cancer cells to chemical therapeutics. *Cancer Lett*, **363(1)**: 7-16. doi:10.1016/j.canlet.2015.01.006
- WU GS, DING Z (2002). Caspase 9 is required for p53-dependent apoptosis and chemosensitivity in a human ovarian cancer cell line. *Oncogene*, **21**: 1-8. doi:10.1038/sj/onc/1205020
- WU X, HU Z, NIZZERO S, ZHANG G, RAMIREZ MR, SHI C, ZHOU J, FERRARI M, SHEN H (2017). Bone-targeting nanoparticle to co-deliver decitabine and arsenic trioxide for effective therapy of myelodysplastic syndrome with low systemic toxicity. *J Control Release*, **268**: 92-101. doi:10.1016/j.jconrel.2017.10.012
- WYSOKIŃSKI R, KUDUK-JAWORSKA J, MICHALSKA D (2006). Electronic structure, Raman and infrared spectra, and vibrational assignment of carboplatin. Density functional theory studies††The authors dedicate this paper to Professor Henryk Chojnacki on the occasion of his 70th birthday. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, **758(2)**: 169-179. doi:https://doi.org/10.1016/j.theochem.2005.10.032
- XIN Y, HUANG Q, TANG JQ, HOU XY, ZHANG P, ZHANG LZ, JIANG G (2016). Nanoscale drug delivery for targeted chemotherapy. *Cancer Lett*, **379(1)**: 24-31. doi:10.1016/j.canlet.2016.05.023
- XU X, HO W, ZHANG X, BERTRAND N, FAROKHZAD O (2015). Cancer nanomedicine: from targeted delivery to combination therapy. *Trends Mol Med*, **21(4)**: 223-232. doi:10.1016/j.molmed.2015.01.001
- YAMAMOTO E, MIYAZAKI S, AOYAMA C, KATO M (2018). A simple and rapid measurement method of encapsulation efficiency of doxorubicin loaded liposomes by direct injection of the liposomal suspension to liquid chromatography. *Int J Pharm*, **536(1)**: 21-28. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.11.035
- YAN B, PARK SH, BALASUBRAMANIAM VM (2017). Influence of high pressure homogenization with and without lecithin on particle size and physicochemical properties of whey protein-based emulsions. **40(6)**: e12578. doi:10.1111/jfpe.12578

- YANAMADALA S, LJUNGMAN M (2003). Potential Role of MLH1 in the Induction of p53 and Apoptosis by Blocking Transcription on Damaged DNA Templates. *Molecular Cancer Research*, **1**: 747-754.
- YANG Q, YANG Y, LI L, SUN W, ZHU X, HUANG Y (2015). Polymeric nanomedicine for tumor-targeted combination therapy to elicit synergistic genotoxicity against prostate cancer. *ACS Appl Mater Interfaces*, **7**(12): 6661-6673. doi:10.1021/am509204u
- YANG X, ZHENG J, SONG Q, XIE F, TANG J, CHEN J, WU J, LI C, CUI W, TANG Y, XIE J, ZHENG J (2015). Determination methods for the anticancer drug dicycloplatin, a supramolecule assembled through hydrogen bonding. *Analyst*, **140**(8): 2704-2712. doi:10.1039/c4an02274b
- YANG Z, LUO X, ZHANG X, LIU J, JIANG Q (2013). Targeted delivery of 10-hydroxycamptothecin to human breast cancers by cyclic RGD-modified lipid-polymer hybrid nanoparticles. *Biomed Mater*, **8**(2): 025012. doi:10.1088/1748-6041/8/2/025012
- YIN F, LIU X, LI D, WANG Q, ZHANG W, LI L (2013). Tumor suppressor genes associated with drug resistance in ovarian cancer (review). *Oncol Rep*, **30**(1): 3-10. doi:10.3892/or.2013.2446
- YINGCHONCHAROEN P, KALINOWSKI DS, RICHARDSON DR (2016). Lipid-Based Drug Delivery Systems in Cancer Therapy: What Is Available and What Is Yet to Come. *Pharmacol Rev*, **68**(3): 701-787. doi:10.1124/pr.115.012070
- YU Z, YU M, ZHANG ZB, HONG G, XIONG QQ (2014). Bovine serum albumin nanoparticles as controlled release carrier for local drug delivery to the inner ear. *Nanoscale Research Letters*, **9**(343). doi:Artn 343
10.1186/1556-276x-9-343
- ZAHEDI P, YOGANATHAN R, PIQUETTE-MILLER M, ALLEN C (2012). Recent advances in drug delivery strategies for treatment of ovarian cancer. *Expert Opin Drug Delivery*, **9**(5): 567-583.
- ZELLER C, BROWN R (2010). Therapeutic modulation of epigenetic drivers of drug resistance in ovarian cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, **2**(5): 319-329. doi:10.1177/
- ZENG S-Q, CHEN Y-Z, CHEN Y, LIU H (2017). Lipid-polymer hybrid nanoparticles for synergistic drug delivery to overcome cancer drug resistance. *New Journal of Chemistry*, **41**(4): 1518-1525.
- ZHANG J, HU J, CHAN HF, SKIBBA M, LIANG G, CHEN M (2016). iRGD decorated lipid-polymer hybrid nanoparticles for targeted co-delivery of doxorubicin and sorafenib to enhance anti-hepatocellular carcinoma efficacy. *Nanomedicine*, **12**(5): 1303-1311. doi:10.1016/j.nano.2016.01.017
- ZHANG J, WANG L, FAI CHAN H, XIE W, CHEN S, HE C, WANG Y, CHEN M (2017). Co-delivery of paclitaxel and tetrandrine via iRGD peptide conjugated lipid-polymer hybrid nanoparticles overcome multidrug resistance in cancer cells. *Sci Rep*, **7**: 46057. doi:10.1038/srep46057
- ZHANG L, ZHANG L (2010). Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Applications. *Nano LIFE*, **1**(1-2): 163-173. doi:10.1142/s179398441000016x
- ZHANG RX, CAI P, ZHANG T, CHEN K, LI J, CHENG J, PANG KS, ADISSU HA, RAUTH AM, WU XY (2016). Polymer-lipid hybrid nanoparticles synchronize pharmacokinetics of co-encapsulated doxorubicin-mitomycin C and enable their spatiotemporal co-delivery and local bioavailability in breast tumor. *Nanomedicine*, **12**(5): 1279-1290. doi:10.1016/j.nano.2015.12.383

- ZHANG RX, WONG HL, XUE HY, EOH JY, WU XY (2016). Nanomedicine of synergistic drug combinations for cancer therapy - Strategies and perspectives. *J Control Release*, **240**: 489-503. doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.012
- ZHANG T, MA J, LI C, LIN K, LOU F, JIANG H, GAO Y, YANG Y, MING C, RUAN B (2017). Core-shell lipid polymer nanoparticles for combined chemo and gene therapy of childhood head and neck cancers. *Oncol Rep*, **37(3)**: 1653-1661. doi:10.3892/or.2017.5365
- ZHAO J, ZHANG X, SUN X, ZHAO M, YU C, LEE RJ, SUN F, ZHOU Y, LI Y, TENG L (2018). Dual-functional lipid polymeric hybrid pH-responsive nanoparticles decorated with cell penetrating peptide and folate for therapy against rheumatoid arthritis. *Eur J Pharm Biopharm*, **130**: 39-47. doi:10.1016/j.ejpb.2018.06.020
- ZHAO X, LI F, LI Y, WANG H, REN H, CHEN J, NIE G, HAO J (2015). Co-delivery of HIF1alpha siRNA and gemcitabine via biocompatible lipid-polymer hybrid nanoparticles for effective treatment of pancreatic cancer. *Biomaterials*, **46**: 13-25. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.12.028
- ZU Y, ZHANG Y, ZHAO X, ZHANG Q, LIU Y, JIANG R (2009). Optimization of the preparation process of vinblastine sulfate (VBLs)-loaded folateconjugated bovine serum albumin (BsA) nanoparticles for tumor-targeted drug delivery using response surface methodology (RsM). *International Journal of Nanomedicine*, **4**: 321-333.
- ZUCCO F, DE ANGELIS I, STAMMATI A. (1998). Cellular models for in vitro toxicity testing. In: *Animal Cell Culture Techniques* Ed.: Springer. 395-422.

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler:

Adı	Özge
Soyadı	Eşim
Doğum yeri ve tarihi	Ankara – 01.10.1990
Uyruğu	T.C.
Medeni durumu	Evli
İletişim adresi ve telefonu	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Emniyet Mah. Degol Cd. No:4 Posta Kod:06560 Yenimahalle, Ankara 03122033157

II. Eğitimi

Lisans	Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2008-2013)
Lise	Ankara Atatürk Lisesi (2004-2008)
İlköğretim	Tevfik İleri İlköğretim Okulu (2004)
Yabancı dili	İngilizce

III. Ünvanları

Araştırma görevlisi (2014-)

IV. Mesleki Deneyimi

Araştırma görevlisi,
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı (2014-)

V. Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar:

TÜFTAD (Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği)

VI. Bilimsel İlgi Alanları:

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Sözlü Bildiriler

1. **Gun O.** Hascicek C, Over Kanseri Tedavisinde Nanosistemler Ve Uygulamaları, 1. Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Sempozyumu-ANES 2017, 1-2 Haziran 2017, Eskişehir, Türkiye.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

1. **Gun O.** Ergin, A D, Gorgoz M., Camca G R, Arisoy S, Yuksel N, “Comparative Evaluation Of Granulac®-Starch Granules Produced by Wet Granulation Method Using PVP Binder in a Low Shear Mixer Granulator”, 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-11), Ankara, Haziran 9-12, 2015
2. **Gun O.** Hascicek C, “Desing and Evaluation of Telmisartan Press-Coated Tablets For Pulsatile Drug Delivery” International Gazi Pharma Symposium (GPSS-2015), Antalya, Kasım 12-15, 2015
3. Hascicek C, **Esim O.** Evaluation of the effect of polymer viscosity on drug release from pulsatile release tablets. 2nd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2017), October 11-13, 2017, Ankara, Turkey
4. **Esim O.** Hascicek C. Preparation and characterization of ciprofloxacin HCl loaded chitosan nanoparticles. 11th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, March 19-22, 2018, Granada – P.E.C.G., Spain.
5. **Esim O.** Gumustas M, Hascicek C, Ozkan SA. Development and validation of a HILIC method for simultaneous determination of carboplatin and

decitabine. 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-12), June 26-29, 2018, Ankara, Turkey.

6. Hascicek C. Doburlu H, **Esim O.** Development of time controlled multi-copmressed dexketoprofen trometamol tablets. 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-12), June 26-29, 2018, Ankara, Turkey.
7. **Esim O.**, Gumustas M, Hascicek C, Ozkan SA. Analytical Method Development and Validation For Simultaneous Determination of Carboplatine and Decitabine by Using HPLC, 19th International Pharmaceutical Technology Symposium (IPTS-19), September 17-19, 2018, Antalya, Turkey.
8. **Esim O.**, Hasciek C, Investigation of The Effects of Formulation Parameters on Carboplatin Loaded Bovine Serum Albumin Nanoparticles, 8th BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences, October 13-16, 2019, İzmir, Turkey.

Ulusal hakemli dergilerde yayınlanmış makaleler

1. Dereli N., **Gün, Ö.**, Canan HASÇİÇEK, Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Nanoboyutlu İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Kullanımı, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 40(1): 54-73, 2016

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanmış makaleler

1. Hascicek C., **Gun O.**, Nano drug delivery systems for ovarian cancer therapy. Integrative Cancer Science and Therapy, 4: 1-4, 2017

VII. Bilimsel Etkinlikleri:

Seminerler

1. Kanser Tedavisinde Nanosistemlerin Kullanılması (2015)
2. Over Kanserinde Alternatif Tedavi Yaklaşımları (2016)

Projeler

1. Canan Hasçıçek, A. Lale Doğan, Özge Eşim, M. Emre Gedik, Karboplatin ile birlikte Desitabin Yüklü Nanopartiküler Sistemlerin Geliştirilmesi ve Platine Duyarlı/ Dirençli Over Kanseri Hücrelerinde Etkilerinin İncelenmesi, TÜBİTAK, 1001 Projesi, 116S395, 15.04.2017-15.04.2020 (Devam ediyor)

