



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK
BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



POLİMERİK NANOTÜBÜLER YAPILARIN İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM OLARAK HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Aslıhan Hilal ALGAN

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Ayşegül KARATAŞ

2014- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POLİMERİK NANOTÜBÜLER YAPILARIN İLAÇ TAŞIYICI
SİSTEM OLARAK HAZIRLANMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

Aslıhan Hilal ALGAN

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Ayşegül KARATAŞ

Bu tez TÜBİTAK tarafından 113S201 Proje numarası ile desteklenmiştir.

2014- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Teknoloji Doktora **Programı**

çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından
Doktora **tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 26/12/2014

Prof. Dr. Nilüfer TARIMCI

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Asuman BOZKIR

Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Arzu BEŞİKCI

Ankara Üniversitesi

Doç. Dr. Ayşegöl KARATAŞ

Ankara Üniversitesi

Doç. Dr. Ayhan SAVAŞER

GATA Eczacılık Bilimleri

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Partiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Biyodağılımı	3
1.2. Partiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Biyodağılımına Etki Eden Faktörler	4
1.2.1. Nanoyapılı Taşıyıcının Boyutu	5
1.2.2. Nanoyapılı Taşıyıcının Yüzey Özellikleri	6
1.2.3. Nanoyapılı Taşıyıcının Esnekliği	7
1.2.3. Nanoyapılı Taşıyıcının Partikül Şekli	7
1.3. Küresel Olmayan Partiküllerin Üretim Yöntemleri	10
1.3.1. Film Gerdirme Yöntemi (Film stretching)	10
1.3.2. Mikroakışkan Sistemler	11
1.3.3. Kalıptan geçirme (Template Assembly)	12
1.3.4. PRINT® yöntemi (Islanmayan Kalıplarda Partikül Üretimi)	13
1.3.5. Membran Yardımcılı Nanofabrikasyon Yöntemi	14
1.4. Küresel Olmayan Partiküllerin Biyolojik Davranışı	19
1.4.1. Küresel Olmayan Partiküllerin Kandaki Dolaşım Süresi	19
1.4.2. Küresel Olmayan Partiküllerin Biyodağılımı	21
1.4.3. Küresel Olmayan İlaç Taşınmasında Kullanımı	21
1.4.4. Küresel Olmayan Partiküllerin Hücresel Alımı	21
1.5. Kanser	22
1.5.1. Kanser İçin Geliştirilen Partiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler	23
1.5.2. Nanoyapılar Kullanarak Kanser Bölgesine Pasif Hedefleme	24
1.6. Etoposid Hakkında Genel Bilgiler	27
1.6.1. Fizikokimyasal Özellikleri	28
1.6.2. Etoposid'in Antitümöral Etki Mekanizması	28
1.6.3. Etoposid'in Farmakokinetik Özellikleri	32
1.6.4. Etoposid'in İlaç Taşıyıcı Sistemlerle Formüle Edildiği Çalışmalar	33
2. GEREÇ VE YÖNTEM	34
2.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler	34
2.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	34
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	35
2.1.3. Çalışmada Kullanılan Tampon Ortamının Bileşimi	36
2.1.4. Çalışmada Kullanılan Maddelerin Kimyasal Formülleri	37
2.2. Etoposid (ETP) Üzerinde Yapılan Çalışmalar	39
2.2.1. ETP'nin Fourier Transform Infrared (FTIR) Spektroskopisi ile Analizi	39
2.2.2. ETP'nin Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) ile Analizi	39
2.2.3. ETP'nin Ultra Viole (UV) Spektrofotometre ile Analizi	39

2.2.4. ETP'nin Asetonitril Ortamında HPLC ile Analizi	40
2.2.5. ETP'nin Metanol Ortamında HPLC ile Analizi	40
2.2.6. ETP'nin PBS-Tw (pH 7,4) Ortamında HPLC ile Analizi	41
2.2.7. İstatistiksel Değerlendirme	41
2.2.8. Analitik Yöntemin Validasyonu	41
2.3. Nanoyapıların Üretimi ve İncelenmesine Yönelik Çalışmalar	45
2.3.1. Damlatma Yöntemiyle Nanoyapıların Üretimi ve İncelenmesi	46
2.3.2. Eritme Yöntemiyle Nanoyapıların Üretimi ve İncelenmesi	49
2.3.3. Daldırma Yöntemiyle Nanoyapıların Üretimi ve İncelenmesi	52
2.3.3.1. Nanoyapılarda Etken Madde Yükleme Etkinliği ve Yükleme Kapasitesinin Tayini	54
2.3.3.2. Etken Madde Yükleme Etkinliğini Artırma Çalışmaları	55
2.3.4. Vakum Yöntemiyle Nanoyapıların Üretimi ve İncelenmesi	56
2.3.5. Seçilen Daldırma Yöntemiyle Yeni Formülasyonların Üretimi ve İncelenmesi	58
2.3.5.1. Nanoyapıların Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS) Analizi	59
2.3.5.2. AAO Membranı Soğukta Çözme Tekniğinin Geliştirilmesi	60
2.3.5.3. AAO Membranı Soğukta Çözme Tekniğiyle Elde Edilen Nanoyapılarda Üretim Veriminin Belirlenmesi	61
2.3.6. Sonuç Formülasyon Üzerinde Yapılan Çalışmalar	61
2.3.6.1. Sonuç Formülasyonun Üretim Tekrarlanabilirliğinin Tayini	62
2.3.6.2. Sonuç Formülasyonda Zeta Potansiyel Analizi	62
2.3.6.3. Sonuç Formülasyonda FTIR Analizi	62
2.3.6.4. Sonuç Formülasyonun DSC Analizi	63
2.3.6.5. Sonuç Formülasyonun Etken Madde Salım Çalışması	63
2.3.7. Hücre Kültürü Çalışmaları	63
2.3.7.1. Hücresel Alım Çalışmaları	64
2.3.7.2. Kanser Hücreleri Üzerinde Sitotoksosite Çalışmaları	65
3. BULGULAR	67
3.1. ETP Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular	67
3.1.1. ETP'nin FTIR Spektroskopisi ile Analizine Ait Bulgular	67
3.1.2. ETP'nin Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) ile Analizine Ait Bulgular	68
3.1.3. ETP'nin Asetonitril Ortamında Ultra Viole (UV) Spektrofotometre ile Analizine Ait Bulgular	69
3.1.4. ETP'nin Asetonitril Ortamında HPLC ile Analizine Ait Bulgular	71
3.1.5. ETP'nin Metanol Ortamında HPLC ile Analizine Ait Bulgular	71
3.1.6. ETP'nin PBS-Tw (pH 7,4) Ortamında HPLC ile Analizine Ait Bulgular	72
3.1.7. Analitik Yöntemin Validasyonuna Ait Bulgular	73
3.2. Nanoyapıların Üretimi ve İncelenmesine Ait Bulgular	77
3.2.1. Damlatma Yöntemiyle Nanoyapıların Üretimi ve İncelenmesine Ait Bulgular	77
3.2.2. Eritme Yöntemiyle Nanoyapıların Üretimi ve İncelenmesine Ait Bulgular	80
3.2.3. Daldırma Yöntemiyle Nanoyapıların Üretimi ve İncelenmesine Ait Bulgular	83
3.2.3.1. Etken Madde Yükleme Etkinliğini Artırma Çalışmalarına Ait Bulgular	87
3.2.4. Vakum Yöntemiyle Nanoyapıların Üretimi ve İncelenmesine Ait Bulgular	89

3.2.5. Seçilen Daldırma Yöntemiyle Yeni Formülasyonların Üretimi ve İncelenmesine ait Bulgular	93
3.2.5.1. AAO Membranı Soğukta Çözme Tekniğiyle Nanoyapıların Üretimi ve İncelenmesine Ait Bulgular	98
3.2.6. Sonuç Formülasyonun Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular	103
3.2.6.1. Sonuç Formülasyonun Üretim Tekrarlanabilirliğine Ait Bulgular	103
3.2.6.2. Sonuç Formülasyonun Zeta Potansiyel Analizine Ait Bulgular	108
3.2.6.3. Sonuç Formülasyonun FTIR Analizine Ait Bulgular	109
3.2.6.4. Sonuç Formülasyonun DSC Analizine Ait Bulgular	110
3.2.6.4. Sonuç Formülasyonun Etken Madde Salım Çalışmasına Ait Bulgular	111
3.2.7. Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular	112
3.2.7.1. Hücresel Alım Çalışmalarına Ait Bulgular	112
3.2.7.2. Kanser Hücrelerinde Sitotoksiste Çalışmalarına Ait Bulgular	119
4. TARTIŞMA	120
4.1. ETP Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi	120
4.2. Nanoyapıların Üretimi ve İncelenmesine Ait Bulgular	121
4.2.1. Damlatma Yöntemiyle Elde Edilen Nanoyapıların Değerlendirilmesi	122
4.2.2. Eritme Yöntemiyle Elde Edilen Nanoyapıların Değerlendirilmesi	123
4.2.3. Daldırma Yöntemiyle Elde Edilen Nanoyapıların Değerlendirilmesi	125
4.2.3.1. Etken Madde Yükleme Etkinliği Artırma Çalışmalarının Değerlendirilmesi	128
4.2.4. Vakum Yöntemiyle Elde Edilen Nanoyapıların Değerlendirilmesi	129
4.2.5. Seçilen Daldırma Yöntemiyle Elde Edilen Yeni Formülasyonların Değerlendirilmesi	130
4.2.5.1. AAO Membranı Soğukta Çözme Tekniğiyle Elde Edilen Nanoyapıların Değerlendirilmesi	132
4.2.6. Sonuç Formülasyonun Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi	134
4.2.6.1. Üretim Tekrarlanabilirliğine Yönelik Bulguların Değerlendirilmesi	134
4.2.6.2. Zeta Potansiyel Analizine Yönelik Bulguların Değerlendirilmesi	135
4.2.6.1. FTIR Analizine Ait Bulgular Bulguların Değerlendirilmesi	135
4.2.6.1. DSC Analizine Yönelik Bulguların Değerlendirilmesi	135
4.2.6.5. Etken Madde Salımına Yönelik Bulguların Değerlendirilmesi	136
4.2.7. Hücre Kültürü Çalışmalarına Yönelik Bulguların Değerlendirilmesi	136
4.2.7.1. Hücresel Alım Çalışmalarına Yönelik Bulguların Değerlendirilmesi	136
4.2.7.2. Kanser Hücrelerinde Sitotoksiste Çalışmalarına Yönelik Bulguların Değerlendirilmesi	137
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	138
ÖZET	141
SUMMARY	142
KAYNAKLAR	143
ÖZGEÇMİŞ	153

ÖNSÖZ

Doktora tez çalışmalarım süresince beni her zaman motive eden, destekleyen, bilgi ve deneyimiyle bana ışık tutan saygıdeğer hocam Doç. Dr. Ayşegül KARATAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Başta Eczacılık Teknolojisi Bölüm Başkanı ve Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Nilüfer TARIMCI olmak üzere doktora eğitimim boyunca benden ilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, laboratuvar imkanlarından faydalanmamı sağlayan çok değerli hocalarım Prof. Dr. Nurten ÖZDEMİR'e, Prof. Dr. Asuman BOZKIR'a, Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL'e, Doç. Dr. Tansel ÇOMOĞLU'na, Doç. Dr. Canan HASÇİÇEK'e, teşekkürü bir borç bilirim. Doktora tez izleme komitemde yer alan Prof. Dr. Asuman BOZKIR'a ve Doç. Dr. Ayhan SAVAŞER'e olumlu yaklaşımları ve değerli bilimsel önerileri için ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Güleryüzleri ve samimiyetleri için hocalarım Yrd. Doç. Dr. Müge KILIÇARSLAN'a, Yrd. Doç. Dr. Tangül ŞEN'e, Yrd. Doç. Dr. Özge İNAL'a, Yrd. Doç. Dr. Ongun SAKA'ya, Yrd. Doç. Dr. Tuba TÜRK'e, Yrd. Doç. Dr. Ulya BADILLI'ya, Yrd. Doç. Dr. Burcu DEVRİM'e çok teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Dr. Ecz. Zerrin BAYINDIR'a, Dr. Ecz. Berrin KÜÇÜKTÜRKMEN'e ve Dr. Ecz. Gülin AMASYA'ya içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında güleryüz ve ilgilerini eksik etmeyen çalışma arkadaşlarım Uzm. Ecz. Mert SERİM, Uzm. Ecz. Umut Can ÖZ, Ecz. Tuğba EREN, Ecz. Miray GÖRGÖZ, Ecz. Özge Gün, Ecz. Sema ARISOY, Ecz. Fatih TURHAN ve Ecz. Doğan ERGİN'e çok teşekkür ederim.

Hücre kültürü çalışmalarım esnasında her konuda bilgi ve deneyimini paylaşan Farmakoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Arzu BEŞİKCİ'ye sağladığı bilimsel destek ve motivasyon için teşekkürü bir borç bilirim. HPLC çalışmalarımın başlangıcında verdiği moralle bana destek olan arkadaşım Analitik Kimya Bölümü Araştırma Görevlisi Sevinç KURBANOĞLU'na ve HPLC çalışmalarım süresince

bilgi ve deneyiminden faydalandığım, kendisinden çok şey öğrendiğim çalışma arkadaşım Analitik Kimya Bölümü Araştırma Görevlisi Mehmet GÜMÜŞTAŞ'a katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını 113S201 nolu araştırma projesi olarak destekleyen TÜBİTAK Araştırma Destek Programları Başkanlığı'na teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak aileme, hiçbir zaman üzerimde emekleri eksik olmayan annem, babam ve ablalarım verdikleri sevgi ve güven duygusu için, sevgili eşim Ertürk ALGAN'a hayatımda olduğu günden bu yana hayatıma kattığı her türlü güzellik için tüm kalbimle sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

% AÇEM	% Açığa Çıkan Etken Madde Miktarı
%BSS	% Bağlı Standart Sapma
ATC	Anatomik ve Terapötik Kimyasal Sınıflandırma
ATP	Adenozin trifosfat
AAO	Anodik Alumina Oksit
C6	Kumarin-6
DCM	Diklorometan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimetil formamid
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
EDS	Enerji Dispersiv X-ray Spektroskopi
ETP	Etoposid
FDA	Amerikan İlaç ve Gıda Kurumu
H ₃ PO ₄	Fosforik asit
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
IFP	Hücrelerarası sıvı basıncı
İV	İntravenöz
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
MTT	(3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum bromid
NaOH	Sodyum hidroksit
PCL	Poli (ε -kaprolakton)

PEG	Poli (etilen glikol)
PLA	Poli(laktik asit)
P(LCG)	Poli (l-laktid-ko-ε-kaprolakton-ko-glikolid)
PLGA	Poli (laktid-ko-glikolid)
PMMA-350	Poli(metil metakrilat) ($M_w \sim 350,000$)
PMMA-996	Poli(metil metakrilat) ($M_w \sim 996,000$)
RES	Retiküloendotelyal sistem
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SS	Standart Sapma
Tg (°C)	Camsı geçiş sıcaklığı
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	İV yolla uygulanan partiküler ilaç taşıyıcının geçtiği fizyolojik aşamalar	4
Şekil 1.2.	Partiküler ilaç taşıyıcının hücreye alınma mekanizmaları	6
Şekil 1.3.	Çeşitli şekillerdeki nanopartiküllerin damar çeperine yaklaşma olasılığını gösteren grafik	8
Şekil 1.4.	Film gerdirme yönteminin şematik gösterimi	10
Şekil 1.5.	Mikroakışkan sistemlerin şematik gösterimi	12
Şekil 1.6.	Kalıptan geçirme yönteminin şematik gösterimi	13
Şekil 1.7.	PRINT® yönteminin şematik gösterimi	14
Şekil 1.8.	Membran yardımcılı üretim yönteminin şematik gösterimi	15
Şekil 1.9.	Membranı ıslatma yöntemindeki bazı tekniklerin üstten, alttan ve her iki yönlü ıslatmaya etkisi	16
Şekil 1.10	Membranı ıslatmada polimer çözeltisinin düşük veya yüksek konsantrasyonda olmasının etkisi	17
Şekil 1.11.	AAO membranın şematik görüntüsü	18
Şekil 1.12.	Akış etkisinde partikül şekline bağlı ilerleme hareketi	20
Şekil 1.13.	Elipsoid ve küresel partiküllerin makrofajlarca alımını gösteren renklendirilmiş SEM görüntüsü	22
Şekil 1.14.	Podophyllum Peltatum	27
Şekil 1.15.	Podofilotoksinin kimyasal yapısı	27
Şekil 1.16.	Etoposid'in kimyasal yapısı	28
Şekil 1.17.	Hücre döngüsünün fazları ve Etoposidin etki aşamaları	29
Şekil 1.18.	Topoizomeraz II'nin etki mekanizması.	30
Şekil 1.19.	Topoizomeraz II inhibitörleri ile oluşan kalıcı Topoizomeraz-DNA kompleksinin sonuçları	31
Şekil 1.20.	Etoposid'in Topoizomeraz II ile etkileşen alt birimleri	32
Şekil 2.1.	Çalışmada kullanılan maddelerin kimyasal formülleri	37
Şekil 2.2.	Millicell EZ slides	65
Şekil 3.1.	ETP'nin elde edilen FTIR spektrumu	67
Şekil 3.2.	ETP'nin literatürdeki FTIR spektrumu	67
Şekil 3.3.	ETP'nin DSC termogramı	68
Şekil 3.4.	ETP'nin literatürde verilen DSC temogramı	68
Şekil 3.5.	ETP'nin asetonitril ortamındaki UV spektrumu	57
Şekil 3.6.	ETP'nin asetonitril ortamında belirtilen koşullarda elde edilen pikini gösteren HPLC kromatogramı	70
Şekil 3.7.	ETP'nin HPLC yöntemi ile elde edilen asetonitril ortamında 220nm'deki kalibrasyon doğrusu	71
Şekil 3.8.	ETP'nin metanol ortamında 220nm'de, elde edilen pikini gösteren HPLC kromatogramı	71
Şekil 3.9.	ETP'nin HPLC yöntemi ile elde edilen metanol ortamında 220nm'deki kalibrasyon doğrusu	60
Şekil 3.10.	ETP'nin (pH 7,4) PBS-Tw ortamında 220nm'de elde edilen pikini gösteren HPLC kromatogramı	72
Şekil 3.11.	ETP'nin (pH 7,4) PBS-Tw ortamında 220nm'deki kalibrasyon doğrusu	73

Şekil 3.12.	ETP'nin miktar tayini yönteminin analitik validasyonundan elde edilen regresyon doğrusu	74
Şekil 3.13.	Ön çalışmalara ait F4 formülasyonunun TEM görüntüleri	79
Şekil 3.14.	Ön çalışmalara ait F5 formülasyonunun TEM görüntüleri	79
Şekil 3.15.	Damlatma yöntemiyle elde edilen a)D1 ve b)D2 formülasyonlarına ait TEM görüntüleri	81
Şekil 3.16.	Eritme yöntemiyle elde edilen a)D3 ve b)D4 formülasyonlarına ait TEM görüntüleri	81
Şekil 3.17.	ETP yüklenerek elde edilen a)E1 b)E2 formülasyonlarına ait TEM görüntüleri	82
Şekil 3.18.	Daldırma yöntemiyle elde edilen C1A formülasyonuna ait TEM görüntüleri	85
Şekil 3.19.	Daldırma yöntemiyle elde edilen C2A formülasyonuna ait TEM görüntüleri	85
Şekil 3.20.	Daldırma yöntemiyle elde edilen C3A formülasyonuna ait TEM görüntüleri	86
Şekil 3.21.	Daldırma yöntemiyle elde edilen C4A formülasyonuna ait TEM görüntüleri	86
Şekil 3.22.	Daldırma yöntemiyle elde edilen A2 formülasyonuna ait TEM görüntüleri	88
Şekil 3.23.	Daldırma yöntemiyle elde edilen A3 formülasyonuna ait TEM görüntüleri	88
Şekil 3.24.	Daldırma yöntemiyle elde edilen A7 formülasyonuna ait TEM görüntüleri	89
Şekil 3.25.	Vakumla elde edilen V1 formülasyonunun TEM görüntüleri	91
Şekil 3.26.	Vakumla elde edilen V2 formülasyonunun TEM görüntüleri	91
Şekil 3.27.	Vakumla elde edilen V1 formülasyonunun SEM görüntüleri	92
Şekil 3.28.	Vakumla elde edilen V2 formülasyonunun SEM görüntüleri	92
Şekil 3.29.	Kullanılan AAO membranların SEM görüntüleri	92
Şekil 3.30.	Daldırma yöntemiyle yeni elde edilen Y1 formülasyonunun SEM görüntüleri	94
Şekil 3.31.	Daldırma yöntemiyle yeni elde edilen Y2 formülasyonunun SEM görüntüleri	94
Şekil 3.32.	Daldırma yöntemiyle yeni elde edilen Y1 formülasyonunun EDS analizi	95
Şekil 3.33.	Daldırma yöntemiyle yeni elde edilen Y2 formülasyonunun EDS analizi	95
Şekil 3.34.	Daldırma yöntemiyle yeni elde edilen Y3 formülasyonunun SEM görüntüleri ve EDS analizi	96
Şekil 3.35.	Daldırma yöntemiyle yeni elde edilen Y6 formülasyonunun SEM görüntüleri ve EDS analizi	97
Şekil 3.36.	AAO membranı soğukta çözerek elde edilen S1 formülasyonunun SEM görüntüleri ve EDS analizi	99
Şekil 3.37.	AAO membranı soğukta çözerek elde edilen S2 formülasyonunun SEM görüntüleri ve EDS analizi	100
Şekil 3.38.	AAO membranı soğukta çözerek elde edilen S3 formülasyonunun SEM görüntüleri ve EDS analizi	101

Şekil 3.39. AAO membranı soğukta çözerek elde edilen S4 formülasyonunun SEM görüntüleri ve EDS analizi	102
Şekil 3.40. Üretimi tekrarlanan S2 formülasyonunun SEM görüntüleri ve EDS analizi	94
Şekil 3.41. Etken maddesiz S2 formülasyonunun SEM görüntüsü	105
Şekil 3.42. Etken madde yüklü S2 formülasyonunun SEM görüntüsü	105
Şekil 3.43. Etken maddesiz S2 formülasyonunun TEM görüntüleri	106
Şekil 3.44. Etken madde yüklü S2 formülasyonunun TEM görüntüleri	107
Şekil 3.45. Sonuç formülasyonun FTIR spektrumu	109
Şekil 3.46. Sonuç formülasyonun DSC termogramı ve karşılaştırılması	110
Şekil 3.47. Sonuç formülasyonun etken madde salım grafiği	111
Şekil 3.48. C6 yüklü nanoçubukların floresan görüntüsü ve negatifi	113
Şekil 3.49. A549 hücrelerinin 2. saatteki görüntüsü ve negatifi	114
Şekil 3.50. A549 hücrelerinin 4. saatteki görüntüsü ve negatifi	115
Şekil 3.51. MCF7 hücrelerinin 2. saatteki görüntüsü ve negatifi	116
Şekil 3.52. MCF7 hücrelerinin 4. saatteki görüntüsü ve negatifi	117
Şekil 3.53. MCF7 hücrelerinin nanoçubuğu içine aldığı varsayılan görüntü ve negatifi	118
Şekil 3.54. Etken madde yüklü S2 formülasyonunun TEM görüntüleri	119

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Etoposidin ATC sınıflandırma sistemindeki yeri	29
Çizelge 2.1.	Ön formülasyon çalışmalarında damlatma yöntemi kullanılarak değerlendirilen parametreler	47
Çizelge 2.2.	Model etken madde yüklenerek damlatma ve eritme yönteminin karşılaştırıldığı formülasyonlar	50
Çizelge 2.3.	Damlatma ve eritme yöntemiyle ETP yüklenerek elde edilen formülasyonlar	51
Çizelge 2.4.	Daldırma yöntemiyle hazırlanan C1A-C4A ve C1B-C4B kodlu formülasyonlar	53
Çizelge 2.5.	Daldırma yöntemiyle artan ETP konsantrasyonlarıyla hazırlanan A1-A12 kodlu formülasyonlar	56
Çizelge 2.6.	Modifiye vakum filtrasyonu yöntemiyle elde edilen formülasyonlar	57
Çizelge 2.7.	Daldırma yöntemiyle elde edilen Y1-Y6 kodlu formülasyonlara ait parametreler	59
Çizelge 2.8.	AAO membranı soğukta çözme tekniğiyle elde edilen formülasyonlar	60
Çizelge 2.9.	Daldırma yöntemiyle hazırlanan C1A-C4A ve C1B-C4B kodlu formülasyonlar	53
Çizelge 3.1.	ETP'nin asetonitril ortamındaki HPLC miktar tayininde belirlenen koşullar	70
Çizelge 3.2.	ETP'nin miktar tayini yönteminin analitik validasyonundan elde edilen regresyon doğrusunun parametreleri	74
Çizelge 3.3.	ETP'nin miktar tayini yönteminin analitik validasyonundan elde edilen doğruluk ve geri elde sonuçları	75
Çizelge 3.4.	ETP'nin miktar tayini yönteminin analitik validasyonundan elde edilen tekrarlanabilirlik sonuçları	76
Çizelge 3.5.	Daldırma yöntemiyle hazırlanan C1A-C4A ve C1B-C4B formülasyonlarının ETP yükleme kapasiteleri	84
Çizelge 3.6.	Daldırma yöntemiyle hazırlanan A1-A12 kodlu formülasyonların ETP yükleme kapasiteleri	87
Çizelge 3.7.	Modifiye vakum yöntemiyle elde edilen formülasyonlar ve ETP yükleme kapasiteleri	90
Çizelge 3.8.	Daldırma yöntemiyle elde edilen yeni formülasyonlar ve ETP yükleme kapasiteleri	93
Çizelge 3.9.	Membranı soğukta çözme tekniğiyle elde edilen formülasyonlar ve ETP yükleme kapasiteleri	98
Çizelge 3.10.	Etken madde yüklü ve boş S2 formülasyonlarının zeta potansiyelleri	108

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji ve nanomateryal bilimi son elli senenin en güncel araştırma konularından birini oluşturmaktadır. Son yıllarda ise nanotüp, nanoçubuk ve nanotel gibi nanotübüler yapılar, uygun mekanik özellikleri ve avantajları nedeniyle optik, elektronik, kimyasal ve medikal uygulamalarda önem kazanmaktadır. Bu yapılar, boy/en oranları çok büyük olduğu için, çap kalınlıkları ihmal edilebilecek düzeyde olan “Tek Boyutlu Nanoyapılar” (One Dimensional Nanostructures) olarak da adlandırılmaktadır. Günümüzde nanotübüler yapılar elde edebilmek amacıyla farklı materyallerin ve farklı yöntemlerin geliştirilmesi üzerine yapılan çalışmalar giderek artmaktadır. Çeşitli alanlarda kullanılmak üzere karbon, yarı iletken, seramik ve polimerik materyallerden oluşan nanotübüler yapılar üretilmekte ve çeşitli avantajlarıyla dikkat çekmektedir. Özellikle medikal ve biyomedikal kullanımı açısından polimerik yapıların önemi bilinmektedir. Bu nedenlerle doku mühendisliği ve biyoteknoloji alanında kullanılmak üzere polimerik materyallerden nanotübüler yapılar üretilmektedir. Biyouygun ve biyobozunur polimerlerden elde edilecek nanotübüler yapıların ilaç taşıyıcı sistem olarak değerlendirilmesine olan ilgi de giderek artmaktadır.

İdeal bir ilaç taşıyıcı sistemin biyouygun ve biyoparçalanabilir özellikte olması, hedefine ulaşmak için kan dolaşımında uzun süre kalması ve etken maddeyi sadece hedef bölgede salması beklenmektedir. Bu amaçlara ulaşabilmek için farklı materyellerden, değişik şekillerde pek çok nanopartiküler sistem geliştirilmiştir. Son yıllardaki çalışmalarda çok çeşitli malzemelerden çok farklı boyutlarda küresel nanopartiküller elde edilmiş ve değerlendirilmiştir. Ancak üretimi nispeten kolay ve tanımlanmış olan küresel nanopartiküller, ilaç taşıyıcı sistem olarak bazı kısıtlamalarla karşılaşmaktadırlar. Nanoküreler vücudun savunma sistemi olan makrofajlar nedeniyle kan dolaşımında sınırlı bir süre kalabilmektedirler. Buna karşılık son dönemde yapılan çalışmalarda, küresel olmayan, boyu uzatılmış ve silindirik şekilli nanotaşıyıcıların yapıları itibarıyla aynı hacimdeki küresel nanopartiküllere göre kan dolaşımında daha uzun süre kalabildiği ve daha iyi dağılım

gösterdiği tespit edilmiştir. Biyodağılım üzerindeki belirgin etkisinin yanında partikülün şekli, nanoyapıların endositoz yoluyla hücre içine alınmasında da önemli rol oynamaktadır. Özellikle kanser hücresi içine endositoz yoluyla alım söz konusu olduğunda ilaç taşıyıcı nanoyapıların partikül boyutu yanında partikül şeklinin de önemli olduğu çalışmalarla değerlendirilmiştir.

Bu çalışmanın amacı; yüksek nitelikli ve yeni ilaç taşıyıcı sistemler geliştirmek için en güncel yaklaşım olan nanoteknoloji alanında, yeni nanofabrikasyon yöntemlerinden birisi olan “Membran Yardımcılı Nanofabrikasyon” yöntemiyle, polimerik nanotübüler yapılar hazırlanması ve bunların ilaç taşıyıcı sistem olarak değerlendirilmesidir. Araştırmalarımız sonucunda şu ana kadar bu yapılara etken madde yüklenerek ilaç taşıyıcı sistem olarak uygulanmasına ilişkin farmasötik teknoloji alanında detaylı bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Tek boyutlu nanoyapılar, nano ölçekte, boyu uzatılmış silindirik yapılar olarak değerlendirilebilmektedir. Bu tez çalışmasında elde edilecek silindirik yapıları nanopartiküllerin, şekil özellikleri ve nano boyutta olmalarının avantajları kullanılarak, kanser tedavisine yönelik ilaç taşıyıcı sistem olarak geliştirilmesi planlanmıştır. Bu bağlamda, çok tercih edilen kemoterapötik ajanlardan olan etoposid kullanılması uygun bulunmuştur. Bu etken madde ile hazırlanmış klasik formlar (kapsül, IV enjeksiyonlar gibi) tedavi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu etken maddenin dozuna bağlı olarak görülen yan etkileri kullanımında sınırlamalar getirmektedir. Ayrıca etoposid sitotoksik etkisini, doza bağlı ve uzun sürede gösterdiği için yan etkileri daha çok hissedilmektedir. Tez çalışmamızda etoposidin, biyoyumlu ve biyoparçalanan polimerlerle silindirik yapıları nanopartiküller şeklinde hazırlayacağımız partiküler ilaç taşıyıcı sistem içerisine yüklenmesi amaçlanmıştır. Membran yardımcı nanofabrikasyon yönteminde, denenecek olan farklı tekniklerle elde edilecek etoposid yüklü silindirik yapıları ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması ve karakterizasyonun yapılması planlanmış, yüzeysel modifikasyona tabi tutulmadan kanser hücreleri içine alınmasının ve kanser hücreleri üzerinde sitotoksitesinin incelenmesi tasarlanmıştır.

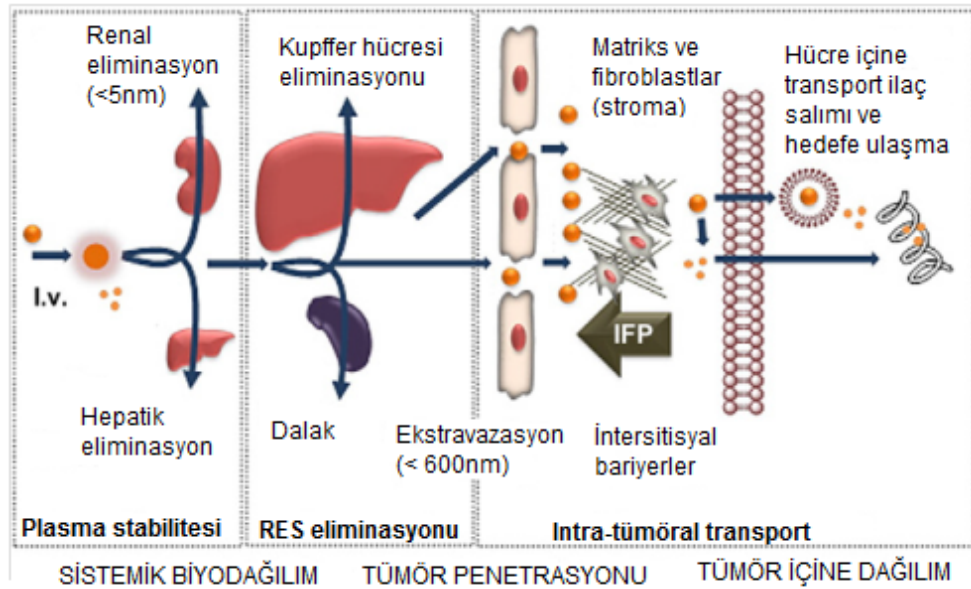
1.1. Partiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Biyodağılımı

İntravenöz (İV) yolla uygulanan ilaç taşıyıcı sistemlerdeki ilerlemeler düşük çözünürlük, zayıf stabilite ve toksik etkisi olan etken maddelerin farmakokinetik özellikleri ve biyodağılımının iyileştirilmesine yardımcı olmuştur (Allen ve Cullis, 2004). Partiküler ilaç taşıyıcıların bileşimi, boyutu, şekli, yüzey kimyası ve mekanik esnekliği gibi fizikokimyasal özellikleri, terapötik fonksiyonlarını etkiler. Bu parametrelerin optimize edilmesi partiküler ilaç taşıyıcı sistemin performansını da artırır (Doshi ve Mitragotri, 2009; Yoo ve ark., 2010). Birçok avantajına rağmen nanotaşıyıcılar vaadettikleri üstünlükleri gösterebilmeleri için bazı engelleri aşmak zorundadırlar (Farokhzad, 2009; Cho, 2008; Barratt, 2000). Bu engeller taşıyıcının terapötik etkisini gerçekleştirmeden önce aşması gereken biyolojik bariyerlerdir. Uygulandıktan sonra, taşıdığı etken maddeyi salıp farmakolojik aktivite görülene kadar pek çok parametre taşıyıcının performansını belirler. Retikülo Endotelial Sistem (RES), renal klerens ve gibi aşması gereken engellerin yanında, hedef bölgede birikim, hedef hücreye giriş ve kimi zaman hücreye girdikten sonraki endozomal mücadele, taşıyıcının aşması gereken zorluklar arasındadır (Yoo ve ark., 2011).

Tüm bu zorlukları aşmak için farklı üretim yöntemleri denenmiştir. Örneğin poli(etilen glikol) ile yüzey modifikasyonu (PEGilasyon) işleminin, nanotaşıyıcıların immün sistemden kaçmasını sağlayarak, dolaşım süresini artırdığı belirlenmiştir (Storm ve ark, 1995). Ancak PEGilasyon işlemi aynı zamanda taşıyıcının hedef hücreyle bağlanma yeteneğini kısıtlamakta ve hedefte birikimini azaltmaktadır (Li ve ark., 2010). Bu gibi sebeplerle nanoyapılı taşıyıcıların biyodağılımda karşılaşacağı engeller çok iyi incelenmeli ve partikülleri hedefe götürecek özellikler her aşama için uygun olmalıdır.

Kan dolaşım sistemine verilen ilaç taşıyıcı sistem, hedefine varana kadar karmaşık bir yolculuktan geçer (Yoo ve ark., 2011; Owens ve ark., 2006). Taşıyıcı sistem damarlarda dolaşırken, vücudun yabancı maddelerden savunma mekanizması olan RES ile yüksek oranda etkileşime girer. RES hareketli fagositik hücrelerden oluşur

(Bertrand ve Leroux, 2012). Makrofajlar bir yana, ilaç taşıyıcı sistem dalak ve böbrekteki filtrasyon mekanizmalarından da kaçmak zorundadır. Eğer ilaç taşıyıcı kendini bu savunma mekanizmalarından koruyabilirse damar çeperinde gerekli yere yanaşıp istenen dokuya penetre olabilir. Dokuya difüze olan partikül stromada bulunan elementleri geçip, hücrelerarası sıvı basıncına (IFP) karşı gelerek hücreye ulaşır (Ernsting ve ark., 2013). Bu süreç taşıyıcının, hedef hücre membranına yapışması ve endositoz ile hücre içine alınmasıyla devam eder (Owens ve ark., 2006). Nanoyapının boyutu, şekli, esnekliği ve yüzey yükü bu süreci karmaşık şekilde yürütür.



Şekil 1.1. İV yolla uygulanan partiküler ilaç taşıyıcının geçtiği fizyolojik aşamalar (Ernsting ve ark., 2013)

1.2. Partiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Biyodağılımına Etki Eden Faktörler

Partiküler taşıyıcı sistemlere olan ilgi, patent ve yayın sayısındaki artış bu sistemlerin önerdiği pek çok avantajla açıklanabilir (Wagner ve ark., 2006). Bu avantajlar; tümör bölgesine yüksek etken madde ulaşmasına izin veren pasif ve aktif hedeflemeye olanak tanıyan tasarımları (Davis ve ark., 2008), taşıdıkları ilacı degradasyondan

korumaları (Sahay ve ark., 2013), ilacın etkinliğini geliştirebilmeleri ve toksikolojik profilini düzenleyebilmeleri (Peer ve ark., 2007), kontrollü ve uzatılmış ilaç salımı sağlayarak dozlama sayısını azaltmaları (Tsurkan ve ark.; 2013) olarak sayılabilir.

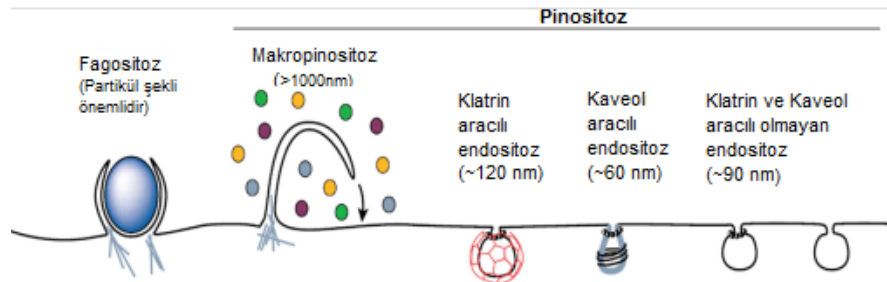
Partiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin avantajların yanında bazı çözölemeyen sorunları da vardır. İV enjeksiyonla partiküler sistemler uygulandığında etraflarını bir protein tabakası sarar (Tenzer ve ark., 2013), yüzeylerine opsoninler yapışır ve kan dolaşımından RES ile uzaklaştırılabilirler (Sakurai ve ark, 2013). Bunun yanında nanopartiküller biyolojik bazı bariyerleri geçmekte zorlanabilirler (Alonso, 2004).

In vivo ortamda partiküller, serum proteinleri, kompleks kan akışı dinamikleri, farklı hücre türleriyle karşılaşma gibi zorlayıcı *in vivo* ortam şartlarıyla da yüz yüze kalırlar. Bu durumlar taşınan ilacın erken salımı (Chauhan ve ark., 2012), serum bileşenleri ile etkileşerek kümeleşme (Hotze ve ark., 2010), kan dolaşımından zamanından önce uzaklaştırılma (Lesniak ve ark., 2010) ve hedefteki etki kaybı gibi pek çok sınırlama ve soruna yol açabilmektedir. Bu sınırlamalar pek çok araştırmacı tarafından araştırılarak biyodağılım üzerine etki eden faktörler detaylı olarak incelenmiştir. Özellikle partikül boyutu, yüzey özellikleri ve partikülün şekli partiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin biyodağılımına etki eden faktörlerin başında gelmektedir.

1.2.1. Nanoyapılı Taşıyıcının Boyutu

Nanometre boyutundaki ilaç taşıyıcı sistemler İV uygulama için önemli aşama kaydetmişlerdir (Muro ve ark., 2008). Partikülün boyutu dolaşım süresi açısından en önemli parametredir. Partikül büyüklüğünün üst sınırı en ince kılcal damar genişliği ile sınırlıdır (Moghimi ve ark., 2001). Partikül boyutu dalak ve renal klerens açısından da önemlidir. Genişliği 200 nm'den büyük partiküller dalaktaki filtrasyon sistemine yakalanma riski taşırken, 10 nm'den küçük partiküller de böbrekteki filtrasyon sisteminden süzölüp giderler (Choi ve ark., 2007). Partikülün boyutu hücreye fagositoz ya da endositoz yoluyla alınmasını da belirler (Şekil 1.2). 500

nm'den küçük partiküller hücreye endositoz yoluyla alınırken, 500'nm den büyük partiküllerin fagositoz yoluyla alındığı düşünülmektedir (Rejman ve ark., 2004). Ancak son zamanlardaki çalışmalarda endotel hücrelerinin 5 µm kadar büyük partikülleri de endositoz yoluyla aldığına dair bilgiler bulunmaktadır (Gratton ve ark., 2008). Küresel partiküllerin hücreye alımları doğrudan boyutuna bağlıdır (Shang ve ark., 2014). Dolaşımda makrofajların ancak hacimce kendinden küçük küresel partikülleri fagositte ettiği bildirilmiştir (Champion ve Mitragotri, 2006).



Şekil 1.2. Partiküler ilaç taşıyıcının hücreye alınma mekanizmaları (Wang ve ark., 2011)

Dolaşımdaki ilaç taşıyıcının damar endoteli ile ilişkisi de partikül boyutuna bağlıdır (Doshi ve ark., 2010). Örneğin kanser hücrelerine hedeflemede, 250 nm'den küçük partiküllerin, yapısı bozulmuş, sızdıran endotelden pasif yolla geçme şansları vardır (Ferrari, 2005; Nie ve ark., 2007). Nanoyapılı ilaç taşıyıcının intraselüler transportu da boyutuna bağlıdır. Muro ve arkadaşlarının (2008) yaptığı bir çalışma partiküllerin intraselüler transportu üzerine partikül boyut ve şeklinin etkisini inceleyen az sayıda çalışmadan birisidir.

1.2.2. Nanoyapılı Taşıyıcının Yüzey Özellikleri

İlaç taşıyıcı partikül dolaşımda seyrederken, kanın çok çeşitli bileşenleriyle karşılaşır. Birçok çalışmada taşıyıcılar genellikle albumin ya da antikor gibi proteinlerle kaplanmıştır. Bu durum taşıyıcının yabancı protein olarak algılanıp, immün sisteme yakalanmasıyla sonuçlanabilir. İlaç taşıyıcı partikülleri protein klerensinden korumak için hidrofilik PEG veya türevleriyle kaplama yoluna gidilmiştir (Zhang ve ark., 2008; Yoo ve ark., 2010). PEGilasyonun ilaç salım hızı

ve oranıyla, endositoz üzerindeki etkisi de incelenmiştir (Moghimi ve ark., 2001). Pozitif yüklü partiküller hücreye negatif yüklü veya yüksüz partiküllerden daha kolay alınır. Ayrıca taşıyıcılar yüzeylerine eklenen birçok hedefleyici ajan ile istenen bölgeye hedeflendirilirler (Doshi ve ark., 2009). Yüzey kimyası aynı zamanda hücreye alımı da etkiler (Rejman ve ark., 2004). Partiküller yüzey yükleri ve kaplamalarına göre hücreye farklı endositoz mekanizmalarıyla alınırlar.

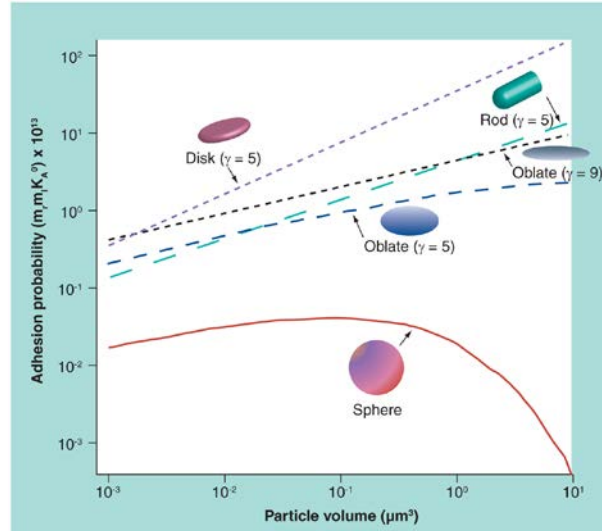
1.2.3. Nanoyapılı Taşıyıcının Esnekliği

Polimerik taşıyıcılar genellikle sert yapıdadır. Kendi boyutlarından daha dar kılcal damarlardan sıkışarak geçebilen kırmızı kan hücrelerinin aksine esnemeyen katı partiküllerin kılcal damarları tıkama ihtimali de vardır (Yoo ve ark., 2010). Kanda uzun süre dolaşım yeteneği kazandırmak için son zamanlarda esnek yapıdaki partiküllerin üretimine yönelik çalışmalar da yapılmaktadır (Geng ve ark., 2007; Doshi ve ark., 2009). Ayrıca yapılan çalışmalarda sert partiküllerin, yumuşak ve esnek partiküllere göre makrofajlarca daha çok yakalandığına dair gözlemler de bulunmaktadır (Beningo ve Wang, 2002).

1.2.4. Nanoyapılı Taşıyıcının Partikül Şekli

Partikülün geometrisi üzerine yapılan son zamanlardaki çalışmalarda ilaç taşıyıcı partiküllerin şeklinin biyodağılımı üzerinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir (Doshi ve Mitragotri, 2009). Dolaşımda farklı şekildeki partiküllerin farklı hidrodinamik güçlerden etkilendiği tespit edilmiştir. Damar içinde hareket eden küresel bir partikül, dışarıdan bir kuvvet etkisine maruz kalmadıkça, akış yönündeki düzgün hareketinden sapmaz. Diğer taraftan küresel olmayan partiküller geometrilerinden dolayı, yön değiştiren ve döndüren kuvvetlere karşı çok hassastırlar ve küçük kuvvetler bile damar çeperlerine doğru yönelmelerine yol açar (Decuzzi ve ark., 2009). Marjinyasyon adıyla bilinen damar çeperlerine doğru olan bu yönelim, damar içinden akan farklı şekildeki partiküller için incelenmiştir (Decuzzi ve ark., 2005).

Boy/en oranları (γ) dolayısıyla hacimleri farklı olan çeşitli şekillerdeki nanopartiküllerin damar çeperlerine yaklaşıp hareket etme eğilimleri değerlendirilmiştir. Şekil 1.3'te görüldüğü gibi yüzey alanı en büyük olan geometrideki partikülün damar çeperine yapışma olasılığının en yüksek olduğu tespit edilmiştir (Liu ve ark., 2012).



Şekil 1.3. Çeşitli şekillerdeki nanopartiküllerin damar çeperine yaklaşma olasılığını gösteren grafik (γ : boy/en oranı) (Liu ve ark., 2012)

Taşıyıcı partikülün şekli aynı zamanda dalaktaki filtrasyon mekanizmasından geçerken de etki etmektedir. Küresel olmayan, 200 nm'den büyük partiküller, bir boyutları (en gibi) 200 nm'den küçük ise bu filtrasyondan geçme şansına sahiptirler. Örneğin 1 μm çaplı ve 150 nm yüksekliğindeki disk şekilli partiküller dalakta tutulmadan geçebilirler (Decuzzi ve ark., 2009).

Yapılan çalışmalara göre ilaç taşıyıcı partikülün şekli, kendi geometrisi ve yönelimi, partikülün dolaşımında fagosite edilip edilemeyeceğini de belirler. Eliptik disk formundaki partiküllerin fagositozdan kaçabildikleri gösterilmiştir (Champion ve Mitragotri, 2009). Bu gözlemlere dayanarak kurtçuk şekilli partiküller üretilmiş ve aynı hacimdeki küresel partiküllere kıyasla belirgin şekilde daha az fagositoza uğradıkları belirlenmiştir (Geng ve ark, 2007).

Son zamanlardaki pek çok araştırma, üretimleri nispeten kolay ve tanımlanabilir olduğu için küresel nanopartiküller üzerine yoğunlaşmıştır. Ancak günümüzde silindirik yapıli nanopartiküller, nanotüpler (*nanotubes*), nanoçubuklar (*nanorods*) ve nanoteller (*nanowires*) gibi tek boyutlu nanoyapılar sundukları üstün özellikler nedeniyle biyomedikal alanda çeşitli uygulamalar için gittikçe önem kazanmaktadır. Bu nanotübüler yapılar ilaç taşıyıcı sistem olarak değerlendirildiğinde, küresel nanopartiküllere göre pek çok avantaj taşıyacağı düşünülmektedir. Bunların içinde özellikle polimerik nanotüpler geniş uygulama alanlarından dolayı ön plana çıkmaktadır (Hillebrenner ve ark., 2007).

Silindirik şekilli nanoyapıların, ilaç taşıyıcı sistem olarak değerlendirildiğinde küresel nanopartiküllere göre bir takım avantajlar sağlayacağını söyleyen çalışmalarda, öncelikle nanotübüler yapının içindeki hacimsel boşluğun aynı çaptaki küresel nanopartiküllere göre daha geniş olduğu ve daha yüksek ilaç taşıma kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Son ve ark, 2007). Elde edilen partiküllerin yüksek ilaç taşıma kapasitesi, özellikle hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemlerde hedef bölgeye ulaşabilen nanopartiküllerin gerekli ilaç dozunu sağlayabilmeleri açısından çok önemlidir. Ayrıca nanotübüler yapıların hem iç boşluğunun hem de dış yüzeyinin kimyasal modifikasyona ve fonksiyonel grup ekleme olanağına sahip olması da önemli bir üstünlüktür. Bunlara ek olarak nanotüp ve nanoçubuk gibi silindirik nanoyapıların, aynı çaptaki küresel nanopartiküllere göre vücutta daha uzun süre sirkülasyon yeteneklerinin olacağı bildirilmiştir (Geng ve ark.,2007; Nishiyama ve ark., 2007). Bu durum iki sebepten dolayı önemlidir. İlk olarak nanotüplerin immün sistem tarafından tanınmadan ve yakalanmadan vücuttaki hedef bölgeye ulaşmaları için daha çok zaman kazanmalarına olanak sağlayacağı, ikinci olarak da ilacın kullanım sıklığını azaltmak üzere nanotüplerin taşıdıkları etken maddeyi daha uzun sürelerde salabileceği düşünülmektedir.

Tüm bunlar dikkate alındığında ilaç taşıyıcı sistem olarak nanotüp ve nanoçubuk şekilli yapıların özellikle kanser tedavisinin geleceği için umut vaadedici olduğu görülmektedir. Bu avantajlarını ortaya çıkarabilmek için, kolay yürütülebilen, düşük maliyetli ve çok yönlü üretim yöntemlerine ihtiyaç vardır. Bu üretim yönteminin;

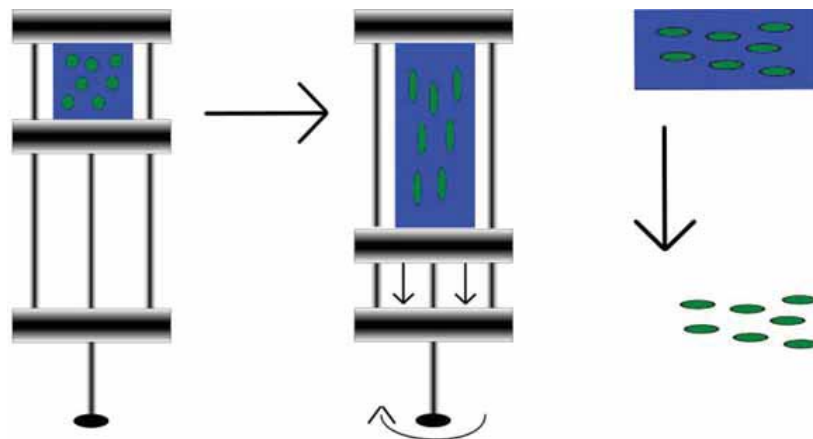
silindirik nanoyapıların çap boyutunu, uzunluğunu, morfolojisini, bunun yanında da nanoyapının üretildiği materyalin ve taşıdığı etken maddenin özelliklerini kontrol altında tutabilmesi gerekmektedir (Al-Kaysi ve ark., 2009).

1.3. Küresel Olmayan Partiküllerin Üretim Yöntemleri

Günümüzde küresel olmayan partiküllerin üretimi için pek çok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler, küresel partiküllerin çeşitli tekniklerle küresel olmayan partiküllere dönüştürülmesi veya yöntemde doğrudan küresel olmayan partikül elde edilmesi olarak karşımıza çıkmaktadır.

1.3.1. Film Gerdirme Yöntemi (Film stretching)

Film gerdirme yöntemi mikro ve nano boyutta farklı geometrilerde küresel olmayan partikül üretmek için basit ve çok yönlü bir yöntemdir (Champion ve ark., 2007). Şekil 1.4'te görüldüğü gibi küresel partiküller bir PVA film içine gömülür (emdirilir). Sıcak yağ içinde polimerin jelleşme sıcaklığı (T_g) üstünde bir sıcaklığa ısıtılıp ya da toluen gibi bir plastizer içinde farklı yönlerde gerdirme (esnetme) işlemi uygulanır.



Şekil 1.4. Film gerdirme yönteminin şematik gösterimi (Mathaes ve ark., 2014)

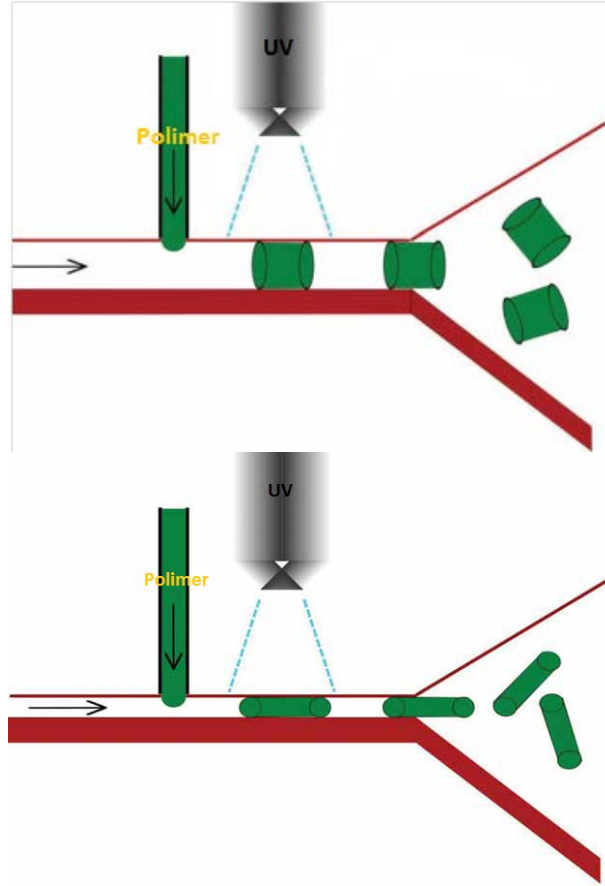
Gerdirme işlemi sonunda partiküllerin esnemesi, jelleşen partiküller ve film materyali arasındaki güçlü hidrojen bağları sayesinde gerçekleşir. Esneme derecesi, ısıtılan sıcaklık, film materyali ve partikülün polimer özellikleri, elde edilen küresel olmayan partikülün şeklini ve boy/en oranını belirler. Partikülün son boy/en oranı, esneme derecesi ile doğru orantılıdır. Sıcaklık ve kullanılan plastizer ise jelleşen partikülün viskozitesini belirler, düşük partikül viskozitesi daha düz şekiller oluşmasını sağlar. İki boyutlu gerdirme işlemi kompleks geometriler elde edilmesini de sağlar (Doshi ve ark., 2009). Küresel olmayan partiküller plastizer çözülünce elde edilir. Biyobozunur polimerlerden PLGA (Yoo ve ark., 2010) ve biyobozunur olmayan polimerlerden polistiren (PS) (Champion ve Mitragotri, 2009) ile başarılı çalışmalar yapılmıştır. Film gerdirme yönteminin basitliğine karşın endüstriyel bir ölçek büyütme işlemi oldukça sorunlu görünmektedir çünkü filmlerin tek tek gerdirilmesi gerekmektedir. Bu sebeple sürekli bir üretim işlemi mümkün görünmemektedir (Mathaes ve ark, 2014).

1.3.2. Mikroakışkan Sistemler

Mikroakışkan sistemler farklı boyut ve şekillerde, poroziteye sahip ve çok çeşitli materyallerden (Shang ve ark., 2013) küresel olmayan partiküller üretilebilen gelecek vaadeden bir yöntemdir. Özellikle litografi, fotolitografi ve kalıp eklenmiş (Yin ve ark., 2001) kombine mikroakışkan sistemler kompleks partikül şekli üretme konusunda potansiyel taşımaktadır. Bu yöntem Şekil 1.5'te şematik olarak gösterilmiştir.

Dijital mikroaynacılarla donatılmış mikroakışkan kanala kontrollü UV ışığı yansıtan sistemler, mikropartiküllerin istenilen şekillerde kontrollü olarak üretimine olanak sağlamaktadır (Lee ve ark., 2009). Yöntemin çok yönlülüğüne rağmen geleneksel mikroakışkan sistemler sıvı akışında 5ml/saat hızını aşamamış ve endüstriyel partikül üretimi için uygun hale getirilememiştir. Ancak Nisisako ve ark.,

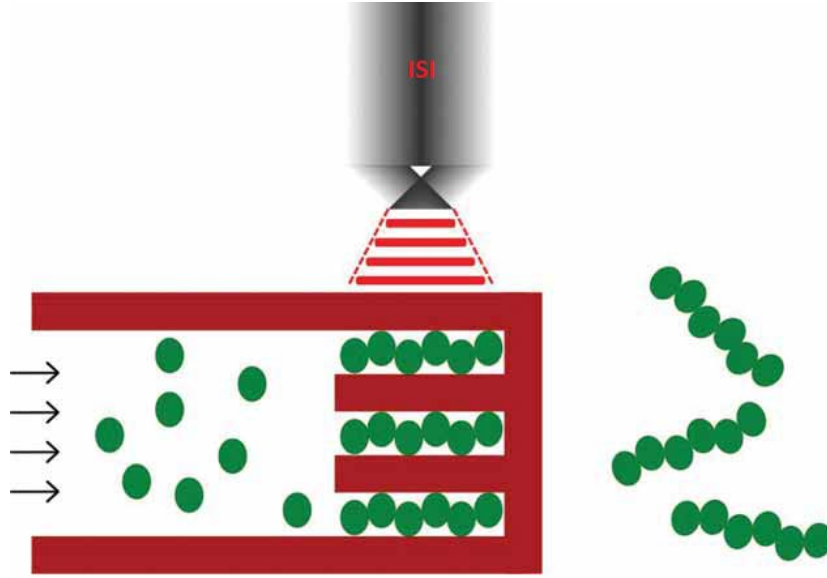
(2008) akış hızı 320ml/saat olan dairesel olarak ayarlanmış mikroakışkan bir sistem üretilip, ölçek büyütme işleminin ilk çalışmasını yapmışlardır.



Şekil 1.5. Mikroakışkan sistemlerin şematik gösterimi (Mathaes ve ark., 2014).

1.3.3. Kalıptan Geçirme (Template Assembly)

Bu yöntemde de film gerdirme yöntemindeki gibi başlangıç olarak küresel partiküller kullanılır. Şekil 1.6’da şematik olarak gösterilen yöntemde küresel partiküller düzgün kanallı kalıplardan bir çapraz bağlayıcı ve ısı yardımıyla geçirilirler (Yin ve Xia, 2001). Böylelikle küresel partiküllerin bir araya gelmiş uzun zincirleri elde edilir (Yin ve Xia, 2003).



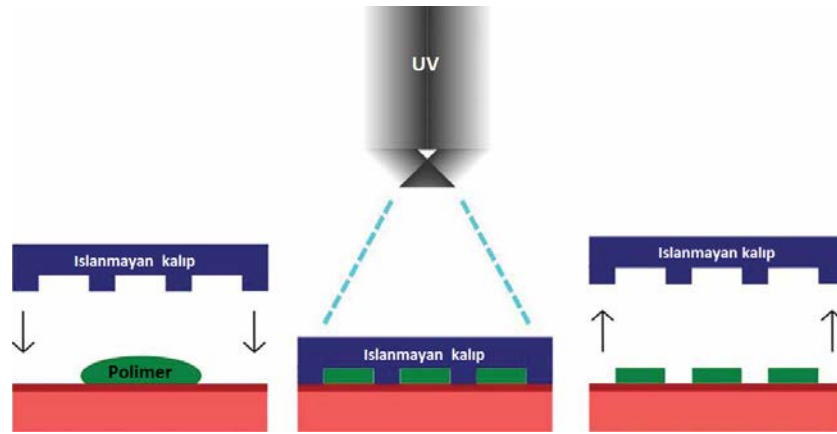
Şekil 1.6. Kalıptan geçirme yönteminin şematik gösterimi (Mathaes ve ark, 2014).

Kolloidal sistemlerin kendiliğinden oluşum mekanizması (self assembly) ve mikroakışkan sistemler biraraya getirilerek, küresel olmayan partiküllerin kolloidal yapıları elde edilmiştir (Vanapalli ve ark., 2008). Veleve ve ark., (2000) farklı boyut ve şekillerdeki kolloidal kristallerin farklı süspansiyonlar halinde büyütülüp elde edilebileceğini göstermişlerdir. Kohler ve ark., (2011) ise nanokanalların içindeki nanopartikülleri, polielektrolitler ile kaplamış ve küresel olmayan nanofiberler ya da nanoyapılı mikrofiberler elde edilmiştir. Bu çalışmalara rağmen bu yöntemle küresel olmayan partikül üretiminin ölçek büyütme işlemi problemli görülmektedir ve henüz rapor edilmemiştir.

1.3.4. PRINT® Yöntemi (Islanmayan Kalıplarda Partikül Üretimi)

PRINT® (*Particle Replication In Non Wetting Templates*) teknolojisi, monodispers polimerik partiküllerin elde edildiği bir yumuşak-baskı işlemidir (soft-lithography process), PRINT aynı zamanda biyodağılımda önemli rolü olan, boyutu ve şekli tanımlı küresel olmayan partiküllerin elde edilebildiği bir top-down üretim tekniğidir.

DeSimone ve ark., (2007) tarafından geliştirilen bu yöntem PRINT® ismiyle tanınmıştır. Yöntemde florlanmış kalıp materyallerin ıslanmama özelliklerinden faydalanılır (Şekil 1.7). PRINT teknolojisi 100 nm'nin altında bile partikül boyutunun, şeklinin ve esnekliğinin tamamen kontrol edilmesine olanak sağlar (Kersey ve ark., 2012) ve sonrasında partiküllerin yüzey yükleri ve hedeflenmeleri de mümkün olabilmektedir (Gratton ve ark., 2008). Yapılan çalışmalarda küresel olmayan partiküller, lipid kompleksleri (Xu ve ark., 2013), PEG ve PLGA (Rolland ve ark., 2005) ya da bunların bileşimi gibi farklı materyallerden üretilip etken madde yüklenebilmiştir (Galloway ve ark., 2013; Chu ve ark., 2013).

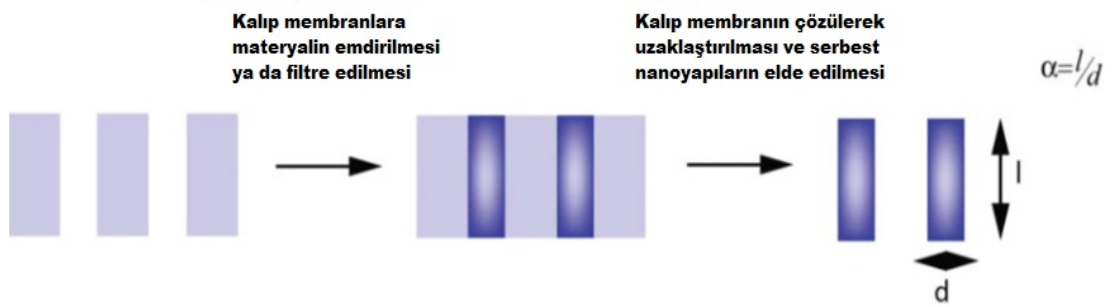


Şekil 1.7. PRINT® yönteminin şematik gösterimi (Mathaes ve ark., 2014).

1.3.5. Membran Yardımcılı Nanofabrikasyon Yöntemi

Membran yardımcı nanofabrikasyon yöntemi, kalıp olarak kullanılan bir membrana istenilen materyalin emdirilmesi ve ardından membran çözülerek uzaklaştırıldığında istenilen materyalden silindirik şekilli nanoyapıların elde edilmesine dayalı bir yöntemdir (Şekil 1.8). Membran yardımcı nanofabrikasyon yöntemi, çok çeşitli materyallerden nanoyapıların üretimine uyum sağlayabilen bir yöntemdir. Bunlara örnek olarak metalik nanoyapılar (Son ve ark., 2006; Steinhart ve ark., 2004), inorganik ve yarı iletken nanoyapılar (Liang ve ark., 2003), karbon nanoyapılar (Hou ve ark., 2005), proteinik nanoyapılar (Chen ve ark., 2006), polimerik nanoyapılar (Steinhart ve ark., 1997) verilebilir. Membran yardımcı nanofabrikasyon

yöntemiyle, homojen tek bileşenli nanoyapıların elde edilmesinin yanında, bu yöntem heterojen, çok bileşenli veya kompozit nanoyapıların üretilmesine de olanak tanımaktadır (Hsueh ve ark., 2008; Dougherty ve ark., 2009). Polimerle yapılan çalışmalarda, iletken polimerlerle düzenli-sıralı nanoyapılar elde edilmiş ve daha değişik özellikteki polimerlerle ilaç taşıyıcı sistemlerin de üretilebileceği bildirilmiştir (Abidian ve ark., 2006).



Şekil 1.8. Membran yardımcı üretim yönteminin şematik gösterimi (Jani ve ark., 2013)

Membran yardımcı nanofabrikasyon, tek boyutlu polimerik nanoyapıların üretimi için kullanılan en önemli yöntemlerden biridir. Nanotübüler yapıların üretimi için kalıp olarak kullanılan nanoporlu membranlar; polikarbonat veya silika (Thomas ve ark., 2008) ya da homojen por boyutları ve por yoğunluğu nedeniyle son zamanlarda en çok tercih edilen Anotlanmış Alüminyum Oksit (AAO) membranlardır (Son ve ark., 2006). Bu membranlar ticari olarak piyasada bulunmakla birlikte çalışmalarında uygunluk ve çeşitliliği artırmak amacıyla pek çok araştırmacı tarafından kolay bir üretim yöntemiyle de elde edilmektedir (Tao ve ark., 2007). Tek boyutlu nanoyapıların üretimi için membran yardımcı yöntemde en geçerli teknik, membranın ıslatılması tekniğidir. Membran ıslatma tekniği, yüzey ıslanabilirliği ve kapiller kuvvetlerle yürüyen bir işlemdir. Düşük enerjili sıvı, yüksek enerjili katı membranın dikey nanokanalıklarının içine dağılmaktadır. Islanma, sıvı ve katı membran arasındaki enerji farkı ile ortaya çıkmaktadır. Şekil 1.9'da görüldüğü gibi membran üstten, alttan yada her iki yönden de ıslatılarak polimer yüklenebilir.

Nanoporlu membranları ıslatma tekniği iki ana yöntemle ve farklı alt tekniklerle uygulanabilmektedir.

1) *membranı polimer çözeltisi ile ıslatma tekniği*

1a. *membranı polimer çözeltisi damlatarak ıslatma*

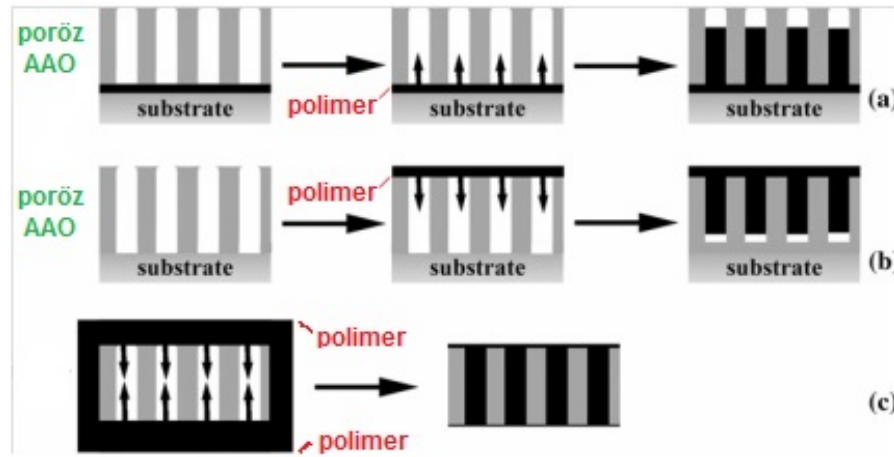
1b. *membranı polimer çözeltisine daldırarak ıslatma*

1c. *membrandan polimer çözeltisini vakum filtrasyonu ile geçirme*

2) *membranı polimer eriyiği ile ıslatma tekniği*

2a. *Polimer filmlerini eriterek ıslatma tekniği*

2b. *Polimeri doğrudan eriterek ıslatma tekniği*



Şekil 1.9. Membranı ıslatma yöntemindeki bazı tekniklerin üstten, alttan ve her iki yönlü ıslatmaya etkisi (Kokonou ve ark., 2013)

Yöntemin seçimi ve çeşitli parametrelere göre nanotüpler veya nanoçubuklar elde edilebilmektedir (Şekil 1.10). Dikey nanokanallara sahip membranın ıslanması için sürükleyici kuvvet, polimer çözeltisi veya eriyiği ile nanoporlar arasındaki ara yüzey gerilimine bağlıdır. Ara yüzey gerilimi ise polimerin eriyiğinin sıcaklığına ya da polimer çözeltisinin konsantrasyonuna bağlı olarak değişebilmektedir. Membranı polimer eriyiği ile ıslatma tekniğinde, bir polimeri camısı geçiş sıcaklığının (T_g) (amorf yapıları polimerler için geçerli) ya da erime noktasının (T_e) (yarı kristal yapıları polimerler için geçerli) üzerinde bir sıcaklığa kadar ısıtınca sürüklenme kuvveti yüksek olmakta ve ıslanma hızlı olacağı için nanotüp şeklinde yapılar elde edilmektedir. Bu durum tamamen ıslanmaya örnektir. Bir polimer, sadece camısı

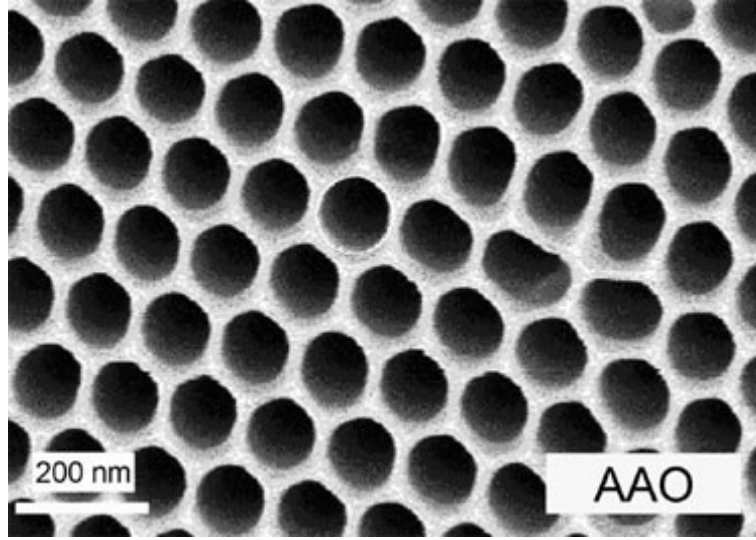
geçiş sıcaklığının (T_g) biraz üzerinde bir sıcaklığa kadar ısınırsa, sürükleyici kuvvet düşük olmakta ve uzun sürede ıslanma olacağı için nanoçubuk şeklinde yapılar elde edilmektedir. Bu durum da kısmi ıslanmaya örnektir. Her polimer için T_g ve T_e arasında ıslatma rejiminin değiştiren bir ıslatma geçiş sıcaklığı (T_w) olduğu bildirilmiştir (Schlitt ve ark., 2008).

Nanoçubukların boyu, membranın ıslanma süresini kontrol ederek ayarlanabilir. Uygulama için viskozite de önemli parametrelerden biridir. Eritme tekniğiyle ıslatmada polimer viskozitesi; sıcaklığın ayarlanmasıyla, çözelti tekniği ile ıslatmada ise viskozite; polimer çözeltisinin konsantrasyonunun ayarlanmasıyla kontrol edilebilir. Ayrıca polimerin molekül ağırlığı tek boyutlu yapının şekline (nanotüp veya nanoçubuk) etki eden önemli diğer bir parametredir (Steinhart ve ark., 1997). Bazı çalışmalarda polimer çözeltisiyle ıslatma tekniği ile nanoyapı şeklinin daha iyi kontrol edilebileceğini çünkü; çözücü seçimi ve polimer çözeltisinin konsantrasyonu gibi ayarlanabilecek parametrelerin avantaj olduğunu bildirilmektedir (Schlitt ve ark., 2008). Ancak ilaç taşıyıcı sistem açısından düşünüldüğünde, polimer eriyiği ile ıslatma tekniğinde organik çözücü kullanılmaksızın nanoyapıların elde edilebilmesi de önemli bir avantaj olarak görünmektedir.



Şekil 1.10. Membranı ıslatmada polimer çözeltisinin düşük veya yüksek konsantrasyonda olmasının etkisi (Massuyeau ve ark., 2009)

Ayrıca bazı çalışmalarda nanoyapılar elde edilirken, membranın üstündeki polimer tabakası kaldırılmadan membranlar çözüldüğünde nanofibriller içeren polimer filmler elde edilmiştir. Bu nanofibril taşıyan polimer filmlerin doku mühendisliğinde ve hücre ekiminde kullanılabileceği bildirilmiştir (Tao ve Desai, 2007).



Şekil 1.11. AAO membranının şematik görüntüsü (Jani ve ark., 2013)

Şimdiye kadar membran yardımcılı üretim yöntemiyle AAO membranlar (Şekil 1.11) kullanılarak elde edilen bu silindirik nanoyapılara etken madde yüklenerek, ilaç taşıyıcı sistem olarak uygulanmasına ilişkin farmasötik teknoloji alanında detaylı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Yapılan araştırmalar sadece, farklı özellikte polimerler kullanılarak etken madde içermeyen yapıların oluşturulmasına ve bu yapıların gelecekte ilaç taşıyıcı sistem olarak değerlendirilirse, avantaj taşıyacağına belirtilmesine yöneliktir (Abidian ve ark, 2006).

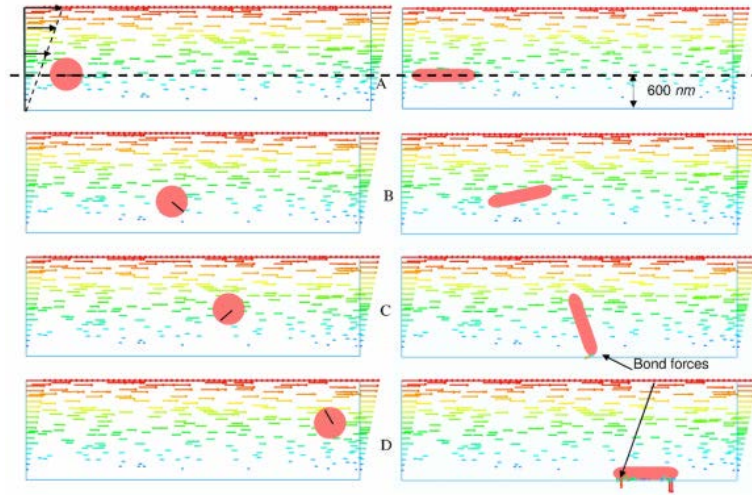
Membran yardımcılı nanofabrikasyon yöntemiyle biyobozunur polimerler kullanılarak yapılan az sayıdaki çalışmalardan birinde, aljinat ve kitosan polimerleri 400 nm por çaplı polikarbonat membranlara (Whatman) sıralı tabaka oluşturma yöntemiyle (Layer-by-Layer) emdirilmiş ve kuruduktan sonra polikarbonat membranlar hidrofobik oldukları için organik çözücü yardımıyla hemen çözülmüştür. Bu şekilde elde edilen nanoçubukların MCF7 hücrelerine alımı değerlendirilmiş ve konfokal mikroskopla görüntülenmiştir (Yang ve ark., 2007).

1.4. Küresel Olmayan Partiküllerin Biyolojik Davranışı

Doğada pek çok biyolojik sistem küresel olmayan şekiller sergiler. Örneğin *E. coli* ve *A. hydrophila* gibi bazı bakteri türleri belirgin olarak uzun-ince silindirik şekillidir ve boyları yaklaşık 300 nm, silindirik çapları 18 nm olan "tobacco mosaic" virüsleri uzun, çubuk şekilli, sağlam ve esnek yapıdadır (Liu ve ark., 2012). Bunun yanında yaklaşık 7 µm çaplı, disk şekilli kırmızı kan hücreleri, makrofajlarca elimine edilmeden önce kan dolaşımında 100-120 gün kadar serbestçe dolaşabilir ve biyolojik sistem için büyük sayılabilecek boyutlarına rağmen esnek yapılarından dolayı biyolojik bariyerlerden ve en ince kılcallardan serbestçe geçebilirler (Doshi ve ark., 2009). Araştırmacılara tasarım kaynağı olan bu farklı şekiller, küresel olmayan partiküllerin *in vivo* ortamdaki davranışının incelenmesine de öncülük etmişlerdir. Küresel olmayan partiküllerin kan dolaşımındaki akış dinamikleri, biyodağılımı ve hücre içine alınması pek çok araştırmacı tarafından *in vitro* (Sharma ve ark., 2010) ve *in vivo* (Merkel ve ark., 2012) olarak farklı yöntemlerle incelenmiş ve kapsamlı makalelerle derlenmiştir (Venkataraman ve ark., 2011; Ernsting ve ark., 2013; Decuzzi ve ark., 2010; Champion ve ark., 2007; Truong ve ark., 2014).

1.4.1. Küresel Olmayan Partiküllerin Kandaki Dolaşım Süresi

Preseptte modern ilaç taşıyıcı sistemler için en önemli kriterlerden biri kan dolaşımında uzun süre kalmalarıdır. Özellikle sitotoksik tedavi açısından dolaşımda kontrollü olarak dağılma ve kanser hücrelerine hedefleme için partiküllerin kan dolaşımında geçirdikleri süre büyük önem taşımaktadır (Daum ve ark., 2011). İV olarak uygulanan partiküllerin şekli, kan akışındaki hareketlerini etkilemektedir. Pek çok çalışmada bilgisayar modellemeleri ile kanıtlanan bulgulara (Şekil 1.12), küresel olmayan partikül geometrisinin, partikülün damar çeperlerine doğru sürüklenme eğilimini artırdığı tespit edilmiştir (Shah ve ark., 2011). Kan akışını *in vitro* olarak taklit eden düzeneklerde ise küresel olmayan partiküllerin akış kanalının kenarlarına yaklaşarak aktığı gözlenerek doğrulanmıştır (Doshi ve ark., 2010; Toy ve ark., 2011).



Şekil 1.12. Akış etkisinde partikül şekline bağlı ilerleme hareketi. Sol taraftaki küresel partikül sıvı akışı etkisiyle çepere temas etmeden dönerek sürüklenmekte, sağ taraftaki çubuk şekilli partikül çepere yapışarak hareket etmektedir. A, B, C, D sırasıyla $t=0$ s, 0.25 s, 0.5s, ve 0.75 s, olarak zamanı göstermektedir (Shah ve ark., 2011).

İV yolla uygulanan partiküllerin kan dolaşımdaki yarı ömrü, partiküllerin damar çeperlerine tutunarak ilerleyişi, RES hücrelerince fagositoz, karaciğer, akciğer ve dalakta bulunan doğal bariyerlerden geçişi gibi faktörlerin oluşturduğu karmaşık bir etkileşimdir. Bu sebeple *in vivo* çalışmalarla da küresel olmayan partiküllerin kan dolaşımında kalma süresi araştırılmış ve küresel partiküllere göre üstünlüğü kanıtlanmıştır (Mathaes ve ark, 2014).

Farklı üretim yöntemleriyle hazırlanan ve küresel olmayan partiküllerle yapılan *in vivo* çalışmalarda *in vitro* çalışmalarla uyumlu sonuçlar bulunmuştur. Arnida ve ark., (2011) PEGile altın nanoküreler ve nanoçubukların, farelere İV uygulamadan 6 saat sonra kan seviyelerini karşılaştırmıştır. Nanoçubukların plasma konsantrasyonu enjekte edilen dozun % 11'i iken nanokürelerin plasma konsantrasyonu % 1'in altında kalmıştır. Filomisel üretiminin öncülerinden olan araştırma grubunun yaptığı bir çalışmada ise solucan şekilli, ortalama 22-60 nm çapta ve 15 μ m uzunluğunda esnek filomiseller rodentlerin kan dolaşımında 7 gün kalabilmişken aynı polimerden üretilen küresel/PEGile miseller kandan 2 günde elimine edilmişlerdir (Geng ve ark., 2007). Merkel ve ark, (2012), PRINT yöntemiyle ürettikleri disk şekilli, oldukça esnek yapıda hidroksi-PEG-akrilat mikro ve nanopartikülleri ile kırmızı kan

hücrelerinin fiziksel özelliklerini taklit etmeye çalışmışlardır. Fareler üzerinde yaptıkları *in vivo* plazma ve farmakokinetik çalışmalarda, polimer disklerin esnekliği akciğerdeki ince kılcallardan ve dalaktaki filtrasyon aralıklarından geçişine olanak tanımış, çapı yaklaşık 6,4 µm olan bu diskler 104 saat sonra başlangıçta İV uygulanan dozun %13,2'si kadar kan dolaşımında bulunabilmişlerdir.

1.4.2. Küresel Olmayan Partiküllerin Biyodağılımı

Mikro ve nanopartikül geometrisi biyodağılımda da önemli rol oynar. Yapılan bir çalışmada Yu ve ark., (2012) farklı şekilli silika partiküllerin biyodağılımını incelemişlerdir. Disk şekilli partiküllerin küresel partiküllerden daha az karaciğer birikimi gösterdiğini bulmuşlardır. Bu durum daha önce de anlatıldığı gibi küresel olmayan partiküllerin fagositozdan kaçıp, dolaşıma devam edebilmeleriyle ilgilidir. Ayrıca disk şekilli partiküllerinin alan/hacim oranlarının büyük oluşu onların damar çeperlerine tutunarak ilerlemelerine olanak vermiştir (Decuzzi ve ark., 2010).

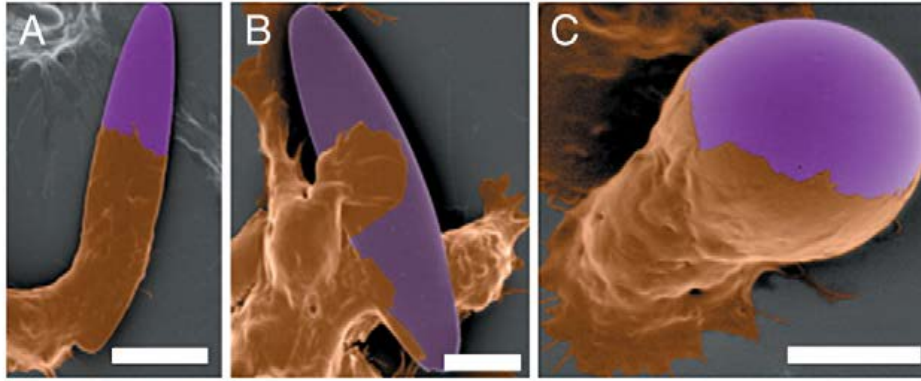
1.4.3. Küresel Olmayan Partiküllerin İlaç Taşınmasında Kullanımı

Yapılan bir çalışmada Geng ve ark., (2007) paklitaksel yüklü küresel misellerle (boy/en=1) filomiselleri (boy/en=8) karşılaştırmışlardır. Boy/en oranındaki artış farelerdeki tümör hücrelerinin ölüm oranını 2 katına çıkarmış ve tümörün belirgin şekilde küçülmesini sağlamıştır. Filomisellerin uzayan yarı ömrü Enhanced Permeability and Retention effect (EPR) etkisiyle pasif hedeflemeyi artırarak tümör hücrelerinin paklitaksele maruziyetini artırmıştır.

1.4.4. Küresel Olmayan Partiküllerin Hücresel Alımı

Hücresel partikül alımında partikülün şekil etkisi fagositik ve fagositik olmayan hücreler açısından farklı yaklaşımlarla değerlendirilmiştir. Mitragotri ve grubu film gerdirme yöntemiyle elde ettikleri değişik geometriye sahip partikülleri

değerlendirmişlerdir. Bu durum aynı materyalden, aynı yüzey yüküyle ve aynı hacimde ama farklı şekillerde elde ettikleri partikülleri değerlendirme imkanı sunmuştur (Champion and Mitragotri, 2009). IgG kaplı 1 μ m ve 3 μ m elipsoid çubukların fare makrofajlarıyla daha az fagosit edildiğini göstermişlerdir.



Şekil 1.13. Elipsoid ve küresel partiküllerin makrofajlarca alımını gösteren renklendirilmiş SEM görüntüsü (Champion and Mitragotri, 2009).

1.5. Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüzce büyüyüp çoğaldığı, sıralı bir takım mutagenез basamaklarına dayanan bir hastalıktır. Bu süreç kanser hücrelerine sınırsız çoğalma potansiyeli, üreme sinyallerini kontrol etme ve büyümelerini engelleyecek koşullara direnç gösterme yeteneği kazandırmaktadır. Tümörler, çevrelerindeki stromal hücrelerle etkileşim yoluyla kendilerine destek elde etmek üzere gelişirler. Aynı zamanda anjiogenezlerini ilerleterek immün sistemden kaçma ve diğer organlara metastaz olanağı da bulurlar. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) Global Kanser Raporuna (The Global Cancer Report) göre her yıl 10 milyon yeni kanser vakası ortaya çıkmakta ve yaklaşık 6 milyon vaka ölümle sonuçlanmaktadır. Ölüme yol açan kanser türlerinin başında, akciğer, mide, karaciğer, kolon ve meme kanserleri gelmektedir (Prakash ve ark., 2011).

Günümüzdeki teknolojilerle kanser araştırmalarında çok önemli gelişmeler sağlansa da halen kesin sonuç veren tedavilere ulaşılamamıştır. Kanserde tedavi sistemlerinin başarısı, sistemin sağlıklı dokuya zarar vermeden tümör dokusunu küçültmesi veya yok etmesi ile ölçülmektedir. Bu sebeple tümöre hedeflemenin kapasitesi, terapötik sistemin başarılı olmasında çok önemlidir. Kanser hücresine özgü olma ve hücrede birikebilme özelliği tedavinin etkinliğini artırırken, kanser hastalarının sıkça karşılaştığı ciddi yan etkileri de azaltmaktadır. Nanopartiküler sistemler; kanser hücresine özgülük ve antikanser ilacı etkin bir şekilde taşıma yetenekleriyle tedavide çok önemli aşama kaydetmişlerdir (Byrne ve Betancourt, 2008).

Kanser tedavisinde nanopartiküllerin üretimi için biyoparçalanabilen polimerlerin kullanılması, hedeflenen bölgede birkaç günden haftalara kadar uzanan ilaç salımı sağlayabilmektedir. Poli(laktik asit) (PLA) ve Poli(laktid-ko-glikolid)(PLGA) gibi polimerlerden elde edilen biyobuzunur nanopartiküller, uzatılmış etken madde salımına olanak tanımaktadır. Özellikle hücre içinde etki sağlayacak etken maddeler için bu durum çok önemlidir. Poli-epsilon-kaprolakton (PCL) nanopartiküllerin endolizozomal kompartmandan sitoplazmik kompartmana çok hızlı hareket ettiği gösterilmiştir. Bu sebeplerle hedefi sitoplazmik olan etken maddeler için olduğu kadar, etkisini nükleusta gösteren bazı kemoterapötik ajanlar için de biyobozunur nanopartiküller etkili birer ilaç taşıyıcı sistem oluşturmaktadır (Panyam ve Labhasetwar, 2003).

1.5.1. Kanser İçin Geliştirilen Partiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Antikanser ilaçlar için üzerinde çalışılan pek çok nanopartiküler sistem bulunmaktadır. Her sistemin materyal özellikleri, etken maddeyi tümöre taşımayı artırmak için geliştirilmiştir. Örneğin; uzun süreli sirkülasyon için ‘stealth’ özellikteki nanopartiküller elde edilmek üzere poli(etilen glikol) (PEG) gibi hidrofilik yüzey sağlayıcılar kullanılmıştır. Endositozu artırmak için ise pozitif yüzey özellikli taşıyıcılar geliştirilmiştir. Kemoterapötik ilaç uygulamaları için geliştirilen

daha pek çok örnek bulunmaktadır, ancak genel olarak nanosistemler şöyle sıralanabilir.

- Dendrimerler,
- Lipozomlar,
- Miseller,
- Polimerik nanopartiküller,
- Proteinik nanopartiküller,
- Seramik nanopartiküller,
- Viral nanopartiküller

Pek çok ilaç taşıyıcı sistem vücuda uygulandığında seçilen bölgede ulaşmadan önce vücuda dağılmaktadır. Ayrıca hedef bölgeye ulaşmak için terapötik ajanlar, inaktivasyona ve kan dolaşımından atılmaya karşı koyarak pek çok biyolojik bariyeri geçmek zorundadır. Etken maddeleri nanotaşıyıcılar içinde hapsetmek, aktif ajanı degradasyondan korumakla birlikte seçilen hücrelere hedefleme için potansiyel oluşturur (Perry ve ark., 2011). Kanser tedavisinde hedefleme iki şekilde gerçekleştirilir. Aktif hedeflemede nanopartiküler sistemlerin yüzeyine hedefleyici fonksiyonel gruplar bağlanarak yapılmaktadır. Pasif hedeflemede ise tümörün çevresindeki ortamın özelliklerinden faydalanılır.

1.5.2. Nanoyapılar Kullanılarak Kanser Bölgesine Pasif Hedefleme

Nanopartiküler sistemler pasif hedefleme yoluyla tümörler üzerinde üstün başarılar sağlamışlardır. Tümör, 2 mm³ boyut ve üzerinde difüzyon limitli hale gelir. Bu difüzyon problemi, hücrenin besin alımını, atık boşaltımını ve oksijen geçişini engeller. Tümör bu difüzyon problemini yenmek üzere yeni damar oluşumuna yani anjiyogeneze başvurur. Anjiyogenezin karakteri, düzgün olmayan dolambaçlı damarlar ve çeperdeki anormallikler ile birlikte endotel hücrelerde perisit bulunmamasıdır. Bütünlüğü olmayan damarlarda tümörün tipine göre, 100 nm-2 µm

arasında boşluklar oluşmaktadır. Ayrıca tümörün lenfatik sistemi de iyi olmadığından, iç basınç dış basınçtan daha yüksektir. Artan iç basınç damar dışına doğru sıvı geçişine neden olur ve ortamdaki osmotik denge bozulur. Bununla birlikte ilaç yüklü nanoyapılar tümör içine ulaşınca bazı reaksiyonlar sayesinde, diğer dokulardan daha fazla kalış süresine sahip olurlar. Tümörü çevreleyen damarlardaki sızıntı ve zayıf lenfatik drenaj, EPR etkisi olarak adlandırılır. Kanseri bölgesine pasif hedeflemede EPR etkisinden yararlanılır (Brannon-Peppas ve Blanchette, 2004).

Son zamanlardaki kanser tedavileri genel anlamda sitotoksik tedavi ve moleküler olarak hedeflenmiş ilaçlar ile tedavi olarak iki şekilde yürütülmektedir. Geleneksel sitotoksik tedavi; radyasyon terapisi ve kemoterapötiklerle tedaviyi tanımlamaktadır. Kanseri hücreleri çoğunlukla mitotik fazda bulunurlar ki bu faz DNA replikasyonunun sürekli olarak gerçekleştiği fazdır. Böylece uygulanan tedavi, örneğin radyasyon terapisi, normal hücrelerden çok, sadece bölünme aşamasında olan kanseri hücreleri üzerinde toksisite yaratır. Aynı şekilde sitostatik antineoplastik ilaçlar da hücre siklusunun DNA replikasyon aşamasında etki göstererek kanseri kemoterapisinde görev alırlar (Byrne ve Betancourt, 2008).

Kanseri tedavisinde kullanılan birçok etken maddenin suda çözünürlüğünün ve biyoyararlanımının çok düşük olması nanopartiküler sistemlerin kullanılması ile aşılabilmektedir. Nanoyapılı taşıyıcı sistemlerin etken madde taşıyıcı olarak geniş yüzey alanı sağlamaları sonucu, sisteme etkin ve yeterli dozda ilaç yüklenebilmesi en önemli avantajlarından biridir. Nanoyapılı sistemlerin ilaç taşıyıcı kapasitesini yükseltmek ve *in vivo* performansını artırmak için yapılan çalışmalar, son yıllarda küresel olmayan partiküllere yönelmiştir (Daum ve ark., 2012). Ayrıca küreselden farklı geometrilerdeki nanoyapılar hidrodinamik özelliklerinden dolayı, daha uzun süre biyodağılım ve hücrede daha iyi tutulma gibi üstünlüklerle ön plana çıkmaktadır (Lee ve ark., 2009).

Küresel olmayan nanopartikül üretmek için son yıllarda kimyasal yöntemlerden litografik tekniklere kadar pek çok yöntem denenmiştir. Küresel olmayan nanoyapılar arasında silindirik şekilli ve nanotübüler yapılar, etken madde salımı için geçerli özellikleri açısından ön plana çıkmıştır. Karbon gibi inorganik materyallerle başlayan bu devrim, organik ve polimerik yapıların çalışmalara katılmasıyla hızla ilerlemektedir (Daum ve ark., 2012). Polimerik materyaller tasarım ve işlenebilirlik açısından ilaç taşıyıcı sistemler olarak daha etkin seçenekler sunmaktadır. Biyouyumlu ve biyobozunur polimerler toksik olmamaları, yüksek stabiliteleri, etken madde yükleme ve salımı açısından beklenen özellikleri taşımaktadır (Champion ve ark., 2007).

Prensipte kanser tedavisinde, partiküler ilaç taşıyıcı sistemler açısından en önemli kriterlerden birisi kan dolaşımında uzun süre kalmalarıdır. Özellikle sitostatik ve sitotoksik tedavi göz önüne alındığında *in vivo* ortamda kanser hücresi içine penetrasyon da taşıyıcı sistem için çok önemlidir. Biyodağılım üzerinde partikül şeklinin etkisi pek çok *in vivo* çalışmada da incelenmiştir. Tümörlü farelerde silika nanoküreler ve küresel olmayan (yarı küre, silindirik ve disk şekilli) partiküller karşılaştırılmış ve silindirik şekilli nano yapıların biyodağılım açısından üstün özellikler gösterdiği saptanmıştır (Decuzzi ve ark., 2010).

Dolaşımda uzun süre kalmalarının yanında küresel olmayan partiküllerin hücreye alımında da küresel partiküllere göre daha etkin oldukları bulunmuştur (Gratton ve ark., 2008). Hücre membranına temas yüzeyinin daha geniş olması sebebiyle silindirik partiküllerin hücre çeperiyle etkileşimi daha yoğun ve kuvvetli olduğu gösterilmiştir (Decuzzi ve ark., 2009). Son zamanlarda sıkça çalışılan, nanoyapılı sistemlerin şekil ve tasarımının kanserin biyolojik prosesleri üzerindeki önemli etkisi ışığında, organik, biyouyumlu ve biyobozunur polimerlerden, nanotübüler ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmesi çalışmamızın özgün değerini oluşturmaktadır.

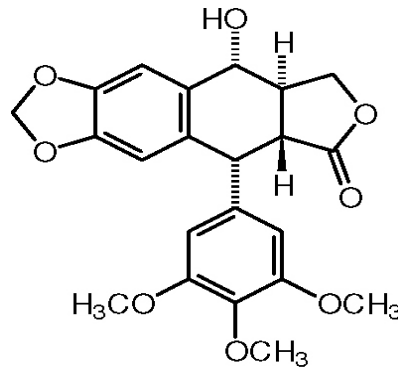
1.6. Etoposid Hakkında Genel Bilgiler

İlk olarak 1963'te sentezlenen ve VP-16 ismiyle de bilinen ETP, *Podophyllum peltatum* (Şekil 1.14) veya *Podophyllum emodi* türlerinin kök ve rizomlarından elde edilen podofilotoksinin (Şekil 1.15) yarı sentetik bir türevidir. Etoposidin ilk klinik çalışması 1971'de rapor edilmiştir ve 1983'te FDA tarafından VePesid ismiyle onaylanmıştır (Hande, 1998; Najar ve Johri, 2014).



Şekil 1.14. Podophyllum Peltatum

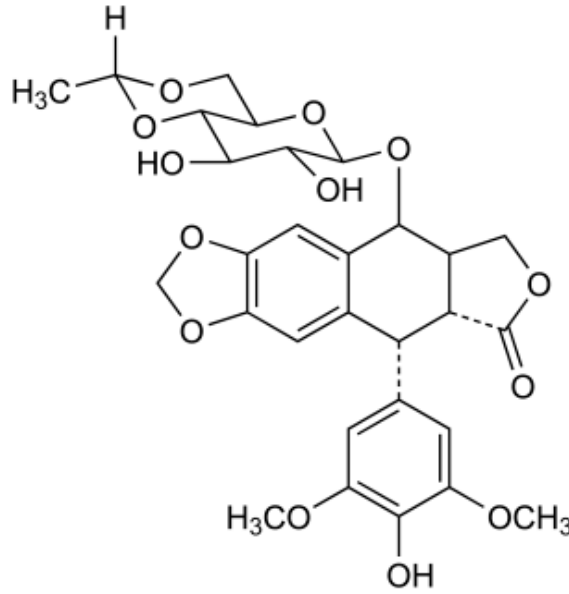
Podofilotoksinin antimitotik özellikleri 1946'da keşfedilmiş, klinik değerlendirmeleri başlamış ancak aşırı toksik etkisi sebebiyle kullanımı durdurulmuştur. Podofilotoksin sitotoksik etkisini tübülün polimerizasyonunu inhibe ederek gösterirken, glukozillenmiş türevi olan etoposidin etki mekanizması tamamen farklıdır.



Şekil 1.15. Podofilotoksinin kimyasal yapısı

1.6.1. Fizikokimyasal Özellikleri

Kimyasal adı 4'-Dimetil epipodofilotoksin 9-(4,6-O-etiliden-β-D-glukopiranosid) olan etoposid, görünümü beyaz, beyaza yakın renkte olan kristal yapılı bir tozdur. Molekül ağırlığı 588.6, molekül formülü C₂₉H₃₂O₁₃, erime derecesi 236-251 °C arasındadır. Etoposid oldukça lipofiliktir ve partiyon katsayısı Log*P* (oktanol/su) 0,6'dır. Disosiasyon sabiti, pKa 9.8 olarak bildirilmiştir (www.sigmaaldrich.com).



Şekil 1.16. Etoposidin kimyasal yapısı

Etoposid, dimetil sülfoksit (30 mg/mL) ve dimetil formamidde çok iyi çözünür, metanol ve kloroformda çözünürlüğü fazla, etanolde az, sudaki çözünürlüğü ise çok düşüktür (< 1mg/mL).

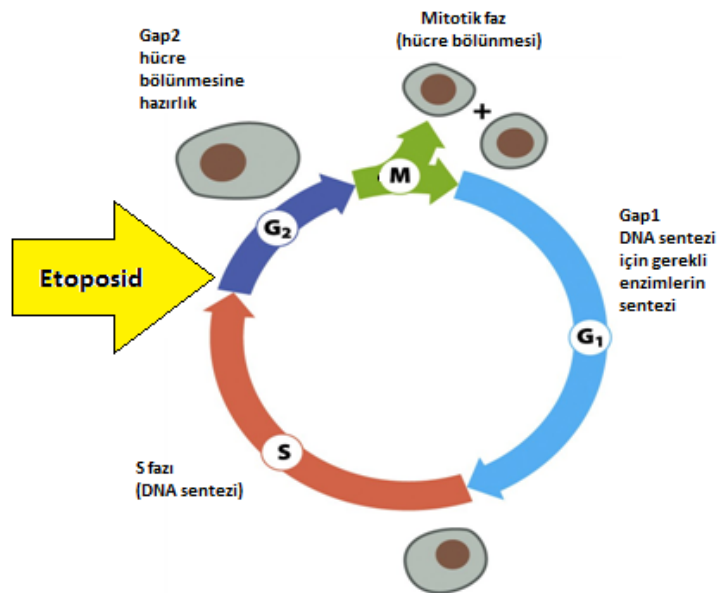
1.6.2. Etoposid'in Antitümöral Etki Mekanizması

Etoposid'in, kimyasal bileşiklerin sınıflandırılması için kullanılan Anatomik ve Terapötik Kimyasal (ATC) sınıflandırma sistemindeki kodu, L01CB01'dir. Etoposidin ATC sınıflandırma sistemindeki yeri Çizelge 1.1'de gösterilmiştir. (<http://www.ilactr.com/atc/L01CB.html>)

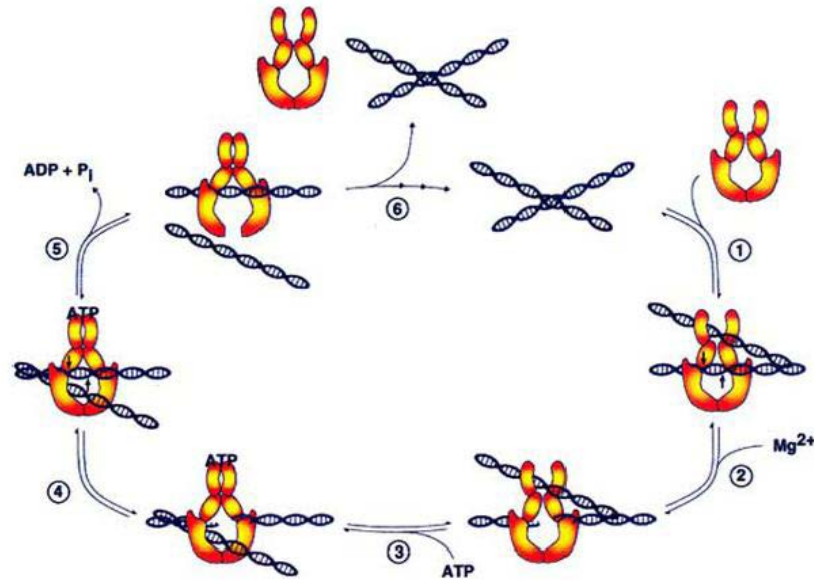
Çizelge 1.1. Etoposid'in ATC sınıflandırma sistemindeki yeri

L	: Antineoplastik ve İmmünomodülatör Ajanlar
L01	: Antineoplastik İlaçlar (Kanser İlaçları)
L01C	: Alkaloidler ve Diğer Doğal İlaçlar
L01CB	: Podofilotoksin Türevleri
L01CB01	: Etoposid

Etoposid'in sitotoksik etkinliği, Topoizomeraz II enzimi ile etkileşerek veya serbest radikal oluşumunu sağlayarak DNA zincirinde kırıkların indüklenmesine bağlıdır. Terapötik konsantrasyondaki etkisi hücre döngüsünün belirli dönemine özgüdür ve S fazının geç safhalarında ve G2 dönemine etkilidir. Dinlenme halindeki hücrelerde sitotoksik etkisi sadece yüksek konsantrasyonlarda görülmüştür.

**Şekil 1.17.** Hücre döngüsünün fazları ve Etoposid'in etki aşamaları

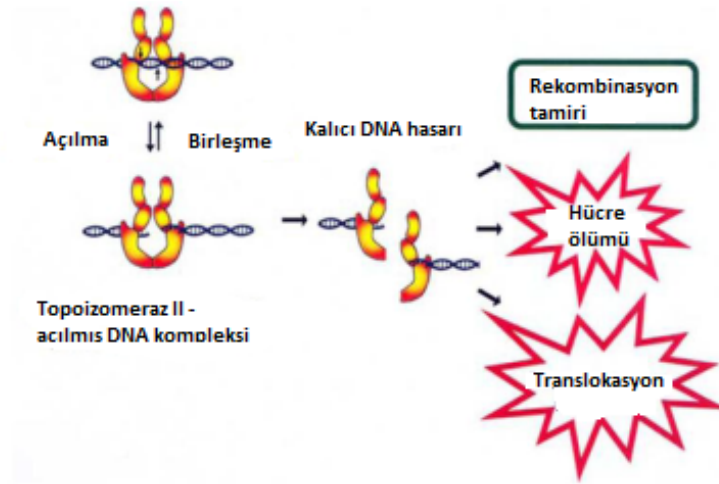
Topoizomerazlar, DNA'nın replikasyon, transkripsiyon ve rekombinasyon gibi temel işlevleri esnasında kritik rol oynayan, DNA'nın yapısıyla tamamen uyumlu enzimlerdir. Topoizomeraz II, çoğalmakta olan hücrelerde DNA özel çift sarmalının açılmasını ve yeniden kusursuzca birleşmesini katalizleyen enzim sınıfıdır. Bu mekanizmayla Topoizomeraz II çekirdekteki DNA'nın topolojik yapısını kontrol ve modifiye eder (Bender ve ark.,2008; McClendon ve Osheroff, 2007). Topoizomeraz II'nin etki mekanizması Şekil 1.18'de verilmiştir (Baldwin ve Osheroff, 2005).



Şekil 1.18. Topoizomeraz II'nin etki mekanizması. (1) Topoizomeraz II-DNA birleşmesi (2) DNA sarmalının açılmasının başlaması (3) ATP bağlanması ve DNA sarmalının geçişi (4) DNA sarmalının açılma-tekrar birleşme işleminin sona ermesi (5) ATP hidrolizi ve enzimin açılması (6) DNA'nın serbest bırakılması ve enzimin başa dönmesi.

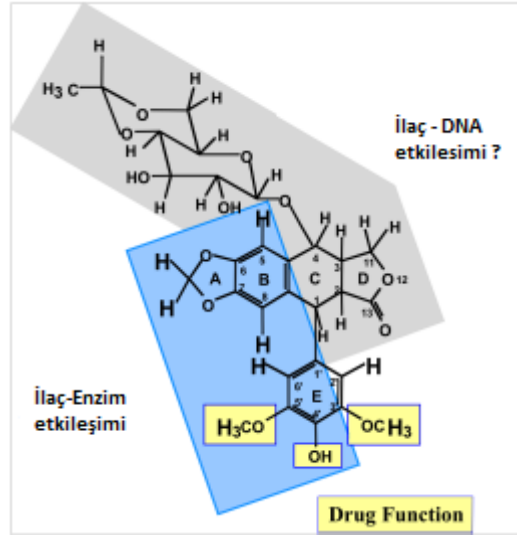
Etoposid antineoplastik etkisini, Topoizomeraz-DNA kompleksine bağlanarak, Topoizomerazın DNA sarmalını yeniden birleştirme etkisini bloke ederek gösterir. Hücre çekirdeğinde Topoizomeraz-DNA kompleksi birikimi artar kalıcı DNA çift sarmal kırıkları meydana gelir. Ortaya çıkan bu durum DNA replikasyon ve transkripsiyonun engellenmesiyle sonuçlanır ve hücre ölümü gerçekleşir. Tümör inhibe edici etkisi, birçok deneysel tümör modelinde gösterilmiştir (Reddy ve ark, 2004).

DNA yıkımında kritik rol oynayan Etoposid-Topoizomeraz II-DNA üçlü kompleksinin oluşumunda her Etoposid molekülü bir enzim molekülüyle non-kovalent bağ kurarak komplekse dahil olur ve enzimi inhibe eder. Bu oluşum Etoposid antitümoral etkisinin, ilaca maruziyet süresine ve molar konsantrasyona bağlı olduğunu açıklar. (Montecucco ve Biamonti, 2007).



Şekil 1.19. Topoizomeraz II inhibitörleri ile oluşan kalıcı Topoizomeraz-DNA kompleksinin sonuçları

Etoposidin yapısı antineoplastik etkisi açısından önemlidir. Şekil 1.20'deki "A", "B", "E" halkalarından oluşan kısmın ilaç-enzim etkileşiminden sorumlu olduğu, bu kısımdaki -OH ve -COH₃ gruplarının etki mekanizmasında rol aldığı öne sürülmektedir. Aynı zamanda yapıdaki "D" halkasıyla birlikte glukoz biriminin Etoposid-Topoizomeraz-DNA kompleksi oluştuğunda DNA ile etkileşime girerek rol oynadığı düşünülmekle birlikte henüz kesinlik kazanmamıştır (Bender ve ark., 2008).



Şekil 1.20. Etoposidin Topoizomeraz II ile etkileşen alt birimleri (Bender ve ark., 2008)

1.6.3. Etoposid'in Farmakokinetik Özellikleri

İV uygulanmasından sonra etoposid iki fazlı parçalanmaya uğrar. Dağılım yarı-ömrü yaklaşık 1,5 saat ve terminal eliminasyon yarı ömrü 4-11 saat arasındadır. Toplam klerensi, 33-48 mL/dakika ya da 16-36 mL/dakika/m² değerleri arasındadır. Terminal yarı-ömrü gibi toplam vücut klerensi de 100-600 mg/m² dozlarda doza bağlı değildir. Aynı doz aralığının üstünde plazma konsantrasyonu altındaki alan (AUC) ve maksimum konsantrasyon (C_{maks}) değerleri dozla doğrusal olarak artar. Etoposid 4-5 gün süreyle günde 100 mg/m² verildiğinde plazmada birikmez.

İn vitro olarak etoposid % 97 oranında insan plazma proteinlerine bağlanır. Çocuklarda plazma albumin düzeyleri ve etoposid renal klerensi arasında ters bir ilişki olduğu bulunmuştur. Kararlı durumda ortalama dağılım hacmi, yetişkinlerde 18-29 litre ya da 7-17 L/m² ve çocuklarda 5-10 L/m² aralığındadır. Etoposid, beyin omurilik sıvısına çok az geçer. Beyin omurilik sıvısında ve intraserebral tümörlerde tespit edilmesine rağmen konsantrasyonları, ekstraserebral tümörler ve plazmadakinden azdır.

Etoposid hem renal hem de renal olmayan (metabolizma ve safra atılımı) yollardan atılır. İlacın ve metabolitlerinin eliminasyonu üzerine böbrek yetmezliğinin etkisi bilinmemektedir. Böbrek ve karaciğer fonksiyonları normal hastalarda etoposidin IV infüzyonunu takiben 48-72 saat içinde uygulanan dozun yaklaşık % 40-60'ı değişmemiş ilaç ve metabolitleri halinde, 72 saat içinde de % 2-16'sından daha azı feçesle atılır. Bunun yanında 24 saat içinde uygulanan dozun yaklaşık % 20-30'u ve 48 saat içinde de % 30-45'i değişmemiş olarak idrarla atılır. Yetişkinlerde ve çocuklarda ana üriner metabolit, hidroksi asit (4-demetil epipodofilik asit 9-(4,6-D-etilinden-β-D-glukopiranozid) dir ki bu metabolit lakton halkasının açılması ile oluşur. Bu aynı zamanda plazmada da muhtemelen transizomer olarak bulunur. Etoposidin glukuronid ve/veya sülfat konjugatları idrarla atılır ve dozun % 5-22'sini kapsar (www.ilactr.com).

1.6.4. Etoposid'in İlaç Taşıyıcı Sistemlerle Formüle Edildiği Çalışmalar

Etoposid'in stabilitesi ve etkinliğini artırmak, yan etkilerini azaltmak, farmakokinetiğini düzeltmek gibi amaçlarla partiküler ilaç taşıyıcı sistemler kullanılarak pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar arasında mikroemülsiyonlar (Pinheiro ve ark., 2006; Jain ve ark., 2010), miseller (Varshosaz ve ark., 2012; Shin ve ark., 2009; Ukawala ve ark., 2012; Wang ve ar., 2008), nanopartiküller (Snehalatha ve ark., 2008; Callewaert ve ark., 2012; Saadati ve ark., 2013; Yordanov ve ark., 2012; Kılıçay ve ark., 2011; Yadav ve ark., 2010), lipid nanopartiküller (Lamprecht ve ark., 2006; Reddy ve ar., 2004; Reddy ve ark., 2005; Saliou ve ark., 2013; Khajavinia ve ark., 2012), Solid lipid nanopartiküller (Reddy ve ark., 2006), lipozomlar (Patlolla ve ark., 2008) bulunmaktadır.

Bu tez çalışmasında Etoposid'in, membran yardımcı yöntemle elde edilen nanotübüler yapılara yüklenerek ilaç taşıyıcı sistem olarak değerlendirilmesinin, farmasötik açıdan farklılık yaratacağı düşünülmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

2.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Cam malzemeler	:İldam
C18 ters faz HPLC kolonu (150x4,6mmx5µm)	:ACE
Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC)	:Shimadzu
Diyaliz mambran (MWCO:12,000Da)	:Sigma-Aldrich
Diyaliz mambran mandalları	:Spectrum Laboratories
Enerji Dispersiv X-ray Spektrometre (EDS)	: EDAX Genesis EDS
Filtrasyon düzeneği	:Merck Millipore
FourierTransformInfraredSpektrometre (FTIR)	:Agilent Cary 630 (Diamond ATR)
Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)	:FEI, TECHNAI G, 120 kV
Hassas terazi	:Sartorius
Liyofilizatör	:Christ Gamma 2-16 LSC
Manyetik karıştırıcı	:Heidolph
Mikropipetler	:Socorex
Mikroplaka okuyucu	:Thermo Scientific
Paket programlar	:GraphPad InStat3
pH-metre	:Inolab
Plastik enjektör	:Ayset

Su arıtma sistemi	:Millipor Mili-Q Gradient A10
Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	:FEI Quanta 400F
Termostatlı yatay çalkalayıcı su banyosu	:Memmert
Ultrasaf su ünitesi	:Millipore
Ultrasantrifüj cihazı	:Beckman Optima XL-100K
Ultrasantrifüj tüpü	:Beckman
Ultrasonik banyo	:Ultrasonic LC 30
UV Spektrofotometre	:Schimadzu 1202 UV Visible
Vakum pompası	:Merck Millipore
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)	:Agilent 1100 series
Zeta potansiyel ve patikül büyüklüğü ölçüm cihazı	:Zetasizer Nano ZS, Malvern Ins.

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

A549 (İnsan akciğer kanseri hücreleri)	:ATCC
Anodik Alüminyum Oksit (AAO) membran	:Whatman International Ltd.
Aseton	:Carlo Erba
Asetonitril (HPLC grade)	:Sigma-Aldrich
Diklorometan (DCM)	:Sigma-Aldrich
Dimetil formamid (DMF)	:Sigma-Aldrich
Dimetil sülfoksit (DMSO)	:Sigma-Aldrich
Disodyum hidrojen fosfat	:Sigma-Aldrich
Enjektör ucu filtre (0,45 µm, 0,22 µm)	:Sartorius

Etoposid (ETP)	:Koçak Farma (Cipla)
Fosforik asit	:Sigma-Aldrich
Hücre kültürü kapları	:Sarstedt
MCF-7(İnsan meme kanseri hücreleri)	:ATCC
Metanol (HPLC grade)	:Sigma-Aldrich
Penisilin-streptomisin	:Lonza
poli(ε -kaprolakton) (PCL)	:Sigma-Aldrich
poli (hidroksietil metakrilat) p(HEMA)	:Sigma-Aldrich
Poli(L-laktid-ko-kaprolakton-ko-glikolid)	:Sigma-Aldrich
poli(d,l-laktid-ko-glikolid) PLGA (50-70kDa)	:Sigma-Aldrich
poli (metil metakrilat) (PMMA, 350 kDa)	:Sigma-Aldrich
poli (metil metakrilat) (PMMA, 996 kDa)	: Sigma-Aldrich
Serolojik pipet	:Sarstedt
Sodyum hidroksit	:Riedel de Haen
Tripsin-EDTA	:Lonza
Tween 80	:Sigma-Aldrich

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Tampon Ortamının Bileşimi

% 0,1 Tween içeren PBS (Phosphate buffered saline (pH 7,4) (PBS-Tw)

Disodyum hidrojen fosfat	2,38 g
Potasyum dihidrojen fosfat	0,19 g
Sodyum klorür	8,0 g
Tween 80	1,0 g
Distile su	1000 ml

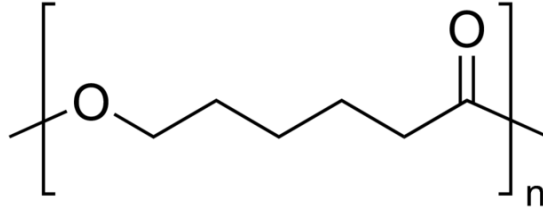
2.1.4. Çalışmada Kullanılan Maddelerin Kimyasal Formülleri

Poli (ε-kaprolakton)

M_w ~65,000

M_n ~42,500

En: 60 °C

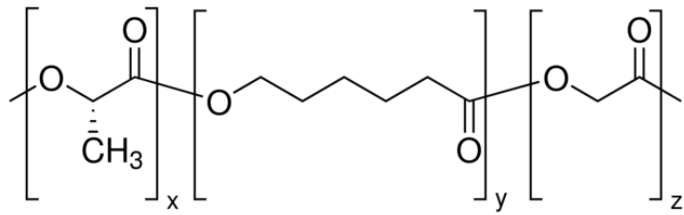


Poli(L-laktid-ko-kaprolakton-ko-glikolid)

L-laktid oranı %70

M_n: ~50,000

T_g: ~28 °C

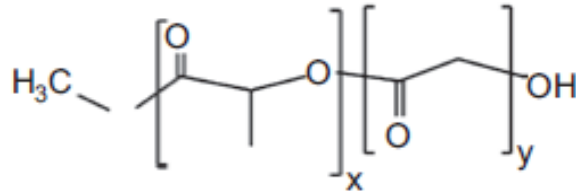


Poli(D,L-laktid-ko-glikolid)

ester terminated,

M_w 50,000-75,000

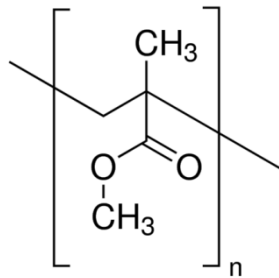
T_g: 45-50 °C



Poli (metil metakrilat)

M_w ~350,000 ve

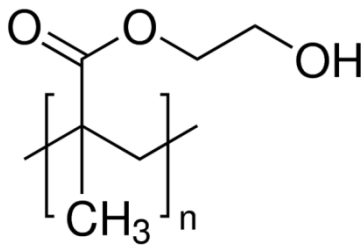
M_w ~996,000



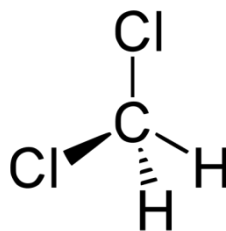
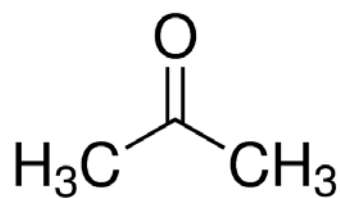
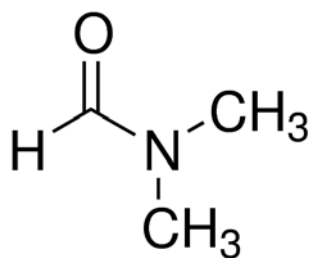
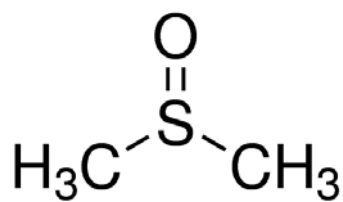
Poli(2-hidroksietil metakrilat)

M_v ~300,000

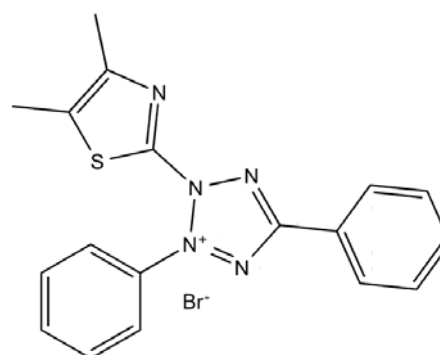
Kristal yapılı



Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan maddelerin kimyasal formülleri

Diklorometan**Aseton****Dimetil formamid****Dimetil sülfoksit****MTT**

(3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum bromid)



Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan maddelerin kimyasal formülleri (devam)

2.2. Etoposid (ETP) Üzerinde Yapılan Çalışmalar

2.2.1. ETP'nin Fourier Transform Infrared (FTIR) Spektroskopisi ile Analizi

Çalışmamızda kullanılan Fourier Transform Infrared (FTIR) spektrometresi, Diamond ATR (Attenuated Total Reflectance) aksesuarlı bir cihazdır (Agilent Cary 630-FTIR, Agilent Technologies) ve yapısında bulunan elmas kristali sayesinde potasyum bromür kullanımına ihtiyaç kalmadan örneklerin FTIR spektrumlarının alınmasına imkan vermektedir. ETP saf halde doğrudan toz olarak cihazın elmas kristali olan özel bölmesine yerleştirilip basıldıktan sonra $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ dalga aralığında FTIR spekturumu alınmıştır.

2.2.2. ETP'nin Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) ile Analizi

DSC kullanılarak ETP'nin termal analizleri yapılmıştır. 2,5 mg ETP tartılarak alüminyum panlar içine konulmuş ve preslenerek kapatıldıktan sonra cihaza yerleştirilmiştir. Çalışmada, 1 atm basınçtaki azot gazı (50ml/dakika) altında, 20-300 °C sıcaklık aralığında 10°C/dakika ısıtma hızında sıcaklık artırılarak termogramlar elde edilmiştir.

2.2.3. ETP'nin Ultra Viole (UV) Spektrofotometre ile Analizi

ETP'nin asetonitril içinde 0,5 mg/ml konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden uygun seyreltmeler yapılarak etken maddenin 200-400 nm aralığında spektrumu alınarak maksimum absorbands gösterdiği dalga boyu (λ_{max}) belirlenmiştir.

2.2.4. ETP'nin Asetonitril Ortamında HPLC ile Analizi

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) analizinde başlangıç için ETP'nin asetonitril içinde 1mg/ml konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden, asetonitril ile uygun seyreltmeler yapılarak 1,0 µg/ml, 5,0 µg/ml 20,0 µg/ml ve 100,0 µg/ml konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltiler kullanılarak HPLC'de enjeksiyon hacmi, mobil faz oranları, akış hızı, sıcaklık gibi parametreler ayarlanarak yöntemin optimizasyonu gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Çalışmamızda kullanmamız için en uygun şartlar belirlenerek etken madde pik şeklinin keskin ve sistem uygunluk parametrelerine uygun olduğu şartlarda analizler gerçekleştirilmiştir.

Etken maddenin kalibrasyonu için ETP'nin asetonitril içinde 0,5 mg/ml konsantrasyonda çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden asetonitril ile uygun seyreltmeler yapılarak bir seri 0,2 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml, 2,0 µg/ml, 5,0 µg/ml 10,0 µg/ml, 20,0 µg/ml 50,0 µg/ml ve 100,0 µg/ml konsantrasyonda çözeltiler elde edilmiş ve HPLC analizleri yapılmıştır. Bilinen konsantrasyonlara (x değerleri) karşı HPLC'den elde edilen alan (y değerleri) grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusu elde edilmiştir. Aynı işlem aynı konsantrasyona sahip üç farklı stok çözelti için tekrarlanmıştır.

2.2.5. ETP'nin Metanol Ortamında HPLC ile Analizi

Etken maddenin metanol ortamındaki kalibrasyonu için ETP'nin asetonitril içinde 0,5 mg/ml konsantrasyonda çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden metanol ile uygun seyreltmeler yapılarak bir seri 0,2 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml, 2,0 µg/ml, 5,0 µg/ml, 10,0 µg/ml 20,0 µg/ml 50,0 µg/ml ve 100,0 µg/ml konsantrasyonda çözeltiler elde edilmiş ve HPLC analizleri yapılmıştır. Bilinen konsantrasyonlara (x değerleri) karşı HPLC'den elde edilen alan (y değerleri) grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusu elde edilmiştir. Aynı işlem aynı konsantrasyona sahip üç farklı stok çözelti için tekrarlanmıştır.

2.2.6. ETP'nin PBS-Tw (pH 7,4) Ortamında HPLC ile Analizi

Etken maddenin PBS-Tw (pH 7,4) ortamındaki kalibrasyonu için ETP'nin asetonitril içinde 0,5 mg/ml konsantrasyonda çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden %0,1 Tween 80 içeren PBS (PBS-Tw) ile gerekli seyreltmeler yapılarak artan 0,2 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml, 2,0 µg/ml, 5,0 µg/ml, 10,0 µg/ml, 20,0 µg/ml 50,0 µg/ml ve 100,0 µg/ml konsantrasyonlarda bir seri çözelti elde edilmiş ve HPLC analizleri yapılmıştır. Bilinen konsantrasyonlara (x) karşı elde edilen alanlar (y) grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Aynı işlem aynı konsantrasyona sahip üç farklı stok çözelti için tekrarlanmıştır.

2.2.7. İstatiksel değerlendirme

Doğru denklemlerinin oluşturulmasında GraphPad InStat3 programı kullanılmıştır. Her bir denklem için bulunan artık kareler toplamı, artık kareler ortalaması ve kesişimin %95 güven sınırları birbirleriyle karşılaştırılarak ideal doğru denklemi belirlenmiştir. Bu ideal doğru denklemi belirlenirken artık kareler toplamı ile artık kareler ortalamasının en küçük değere sahip olması dikkate alınmıştır. Çalışmalarımızda veriler arasında anlamlı farklılıklar olup olmadığını göstermek amacıyla ise tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testine başvurulmuştur. Tek yönlü ANOVA testi için %95 güven sınırında, $p > 0,05$ için farkın önemsiz olduğu, $p < 0,05$ için farkın önemli olduğu belirlenmiştir.

2.2.7. Analitik Yöntemin Validasyonu

Analitik bir yöntemin validasyonu tasarlanan analitik yöntemin performans karakteristiğinin belirlendiği bir işlemdir. Kullanılan analitik yöntemin validasyon parametreleri olarak ICH Q2 (R1) kılavuzunda yer alan doğrusallık ve aralığı, doğruluk, kesinlik (tekrarlanabilir ve ara kesinlik), teşhis sınırları (LOD) ve tayin sınırları (LOQ) ile özgünlük incelenmiştir.

Doğrusallık ve Aralığı

Bir analitik yöntemin doğrusallığı, analiz işleminin belirlenen aralıkta numune içindeki madde konsantrasyonu ile doğru orantılı test sonuçları verebilme yeteneğidir. Analitik işlemin aralığı ise doğrusallığı sağladığı gösterilen analiz işlemi için numunede analiz edilen maddenin en düşük ve en yüksek konsantrasyonları arasındaki doğrusal aralıktır. Analitik işlemin doğrusallığı saptanırken uygun istatistiksel hesaplamalarla en küçük kareler yöntemi kullanılarak regresyon doğrusu elde edilir. Regresyon doğrusunun eğimi, korelasyon katsayısı, kesişim ve artık kareler toplamı belirlenerek lineer ilişki yorumlanır.

ETP'nin miktar tayininde kullanılmak üzere elde edilen kalibrasyonlarda doğrusallık ve aralığını bulmak amacıyla etken maddenin asetonyril içinde 0,5 mg/ml konsantrasyonda stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden uygun seyreltmeler yapılarak 0,2 µg/ml - 100 µg/ml konsantrasyon aralığında artan konsantrasyonlarda bir seri çözelti hazırlanarak HPLC ile analizleri yapılmıştır. Bilinen konsantrasyonlara (x) karşı elde edilen alanlar (y) grafiğe geçirilerek GraphPad InStat3 istatistik programı ile kalibrasyon doğrusu çizilmiş ve doğrunun parametreleri değerlendirilmiştir.

Doğruluk

Bir analitik yöntemin doğruluğu deneysel olarak elde edilen verilerin gerçek/teorik değerlerle aynılığı olarak ifade edilir. Doğruluk analitik yönteminin hatasızlığının bir ölçüsüdür. Analitik işlemin doğruluğu en az üç farklı konsantrasyon noktasında en az üçer kez hazırlanan numunedeki miktarların belirlenen konsantrasyonlardaki % geri elde değerlerinin ortalaması, bu dağılımın standart sapması ve % bağıl standart sapması hesaplanarak tayin edilmektedir.

Doğruluğu tayin etmek amacıyla etken maddenin miktar tayininde kullanılmak üzere hazırlanan kalibrasyonlarda düşük, orta ve yüksek konsantrasyon olarak belirlenen

0,5 µg/ml, 5 µg/ml ve 50 µg/ml konsantrasyonlarda ETP çözeltileri hazırlanmıştır. Okunan alan değerleri kalibrasyon doğru denkleminde yerine konularak konsantrasyon değerleri hesaplanmış buradan hareketle % geri elde ve % bağıl standart sapma (%BSS) değerleri bulunmuştur

Kesinlik

Bir analitik yöntemin kesinliği aynı homojen numunenin belirlenen şartlar altında çok sayıdaki analizlerinden elde edilen ölçüm sonuçlarının yakınlığı olarak ifade edilir. Kesinlik belirlenen işlem koşullarında yöntemin, tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve tekrar elde edilebilirlik olarak üç farklı seviyede incelenmektedir. Analitik yöntemin kesinliği ölçümlerin standart sapma ve % bağıl standart sapma (%BSS) değerleri bulunarak test edilmiştir. Bu etkilerin her birinin incelenmesinin gerekli olmadığı belirtilmiştir. Kesinliği tayin etmek amacıyla etken maddenin miktar tayininde kullanılan analitik yöntemin tekrarlanabilirliği değerlendirilmiştir.

Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik aynı koşullar altında ve kısa bir zaman aralığında yöntemin kesinliğini göstermektedir. ETP'nin miktar tayininde kullanılmak üzere yapılan kalibrasyonlarda tekrarlanabilirlik tayini amacıyla düşük, orta ve yüksek konsantrasyon olarak belirlenen 0,5 µg/ml, 5 µg/ml ve 50 µg/ml konsantrasyonlarda ETP çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan her bir çözelti arka arkaya 6 kez HPLC'de analiz edilmiştir. Elde edilen alan değerleri kalibrasyon doğrusunda yerine konularak konsantrasyon değerleri hesaplanmış, ortalama ve standart sapma değerleri elde edilmiş ve buradan %BSS değerleri bulunmuştur.

Ara kesinlik

Ara kesinlik farklı günlerde, farklı analistler ve farklı cihazlar gibi laboratuvar içi varyasyonların kesinliğini ifade eder.

Tekrar elde edilebilirlik

Tekrar elde edilebilirlik analitik yöntemin standardizasyonu amacıyla farklı laboratuvarlar arasındaki varyasyonların kesinliği ifade eder. Genellikle ortak işbirliği ile yapılan çalışmalarda kullanılır.

Teşhis ve Tayin sınırları

Bir analitik işlemin teşhis sınır (Limit of Detection-LOD) analizi yapılan örneğin kromatogramdaki pikinin ve yerinin belirlediği ama miktar tayini sınırları içerisine girmeyen en alt konsantrasyondur. Bir kaç yolla bulunabilir. Yapılan deneylerden elde edilen sonuçların kullanıldığı hesaplamalardan bulunabildiği gibi doğrudan gözlemlenerek de bulunabilir. Tayin sınırı (Limit of Quantification-LOQ) ise analizi yapılan maddenin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği, doğrusallık aralığı dışında olan veya aralığın en alt sınırını oluşturan konsantrasyon düzeyidir. Kalibrasyon eşitliğinin eğimi, standart sapmaya bölünerek elde edilen değer 3,3 ile çarpılarak LOD, aynı değer 10 ile çarpılarak LOQ hesaplanır.

Özgünlük

Özgünlük analiz yönteminin, ortamdaki diğer olası bileşenler varlığında analiz edilen maddeyi kesin olarak tayin edebilme özelliğidir. ETP'nin formülasyonlardaki olası diğer maddelerle HPLC analizinde girişim yapıp yapmadığı incelenmiştir.

2.3. Nanoyapıların Üretimi ve İncelenmesine Yönelik Çalışmalar

Membran yardımcılı nanofabrikasyon yöntemiyle silindirik nanoyapıların elde edilmesi için kalıp olarak, nanoporlu Anotlanmış Aluminyum Oksit (AAO) membran olan - Whatman Anodisc, (Anopore™) kullanılmıştır. Ön çalışmalarda yöntemin optimizasyonu esnasında aynı özellikteki 13 mm çaplı AAO membran, daha sonraki çalışmalarda üretim verimini artırmak için 47mm çaplı AAO membran tercih edilmiştir. Üretici tarafından, membranın por genişliği yaklaşık 200 nm; por boyu (membranın kalınlığı) 60 µm olarak bildirilmiştir. Nanotübüler yapıların üretimi için membran yardımcılı nanofabrikasyon yönteminde öncelikle en geçerli teknik olan, *"membranı polimer çözeltisi ile ıslatma tekniği"* kullanılarak yöntem optimize edilmeye çalışılmıştır.

Yöntemi optimize ederken formülasyonun üretimi esnasında üzerinde çalışılması gereken kritik parametreler şu şekilde belirlenmiştir:

- *Polimer ve etken maddeyi iyi çözen ortak çözücü seçimi
- *Polimer/etken madde çözeltisinin konsantrasyonu
- *Polimer/etken madde oranı
- *AAO membranın etken madde içeren polimer çözeltisiyle dolması için gereken süre
- *Etken madde içeren polimer çözeltisiyle dolan AAO membranın kuruması için gereken süre
- *Kuruyan AAO membranı çözecek olan seyreltik asit ya da bazik çözeltinin konsantrasyonu
- *Serbest polimerik nanoyapıların elde edilmesinde AAO membranın çözülmesi için gereken süre

Çalışmamızda tüm bu parametreler detaylı olarak değerlendirilmiş, üretilmesi amaçlanan yaklaşık 200 nm çaplı silindirik ve bütünlüğünü koruyan polimerik nanoyapılara ulaşmak için, bize partikül boyutu ve partikül şekliyle ilgili detaylı bilgi veren en önemli analiz görüntüleme teknikleri olmuştur. Neredeyse her formülasyon için Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ya da Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi kullanılarak görüntüleme yapılmış, boyutları ve şekil özellikleri uygun görülen formüller için etken madde yükleme etkinliğini artırmaya yönelik çalışmalara gidilmiştir. Olumlu sonuç elde edilen formülasyonlardan sonuç formülasyon belirlenmiş ve bu formülasyon üzerinde DSC analizi, FTIR analizi, Zeta potansiyeli ölçümü, etken madde salım çalışmaları ve hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır.

Tez çalışmamız görüntülemenin önemli ve yoğun olduğu bir araştırmadır. Görüntüleme aynı zamanda nanoyapıların partikül boyutu analizi için de kullanılmıştır. Tez çalışmamızdaki formülasyonlara ait tüm görüntülerin paylaşılması mümkün olmadığı için, bulgular kısmında formülasyonların ardından, bizi olumlu sonuçlara yönlendiren TEM ve SEM görüntüleri paylaşılmıştır.

2.3.1. Damlatma Yöntemiyle Nanoyapıların Üretimi ve İncelenmesi

Nanoporlu membranları ıslatma yönteminde ilk olarak *"membranı polimer çözeltisi ile ıslatma tekniği"* değerlendirilmiştir. Bu teknikte ilk irdelenen yöntem *"membranı polimer çözeltisi damlatarak ıslatma"* yöntemidir (Schlitt ve ark., 2008). Bu yöntem kısaca "damlatma" olarak adlandırılmıştır. Membranları polimer çözeltisi ile ıslatma yönteminde öncelikle çözücü seçimi, polimer çözeltisinin konsantrasyonu, membranı çözmek için kullanılacak seyreltik baz çözeltisinin konsantrasyonu ve nanoyapıları serbest hale getirmek için membranın çözülmesi süre değerlendirmeye alınmıştır. Polimer ve etken madde çözeltisi hazırlamak için gerekli olan ortak çözücünün hem polimeri hem de etken maddeyi çok iyi çözmesi gerektiği belirlenmiştir. Etken madde ve kullanılan polimerin hidrofobik özelliği göz önüne alındığında en iyi seçim organik çözücüler arasından yapılmıştır.

Etken madde yükleme aşamasına geçmeden önce ön çalışmalarda nanotübüler yapıların oluşumunu gözlemlemek amacıyla etken madde kullanılmadan polimer çözeltileri hazırlanmış ve değerlendirilmeye alınmıştır. Bunun için ilk değerlendirilen polimer Poli-ε-kaprolakton (PCL) olmuştur. PCL'nin çözücüler arasında yer alan kloroform ve aseton (Vivek ve ark., 2007) kullanılarak polimer çözeltileri, organik çözücünün uçmasını engellemek için kapaklı cam kapta manyetik karıştırıcı yardımıyla hazırlanmıştır.

Yapılan ön çalışmada kullanılan AAO membranların bir kısmı, membran nanoporlarının yüzeyini iyonik olarak aktive etmek amacıyla ultrasonik banyoda 1 dakika su ile yıkanmıştır. Diğer bir kısım AAO membran kuru olarak kullanılırken bir kısmı da polimerin çözüldüğü çözücü ile ıslatılarak kullanılmıştır. Hazırlanan PCL çözeltilerinden 100 µl alınarak cam lam üzerindeki 13 mm çaplı AAO membran üstüne damlatılmış ve oluşan ıslanmanın, membranın altına kadar geçip geçmediği gözlenmiştir. Membranların tamamen kuruması için 5 saat beklenmiştir. Ön çalışmalar için hazırlanan formülasyonların parametreleri Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Ön formülasyon çalışmalarında damlatma yöntemi kullanılarak değerlendirilen parametreler

Kod	Polimer ve Konsantrasyonu	Çözücü	AAO özelliği	Kurutma süresi	AAO çözme işlemi	AAO çözme süresi
F1	PCL %2,5	Kloroform	Su ile önceden yıkanmış	5 saat	1M NaOH	3 saat
F2	PCL % 2,5	Kloroform	Kuru membran	5 saat	1M NaOH	5 saat
F3	PCL % 5,0	Kloroform	Kloroform ile ıslatılmış	5 saat	1M NaOH	7 saat
F4	PCL % 2,5	Aseton	Aseton ile ıslatılmış	5 saat	1M NaOH	3 saat
F5	PCL % 5,0	Aseton	Kuru membran	5 saat	1M NaOH	5 saat
F6	PCL % 2,5	Aseton	Su ile önceden yıkanmış	5 saat	1M NaOH	2 saat

Konuyla ilgili yapılan çalışmalarda (Tao ve Desai, 2007) biyobozunur olmayan polimer emdirilmiş membranları çözmek için kullanılan 2M sodyum hidroksit çözeltisi (NaOH) yerine biyobozunur polimerlerle çalışıldığı için 1M NaOH (%4 a/h NaOH) kullanılarak öncelikle boş AAO membranların çözülmesi için geçen süre belirlenmiş ve yaklaşık 2 saat bulunmuştur. Yükleme işlemi sonrasında çözme işlemi, polimer yüklü AAO membranlar 1M NaOH çözeltisinde manyetik karıştırıcıda yavaş hızda (60 rpm) karıştırılarak ortamda iri parçacık gözlenmeyene kadar sürdürülmüştür bu sebeple çözme işlemi farklı sürelerde tamamlanmıştır.

Yapılan ön çalışmalarda olduğu düşünülen nanoyapıları disperse halde oldukları bazik ortamdan ayırabilmek için santrifüj işlemi (10.000 rpm, 10 dakika) uygulanmıştır. Santrifüj tüpünün alt kısımlarında sadece bulanıklık oluşmuş, üstteki süpernatant atılarak alttaki kısma yıkamak amacıyla ultrasaf su eklenerek tekrar santrifüjlenmiştir (10.000 rpm, 10 dakika). Santrifüj tüpünün üst kısmında kalan süpernatant atılmış, alttaki bulanık kısım alınmış bu dispersiyondan analizler yapılmıştır.

Ön çalışmalarımızda formülasyonlar değerlendirilirken, oluşan nanoyapıların incelenmesinde başvuru ilk analiz TEM görüntüleme olmuştur. TEM görüntüleme için ilk etapta daha homojen görünen F4 ve F5 formülasyonları seçilmiştir. Bu formülasyonlar 15 dakika ultrasonik banyoda çalkalanarak görüntüleme için hazır hale getirilmiştir. Sonike edilen formülasyonlardan 10-15 µl kadar alınıp TEM için özel karbon gridlere damlatılıp kurumaya bırakılmıştır. Yeterli kuruma sağlanınca gridler, cihazın kapalı sistemine yerleştirilmiş ve elektronların serbestçe hareket edebileceği yüksek vakum altında görüntüleme gerçekleştirilmiştir.

TEM görüntüleme için seçilen diğer F2 ve F6 formülasyonlarına nanoyapılara zarar verebileceği düşüncesiyle ultrasonikasyon uygulanmadığı için parçacıklar üst üste yapışarak görüntülemeyi imkansız hale getirmişlerdir. Bu sebeple TEM görüntülemesinden önce formülasyonlara ultrasonikasyon uygulanması gerektiği anlaşılmıştır.

TEM görüntülemelerinden elde edilen olumlu sonuçlar nedeniyle ve formülasyonların hazırlanmasında polimer çözeltileri elde edilirken ufak konsantrasyon farklılıklarının bile polimer çözeltisinin nanoporlara sürüklenmesine etki ettiği gözlemlendiği için ön çalışmalar da dahil tüm formülasyonlarda etken madde kullanılmasına karar verilmiştir. Damlatma yöntemiyle çalışmalara devam edilirken, tez çalışmasında kullandığımız etken madde olan ETP henüz elimize ulaşmamış olduğu için ön deneme amacıyla elimizdeki başka bir ilaç model etken madde olarak kullanılmıştır. Ön çalışmalara kısa bir süre, hidrofobik olması ve çeşitli pH koşullarına dayanıklı olması sebebiyle, 4-florokinolon grubu antibakteriyel ajanlardan, “ofloksasin” model etken madde (mEM) olarak kullanılarak devam edilmiştir.

2.3.2. Eritme Yöntemiyle Nanoyapıların Üretimi ve İncelenmesi

Membranı polimer çözeltisi ile ıslatmanın yanı sıra, polimer eriyiği ile ıslatma yönteminin (Dougherty ve Liang, 2009) değerlendirilmesi amacıyla polimer çözeltilerinden ince film dökülerek ön çalışmalara devam edilmiştir. Bir karşılaştırma yapabilmek amacıyla damlatma yönteminde olumlu kabul edilen formülasyon parametrelerinden yola çıkılmış, aynı polimer konsantrasyonu ve aynı polimer/etken madde oranlarıyla polimer çözeltileri hazırlanarak etken madde içeren polimer filmleri oluşturulmuştur. Filmler, farklı miktarlarda polimer çözeltileri kullanılarak kalınlıkları AAO membranın kalınlığı yani nanoporların boyuna yakın kalınlıkta (50-60 μm) olacak şekilde ayarlanarak düzgün yüzeylerde ve oda sıcaklığında (25°C) kurutularak hazırlanmıştır.

Hem damlatma hem eritme yönteminde aynı oranda etken madde yüklemesinin nanoyapıların oluşumundaki etkisini gözlemlemek amacıyla, seyreltik ve derişik olarak iki farklı polimer/etken madde oranı kullanılmıştır. Seyreltik konsantrasyonda polimer/etken madde oranı; 20:1, derişik çözeltilerde polimer/etken madde oranı ise 10:1 olarak belirlenmiştir. Etken madde kullanılarak hazırlanan formülasyonların bileşimi Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Model etken madde yüklenerek damlatma ve eritme yönteminin karşılaştırıldığı formülasyonlar

Kod	Yöntem	Çözücü	Polimer ve konsantrasyonu	Polimer/mEM oranı	AAO çözme işlemi	AAO çözme süresi
D1	Damlatma	DCM	PCL % 2,5	20:1	1M NaOH	3 saat
D2	Damlatma	DCM	PCL % 2,5	10:1	1M NaOH	3 saat
D3	Eritme	DCM	PCL % 2,5	20:1	1M NaOH	4 saat
D4	Eritme	DCM	PCL % 2,5	10:1	1M NaOH	4 saat

İlk yöntem olan damlatma yönteminde (D1 ve D2) etken madde ve PCL aynı çözücüde Çizelge 2.2'deki oranlarda karıştırılarak çözülmüştür. Etken maddenin yüklenebilirliğini gözlemlemek amacıyla birbirinden farklı konsantrasyonda çözeltiler hazırlanırken, öncelikle PCL % 2,5 konsantrasyonda DCM'de çözülmüş sonrasında etken madde polimere göre 20:1 ve 10:1 oranlarında çözeltiye eklenmiştir. Bu çözeltiden 100 µl alınarak 13 mm AAO membran yüzeyine bir mikroskop camı üzerinde damlatılmış, membran çözeltiyi emdikten sonra, çözücünün tamamen uçması için oda sıcaklığında 5 saat bekletilmiştir. Tamamen kuruduktan sonra AAO membran, 1M NaOH çözeltisinde çözülerek eritilmiş, nanoyapılar santrifüjlenerek (20.000 rpm, 20 dakika) çöktürülmüş ve ultrasaf su ile tekrar aynı koşullarda santrifüjlenerek yıkanmıştır.

İkinci yöntem olan eritme yönteminde, PCL ve etken madde Çizelge 2.2'de gösterilen oranlarda ortak çözücüde (DCM) çözülmüş ve film dökülmüştür. Oda sıcaklığında (25°C) kurutulan filmlerin kalınlıkları dört farklı noktadan ölçülerek yaklaşık 50µm kalınlığında elde edildiği belirlenmiş, elde edilen filmler, AAO membranın çapı genişliğinde (13mm) daireler halinde kesilmiştir. Isıtıcı üzerine düzgün yüzeyli metal bir parça oturtularak PCL'nin erime sıcaklığının (60°C) üstünde bir sıcaklık olan 80°C'ye ısıtılmış ve AAO membran da bu metal parça üzerine yerleştirilmiştir. Çapı 13 mm olan bir daire olarak kesilen etken madde yüklü polimer film AAO mebranın tam üzerine denk gelecek şekilde yerleştirilmiş ve

erimesi beklenmiştir. Polimer eriyiğinin porların içine girdiği düşünüldüğünde metal parça ısıtıcıdan alınmış ve soğutulmuştur. Eriyiği içeren membran yine 1M NaOH'da çözülerek eritilmiş ve oluştuğu düşünülen nanoyapılar aynı koşullarda santrifüjlenerek (20.000 rpm, 20 dakika) toplanmıştır.

Çalışmanın devamında asıl etken madde olan ETP formülasyonlara yüklenmesini gözlemek amacıyla yine polimer olarak PCL ve çözücü olarak DCM kullanılarak, damlatma ve eritme yöntemleriyle, aynı şekilde ve Çizelge 2.3'de belirtilen parametrelerle formülasyonlar hazırlanmıştır.

Çizelge 2.3. Damlatma ve eritme yöntemiyle ETP yüklenerek elde edilen formülasyonlar

Kod	Yöntem	Çözücü	Polimer ve Konsantrasyonu	Polimer/ ETP oranı	AAO çözme işlemi	AAO çözme
E1	Damlatma	DCM	PCL % 2,5	10:1	0,5M NaOH	5 saat
E2	Eritme	DCM	PCL % 2,5	10:1	0,5M NaOH	6 saat

ETP yüklenerek hazırlanan formülasyonlarda AAO membranı çözme işlemi 1M NaOH yerine 0,5M NaOH'da gerçekleştirilmiş ve bu durum AAO membranı çözme süresini uzatmıştır. PCL kullanılarak hazırlanan bu grup formülasyonlarda elde edilen nanoyapıların miktarı çok az da olsa, kurutulduktan sonra etken madde tayini amacıyla DCM ile çözülmeye çalışılmış ancak saatler süren karıştırma sonrasında bile nanoyapıların çözülmesi gerçekleşmemiştir. Bu durum NaOH varlığında PCL'nin yapısında bir değişim oluştuğu düşüncesine götürmüştür. Gerekli araştırmalar yapılarak NaOH'ın PCL üzerindeki etkisi hakkında sonuca ulaşılmış ve tartışma kısmında Bölüm 4.2.2'de detaylı olarak paylaşılmıştır. NaOH'ın etkileri nedeniyle bundan sonraki çalışmalarda, biyobozunur polimerlerle hazırlanan formülasyonlar için AAO membranı çözme işlemi seyreltik fosforik asit çözeltisinde gerçekleştirilmiştir.

2.3.3. Daldırma Yöntemiyle Nanoyapıların Üretimi ve İncelenmesi

Yöntemin optimize edilmesi sırasında en önemli parametrelerden birini etken maddenin nanoyapılara yüklenmesi oluşturmaktadır. Bu sebeple hem nanoyapıları daha yüksek verimle elde etmek hem de etken maddenin yükleme kapasitesini artırmak için çalışmalar yapılmıştır. Polimer çözeltisinin, AAO membranın porlarına daha etken ve homojen dolumunu sağlamak amacıyla yeni bir teknik denenmiştir (Kokonou ve ark., 2013). Ağzı sıkıca kapalı bir kapta yeterli miktar polimer çözeltisine AAO membranı tamamen daldırılarak gerçekleştirilen bu yöntem “daldırma” olarak adlandırılmıştır. Çalışmanın bu aşamasından itibaren üretim verimini artırmak amacıyla 13mm çaplı AAO membranlar yerine 47 mm çaplı AAO membranlar kullanılmaya başlanmıştır. Bu kırılğan yapı 47 mm çaplı AAO membranları polimer çözeltisine bütün olarak batırabilmek için, ağız kısmı 55 mm, taban kısmı ise çözeltinin homojen yayılabilmesi için düz ve 65 mm olan kapaklı özel cam kaplar ürettirilmiştir.

Biyobozunur polimerlerden PCL ile yapılmış olan ön çalışmalarda, polimerin hassas yapısı gereği, değerlendirmekte olduğumuz formülasyon parametrelerinin, özellikle etken madde yüklenmesine ait sonuçların net olarak belirlenemediği düşünülmüş, yöntemin optimizasyonu açısından başka polimerler ile çalışılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Bu bağlamda formülasyon parametrelerinin sonuçlarını daha net gözlemlemek amacıyla yine biyouygun olan ancak yapısal olarak daha dayanıklı ve bu yöntemle işlenebilirliği daha kolay olan polimerlerden poli (metil metakrilat, PMMA) (Martin ve Mijangos, 2009), farklı molekül ağırlıkları ile değerlendirilerek çalışmamıza dahil edilmiştir.

Çalışmalara ilk olarak PMMA'nın yüksek molekül ağırlıklı (PMMA-996, Mw: 996kDa) ile devam edilmiş ve %2 PMMA-996 konsantrasyonunda formüllerin hazırlanması uygun bulunmuştur. Çözücü olarak diklorometan ve aseton kullanılmış, bazı formüllerde çözelti hazırlanırken, polaritesi nedeniyle AAO'nun iyonik yapısıyla etkileştiği belirtilen ayrıca ETP'nin en iyi çözücülerinden biri olan dimetil formamid (DMF) çözücü sistemine eklenerek polimerin nanoporlarda sürüklenmesine etkisi

incelenmiştir. Bu grup formülasyonlarda başlangıç için 3 saat daldırma süresi uygulanmıştır. DMF daha az uçucu bir çözücü olduğu için AAO membranları kurutma süresi uzatılmıştır.

Daldırma yöntemiyle formülasyonlar hazırlanırken dikkat edilen en önemli noktalardan birisi, AAO membran belli süre polimer çözeltisinde bekletildikten sonra, kurutmaya geçmeden önce alt ve üst yüzeyde biriken polimer çözeltisinin temizlenmesi olmuştur. Konuyla ilgili çalışmalarda kullanılan özel dokulu toz bırakmayan laboratuvar mendilleri (Kimweps, KIMTECH Science) DCM ile ıslatılıp membranın üstü bastırılmadan yüzeyden silinmiş (Huang ve ark., 2013) ve böylelikle polimer tabakası kuruyup yapışmadan nanoyapıların, AAO çözünmesi esnasında serbestçe elde edilmesi sağlanmıştır. Membranı çözdükten sonra nanoyapılar ultrasantrifüj ile (40.000rpm, 30 dakika) ile toplanmış, ultrasaf su ile aynı koşullarda santrifüjlenerek 3 kez yıkanmış ve -40°C dondurulup, 48 saat süreyle liyofilize edilmiştir.

Çizelge 2.4. Daldırma yöntemiyle hazırlanan C1A-C4A ve C1B-C4B kodlu formülasyonlar

Kod	Polimer ve Konsantrasyonu	Çözücü sistemi (ml)	Polimer/ETP oranı	Kurutma süresi (25°C)	AAO çözme işlemi
C1A	PMMA-996 %2	DCM (5,0)	(10:1)	15 saat	%10 H ₃ PO ₄
C2A	PMMA-996 %2	DCM:DMF (4,5:0,5)	(10:1)	15 saat	%10 H ₃ PO ₄
C3A	PMMA-996 %2	Aseton (5,0)	(10:1)	15 saat	%10 H ₃ PO ₄
C4A	PMMA-996 %2	Aseton:DMF (4,5:0,5)	(10:1)	15 saat	%10 H ₃ PO ₄
C1B	PMMA-996 %2	DCM (5,0)	(10:2)	15 saat	%10 H ₃ PO ₄
C2B	PMMA-996 %2	DCM:DMF (4,5:0,5)	(10:2)	15 saat	%10 H ₃ PO ₄
C3B	PMMA-996 %2	Aseton (5,0)	(10:2)	15 saat	%10 H ₃ PO ₄
C4B	PMMA-996 %2	Aseton:DMF (4,5:0,5)	(10:2)	15 saat	%10 H ₃ PO ₄

2.3.3.1. Nanoyapılarda Etkin Madde Yükleme Etkinliği ve Yükleme Kapasitesinin Tayini

AAO membranı polimer çözeltisiyle doldurmak için kullanılan daldırma yöntemiyle üretim verimi artmış ve liyofilizasyon sonrası etken madde yükleme etkinliği tayini yapmak için yeterli miktar toz elde edilebilmiştir. Hazırlanan nanotübüler yapılarıdaki etken madde miktar tayini için belli miktar liyofilize toz belli miktar diklorometan (DCM) ile çözülmüştür. Elde edilen çözelti metanol eklenerek 5 dakika karıştırılmış nanotübüler yapılara yüklenen etken madde metanole alınmış ve ETP miktarı HPLC’de tayin edilmiştir.

Nanoyapıların etken madde yükleme etkinliği (YE) hesaplanırken, Denklem 2.1’de gösterildiği şekilde; miktar tayini için tartılan liyofilize tozun, baştaki polimer/etken madde oranına göre teorik etken madde miktarı bulunmuş ve HPLC analizinden elde edilen etken madde miktarı ile oranlanarak 100 ile çarpılmıştır. Nanoyapıların etken madde yükleme kapasitesi (YK) hesaplanırken ise, Denklem 2.2’de gösterildiği şekilde; HPLC analizinden elde edilen etken madde miktarı, miktar tayini için tartılan liyofilize tozun toplam miktarına oranlanarak 100 ile çarpılmıştır.

$$\text{Yükleme Etkinliği (\%YE)} = (A/B) \times 100 \quad (\text{Denklem 2.1})$$

$$\text{Yükleme Kapasitesi (\%YK)} = (A/C) \times 100 \quad (\text{Denklem 2.2})$$

A: Nanoyapılara yüklenen etken madde miktarı

B: Formülasyondaki teorik etken madde miktarı

C: Tartılan nanopartikül miktarı

2.3.3.2. Etken Madde Yükleme Etkinliğini Artırma Çalışmaları

Daldırma yöntemiyle elde edilen formülasyonlarda etken madde yükleme etkinliğini artırabilmek için öncelikli olarak, formülasyona eklenen etken madde miktarı artırılmıştır. Formülasyonlardaki polimer/etken madde oranları (10:1, 10:2, 10:3, 10:3,5) değiştirilerek yükleme etkinliği artırılmaya çalışılmıştır. Çalışmalara yine PMMA-996 ve biyobozunur polimerden PCL ile devam edilmiştir. Bu iki polimer için nanoporları doldurması açısından uygun olan %2 polimer konsantrasyonu sabit tutulmuş ancak çözücü sistemi hacmen değiştirilerek formüller hazırlanmıştır.

Ayrıca polimer çözeltisi hazırlarken, etken maddenin ortamdaki çözünürlüğünü artırmak amacıyla olan ETP'nin iyi çözünürlük gösterdiği DMF yerine yine ETP'nin çok iyi çözünürlük gösterdiği dimetil sülfoksitten (DMSO) faydalanılmasına karar verilmiştir. DMSO ilave edilen formülasyonlarda etken maddenin gözle görülür şekilde daha hızlı çözüldüğü ve daha berrak çözeltiler elde edildiği kaydedilmiştir. Daldırma yönteminde AAO membranın etken madde içeren polimer çözeltisiyle dolması için gereken sürenin etkisini de gözlemlemek amacıyla tüm formülasyonlar için bu süre 5 saat olarak ayarlanmıştır. Daha sonra çözücülerin tam olarak uçması için membranlar 1 gece boyunca 15 saat kurumaya bırakılmıştır.

Bu grup formülasyonlarda, kritik parametrelerden biri olan, polimer yüklü AAO membranı çözmek için kullanılan fosforik asit (H_3PO_4) konsantrasyonu %10'dan, %8'e düşürülmüş, H_3PO_4 konsantrasyonunun düşürülmesinin de formülasyonların üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ayrıca AAO membranı etken madde yüklü polimer çözeltisine daldırma süresinin 3 saatten 5 saate çıkarılmış olması da irdelenen formülasyon parametrelerinden birisi olmuştur. Hem PPMA-996 ve hem PCL polimeri kullanarak elde edilen formülasyonlarda belirlenen işlem parametreleri Çizelge 2.5'teki gibi ayarlanmıştır.

Çizelge 2.5. Daldırma yöntemiyle artan ETP konsantrasyonlarıyla hazırlanan A1-A12 kodlu formülasyonlar

Kod	Polimer ve Konsantrasyonu	Çözücü sistemi (ml)	Polimer/ETP oranı	Daldırma süresi	AAO çözme işlemi
A1	PMMA-996 %2	DCM (7,0)	10:1	5 saat	%8 H_3PO_4
A2	PMMA-996 %2	DCM (7,0)	10:2	5 saat	%8 H_3PO_4
A3	PMMA-996 %2	DCM (7,0)	10:3	5 saat	%8 H_3PO_4
A4	PMMA-996 %2	DCM (7,0)	10:3,5	5 saat	%8 H_3PO_4
A5	PCL %2	DCM (7,0)	10:1	5 saat	%8 H_3PO_4
A6	PCL %2	DCM (7,0)	10:2	5 saat	%8 H_3PO_4
A7	PCL %2	DCM (7,0)	10:3	5 saat	%8 H_3PO_4
A8	PCL %2	DCM (7,0)	10:3,5	5 saat	%8 H_3PO_4
A9	PMMA-996 %2	DCM:DMSO (6:1)	10:4	5 saat	%8 H_3PO_4
A10	PMMA-996 %2	DCM:DMSO (6,5:0,5)	10:4	5 saat	%8 H_3PO_4
A11	PCL %2	DCM:DMSO (6:1)	10:4	5 saat	%8 H_3PO_4
A12	PCL %2	DCM:DMSO (6,5:0,5)	10:4	5 saat	%8 H_3PO_4

2.3.4. Vakum Yöntemiyle Nanoyapıların Üretimi ve İncelenmesi

Yöntemi geliştirmek için farklı alternatifler aranırken vakumla filtrasyon yöntemiyle AAO membrana polimer yüklemesi çalışmaları incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda (Martin and Mijangos, 2009) klasik filtrasyon yöntemiyle nanoporlu membran, filtrasyon düzeneğinin üstüne yerleştirilip, üstten polimer çözeltisi dökülüp alttan vakum uygulanarak yüksek verimle polimerik nanofiberler elde edildiği söylenmiştir.

Vakumla filtrasyon yöntemi modifiye edilerek çalışmamıza uygun hale getirilmek için literatürlerde yer almayan yeni bir teknik denenmiştir. AAO membran polimer çözeltisi içine daldırılmış haldeyken vakumlu desikatöre yerleştirilmiş ve desikatörün kapağı sıkıca kapatılarak kuvvetli bir vakum pompası (Millipore) yardımıyla -80 kPa vakum uygulanmıştır. Bu şekilde ortamdaki ve membranın porlarındaki tüm hava boşaltılarak atmosfer basıncı ortadan kaldırılmış ve 1 dakika beklenmiştir. Vakum kapatılıp desikatör içine tekrar hava verildiğinde basıncı dengeye getirmek için membranın porlarına hızlıca hava dolarken aynı zamanda etken madde taşıyan polimer çözeltisini de hızlıca porlara çekmiş ve sistem dengeye gelmiştir.

AAO membranın boyu kadar olan tüm porlara sıvı iletiminin hızlı olarak sağlanması için geliştirdiğimiz bu yöntemle öncelikli olarak farklı molekül ağırlıklı PMMA polimeriyle farklı formülasyonlar denenmiştir. Bu arada PMMA içeren formülasyonlarda AAO çözme işlemi için 0,25M NaOH (%1 NaOH) etkisiyle %6 H₃PO₄ etkisi de karşılaştırılmıştır. Kendi geliştirdiğimiz bu yöntem AAO membranın nanoporlarının polimer çözeltisiyle çok kısa sürede dolmasını sağlayarak işlem süresini önemli ölçüde kısalttığı için çok değerlidir.

Çizelge 2.6. Modifiye vakum filtrasyonu yöntemiyle elde edilen formülasyonlar

Kod	Polimer ve konsantrasyonu	Çözücü sistemi (ml)	Polimer/ETP oranı	AAO çözme işlemi	AAO çözme süresi
V1	PMMA-350 %2	DCM (7,0)	(10:2)	0,25M NaOH	5 saat
V2	PMMA-350 %2	DCM (7,0)	(10:2)	%6 H ₃ PO ₄	8 saat
V3	PMMA-996 %2	DCM (7,0)	(10:2)	0,25M NaOH	5 saat
V4	PMMA-996 %2	DCM (7,0)	(10:2)	%6 H ₃ PO ₄	8 saat

Bu formülasyonlar için etken madde yükleme etkinliği tayini yapılırken gözden kaçan çok önemli bir nokta dikkati çekmiştir. Çalışmalar esnasında nanotübüler yapılar, polimerin parçalanıp etken maddenin açığa çıkması için önce DCM ile çözülmüş daha sonra üstüne metanol eklenerek etken madde organik fazdan çekilirken, metanol ile karıştırılma süresi 5 dakika olarak ayarlanmıştır. Ancak etken madde yükleme kapasitesinin düşük olmasının nedenleri araştırılırken metanolle karıştırma süresi 5 dakikadan 30 dakikaya çıkarılan tayinlerde etken madde yükleme kapasitesinin önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. Bu ümit verici gelişme dolayısıyla etken madde yükleme etkinliği olumlu sonuç veren özellikle biyobozunur polimerlerle elde edilen formülasyonlar tekrar değerlendirmeye alınmış ve bundan sonraki çalışmalarda etken madde miktar tayininde metanolle karıştırma yaparken daha uzun süre karıştırılmasına dikkat edilmiştir.

Çalışmanın bu aşamadan sonraki kısmında liyofilizasyon sonrası elde edilen nanoyapılarda daha geniş alan görüntülemenin hem formülasyonun geneli açısından daha çok fikir vereceği hem de zaman ve mali yük açısından fayda sağlayacağı öngörülerek TEM görüntüleme yerine taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleme tekniğine başvurulmuştur. Sonuç formülasyona ulaşıldığında nanoyapının detaylı analizine ihtiyaç duyulduğu zaman TEM görüntüleme yapılmasına karar verilmiştir. Ayrıca kullanılan AAO membranlar da por yapısını detaylı görmek amacıyla SEM ile analiz edilmiştir.

2.3.5. Seçilen Daldırma Yöntemiyle Yeni Formülasyonların Üretimi ve İncelenmesi

Çalışmalarımızda membranı ıslatma işlemlerinde kullandığımız damlatma, eritme, daldırma ve vakum uygulama yöntemleri arasında üretilen nanoyapıların miktarına bakılarak en iyi üretim verimi ve en yüksek etken madde yükleme kapasitesi elde edilen yöntem "daldırma" yöntemi olmuştur. TEM görüntülerinden elde edilen bulgulara göre de daldırma yöntemiyle elde edilen nanoyapıların şekil ve bütünlük

olarak en uygun olduğu bulunmuştur. Bu sebeple bundan sonraki çalışmalarımıza daldırma yöntemi kullanılarak devam edilmiştir.

Daldırma yöntemiyle elde ettiğimiz yeni grup formülasyonlarda, PMMA polimerleriyle, polimer/ETP, 10:3 oranıyla hazırlanan formüller için daldırma süresinin etkisi 24 saat, 10 saat ve 4 saat olarak incelenmiştir (Çizelge 2.7). Ayrıca polimerin molekül ağırlığının etkisini net bir şekilde gözlemek amacıyla PMMA-350 ve PMMA-996 ile elde edilen çözeltilerde DMF'in etkisi de yeniden değerlendirilmiştir.

Çizelge 2.7. Daldırma yöntemiyle elde edilen Y1-Y6 kodlu formülasyonlara ait parametreler

Kod	Polimer ve Konsantrasyonu	Çözücü sistemi (ml)	Polimer/ETP oranı	Daldırma süresi	AAO çözme işlemi	AAO çözme süresi
Y1	PMMA-350 %2	DCM:DMF (6.0:0,5)	10:3	24 saat	%8 H ₃ PO ₄	6 saat
Y2	PMMA-996 %2	DCM:DMF (6.0:0,5)	10:3	24 saat	%8 H ₃ PO ₄	6 saat
Y3	PMMA-350 %2	DCM:DMF (6.0:0,5)	10:3	10 saat	%8 H ₃ PO ₄	6 saat
Y4	PMMA-996 %2	DCM:DMF (6.0:0,5)	10:3	10 saat	%8 H ₃ PO ₄	6 saat
Y5	PMMA-350 %2	DCM:DMF (6.0:0,5)	10:3	4 saat	%8 H ₃ PO ₄	6 saat
Y6	PMMA-996 %2	DCM:DMF (6.0:0,5)	10:3	4 saat	%8 H ₃ PO ₄	6 saat

2.3.5.1. Nanoyapıların Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS) Analizi

Enerji Dağılımlı X-ışınları Spektroskopisi olarak tanımlayabileceğimiz EDS genel olarak numunenin elementel analizi için kullanılan bir yöntemidir. Herhangi bir numune üzerindeki bir alanda elementel kompozisyonu tanımlamak için kullanılmaktadır. SEM yapısına adapte edilen EDS analizi, örnek üzerine taramalı bir elektron demeti düşürülerek gerçekleştirilir. Bu elektronların bazıları numune

içindeki elektronlar ile çarpışarak elektronların yörüngelerinden çıkması sağlanır. Boşalan pozisyonlar X-ışınları yayan yüksek enerjili elektron tarafından doldurulur. Numuneden yayılan X-ışınları yarı iletken dedektör tarafından analiz edilerek, numunenin elementel kompozisyonu yani hangi elementleri içerdiği tespit edilebilmektedir. EDS atom numarası 4'ten büyük olan elementler için nitel (kalitatif) analiz özelliğine sahiptir. EDS analizi çalışmamızda elde edilen nanoyapılarda inorganik alüminyum artığı kalıp kalmadığının tespiti için kullanılmıştır.

2.3.5.2. AAO Membranı Soğukta Çözme Tekniğinin Geliştirilmesi

Bu aşamadan sonra elde edilen nanoyapıların birbiriyle girişim yapmaması ve etken madde yükleme etkinliği artırılarak serbest nanotübüler yapıların elde edilmesine yönelik çalışmalara başlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak işlemlerde ilk yapılan değişiklik nanoyapıların ultrasantrifüjle toplanması ve 3 kez ardarda yıkanması yerine filtrasyon düzeneği yardımıyla 50 nm porlu Polikarbonat (Nucleopore, Whatman) filtrelerle toplamak ve bu şekilde yıkamak olmuştur. Bu noktada AAO membran çözünürken uyguladığımız karıştırma işleminin ve ortam sıcaklığının nanoyapıların serbest hale geçmesi üzerindeki etkisinin incelenmesine dolayısıyla çözünme ortamı sıcaklığının 10-15°C olarak ayarlanmasına karar verilmiştir.

Çizelge 2.8. AAO membranı soğukta çözme tekniğiyle elde edilen formülasyonlar

Kod	Polimer ve Konsantrasyonu	Çözücü sistemi (ml)	Polimer/ETP oranı	Daldırma süresi	AAO çözme işlemi	AAO çözme süresi
S1	PCL %3	DCM:DMF (5,0:1,0)	10:2	8 saat	%7 H ₃ PO ₄	6 saat
S2	ePLGA %4	DCM:DMF (5,0:1,0)	10:2	8 saat	%7 H ₃ PO ₄	6 saat
S3	P(LCG) %4	DCM:DMF (5,0:1,0)	10:2	8 saat	%7 H ₃ PO ₄	6 saat
S4	PMMA:P(HEMA) (3:1) %4	DCM:DMF (5,0:1,0)	10:2	8 saat	%7 H ₃ PO ₄	6 saat

Çalışmaya yeniden biyobozunur polimerlerle devam edilmiş, bir de polimer kompozisyonu denenmeye karar verilmiştir. Çizelge 2.8'de görüldüğü gibi yine ilk olarak PCL değerlendirmeye alınmıştır. Daha sonra poli(laktik-ko-kaprolakton-ko-glikolik asit), (P(LCG)) ve poli(laktid-ko-glikolid) yani PLGA'nın ester uçlu türevi (ester terminated) çalışmaya dahil edilmiştir. Ayrıca akrilatların suyla şişip çok iyi hidrojel oluşumu gösteren bir türevi olan poli (hidroksietil metakrilat) P(HEMA) ise PMMA-350 ile 1:3 oranında karıştırılarak S4 formülasyonu elde edilmiştir. AAO membranları çözme süresi de %7 H₃PO₄ içinde 7 saat olarak ayarlanmıştır. Böylelikle formülasyonun üretimi esnasında üzerinde çalışılan, polimer/ETP oranı, AAO membranın çözöldüğü H₃PO₄ çözeltisinin konsantrasyonu ve AAO membranın çöölmesi için gereken süre gibi kritik parametreler, Çizelge 2.8'de veriliğı şekilde son halini almıştır.

2.3.5.3. AAO membranı Soğukta Çözme Tekniğıyle Elde Edilen Nanoyapılarda Üretim Veriminin Belirlenmesi

Üretim veriminin belirlenmesi için işlemin başında kullanılan AAO membranlar kuru olarak tartılmıştır. Etken madde içeren polimer çözeltisiyle dolum gerçekleştikten sonra AAO membranlar kurutulup tekrar tartılmıştır. Bu ikisi arasındaki fark alınarak AAO membranın hapsettiğı toplam madde miktarı bulunmuştur. AAO membran çöölüp nanotüböler yapılar liyofilize edildikten sonra elde edilen toz ürün tartılmış ve Denklem 3.1 kullanılarak % üretim verimi hesaplanmıştır.

$$\text{Üretim verimi (\% ÜV)} = [(A / (B - C)) \times 100 \quad (\text{Denklem 3.1})$$

A: Liyofilizasyondan sonra elde edilen kuru toz ağırlığı

B: Polimer/Etken madde çözeltisiyle dolup kurutulan AAO membranın ağırlığı

C: AAO membranın işlem başındaki kuru ağırlığı

2.3.6. Sonuç Formülasyon Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Sonuç açısından en iyi olduğu düşünülen S2 formülasyonundan elde edilen nanoyapılar için, üretim tekrarlanabilirliğinin tayini, zeta potansiyeli tayini, formülasyonun FTIR Analizi ve DSC Analizi, ayrıca etken madde salım çalışması yapılmış, daha sonra hücre kültürü çalışmalarına geçilmiş ve hücrel alım çalışmalarıyla kanser hücreleri üzerinde sitotoksisite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

2.3.6.1. Sonuç Formülasyonun Üretim Tekrarlanabilirliğinin Tayini

Çalışmalara sonuç formülü olarak belirlenen S2 formülünün tekrar edilmesi ve karakterizasyon sonuçlarının tekrar analiz edilmesiyle devam edilmiştir. S2 formülü ile etken maddesiz boş formül hazırlanmış ve hem ETP yüklü hem etken maddesiz formülasyonun SEM görüntüleri tekrar çekilmiş ve detaylı olarak incelenmiştir. Daha sonra formülasyon yapısının detaylı analizi için TEM görüntüleri de çekilmiş ve incelenmiştir. Formülasyonun etken madde yükleme etkinliği ve üretim verimi bulunmuş ve yapılması düşünülen diğer analizlere geçilmiştir.

2.3.6.2. Sonuç Formülasyonun Zeta Potansiyel Analizi

Sonuç formülasyon olan S2 için, ETP yüklü ve etken maddesiz boş nanotübüler partiküllerin dispersiyon halindeki stabilitelerini yorumlamak amacıyla Zeta potansiyelleri (Zetasizer, Malvern Ins.) hem liyofilizasyondan önce hem liyofilizasyondan sonra tayin edilmiştir. Partiküllerin yüzey yüklerini ölçebilmek için partiküller her ölçümde aynı oranda seyreltilmişlerdir. Sonuçlar bulgular bölümünde paylaşılmıştır.

2.3.6.3. Sonuç Formülasyonun FTIR Analizi

Fourier Transform Infrared (FTIR) cihazı yapısında bulunan elmas kristali ile potasyum bromür kullanımına ihtiyaç kalmadan örneklerin FTIR spektrumlarının alınmasına imkan vermektedir. Nanotübüler partiküller doğrudan toz olarak cihazın özel elmas kristali olan bölmesine yerleştirilip, PLGA polimeri ise toz edilemediği için DCM ile film halinde hazırlandıktan sonra $400-4000\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında FTIR spekturumu alınmıştır.

2.3.6.4. Sonuç Formülasyonun DSC Analizi

Diferansiyel taramalı kalorimetre kullanılarak nanotübüler partiküllerin ve ayrıca ePLGA polimerinin termal analizleri yapılmıştır. 2,5 mg formülasyon ve ayrıca 5 mg ePLGA polimeri tartılarak alüminyum panlar içine konulmuş ve preslenerek kapatıldıktan sonra cihaza yerleştirilmiştir. Çalışmada, 1 atm basınçtaki azot gazı (50ml/dakika) altında, 20-300 °C sıcaklık aralığında 10°C/dakika ısıtma hızında sıcaklık artırılarak termogramlar elde edilmiştir.

2.3.6.5. Sonuç Formülasyonun Etken Madde Salım Çalışması

Etken madde yükleme etkinliği ve üretim verimi en iyi bulunan S2 formülasyonundan *in vitro* etken madde salım çalışması yapılmıştır. ETP'nin klinikte uygulama dozu 0,2mg/ml olduğu için elde edilen liyofilize nanoyapılar 0,2 mg ETP içerecek şekilde tartılıp 2 ml çözünme ortamı ile 1 dakika ultrasonik banyoda disperse edilerek diyaliz membrana (Sigma-Aldrich, 12000Da MWCO) yerleştirilmiştir. Membranlar kapaklı cam kaplarda bulunan 100ml pH 7,4 PBS-Tw ortamına koyulmuş, sıcaklığı $37\pm0,5^{\circ}\text{C}$ olan yatay çalkalayıcılı su banyosunda 100rpm çalkalama hızında *in vitro* etken madde salımı gerçekleştirilmiştir. Ortamlardan belli zaman aralıklarında 1 ml numune çekilmiş, eşit hacimde ve aynı

sıcaklıkta taze salım ortamı kaplara ilave edilmiştir. Alınan numuneler HPLC'de tayin edilerek ETP miktarları belirlenmiştir.

2.3.7. Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmanın bu aşamasında, hazırlanmış olan nanotübüler yapıların kanser hücreleri içine girip girmediğinin belirlenmesi hedeflenmiş ve bu amaçla İnsan Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Hücresi (A549) ve İnsan Meme Kanseri Hücresi (MCF-7) seçilerek iki farklı kanser hücre dizisinde çalışılmıştır.

Rutin İşlemler:

Hücreler, üretici firmaların bildirdiği şekilde ekilmiş ve tüm çalışmalar süresince aşağıdaki koşullarda üretilmiş ve çoğaltılmıştır. Kültür besi yeri olarak yüksek konsantrasyonda (4,5mM) glukoz, 2 mM L-glutamin, %10 fetal sıgır serumu ve %1 penisilin/streptomisin (10.000U.ml^{-1} penisilin / $10.000\mu\text{g.ml}^{-1}$ streptomisin) içeren DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) kullanılmıştır.

Çoğaltma ve yeniden ekim:

Hücreler, yapışık hücreler için işlem görmüş, 25 cm^2 'lik kültür kaplarında çoğaltılmıştır. Hücreler yüzeyin %80'ini kapladıklarında kültür ortamı uzaklaştırılmış ve % 0.05 tripsin / % 0.025 EDTA çözeltisi ile 2 kez yıkanmıştır. Yıkama çözeltisinin de uzaklaştırılmasından sonra hücreler 37°C 'lik CO_2 inkübatöründe $5 (\pm 2)$ dakika bekletilmiş, süre sonunda kap yüzeyinden ayrıldıkları mikroskopik olarak gözlenen hücreler 37°C 'lik taze besi yeri ile istenilen yoğunlukta yeniden ekilmiştir. Bizim çalışma koşullarımızda bu işlemin haftada 1-2 kez yapılması gerekmiştir.

2.3.7.1. Hücresel Alım Çalışmaları

Üretilen nanotübüler yapıların kanser hücrelerine alımını konfokal mikroskop (Zeiss LSM 510) ile gözleyebilmek amacıyla nanoyapılar formüle edilirken floresan özellik taşıyan Kumarin-6 (C6) bileşiği (Tahara ve ark., 2010; Yan ve ark., 2010) kullanılmıştır. Polimer çözeltilerine polimer/C6 (10:0,1) oranında C6 eklenerek hem etken madde içeren hem de içermeyen boyalı nanotübüler yapılar elde edilmiştir. En iyi sonuç aldığımız S2 formülasyonuna (Çizelge 2.8) uygun olarak hazırlanan, kültür ortamı içinde dağıtılmış ve literatüre uygun olarak konsantrasyonu ayarlanmış floresan madde taşıyan polimerik nanotüpler, görüntüleme işleminin gerektirdiği şekilde çoğaltma ve inkübasyonlar için üretilen kapaklı ve 8 bölmeli steril özel kültür kapları (Millicell® EZ SLIDES, Şekil 2.2) üzerinde çoğaltılmıştır.

İki farklı hücre dizisi (A549 ve MCF-7), sadece floresan madde içeren ve floresan madde yanında ETP konsantrasyonu 2,5 µg/ml olan nanoyapılar içeren kültür ortamı ile ayrı EZ Slide içinde 2 ve 4 saat süreyle inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon sürelerinin sonunda hücreler sabitlenmek amacıyla 3'er kez PBS tamponu ile yıkanmış, % 4 formaldehit ile 20 dakika inkübe edilmiş ve yeniden PBS ile yıkanarak görüntülemeye hazır hale getirilmiştir. Nanoyapıların kanser hücreleri içine alımı konfokal mikroskopta görüntülenmiştir.



Şekil 2.2. Millicell EZ slides

2.3.7.2. Kanser Hücreleri Üzerinde Sitotoksosite Çalışmaları

Sitotoksosite çalışmaları için seçilen A549 hücreleri süspansiyon haline getirildikten sonra 96-kuyucuklu polistiren plakalara eşit hacimde ekilmiştir. Esas Kontrol grubu üzerinde hücrelere hiçbir uygulama yapılmamış, uygulama yapılan gruplarda ETP içeren dozlar 1µg/ml, 5µg/ml ve 25µg/ml olarak ayarlanmıştır (Litwiniec ve ark., 2013). Uygulanan nanopartikül grupları; ETP yüklü nanopartikül (ETPnp), ETP içermeyen boş nanopartikül (BOŞnp) olarak belirlenmiştir. Aşağıda formülü verilen ETP'nin İV enjeksiyonluk piyasa preparatı (Etoposide-TEVA, Enjeksiyon Konsatresi, 100 mg/5 ml) karşılaştırma amacıyla kullanılmıştır.

ETP	100 mg
Susuz sitrik asit	10 mg
Polisorbat 80	400 mg
Etanol	1205 mg
PEG 300	ym 5 ml

Piyasa preparatının bu formülünden hareketle elimizdeki ETP'nin çözelti grubu (ETPçöz) hazırlanmış, bu çözelti grubuna kontrol sağlamak amacıyla sadece yardımcı maddeleri içeren bir negatif kontrol (NK) grubu tasarlanmıştır.

A549 hücrelerinin canlılığı 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum bromid (MTT) testi ile belirlenmiştir. Belirlenen süreler sonunda hücrelerin üzerindeki ilaçlı ortamlar alınarak, 200 µl taze kültür ortamı ilave edilmiş, üzerine 20 µl MTT çözeltisi ilave edilerek karanlıkta 37°C'lik CO₂ inkübatöründe 3 saat bekletilmiştir. Sonrasında kuyucuklara belli miktar DMSO ilave edilerek oluşan mor renk 570nm'de mikropilaka okuyucu (Thermo Scientific) ile spektrofotometrik olarak okunmuş ve aşağıdaki formül yardımıyla canlı hücrelerin yüzdesi hesaplanmıştır. Hiçbir uygulama yapılmayan hücreler asıl kontrol grubudur ve elde edilen OD değerine karşı hücre canlılığı %100 olarak belirlenmiştir.

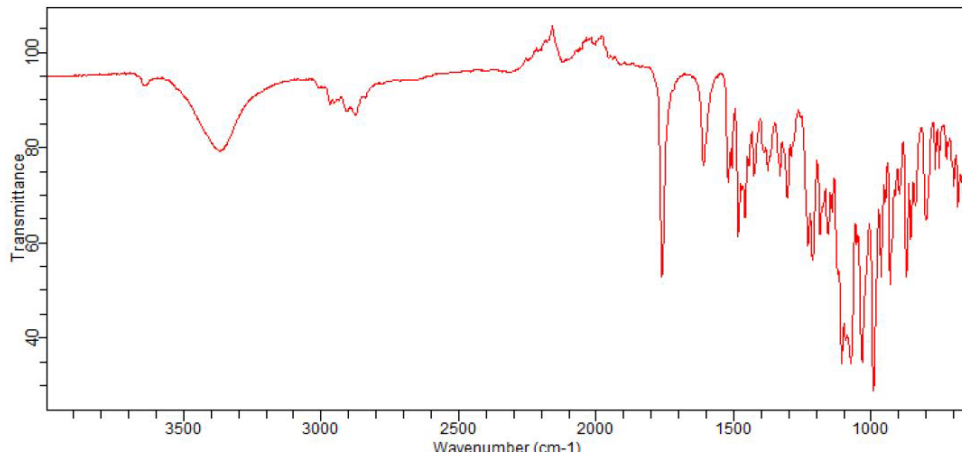
$$\text{Hücre canlılığı(\%)} = [\text{OD(uygulama yapılan hücreler)}/\text{OD(kontrol)}] \times 100$$

3. BULGULAR

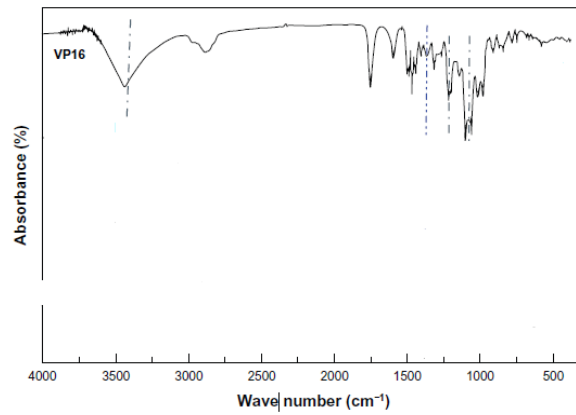
3.1. ETP Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular

3.1.1. ETP'nin FTIR Spektroskopisi ile Analizine Ait Bulgular

ETP'nin çalışmamızdan elde edilen FTIR spektrumu Şekil 3.1'de, literatürden elde edilen FTIR spektrumu Şekil 3.2'de verilmiştir.



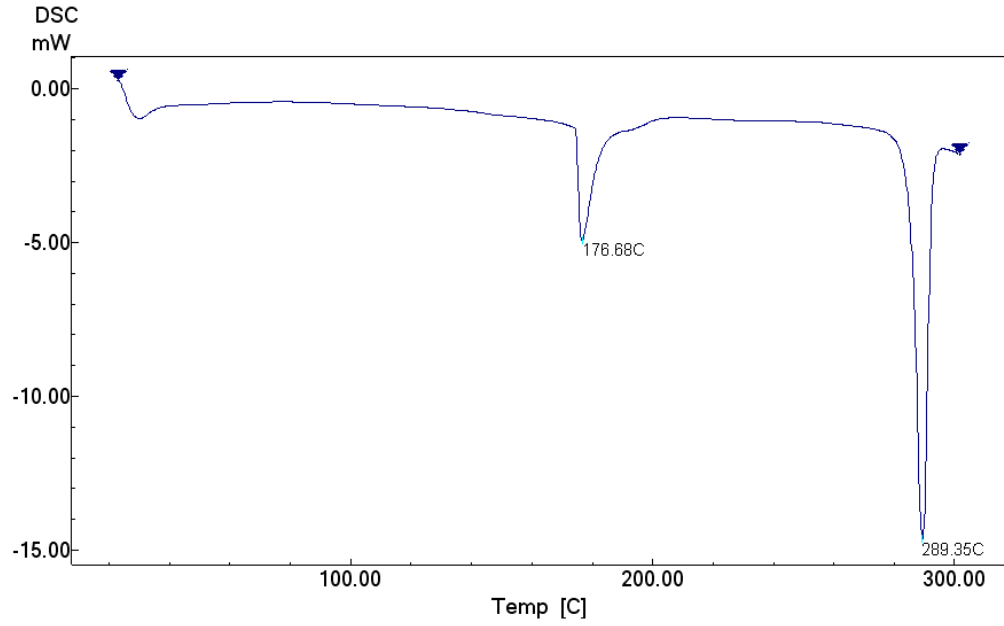
Şekil 3.1. ETP'nin elde edilen FTIR spektrumu



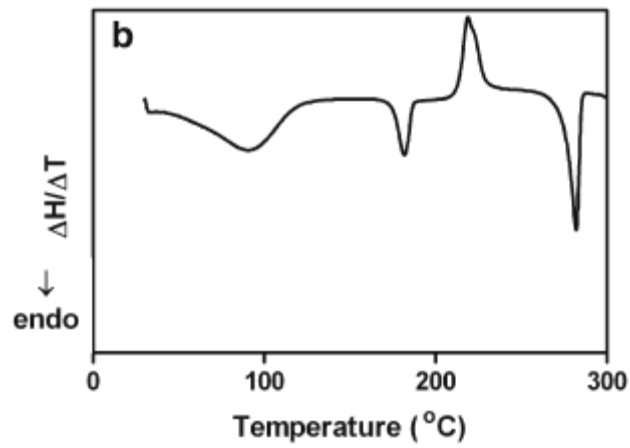
Şekil 3.2. ETP'nin literatürdeki FTIR spektrumu (Qin ve ark., 2013)

3.1.2. ETP'nin DSC ile Analizine Ait Bulgular

ETP'nin DSC ile analizinden elde edilen termogram Şekil 3.3'de, literatürde görülen DSC termogramı Şekil 3.4'de verilmiştir.



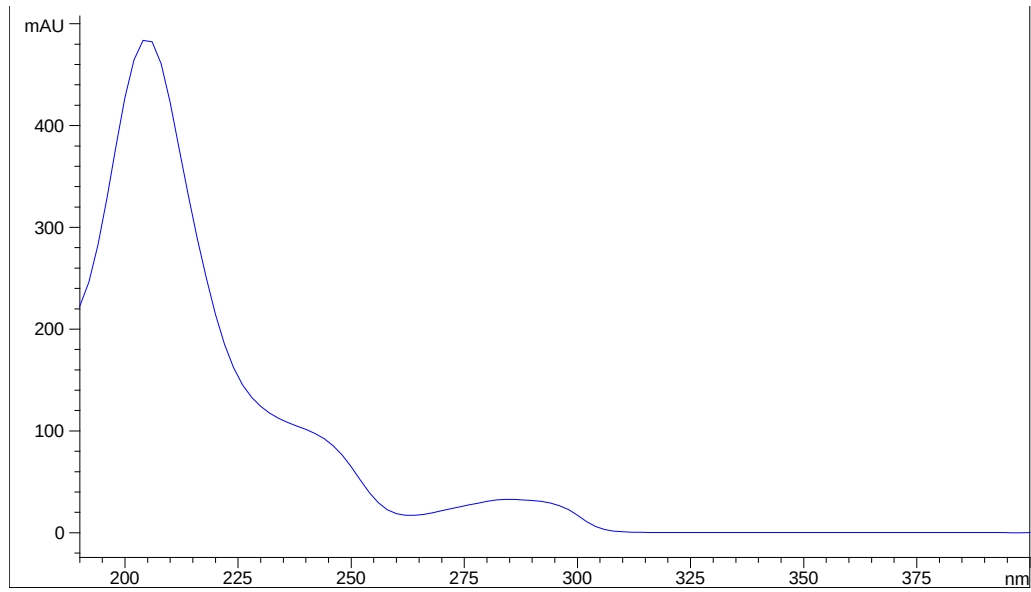
Şekil 3.3. ETP'nin DSC termogramı



Şekil 3.4. ETP'nin literatürde verilen DSC termogramı (Solano ve ark., 2013)

3.1.3. ETP'nin Asetonitril Ortamında UV Spektrofotometre ile Analizine Ait Bulgular

UV Spektrofotometre ile yapılan çalışmada ETP'nin $\lambda_{\max}$ değerleri 220 nm olarak belirlenmiştir ve UV spektrumu Şekil 3.5'te gösterilmiştir.



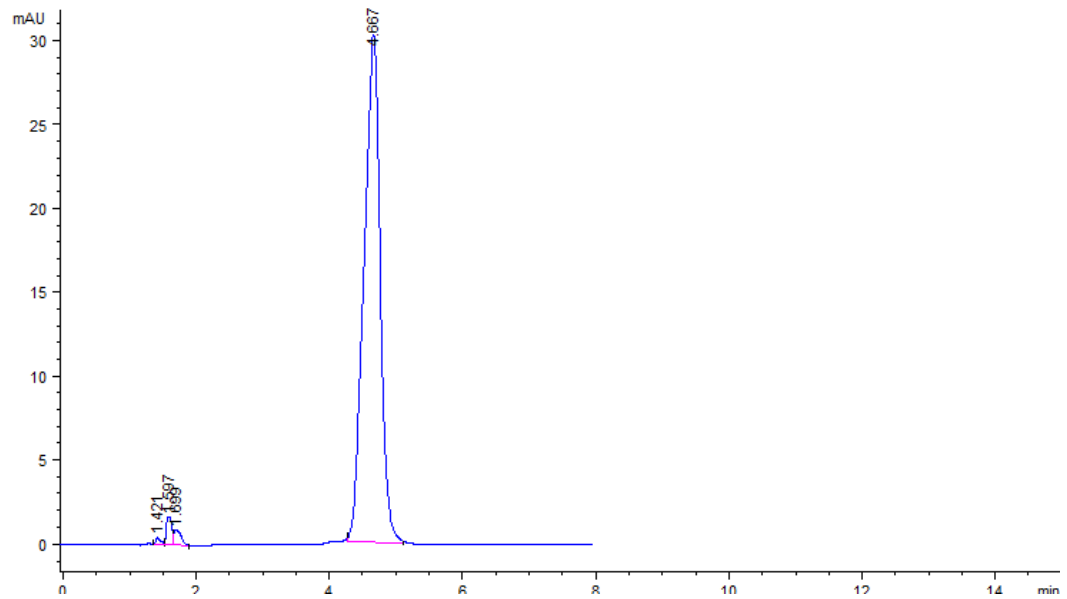
Şekil 3.5. ETP'nin asetonitril ortamındaki UV spektrumu

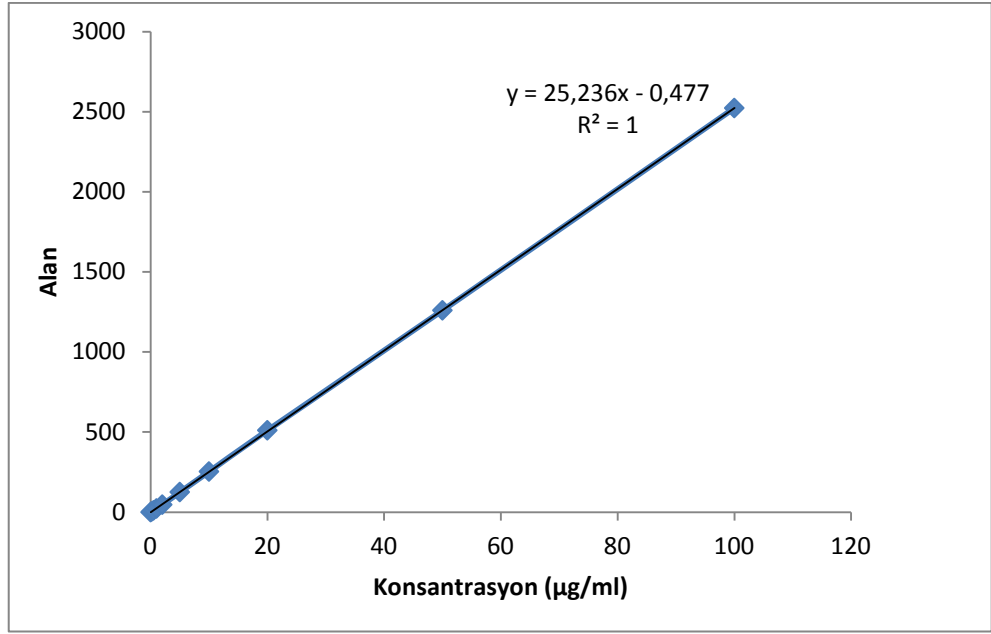
3.1.4. ETP'nin Asetonitril Ortamında HPLC ile Analizine Ait Bulgular

ETP'nin asetonitril ortamındaki HPLC ile tayininde belirlenen gerekli koşullar Çizelge 3.1'de verilmiştir. Bu koşullara göre HPLC'de elde edilen ETP piki Şekil 3.6'da, kalibrasyon doğrusu Şekil 3.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. ETP'nin asetonitril ortamındaki HPLC miktar tayininde belirlenen koşullar

Cihaz	Agilent series 1100
Kolon	ACE 5 C18 (150mm x 4,6mm, 5µm)
Sıcaklık	40°C
Dalga boyu	220 nm
Mobil faz	Asetonitril: pH 5,0 fosfat tamponu
Akış hızı	1ml/dakika
Enjeksiyon hacmi	10 µl
Alıkonma zamanı	4,7 dakika

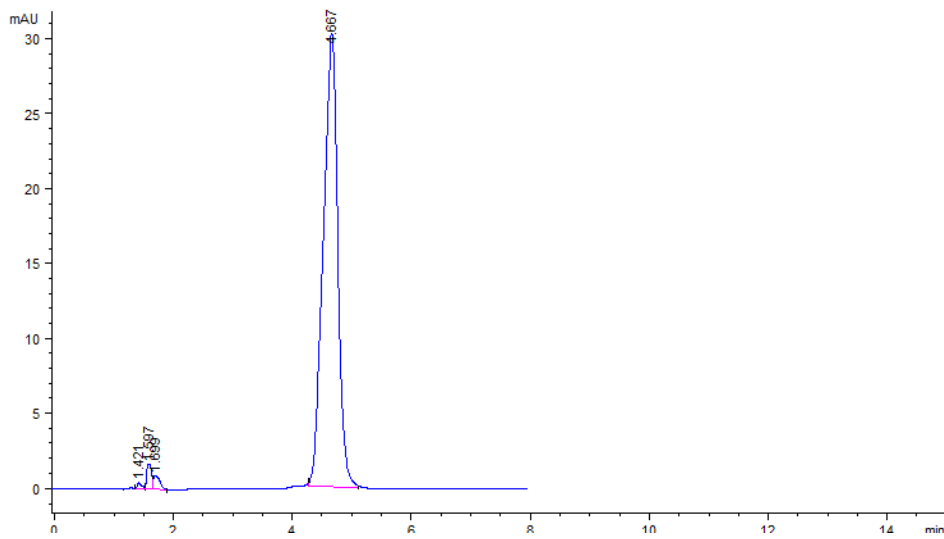
**Şekil 3.6.** ETP'nin asetonitril ortamında belirtilen koşullarda elde edilen pikini gösteren HPLC kromatogramı



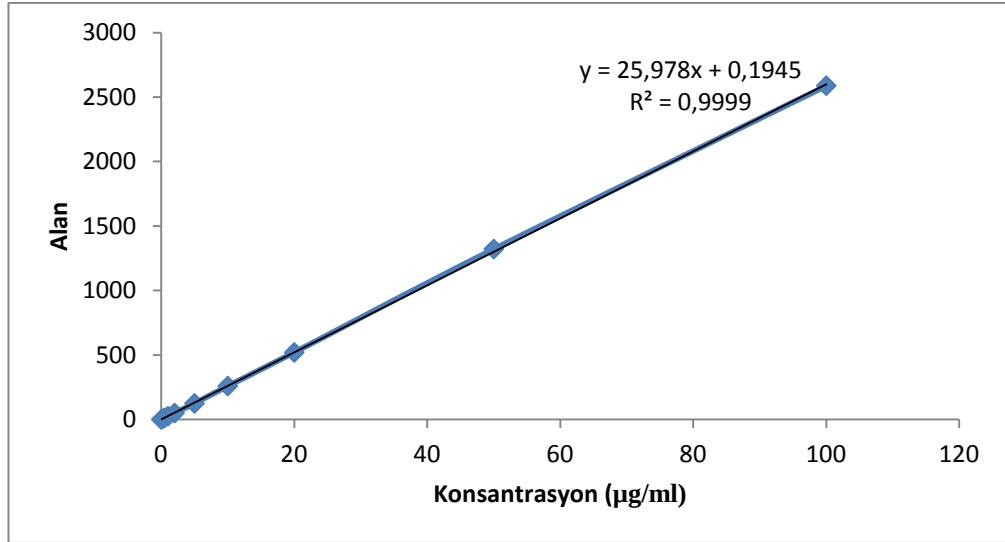
Şekil 3.7. ETP'nin HPLC yöntemi ile elde edilen asetonitril ortamında 220nm'deki kalibrasyon doğrusu

3.1.5. Etoposid'in Metanol Ortamında HPLC ile Analizine Ait Bulgular

ETP'nin metanol ortamında elde edilen HPLC kromatogramı Şekil 3.8'de, kalibrasyon doğrusu Şekil 3.9'da verilmiştir.



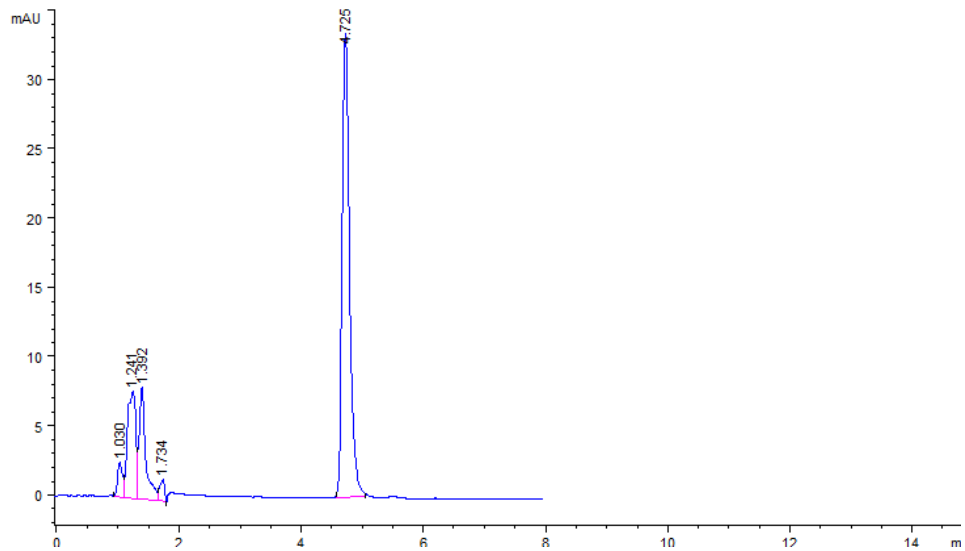
Şekil 3.8. ETP'nin metanol ortamında 220nm'de, elde edilen pikini gösteren HPLC kromatogramı



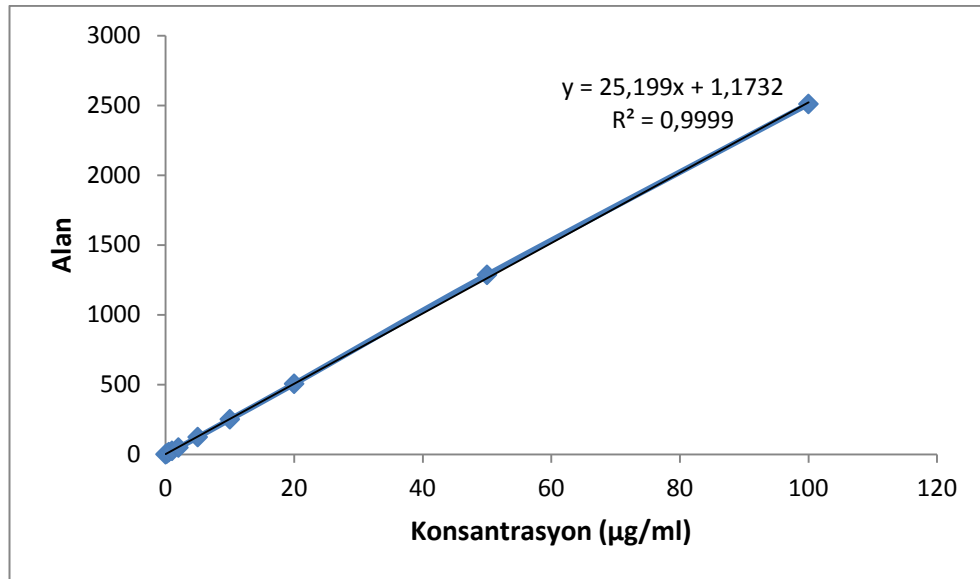
Şekil 3.9. ETP'nin HPLC yöntemi ile elde edilen metanol ortamında 220nm'deki kalibrasyon doğrusu

3.1.6. ETP'nin PBS-Tw (pH 7,4) Ortamında HPLC ile Analizine Ait Bulgular

ETP'nin PBS-Tw (pH 7,4) ortamında elde edilen HPLC kromatogramı Şekil 3.10'da, kalibrasyon doğrusu Şekil 3.11'de verilmiştir.



Şekil 3.10. ETP'nin (pH 7,4) PBS-Tw ortamında 220nm'de, elde edilen pikini gösteren HPLC kromatogramı

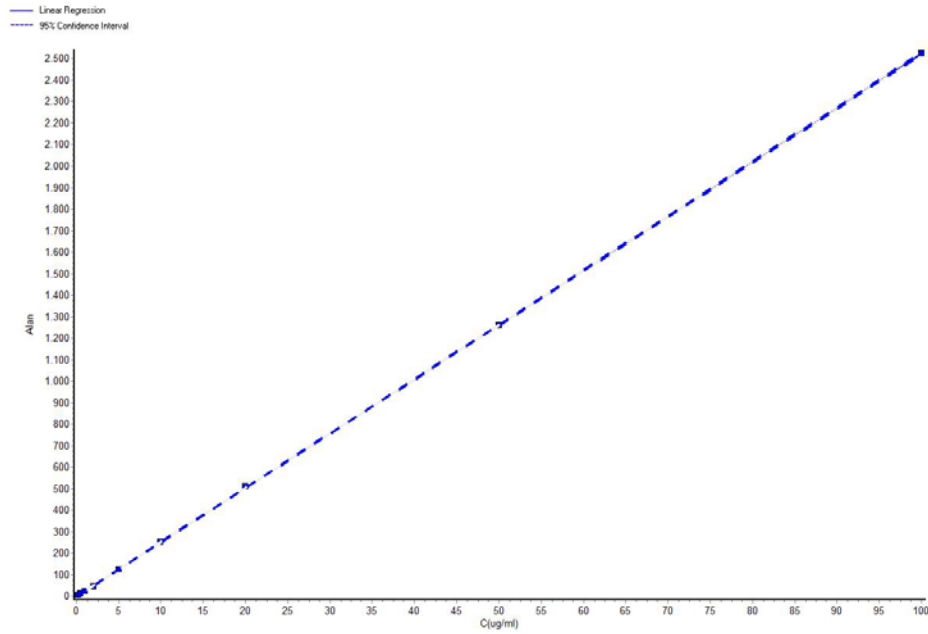


Şekil 3.11. ETP'nin (pH 7,4) PBS-Tw ortamında 220nm'deki kalibrasyon doğrusu

3.1.6. Analitik Yöntemin Validasyonuna Ait Bulgular

Doğrusallık ve Aralığı

ETP'nin miktar tayini yönteminin analitik validasyonuna ait doğrusallık ve aralığı çalışması belirtildiği şekilde tayin edilmiştir. Etoposidin miktar tayini yönteminin analitik validasyonuna ait doğrusallık ve aralığı çalışmasından elde edilen regresyon doğrusunun şekli Şekil 3.12'de bu doğruya ait elde edilen parametreler Çizelge 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.12. ETP'nin miktar tayini yönteminin analitik validasyonundan elde edilen regresyon doğrusu

Çizelge 3.2. ETP'nin miktar tayini yönteminin analitik validasyonundan elde edilen regresyon doğrusunun parametreleri

	Asetonitril ortamı
Doğrusallık ve aralığı	0,2-100 µg/ml
Eğim	25,236
Eğimin standart hatası	0,2934
Eğimin % 95 Güven aralığı	Alt sınır: 25,169 Üst sınır: 25,304
Eğimin önemlilik değeri	<0,0001
Kesişim	-0,4770
Kesişimin standart hatası	1,059
Kesişimin %95 Güven aralığı	Alt sınır: -2,919 Üst sınır: 1,965
Determinasyon katsayısı (r^2)	1,0
Regresyon doğrusundan sapmaların standart hatası ($Sy.x$)	2,855

Doğruluk

ETP'nin miktar tayini yönteminin analitik validasyonuna ait doğruluk ve geri elde çalışması yöntemde belirtildiği şekilde tayin edilmiştir. ETP'nin miktar tayini yönteminin analitik validasyonundan elde edilen doğruluk ve geri elde sonuçları Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. ETP'nin miktar tayini yönteminin analitik validasyonundan elde edilen doğruluk ve geri elde sonuçları

1.Konsantrasyon (0,5 µg/ml)			2.Konsantrasyon (5 µg/ml)			3.Konsantrasyon (50µg/ml)		
Alan	C (µg/ml)	% Geri elde	Alan	C (µg/ml)	% Geri elde	Alan	C (µg/ml)	% Geri elde
10,8	0,447	89,372	125,0	4,972	97,009	1257,8	49,860	101,657
10,9	0,451	90,165	125,2	4,980	97,089	1260,9	49,983	101,586
11,2	0,463	92,543	125,7	4,999	96,771	1259,9	49,944	101,982
11,1	0,459	91,749	125,8	5,004	96,851	1263,7	50,094	102,069
10,8	0,447	89,372	125,2	4,980	96,612	1256,5	49,809	102,355
10,8	0,447	89,372	125,2	4,980	96,692	1256,5	49,809	101,895
Ortalama		90,4290	Ortalama		99,7202	Ortalama		99,8331
SS		1,3879	SS		0,2543	SS		0,2246
%BSS		1,5347	%BSS		0,2551	%BSS		0,2250

Keskinlik

ETP'nin miktar tayini yönteminin analitik validasyonuna ait keskinlik çalışmasında yöntemin tekrarlanabilirliği ile farklı gün ve farklı analistlere ait ara keskinliği tayin edilmiştir. ETP'nin miktar tayini yönteminin analitik validasyonundan elde edilen tekrarlanabilirlik çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. ETP'nin miktar tayini yönteminin analitik validasyonundan elde edilen tekrarlanabilirlik sonuçları

Teorik C (µg/ml)	Bulunan C (µg/ml)	Teorik C (µg/ml)	Bulunan C (µg/ml)	Teorik C (µg/ml)	Bulunan C (µg/ml)
0,5	0,4508	5	4,9999	50	50,0942
0,5	0,4508	5	4,9801	50	50,0942
0,5	0,4627	5	4,9801	50	49,9832
0,5	0,4587	5	5,0038	50	49,8904
0,5	0,4587	5	5,0038	50	49,8604
0,5	0,4627	5	4,9721	50	49,9832
Ortalama	0,4574	Ortalama	4,98982	Ortalama	49,9843
SS	0,0054	SS	0,0139	SS	0,0983
%BSS	1,184	%BSS	0,280	%BSS	0,197

Teşhis ve Tayin sınırları

ETP'nin miktar tayini yönteminin analitik validasyonunda yapılan analizlerden elde edilen kalibrasyon eşitliğinin eğimi, standart sapmaya bölünerek elde edilen değer, 3,3 ile çarpılarak teşhis sınırı (Limit of Detection-LOD), aynı değer 10 ile çarpılarak tayin sınırı (Limit of Quantification-LOQ) hesaplanmıştır. Teşhis sınırı 0,024 µg/ml, tayin sınırı ise 0,072 µg/ml olarak bulunmuştur.

Özgünlük

ETP'nin miktar tayini yönteminin özgünlüğü için, formülasyonlarda bulunan diğer maddelerin HPLC'de elde edilen ETP pikiyle girişim yapmadığından emin olunmuştur. Analitik yöntemin özgünlüğü ispatlanmıştır.

3.2. Nanoyapıların Üretimi ve İncelenmesine Ait Bulgular

3.2.1. Damlatma Yöntemiyle Nanoyapıların Üretimi ve İncelenmesine Ait Bulgular

Damlatma yönteminin optimizasyonu amacıyla yapılan ön çalışmadan elde edilen ilk bulgularda çözücü seçiminin çok önemli olduğu sonucuna varılmıştır. Yöntemde asıl amaç etken maddeyi hapsedecek olan polimerin nanokanallarda şekil alması olduğu için, çözücünün polimeri nanoporlara sürükleyecek özellikte ve sürüklenme tamamlandıktan sonra da buharlaşarak yeterli kurumayı sağlayacak kalitede olması gerektiği sonucuna varılmıştır.

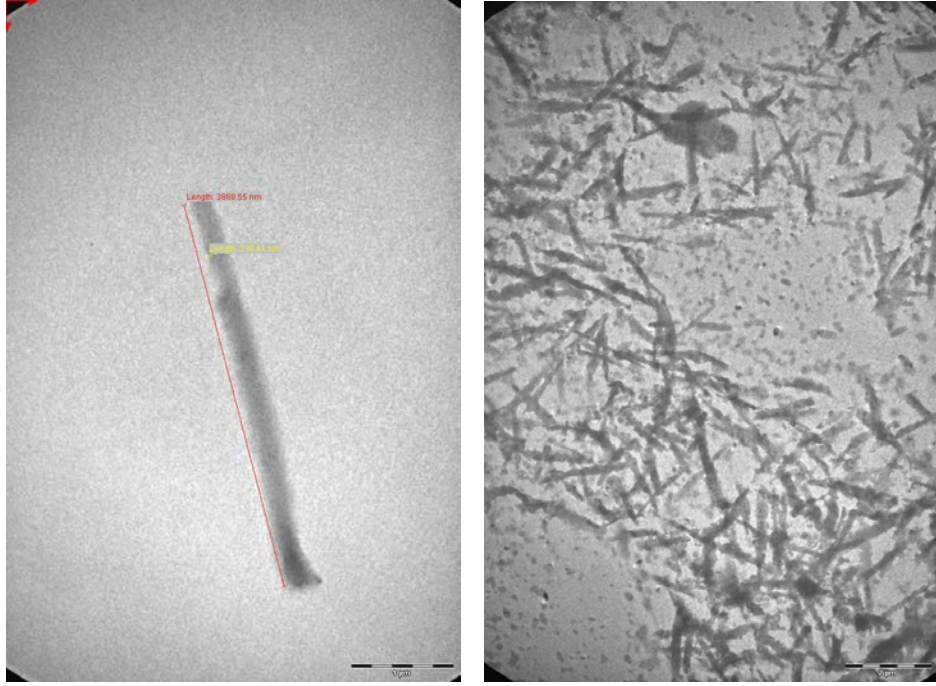
Formülasyon parametreleri Çizelge 2.1'de verilen damlatma yönteminde çözücü olarak kloroform kullanılan ön çalışmalarda PCL'nin kloroformda çok iyi çözündüğü ancak polimer çözeltileri AAO membranın altına geçmeden kloroformun çok hızlı buharlaştığı görülmüştür. Özellikle % 5 konsantrasyonda kloroform içindeki polimer çözeltilerinin porlara girmeden membranın üstünde kalarak hemen kurduğu gözlenmiştir. Bu durum aynı zamanda membranlar kuruduktan sonra 1M NaOH çözeltisindeki çözünme süresinin uzamasıyla da tespit edilmiştir. Membranın çözünmesi gereken sürede ortamda görülen iri parçacıkların aslında membranın porlarına giremeyen ve yüzeyinde kalıp ince bir film tabakası oluşturan polimer katmanı olduğu anlaşılmıştır. Bu sebeplerle polimer çözeltileri hazırlamak için çözücü olarak kloroform kullanımından vazgeçilmiştir.

PCL çözeltisinin aseton kullanılarak hazırlandığı çalışmalarda (Çizelge 2.1) kloroforma göre aseton daha az uçucu bir çözücü olduğu için polimer çözeltisinin membranın porlarına daha iyi sürüklendiği gözlenmiştir. Ancak PCL'nin asetonda daha zor çözündüğü, çözünme süresinin uzadığı hatta %5 konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerde PCL'nin tamamen çözünmediği düşünüldüğü için kullanılacak olan polimere göre organik çözücünün çok iyi değerlendirilerek

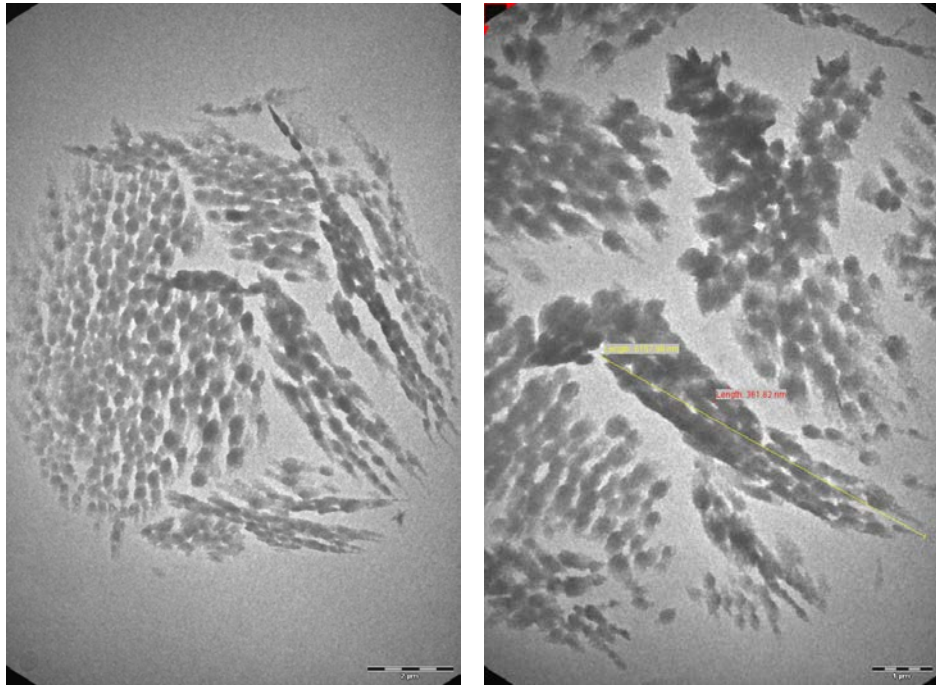
seçilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Bundan sonraki çalışmalarda alternatif diğer bir çözücü olarak diklorometan (DCM) da kullanılmaya karar verilmiştir.

Yapılan ön çalışmalarda (Çizelge 2.1) polimer çözeltisi damlatılmadan önce AAO nanoporların yüzeyini iyonik olarak aktive etmek amacıyla AAO membranın su ile 1 dakika ultrasonik banyoda yıkanarak ön işleme tabii tutulmasının olumsuz etki ettiği gözlenmiştir. Membranın nanoporlarının su ile tıkandığı, suyun kuruyamadığı veya polimer çözeltisini sürüklemeye işe yarayacağı öngörülen AAO'nun kendi iyonik dengesinin bozulmuş olabileceği düşünülmüştür. Ön işlem olarak membranı polimer çözeltisinin çözücüsüyle önceden ıslatmanın da işleme olumlu bir katkı sağlamadığı gözlenmiştir. En olumlu sonuçlar AAO membran hiç bir ön işleme tabii tutulmadan ve kuru haldeyken polimer çözeltisinin damlatıldığı çalışmalarda elde edilmiştir. AAO membranın kendi orjinal iyonik dengesinin polimer çözeltisinin nanoporlara sürüklenmesinde gerekli olduğu ve bundan sonraki çalışmalarda hiç bir ön işlem uygulanmadan kullanılmasına karar verilmiştir.

TEM görüntüleme için seçilen ilk iki formülasyon daha homojen dispersiyon halinde görünen, %2,5'lük PCL ile asetonunda hazırlanmış olan F4 ve %5,0'lik PCL ile yine asetonunda hazırlanmış olan F5 formülasyonları olmuştur. Bu formülasyonlara ultrasonikasyon uygulanarak görüntüleme için hazır hale getirilmiş ve Bölüm 2.3.1'de anlatıldığı şekilde numune hazırlanılarak TEM görüntüleme yapılmıştır. F4'ün Şekil 3.13'teki TEM görüntülerinden de görüldüğü gibi serbest dağılan, silindirik şekilli, düzgün yüzeyli nanoyapılar elde edilebilmiş, dahası bu nanoyapıların çapları ulaşmayı hedeflediğimiz 200 nm civarında yani AAO membranın por çapları kadar bulunmuştur. Nanoyapıların boyları ise değişmekle birlikte 2-4µm aralığında görüntülenmiştir. Şekil 3.14'te F5 formülasyonundan elde edilen görüntülerde çapları birbirine yakın ancak bir sıra halinde dizilmiş boğumlu nanoyapılar elde edildiği gözlenmiştir. TEM görüntüleme için seçilen diğer F2 ve F6 formülasyonlarında nanoyapılara zarar verebilir düşüncesiyle ultrasonikasyon uygulanmadığı için parçacıklar çok üst üste yapışarak görüntülemeyi olanaksız hale getirdiğinden görüntüleme yapılamamış, TEM için numune hazırlama işleminden önce 15 dakika kadar ultrasonikasyon yapmanın gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 3.13. Ön çalışmalara ait F4 formülasyonunun TEM görüntüleri



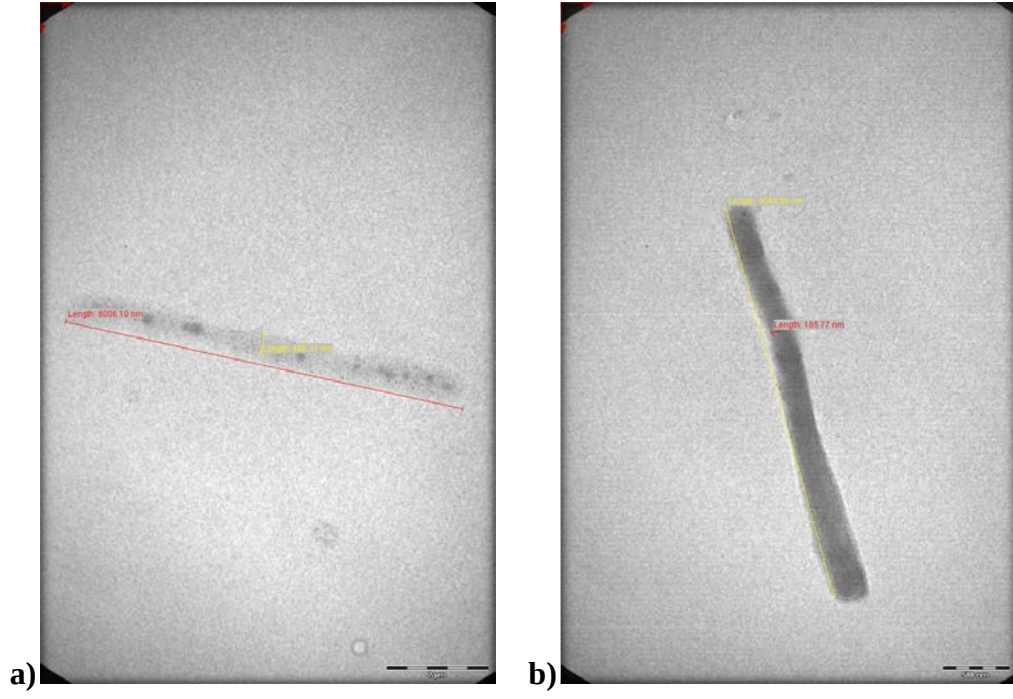
Şekil 3.14. Ön çalışmalara ait F5 formülasyonunun TEM görüntüleri

3.2.2. Eritme Yöntemiyle Nanoyapıların Üretimi ve İncelenmesine Ait Bulgular

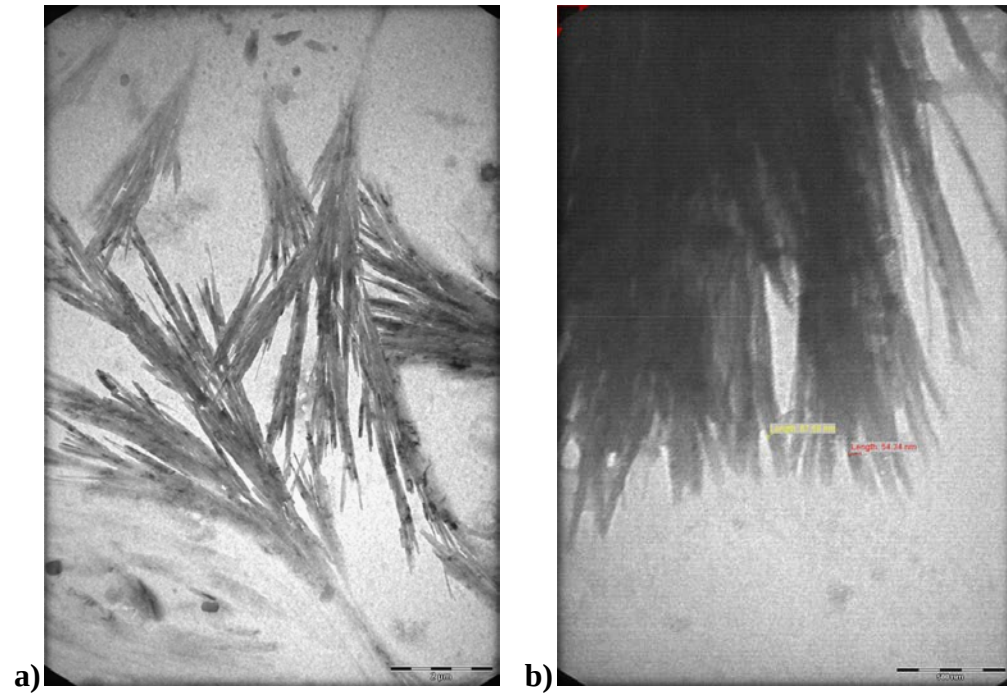
Damlatma yönteminden elde edilen çalışma sonuçlarına göre, daha önce çözücü olarak kullanılan aseton yerine tercih edilen DCM, polimer çözeltisini membranın nanoporlarına sürüklemeye açısından daha başarılı bulunmuştur. Bu sebeple PCL ve etken maddenin ortak çözücüsü olarak çalışmalara DCM ile devam edilmiştir. Damlatma yönteminden elde ettiğimiz bulgular ve TEM görüntüleri nanotübüler yapılara etken madde yükleme çalışmalarımıza ışık tutmuştur.

Model etken madde (mEM) içeren polimer çözeltisinden damlatma yöntemi için hazırlanan D1 (PCL/mEM, 20:1) ve D2 (PCL/mEM, 10:1) formülasyonların görüntüleri Şekil 3.15'de ve eritme yöntemi için hazırlanan D3 (PCL/mEM, 20:1) ve D4 (PCL/mEM, 10:1) formülasyonların görüntüleri Şekil 3.16'da karşılaştırmalı olarak paylaşılmıştır. Şekil 3.15 ve Şekil 3.16'da verilen TEM görüntülerinden elde edilen sonuçlara göre, damlatma yönteminde tek ve bağımsız nanoyapılar elde edilirken eritme yönteminde küme halinde birleşik nanoyapılar oluşmuştur. Ayrıca model etken madde olarak yüklediğimiz ofloksasinin konsantrasyonuna bağlı olarak her iki yöntem için de polimer/mEM oranı 20:1 olan formülasyonlardan elde edilen nanoyapıların daha açık renkli, polimer/mEM oranı 10:1 olan formülasyonlardan elde edilen nanoyapıların daha koyu renkli ve doygun olduğu görülmüştür.

Nanoyapıların boyutlarına bakıldığında, damlatma yöntemiyle elde edilen D1 ve D2 formülasyonlarında, çapları 200 nm'ye yakın ve boyları 3-8 µm arasında değişen silindirik şekilli nanoyapılar görülmektedir (Şekil 3.15). Eritme yönteminde ise oluşan nanoyapıları çapının 50-60 nm kadar olduğu, boylarının ise daha uzun olduğu görülmektedir (Şekil 3.16).

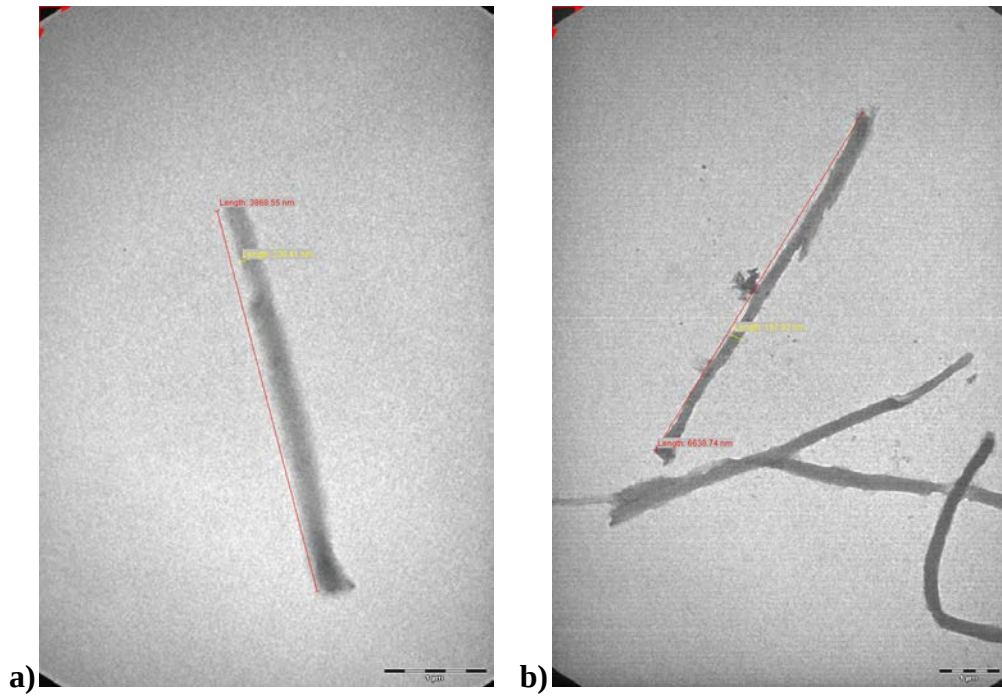


Şekil 3.15. Damlatma yöntemiyle elde edilen a)D1 ve b)D2 formülasyonlarına ait TEM görüntüleri



Şekil 3.16. Eritme yöntemiyle elde edilen a)D3 ve b)D4 formülasyonlarına ait TEM görüntüleri

Çalışmanın devamında asıl etken maddemiz olan ETP'nin formülasyonlara yüklenmesini incelemek amacıyla yine damlatma ve eritme yöntemleriyle aynı formülasyon parametreleri kullanılarak Çizelge 2.3'de belirtildiği şekilde formülasyonlar hazırlanmıştır. Buradaki tek değişiklik ETP içeren bu grup formülasyonlarda AAO membranı çözme işleminin 1M NaOH yerine 0,5M NaOH'da gerçekleştirilmiş olmasıdır. Bu durum AAO membranı çözme süresini damlatma yöntemi ile elde edilen formülasyonda (E1) 5 saate, eritme yöntemiyle elde edilen formülasyonda (E2) 6 saate çıkarmıştır. Şekil 3.17'de verilen TEM görüntülerinde E1 formülasyonundan düzgün ve homojen nanoyapılar elde edildiği, çaplarının 200 nm'ye boylarının 3 µm'ye yakın olduğu tespit edilmiştir. E2 formülasyonundan ise daha ince ama boyu daha uzun nanoyapılar oluştuğu görülmüştür.



Şekil 3.17. ETP yüklenerek elde edilen a)E1 b)E2 formülasyonlarına ait TEM görüntüleri

Bu grup formülasyonlarda elde edilen az miktardaki nanotüpler etken madde miktar tayini düşüncesiyle DCM'de çözmek için saatlerce karıştırılmış ve PCL nanoyapılarda hiçbir çözünme görülmemiştir. Bu durum Şekil 2.1'de paylaşılan PCL'nin kimyasal yapısı üzerinde düşünülerek detaylı olarak araştırılmış ve NaOH'ın PCL'yi hidrofilikleştirdiği bulunmuştur. Yapılan araştırmalarda NaOH'ın asit yapısı taşıyan PLGA gibi diğer biyobozunur polimerler üzerinde de aynı etkiyi gösterdiği tespit edilmiş ve NaOH'ın elde edilen nanoyapıların bütünlüğünün bozulmasına sebep olacağı düşünüldüğünden biyobozunur polimerler ile hazırlanan formülasyonlar için AAO membranı çözme işlemine bundan sonraki çalışmalarda seyreltik fosforik asit ile devam edilmiştir. NaOH'ın PCL üzerindeki etkileri tartışma kısmında Bölüm 4.2.2'de detaylı olarak paylaşılmıştır.

3.2.3. Daldırma Yöntemiyle Nanoyapıların Üretimi ve İncelenmesine Ait Bulgular

Membranları polimer çözeltisine daldırarak ıslatma (daldırma) yöntemi, hem nanoporların homojen dolmasına olanak vermiş hem de polimer çözeltisinin porlara dolumu esnasında organik çözücünün uçmasını engelleyerek üretim verimini artırmıştır. Bu yöntemle birlikte 47 mm çaplı AAO membranların kullanılması da verimi önemli ölçüde artırmıştır. Üretim veriminin artması nedeniyle etken madde miktar tayini yapılmasını için yeterli ölçüde nanopartikül içeren toz miktarına ulaşılmıştır.

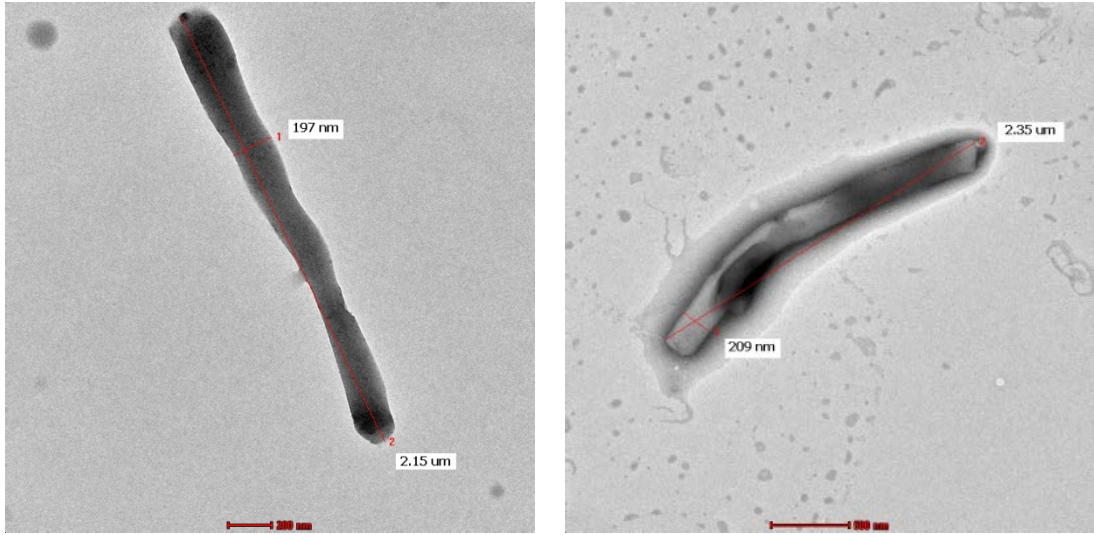
Daldırma yöntemiyle hazırlanan formülasyonlar, etken madde yükleme etkinlikleri ve yükleme kapasiteleri Çizelge 3.1'de verilmiştir. C1B-C4B kodlu formülasyonlarda polimer/ETP oranı (10:2)'ye çıkarılmış ve olumlu etkileri görülmüştür. ETP yükleme etkinlikleri C1A formülasyonunda %1,8'den %2,1'e; C2A'da %2,2'den %2,4'e; C3A'da %1,1'den %1,5'e; C4A'da ise 4,4'ten 4,5'e çıkmıştır. En yüksek ETP yükleme etkinliği C4B'de bulunmuştur.

Çizelge 3.5. Daldırma yöntemiyle hazırlanan C1A-C4A ve C1B-C4B formülasyonlarının ETP yükleme kapasiteleri

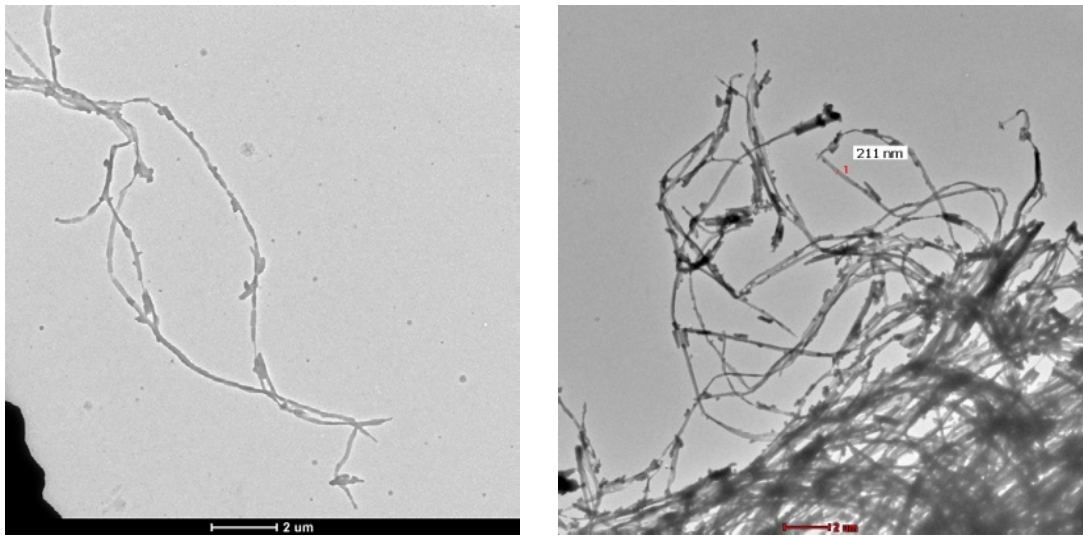
Kod	Polimer ve Konsantrasyonu	Çözücü sistemi (ml)	Polimer/ETP oranı	AAO çözme işlemi	ETP YE(%)	ETP YK(%)
C1A	PMMA-996 %2	DCM (5,0)	(10:1)	%10 H ₃ PO ₄	1,8	0,16
C2A	PMMA-996 %2	DCM:DMF (4,5:0,5)	(10:1)	%10 H ₃ PO ₄	2,2	0,20
C3A	PMMA-996 %2	Aseton (5,0)	(10:1)	%10 H ₃ PO ₄	1,1	0,10
C4A	PMMA-996 %2	Aseton:DMF (4,5:0,5)	(10:1)	%10 H ₃ PO ₄	4,4	0,40
C1B	PMMA-996 %2	DCM (5,0)	(10:2)	%10 H ₃ PO ₄	2,1	0,35
C2B	PMMA-996 %2	DCM:DMF (4,5:0,5)	(10:2)	%10 H ₃ PO ₄	2,4	0,40
C3B	PMMA-996 %2	Aseton (5,0)	(10:2)	%10 H ₃ PO ₄	1,5	0,25
C4B	PMMA-996 %2	Aseton:DMF (4,5:0,5)	(10:2)	%10 H ₃ PO ₄	4,5	0,75

C1A formülasyonuna ait görüntüler Şekil 3.18'de, C2A formülasyonuna ait görüntüler Şekil 3.19'da, C3A formülasyonuna ait görüntüler Şekil 3.20'de, C4A formülasyonuna ait görüntüler Şekil 3.21'de paylaşılmıştır. C2A, C4A, C2B ve fomülasyonlarında çözücü sistemine 4,5:0,5 oranında ilave edilen DMF nanoyapıların boylarında belirgin uzamaya neden olmuştur. Nanoyapıların boyları uzadığında daha yüksek ETP yükleme kapasitesi elde edildiği bulunmuştur. Çözücülerden DCM tek başına kullanıldığında asetondan daha yüksek etken madde yüklenmesini sağlarken, aseton DMF ile birlikte kullanıldığında daha yüksek etken madde yüklenmesini sağlamıştır.

TEM görüntülerinden, Şekil 3.18'de verilen C1A formülasyonununundan elde edilen nanoyapıların çapı yaklaşık 200 nm boyu ise yaklaşık 2,5 μm olarak görülmektedir. Şekil 3.19'da verilen C2A formülasyonununundan elde edilen nanoyapıların çapı yine yaklaşık 200 nm olmakla beraber boylarının uzadığı görülmektedir.

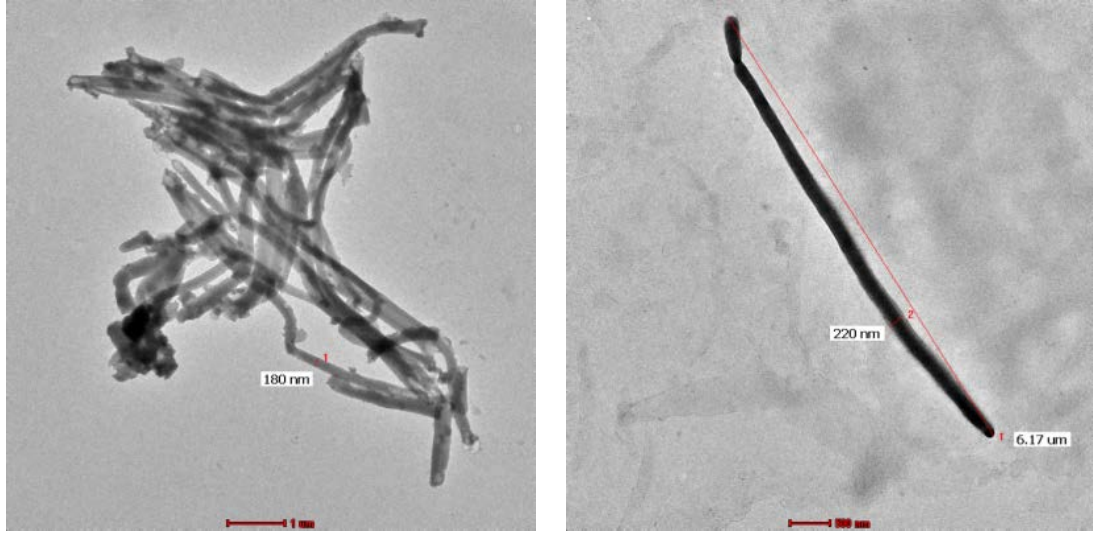


Şekil 3.18. Daldırma yöntemiyle elde edilen C1A formülasyonuna ait TEM görüntüleri

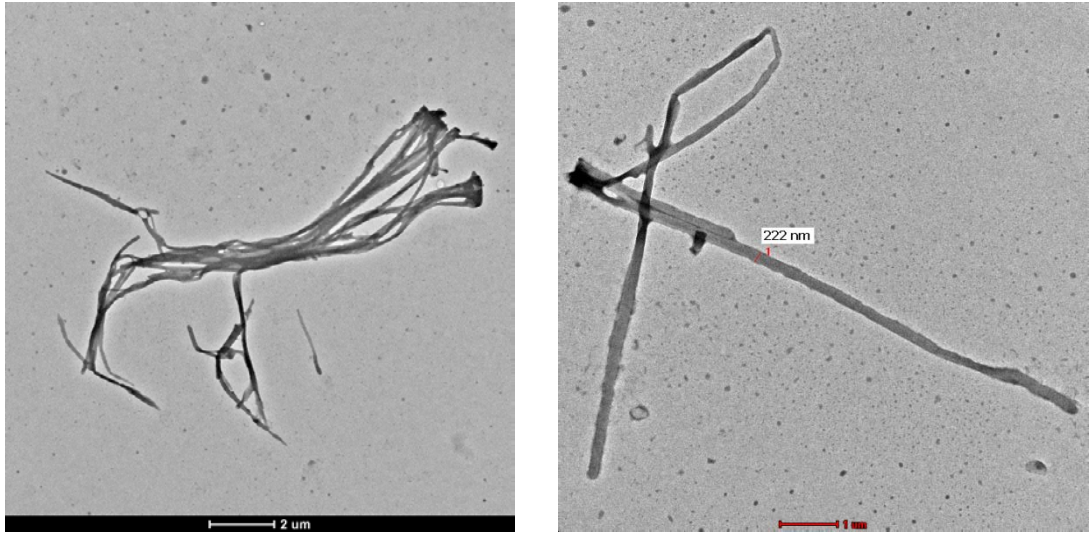


Şekil 3.19. Daldırma yöntemiyle elde edilen C2A formülasyonuna ait TEM görüntüleri

Şekil 3.20'de C3A formülasyonundan elde edilen düzgün ve homojen şekilli nanoyapılarda yine 200nm civarında partikül çapı ve 5-6 μm civarında uzunluk gözlenmiştir. Şekil 3.21'de verilen C4A formülasyonundan elde edilen yapılarda ise 200nm'ye yakın çap elde edilirken, uzunluklar 10 μm 'yi aşmıştır.



Şekil 3.20. Daldırma yöntemiyle elde edilen C3A formülasyonuna ait TEM görüntüleri



Şekil 3.21. Daldırma yöntemiyle elde edilen C4A formülasyonuna ait TEM görüntüleri

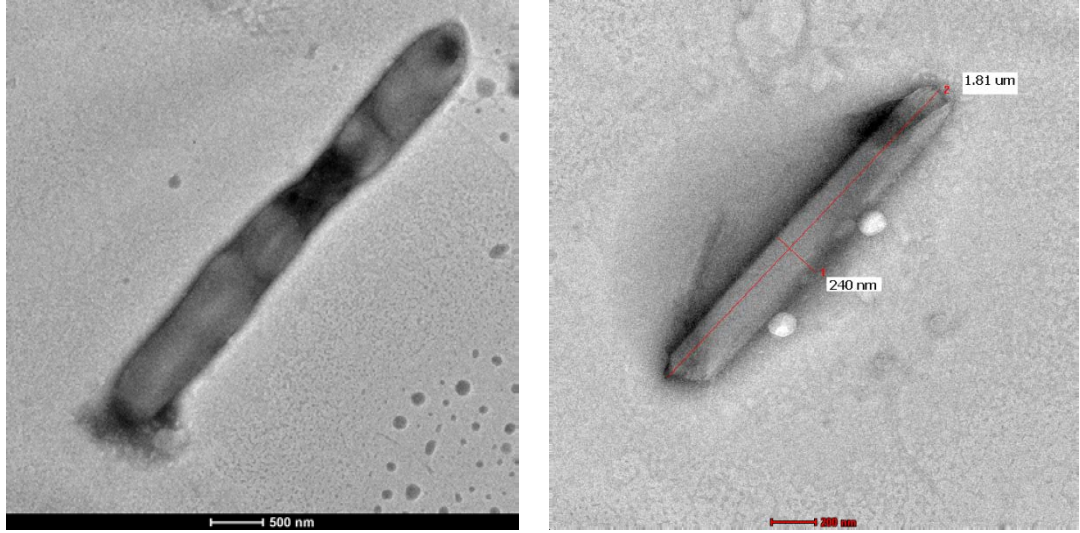
3.2.3.1. Etken Madde Yükleme Etkinliğini Artırma Çalışmalarına Ait Bulgular

Daldırma yöntemi kullanılarak etken madde yükleme etkinliğini artırma çalışmalarında hem PMMA hem PCL ile elde edilen formülasyonlarda etken madde miktarının polimere göre belli oranda artırılması etken madde yükleme etkinliğini olumlu yönde etkilemiştir. Ancak PMMA kullanılan formülasyonlarda polimere göre 10:3, PCL kullanılan formülasyonlarda polimere göre 10:2 oranından fazla ETP eklenmesinin yükleme etkinliğini düşürdüğü görülmüştür. Bu durumun ETP'nin çözünürlüğü ile ilişkisini anlamak için, polimer çözeltisi hazırlarken, etken maddenin ortamdaki çözünürlüğünü artırmak amacıyla ETP'nin çok iyi çözünürlük gösterdiği DMSO ilave edilmesinin yükleme kapasitesi üzerinde olumsuz etki gösterdiği bulunmuştur.

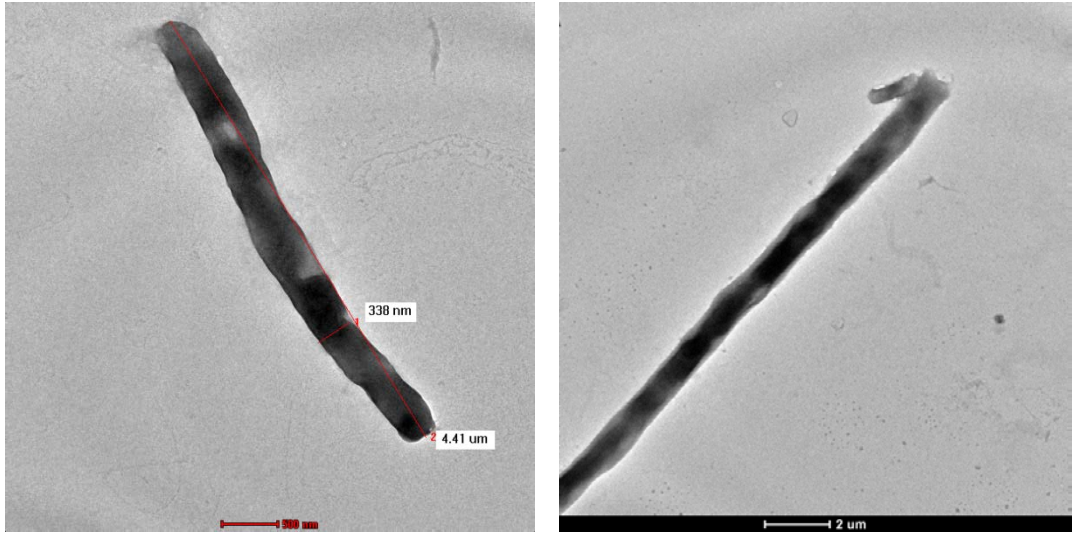
Çizelge 3.6. Daldırma yöntemiyle hazırlanan A1-A12 kodlu formülasyonların ETP yükleme kapasiteleri

Kod	Polimer ve Konsantrasyonu	Çözücü sistemi (ml)	Polimer/ETP oranı	ETP YE(%)	ETP YK(%)
A1	PMMA-996 %2	DCM (7,0)	10:1	7,6	0,69
A2	PMMA-996 %2	DCM (7,0)	10:2	9,86	1,64
A3	PMMA-996 %2	DCM (7,0)	10:3	18,1	4,15
A4	PMMA-996 %2	DCM (7,0)	10:3,5	4,51	1,17
A5	PCL %2	DCM (7,0)	10:1	2,73	0,25
A6	PCL %2	DCM (7,0)	10:2	7,1	1,18
A7	PCL %2	DCM (7,0)	10:3	4,42	1,02
A8	PCL %2	DCM (7,0)	10:3,5	1,15	0,29
A9	PMMA-996 %2	DCM:DMSO (6:1)	10:4	1,2	0,34
A10	PMMA-996 %2	DCM:DMSO (6,5:0,5)	10:4	1,5	0,43
A11	PCL %2	DCM:DMSO (6:1)	10:4	0,75	0,21
A12	PCL %2	DCM:DMSO (6,5:0,5)	10:4	0,85	0,24

Formülasyonların yapısal analizinin de incelenerek yorumlanabilmesi için daha önce olduğu gibi TEM görüntülerine başvurulmuştur. PMMA/ETP, 10:2 oranında hazırlanan kodlu A2 formülasyonun Şekil 3.22’de, PMMA/ETP, 10:3 oranında hazırlanan A3 formülasyonun Şekil 3.23’te TEM görüntüleri yer almaktadır. Nanoyapıların homojenliğini ve bütünlüğünü koruduğu görülmüştür.

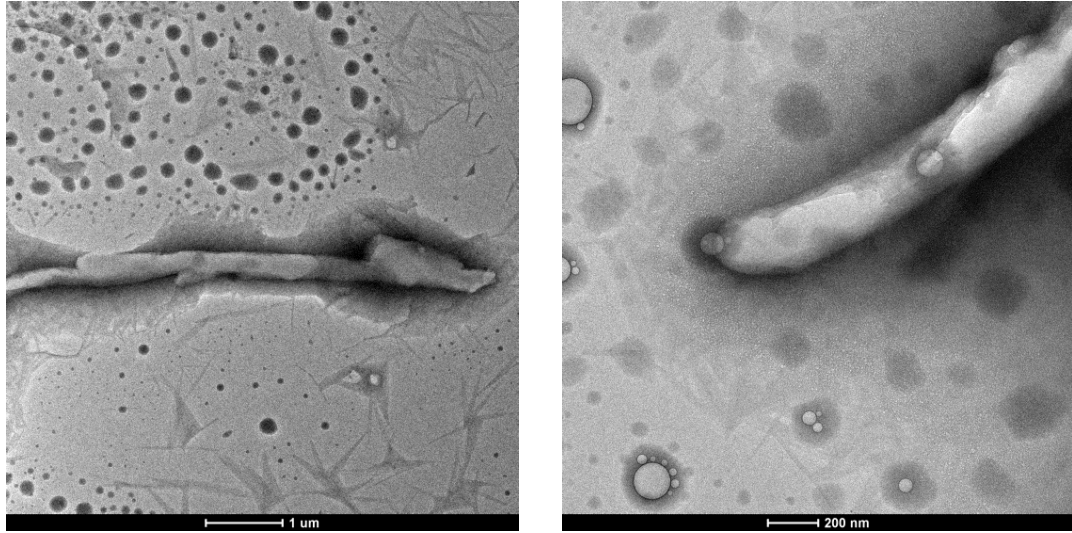


Şekil 3.22. Daldırma yöntemiyle elde edilen A2 formülasyonuna ait TEM görüntüleri



Şekil 3.23. Daldırma yöntemiyle elde edilen A3 formülasyonuna ait TEM görüntüleri

Formülasyonlarda artan etken madde konsantrasyonlarını değerlendirdiğimiz çalışmamızda PCL/ETP, 10:3 oranında elde edilen ve etken madde yükleme kapasitesi düşen A7 formülasyonunun Şekil 3.24'de verilen görüntüsünde ortamda bulunan madde yoğunluğu ve nanoyapıların çok düzgün olmayan şekilleri dikkati çekmiştir.



Şekil 3.24. Daldırma yöntemiyle elde edilen A7 formülasyonuna ait TEM görüntüleri

3.2.4. Vakum Yöntemiyle Nanoyapıların Üretimi ve İncelenmesine Ait Bulgular

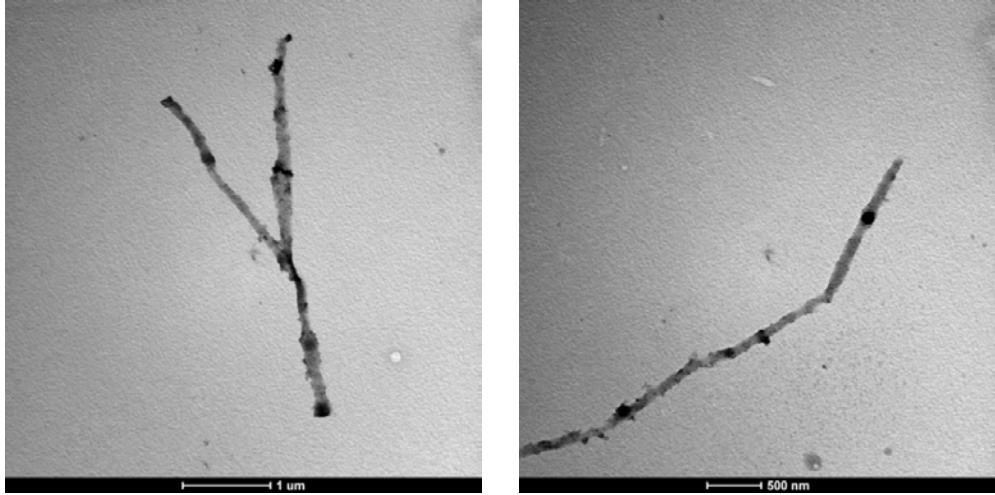
Vakum kullanarak AAO membranının tüm porlarına sıvı iletiminin homojen olarak sağlanması için geliştirdiğimiz bu yöntemle öncelikli olarak PMMA polimerleriyle farklı formülasyonlar denenmiştir. Bu farklı teknikle elde edilen formülasyonlarda gözlenen ortak karakter, polimer çözeltisinin porlara çok hızlı sürüklenmesi sebebiyle porların yüzeyini tam kaplamadan ve porların içerisini tam dolduramadan şekil alması sonucunda çok ince ve uzun yani nanofiber şeklindeki yapıların elde edilmesi olmuştur. Boylarının çok uzun olması nedeniyle elde edilen nanotübüler yapıların ultrasantrifüj sonrası serbestliğini koruyamadığı ve birbirleriyle girişim yaptığı gözlenmiştir. Modifiye ettiğimiz vakum yöntemiyle elde edilen formülasyonlar ve etken madde yüklemeleri Çizelge 3.7'de paylaşılmıştır.

Çizelge 3.7. Modifiye vakum yöntemiyle elde edilen formülasyonlar ve ETP yükleme kapasiteleri

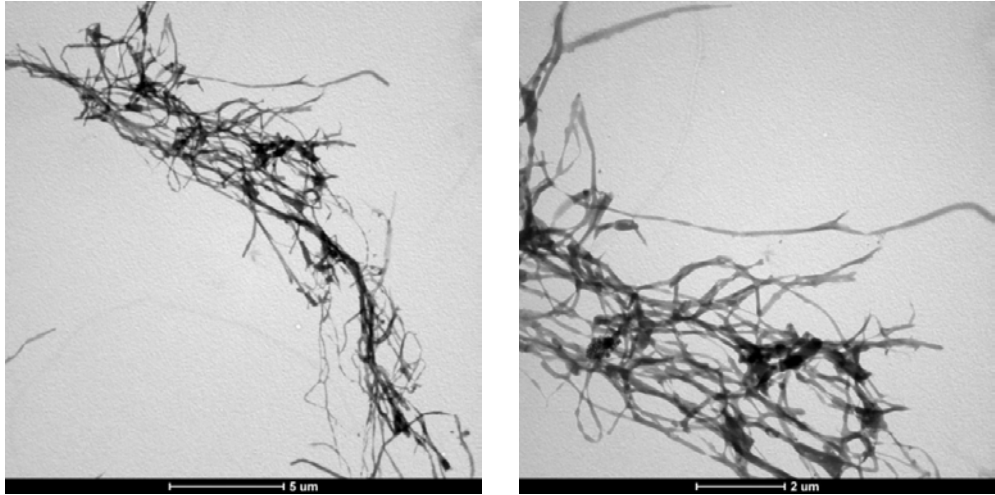
Kod	Polimer ve konsantrasyonu	Çözücü sistemi (ml)	Polimer/ETP oranı	AAO çözme işlemi	ETP YE(%)	ETP YK(%)
V1	PMMA-350 %2	DCM (7,0)	(10:2)	0,5M NaOH	1,95	0,33
V2	PMMA-350 %2	DCM (7,0)	(10:2)	%6 H ₃ PO ₄	*6,43	*1,07
V3	PMMA-996 %2	DCM (7,0)	(10:2)	0,5M NaOH	1,84	0,31
V4	PMMA-996 %2	DCM (7,0)	(10:2)	%6 H ₃ PO ₄	5,48	0,91

Bu formülasyon grubuyla çalışılırken, önceki ETP miktar tayini çalışmalarında gözden kaçmış olan çok önemli bir nokta tespit edilmiştir. Örneğin V2 formülasyonunda ETP miktar tayini yaparken **metanolle 5 dakika karıştırılma ile % 6,43 bulunan etken madde yükleme etkinliği aynı formülasyonda metanolle 30 dakika karıştırma yapıldığında % 11,2 bulunmuştur.** Bu çok önemli gelişme dolayısıyla önceki çalışmalarımızda etken madde yükleme etkinliği ümit verici olan özellikle biyobozunur polimerlerle elde edilen formülasyonlar tekrar değerlendirmeye alınmış ve etken madde miktar tayininde metanolle en az 30 dakika karıştırma yapılmasına dikkat edilmiştir.

Bu yöntemle elde edilen V1 formülasyonunun TEM görüntüleri Şekil 3.27, V2 formülasyonunun görüntüleri Şekil 3.28 ile paylaşılmıştır. Her iki formülde de düzgün nanofiberler elde edildiği gözlenmiştir. Ayrıca kullanılan AAO membranın SEM görüntülerine (Şekil 3.29) bakılınca, üretici tarafından çok düzgün porlara sahip olduğu belirtilmiş olmasına rağmen, homojen olmayan ve 200nm'ye yakın olsa da çap farklılıkları görülen porlara sahip bir membran olduğu ortaya çıkmıştır. Yine de membran yardımcılı nanofabrikasyon yöntemi için pek çok çalışmada aynı üreticiden temin edilen AAO membran kullanılmış (Feng ve ark., 2011; Huang ve ark., 2013) ve yöntemin parametrelerinin değerlendirilmesi açısından kullanışlı bir model membran olduğu gösterilmiştir.

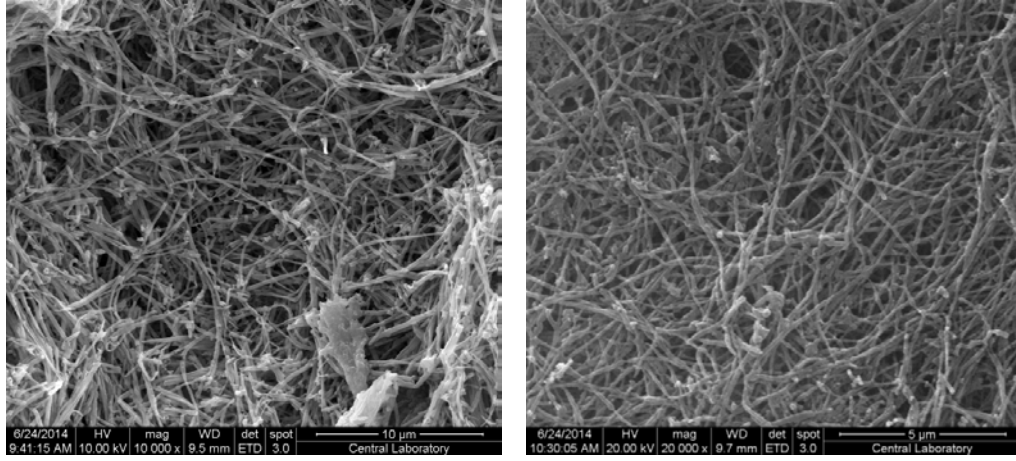


Şekil 3.25. Vakumla elde edilen V1 formülasyonunun TEM görüntüleri

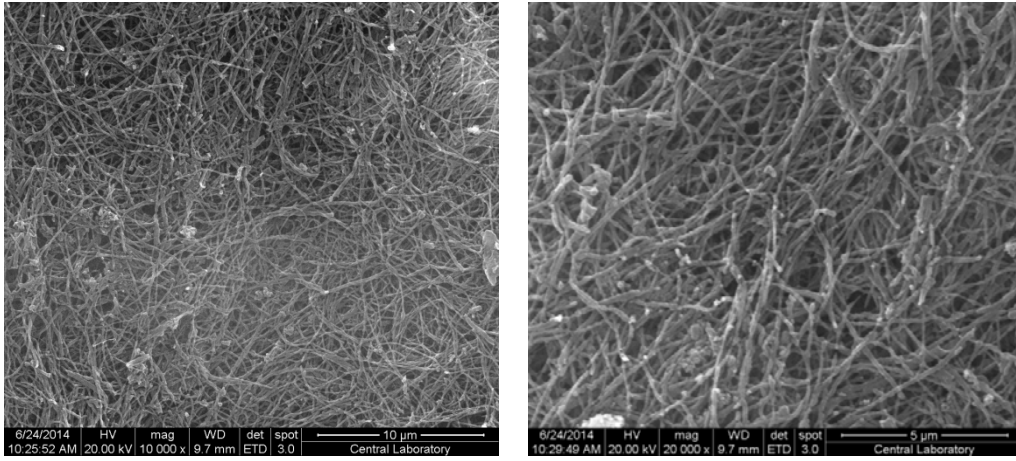


Şekil 3.26. Vakumla elde edilen V2 formülasyonunun TEM görüntüleri

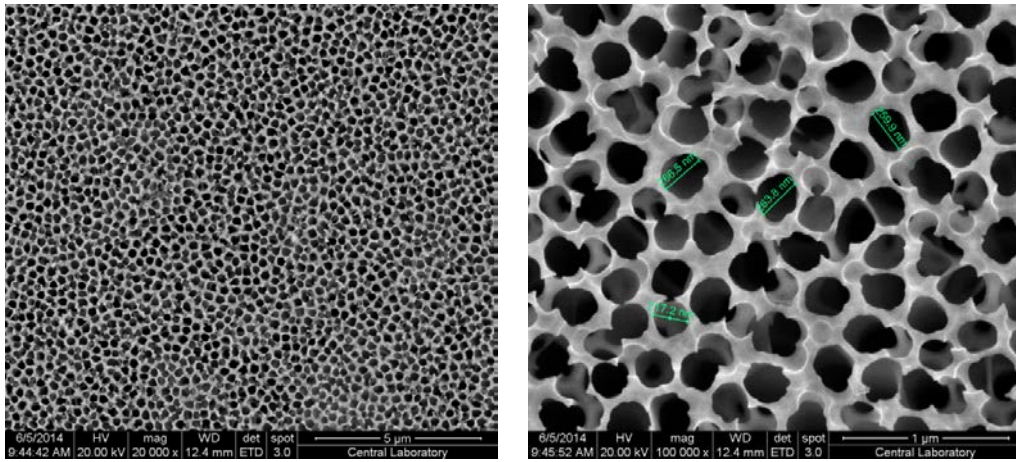
Çalışmanın bu aşamadan sonraki kısmında liyofilizasyon sonrası elde edilen nanoyapılarda daha geniş alan görüntülemenin hem formülasyonun geneli açısından daha çok fikir vereceği hem de zaman ve mali yük açısından fayda sağlayacağı öngörülerek TEM görüntüleme yerine SEM görüntüleme tekniğine başvurulmuştur. Vakumlu desikatör kullanılarak elde edilen formülasyonların SEM görüntüleri (Şekil 3.27 ve Şekil 3.28) bu öngörümüzü kanıtlar nitelikte çıkmıştır. Düzgün yüzeyli nanofiber yapılar elde edildiği görülmüştür. Ancak kullanılan AAO membranının porlarının beklenilenin aksine homojen olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 3.29).



Şekil 3.27. Vakumla elde edilen V1 formülasyonunun SEM görüntüleri



Şekil 3.28. Vakumla elde edilen V2 formülasyonunun SEM görüntüleri



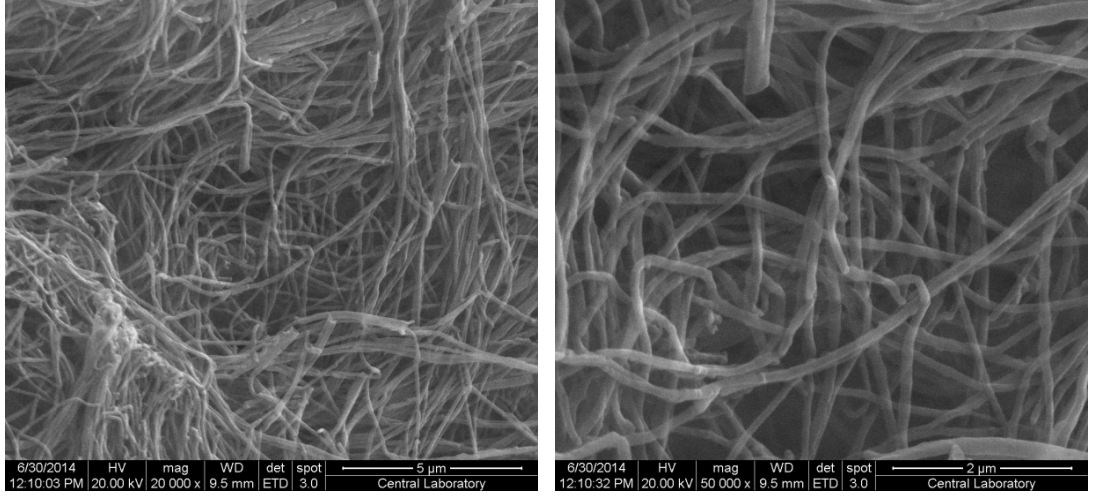
Şekil 3.29. Kullanılan AAO membranların SEM görüntüleri

3.2.5. Seçilen Daldırma Yöntemiyle Yeni Formülasyonların Üretimi ve İncelenmesine Ait Bulgular

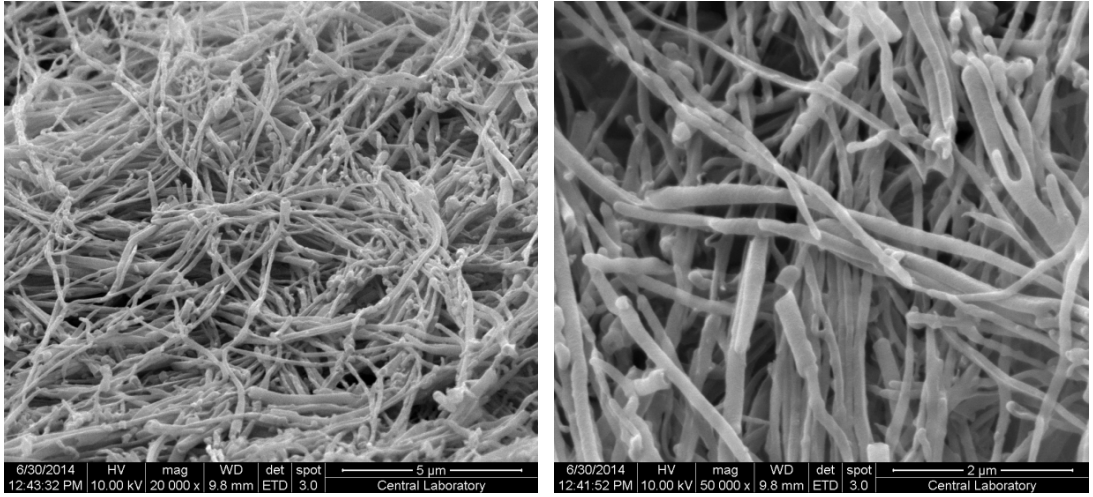
Çalışmalarımızda membranı ıslatma işlemlerinde kullandığımız damlatma, eritme, daldırma ve vakum uygulama yöntemleri arasında üretilen nanoyapıların miktarına bakılarak en iyi işlem etkinliği ve en yüksek etken madde yükleme kapasitesi elde edilen yöntem "daldırma" yöntemi olmuştur. TEM görüntülerinden elde edilen bulgulara göre de daldırma yöntemiyle elde edilen nanoyapıların şekil ve bütünlük olarak en uygun olduğu bulunmuştur. Aslında nanoyapıların şekilleri homojen ve düzgün olduğunda etken madde yükleme etkinliklerinin de yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sebeple bundan sonraki çalışmalarımıza daldırma yöntemi kullanılarak devam edilmiştir.

Çizelge 3.8. Daldırma yöntemiyle elde edilen yeni formülasyonlar ve ETP yükleme kapasiteleri

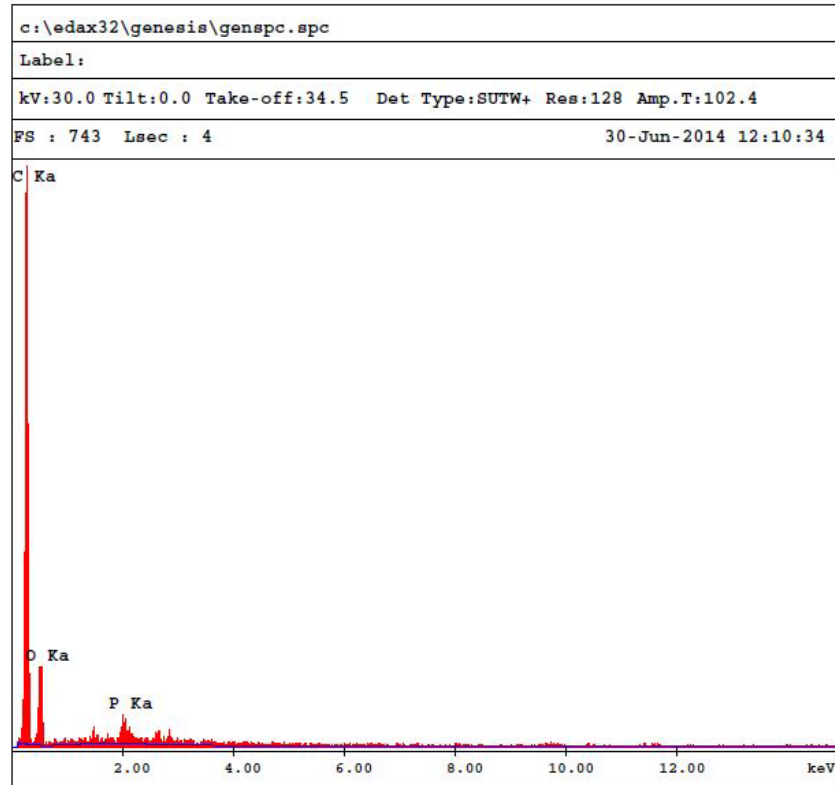
Kod	Polimer ve Konsantrasyonu	Çözücü sistemi (ml)	Polimer/ETP oranı	Daldırma süresi	ETP YE(%)	ETP YK(%)
Y1	PMMA-350 %2	DCM:DMF (6.0:0,5)	(10:3)	24 saat	6,4	1,48
Y2	PMMA-996 %2	DCM:DMF (6.0:0,5)	(10:3)	24 saat	5,6	1,29
Y3	PMMA-350 %2	DCM:DMF (6.0:0,5)	(10:3)	10 saat	14,5	3,35
Y4	PMMA-996 %2	DCM:DMF (6.0:0,5)	(10:3)	10 saat	6,5	1,50
Y5	PMMA-350 %2	DCM:DMF (6.0:0,5)	(10:3)	4 saat	2,1	0,48
Y6	PMMA-996 %2	DCM:DMF (6.0:0,5)	(10:3)	4 saat	1,0	0,23



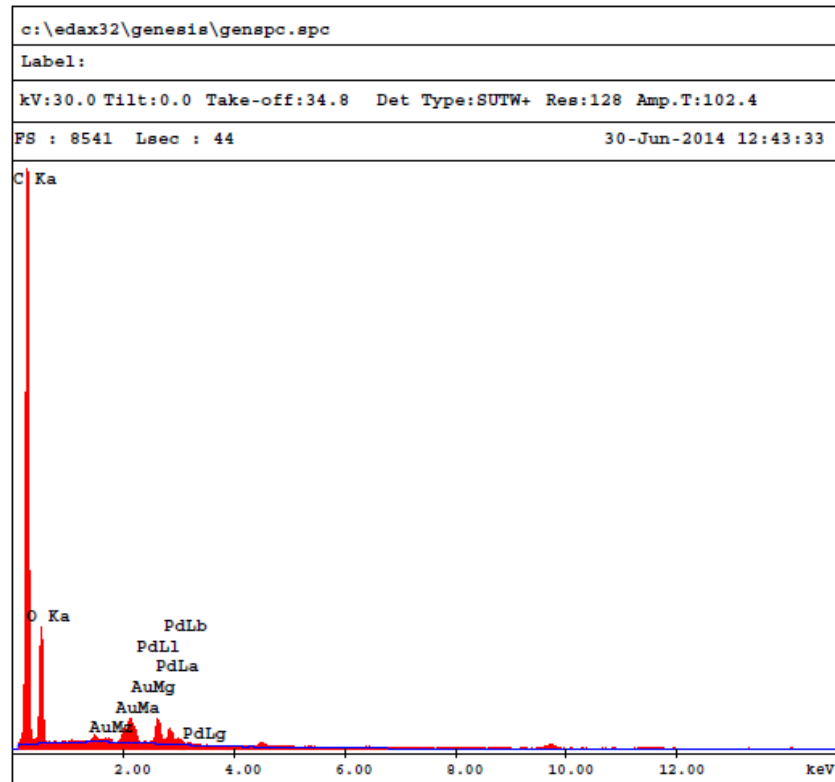
Şekil 3.30. Daldırma yöntemiyle yeni elde edilen Y1 formülasyonunun SEM görüntüleri



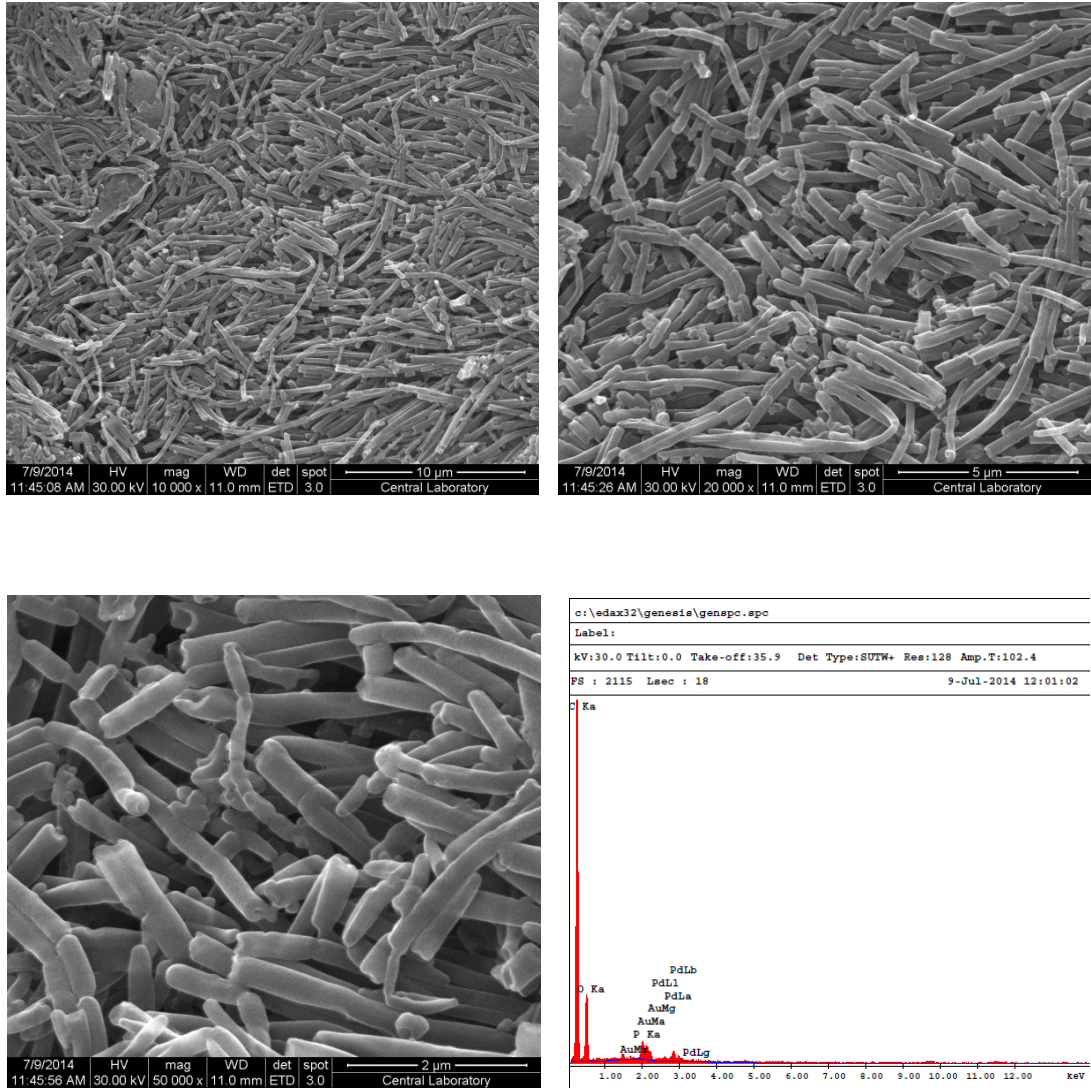
Şekil 3.31. Daldırma yöntemiyle yeni elde edilen Y2 formülasyonunun SEM görüntüleri



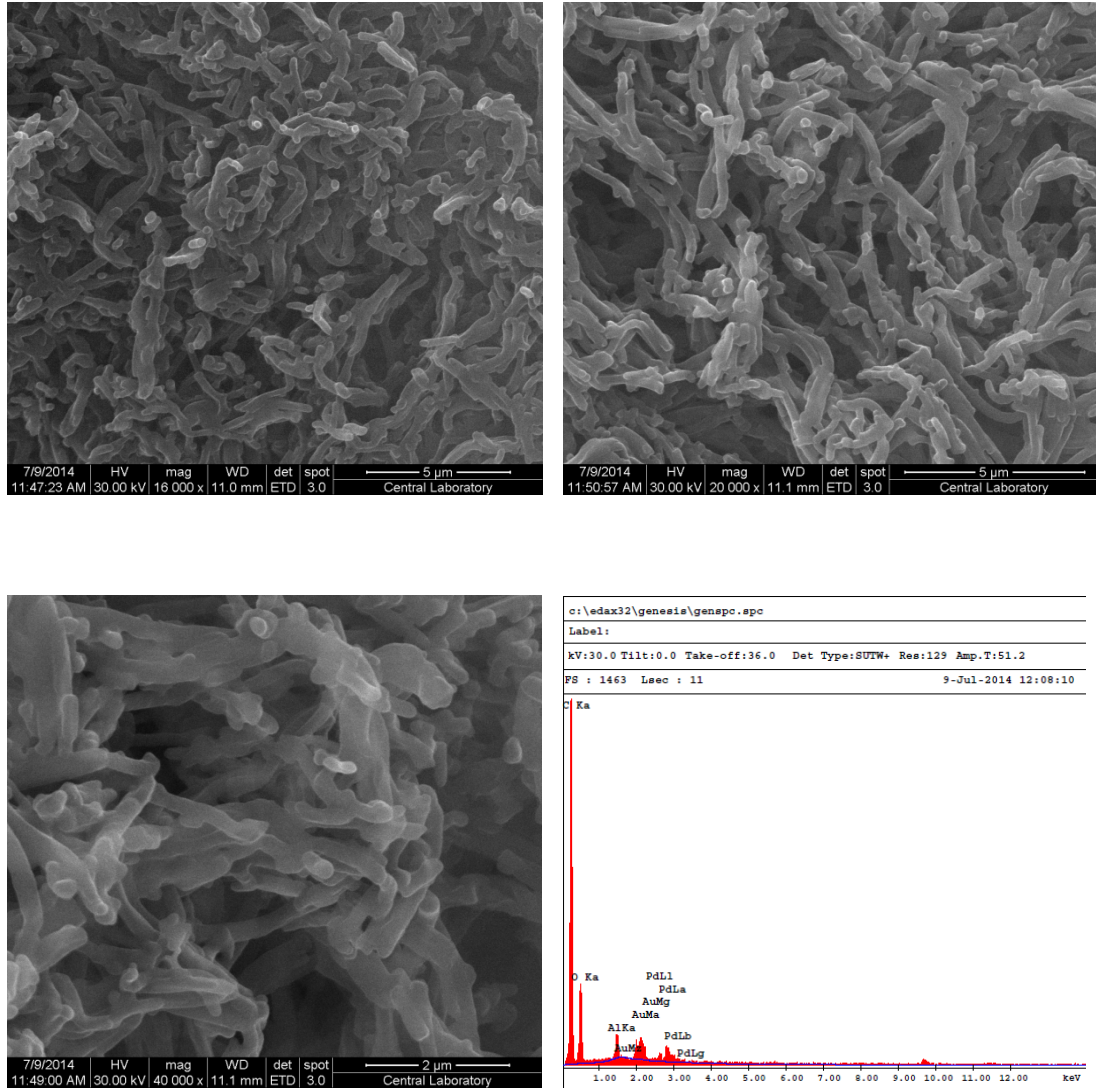
Şekil 3.32. Daldırma yöntemiyle yeni elde edilen Y1 formülasyonunun EDS analizi



Şekil 3.33. Daldırma yöntemiyle yeni elde edilen Y2 formülasyonunun EDS analizi



Şekil 3.34. Daldırma yöntemiyle yeni elde edilen Y3 formülasyonunun SEM görüntüleri ve EDS analizi



Şekil 3.35. Daldırma yöntemiyle yeni elde edilen Y6 formülasyonunun SEM görüntüleri ve EDS analizi

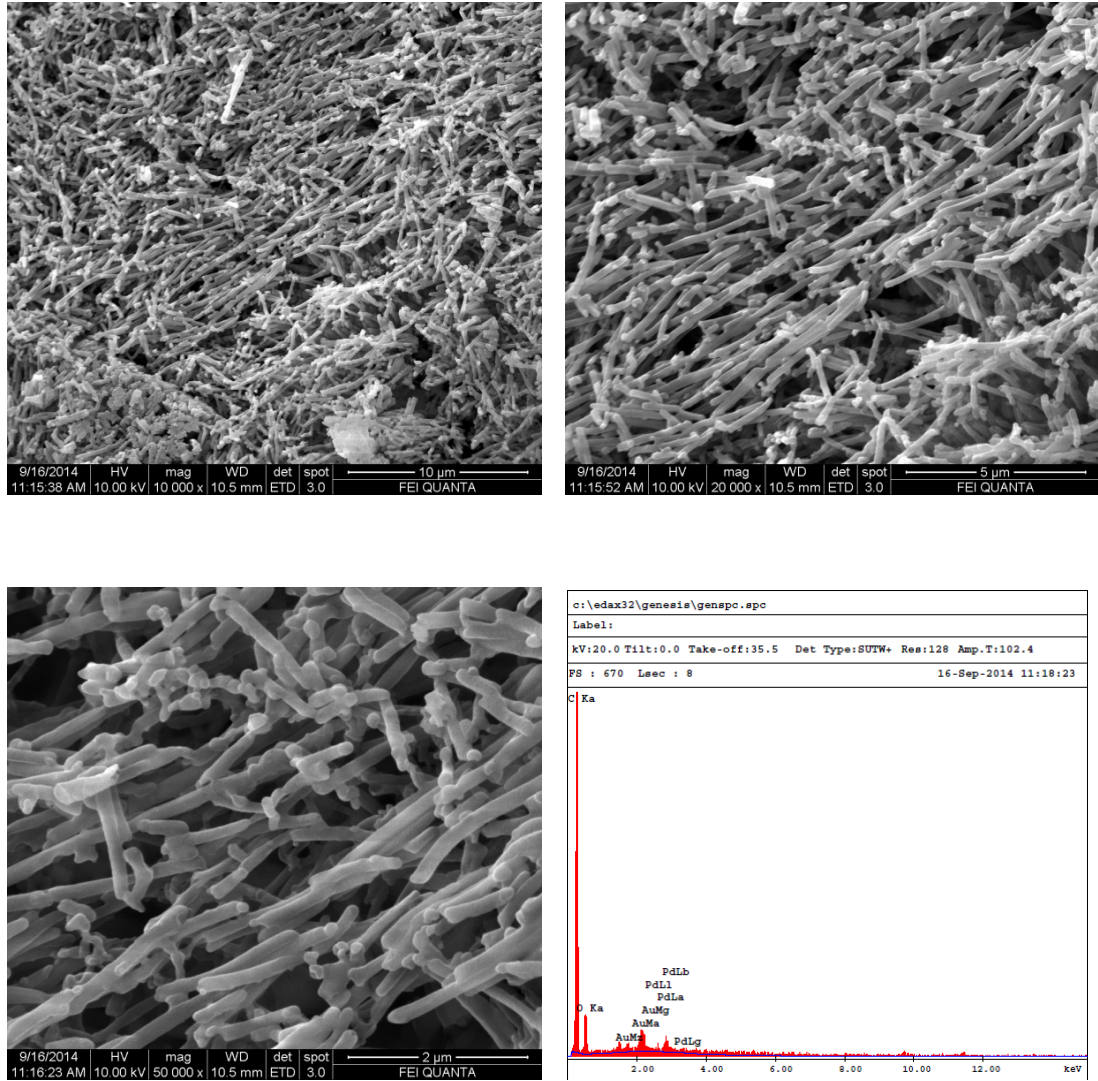
3.2.5.1. AAO Membranı Soğukta Çözme Tekniğiyle Nanoyapıların Üretimi ve İncelenmesine Ait Bulgular

Formülasyon parametreleri istediğimiz şekli alınca önce değerlendirdiğimiz biyobozunur polimerler yeniden değerlendirmeye alınmış ve olumlu sonuçlar elde edilerek bütünlüğünü koruyan yaklaşık 200 nm çaplı partiküllere ulaşılmıştır. Elde edilen partiküllerin yükleme kapasiteleri de önceki formüllere göre daha yüksektir. Biyobozunur polimerler arasında en iyi ETP yükleme etkinliği ve en yüksek üretim verimiyle birlikte en düzgün şekilli partiküller ePLGA diye adlandırdığımız ester uçla biten (ester terminated) PLGA polimeriyle elde edilmiştir.

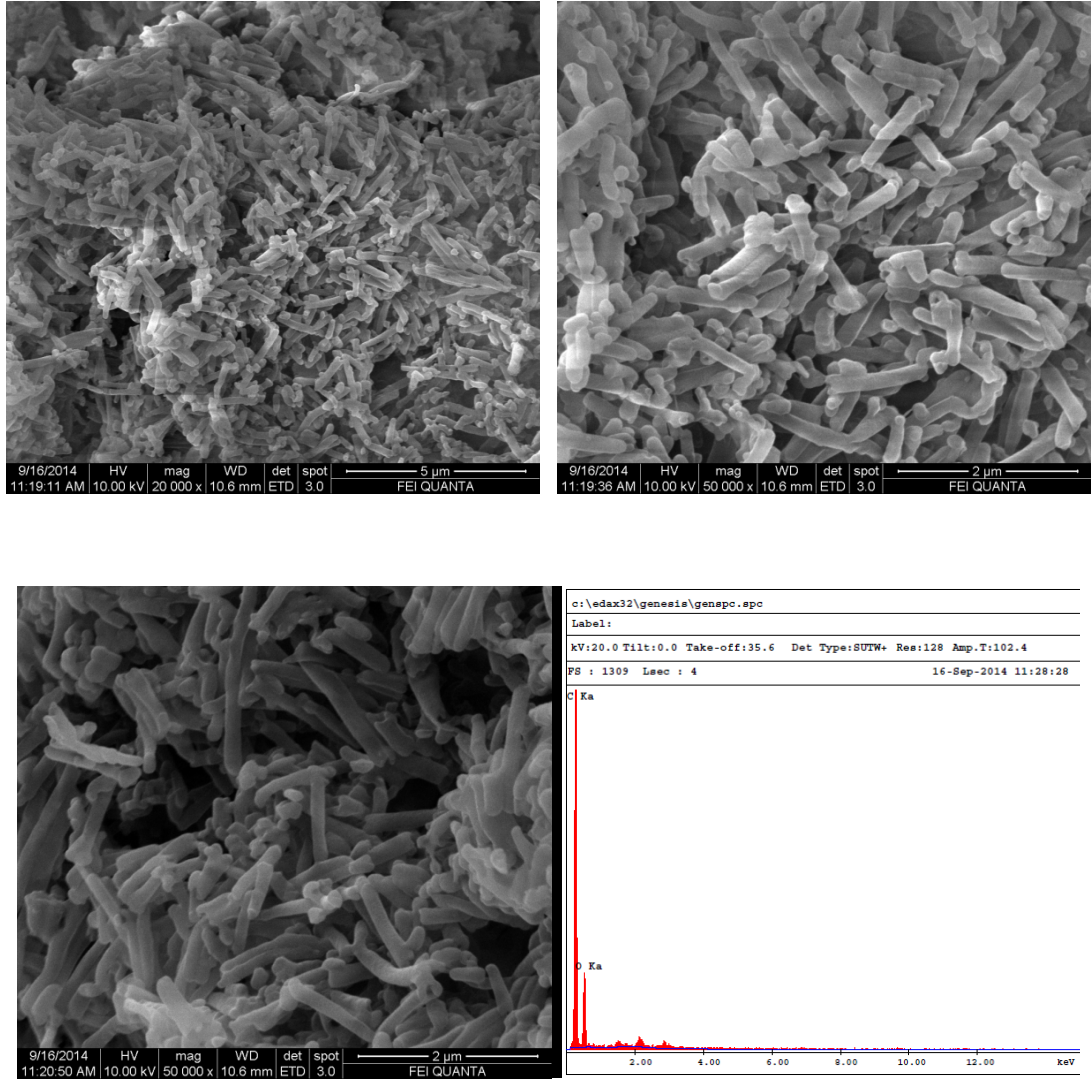
Aynı zamanda PMMA350-P(MEMA) (3:1) oranında kullanılan polimer karışımından da % 25,1 etken madde yükleme etkinliği ve % 86 üretim verimi elde edilmiş olsa da biyobozunur polimer olması sebebiyle ePLGA ile çalışmalara devam edilmiş ve sonuç formül olarak S2 belirlenmiştir.

Çizelge 3.9. Membranı soğukta çözme tekniğiyle elde edilen formülasyonlar ve ETP yükleme kapasiteleri

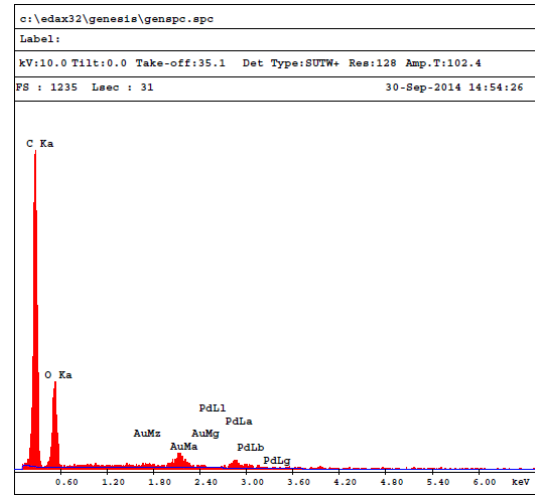
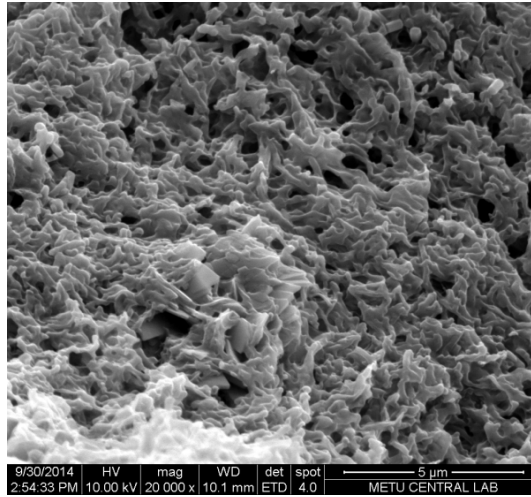
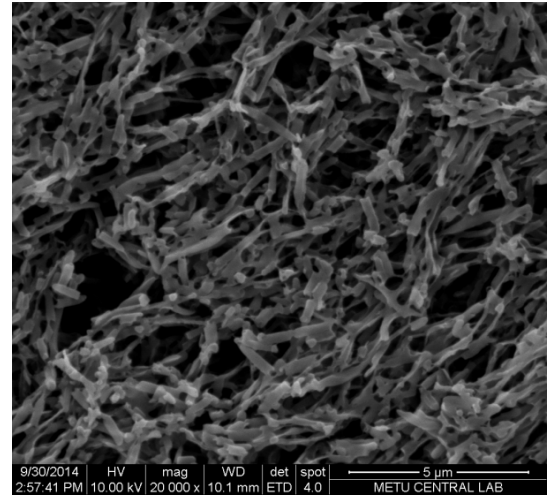
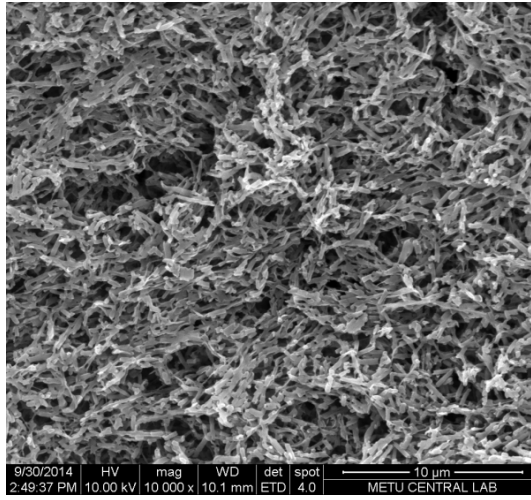
Kod	Polimer ve Konsantrasyonu	Çözücü sistemi (ml)	Polimer/ETP oranı	ETP YE(%)	ETP YK(%)	ÜV (%)
S1	PCL %3	DCM:DMF (5,0:1,0)	10:2	10,25	1,71	55
S2	ePLGA %4	DCM:DMF (5,0:1,0)	10:2	18,21	3,04	84
S3	P(LCG) %4	DCM:DMF (5,0:1,0)	10:2	12,08	2,01	65
S4	PMMA:P(HEMA) (3:1) %4	DCM:DMF (5,0:1,0)	10:2	25,12	4,17	86



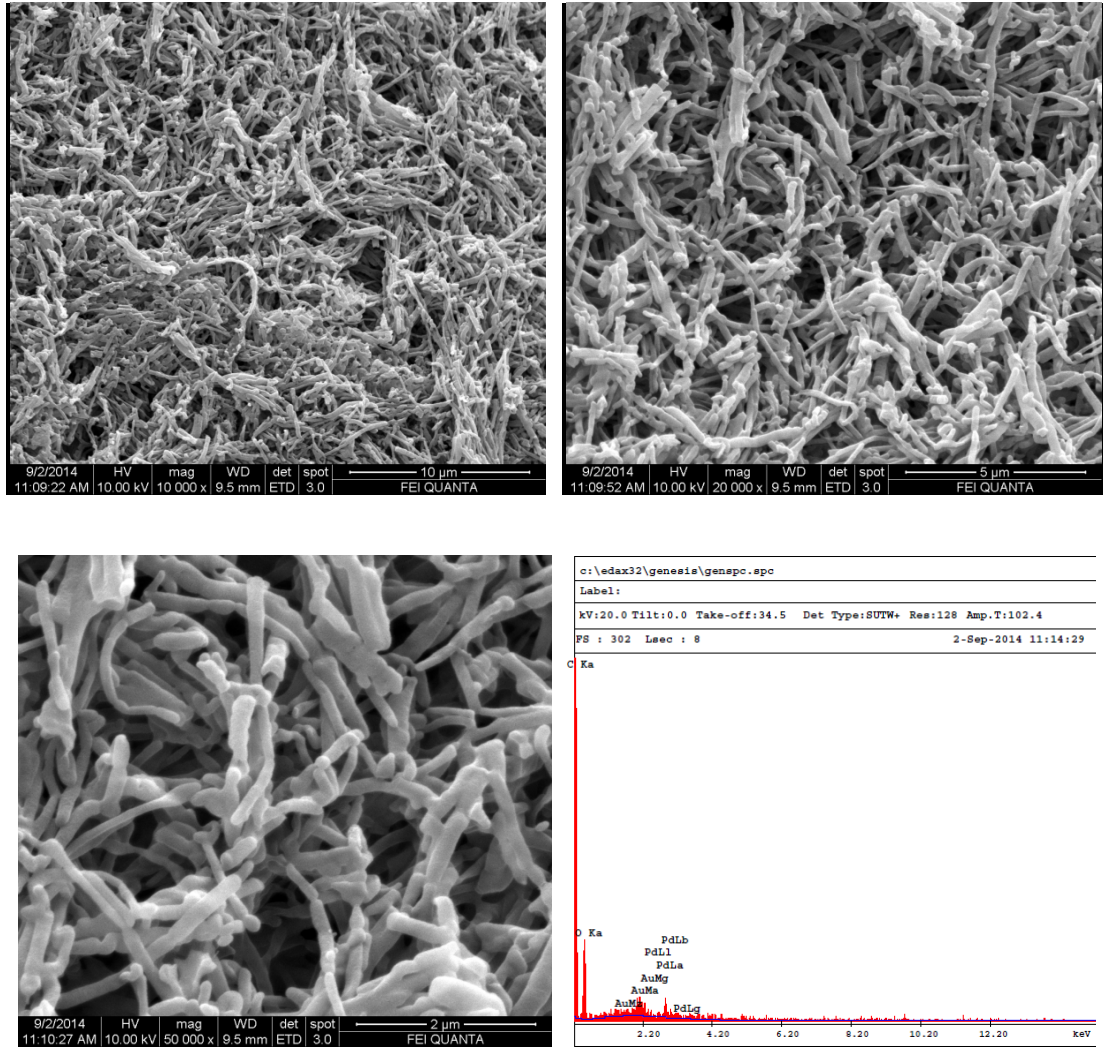
Şekil 3.36. AAO membranı soğukta çözerek elde edilen S1 formülasyonunun SEM görüntüleri ve EDS analizi



Şekil 3.37. AAO membranı soğukta çözerek elde edilen S2 formülasyonunun SEM görüntüleri ve EDS analizi



Şekil 3.38. AAO membranı soğukta çözerek elde edilen S3 formülasyonunun SEM görüntüleri ve EDS analizi



Şekil 3.39. AAO membranı soğukta çözerek elde edilen S4 formülasyonunun SEM görüntüleri ve EDS analizi

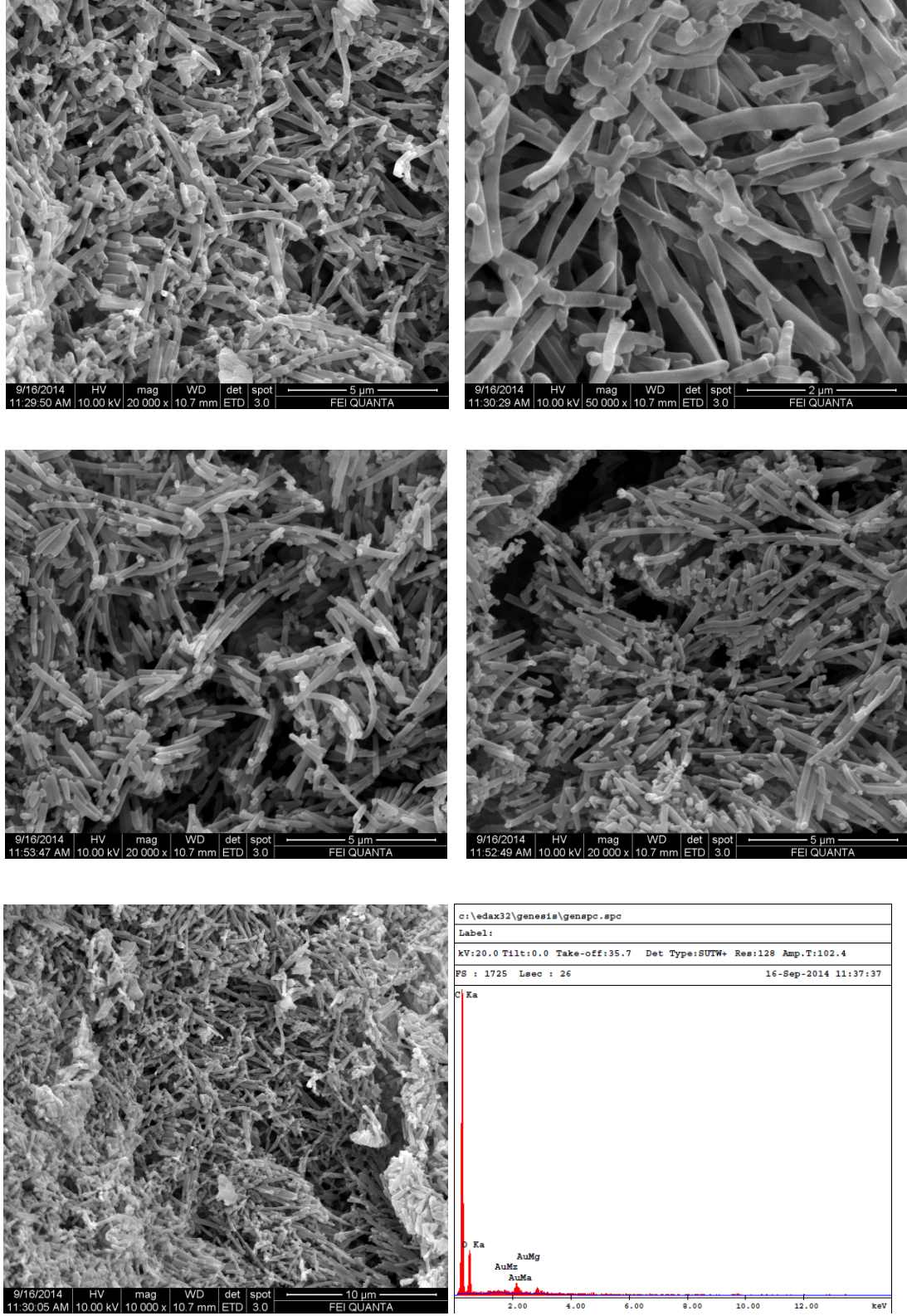
3.2.6. Sonuç Formülasyon Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular

Sonuç açısından en iyi olduğu düşünülen S2 formülasyonundan elde edilen nanoyapılar için, üretim tekrarlanabilirliğinin tayini, zeta potansiyeli tayini, formülasyonun FTIR Analizi ve DSC Analizi, ayrıca etken madde salım çalışması yapılmış, daha sonra hücre kültürü çalışmalarına geçilmiş ve hücresel alım çalışmalarıyla kanser hücreleri üzerinde sitotoksisite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

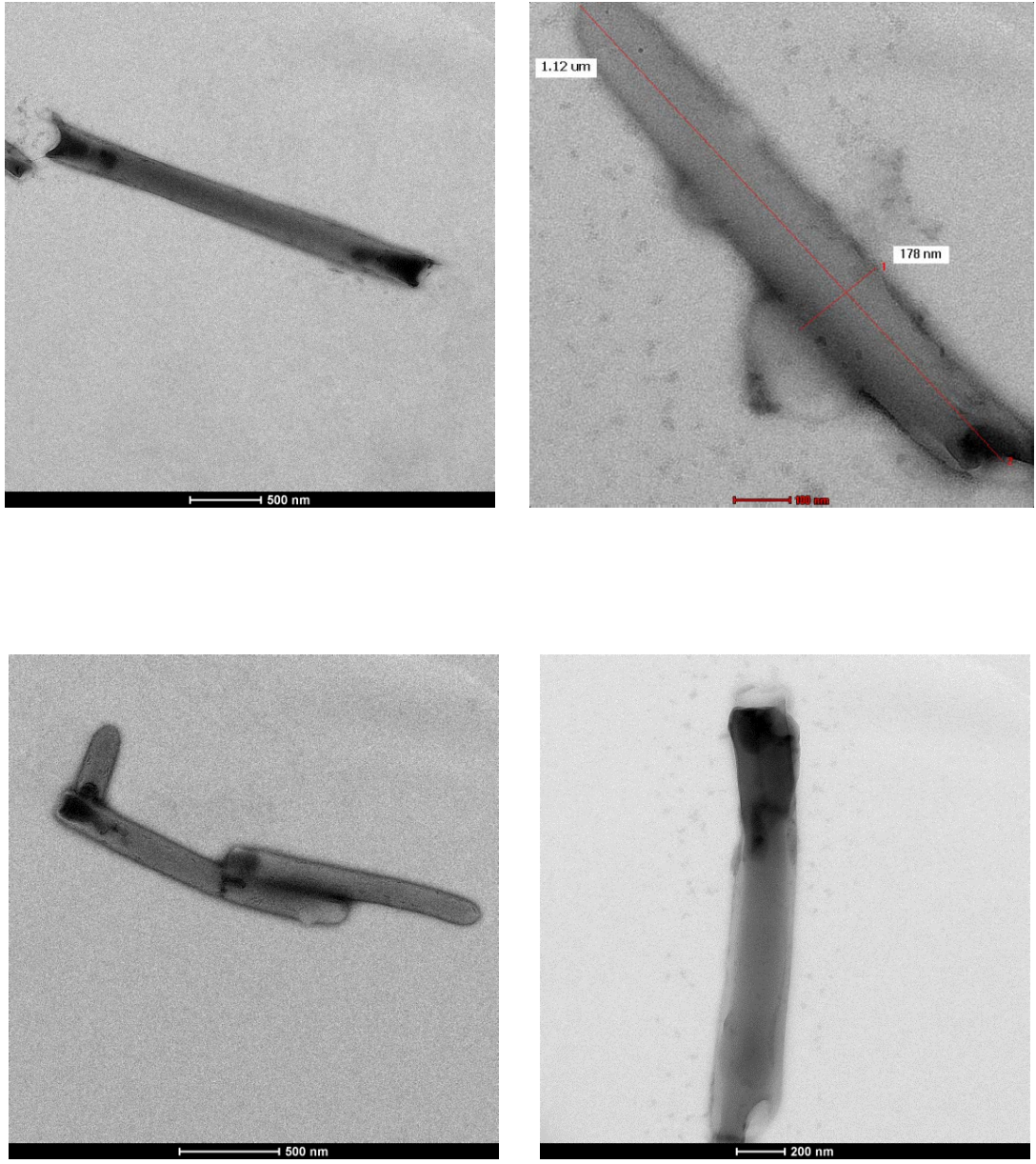
3.2.6.1. Sonuç Formülasyonun Üretim Tekrarlanabilirliğine Ait Bulgular

Çalışmalara sonuç formülü olarak belirlenen S2 formülünün tekrar üretilmesi ile devam edilmiştir. Aynı zamanda S2 formülü ile etken maddesiz formül hazırlanmış ve hem ETP yüklü hem etken maddesiz formülasyonun SEM görüntüleri (Şekil 3.40) tekrar çekilmiş ve detaylı olarak incelenmiştir. Daha sonra nanotübüler yapının detaylı analizi için TEM görüntüleri de çekilmiş ve incelenmiştir. Formülasyonun etken madde yükleme etkinliği yine $18 \pm 0,926$ (n=3) bulunmuş, işlem etkinliği de $84,4 \pm 2,52$ (n=3) olarak tespit edilmiş ve formülasyon üzerinde yapılması düşünülen diğer analizlere geçilmiştir. S2 formülü, beklendiği gibi düzgün ve bütünsel nanoyapılardan oluşmuştur.

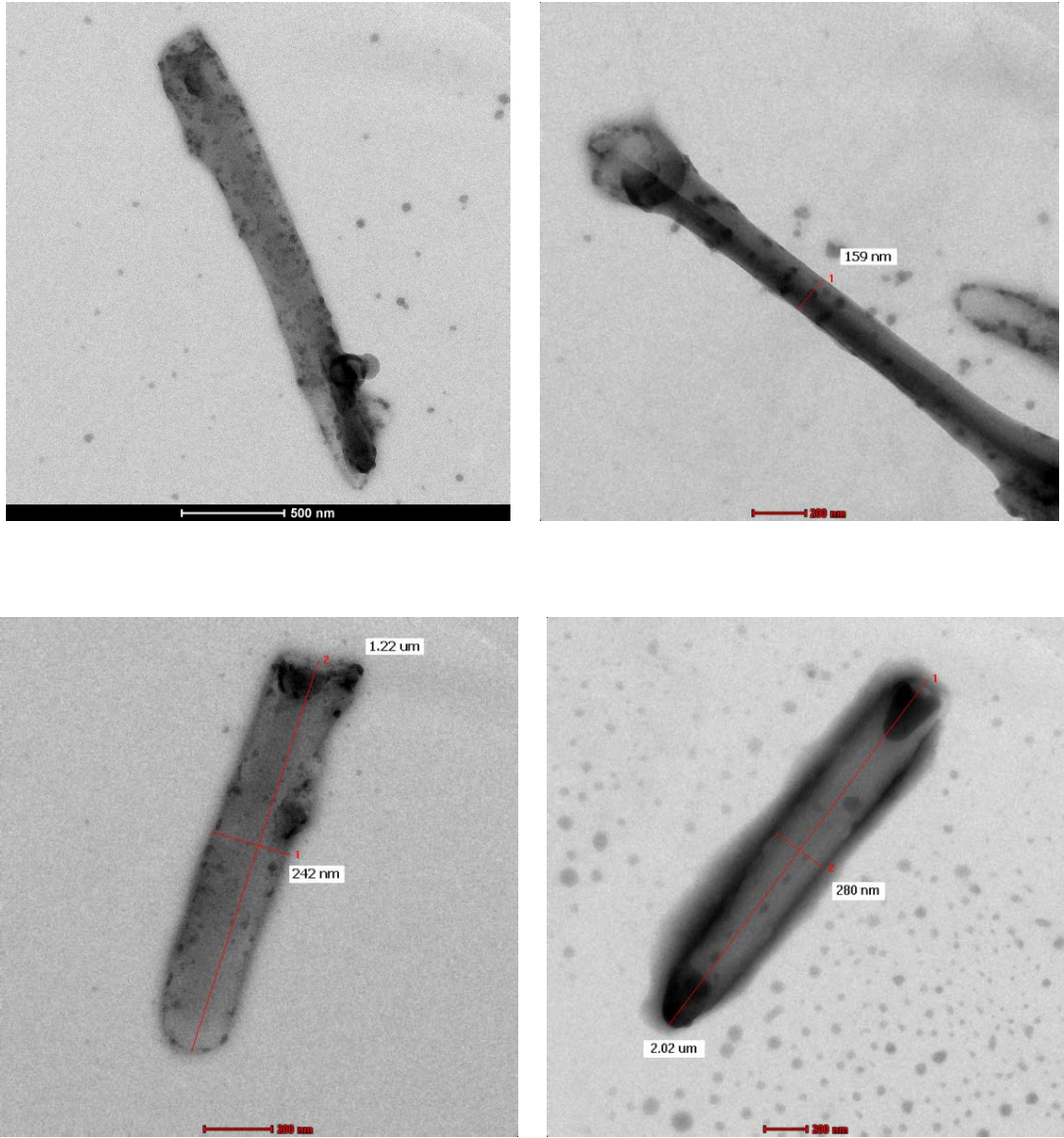
Bu sebeplerle S2 formülünün tekrar elde edilebilirliği kesinleştirilmiş ve üretimi pek çok kere gerçekleştirilmiştir. S2 formülasyonuna ve etken maddesiz boş formülasyona ait SEM (Şekil 3.41, Şekil 3.42) ve TEM (Şekil 3.43, Şekil 3.44) görüntüleri detaylı olarak paylaşılmıştır.



Şekil 3.40. Üretimi tekrarlanan S2 formülasyonunun SEM görüntüleri ve EDS analizi



Şekil 3.43. Etken maddesiz S2 formülasyonunun TEM görüntüleri



Şekil 3.44. Etken madde yüklü S2 formülasyonunun TEM görüntüleri

3.2.6.2. Sonuç Formülasyonun Zeta Potansiyel Analizine Ait Bulgular

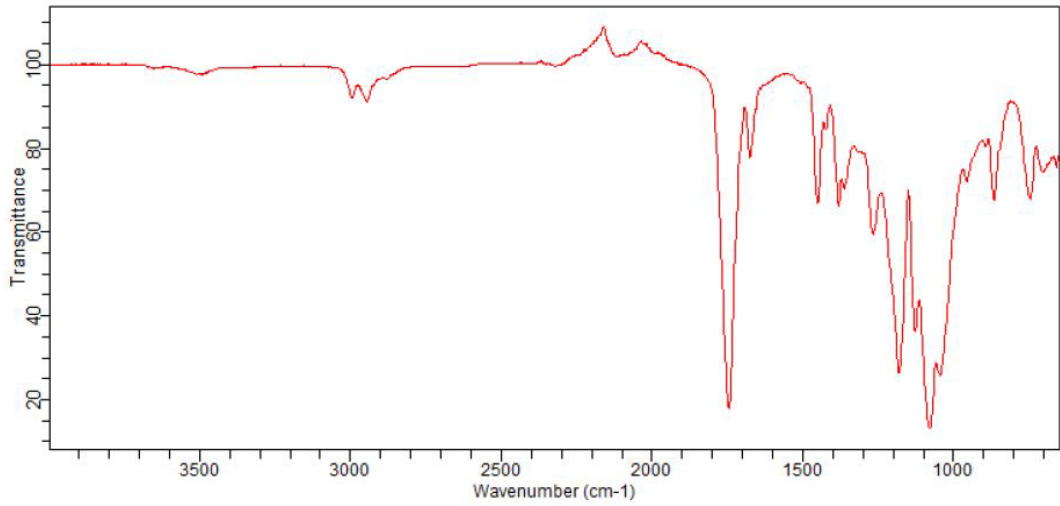
Sonuç formülasyon olan S2 için, ETP yüklü ve etken maddesiz boş nanotübüler partiküllerin dispersiyon halindeki stabilitelerini yorumlamak amacıyla Zeta potansiyelleri (Zetasizer, Malvern Ins.) hem liyofilizasyondan önce hem liyofilizasyondan sonra tayin edilmiştir. Partiküllerin yüzey yüklerini ölçebilmek için partiküller her ölçümde aynı oranda (0,25 µg/ml) seyreltilmişlerdir. Sonuçlar Çizelge 3.10’da paylaşılmıştır.

Çizelge 3.10. Etken madde yüklü ve boş S2 formülasyonlarının zeta potansiyelleri

	Zeta Potansiyeli ± SH*
Boş S2 formülasyonu Liyofilizasyondan önce	- 47,9 ± 0,399
Boş S2 formülasyonu Liyofilizasyondan sonra	- 37,2 ± 0,596
ETP yüklü S2 formülasyonu Liyofilizasyondan önce	- 60,8 ± 0,514
ETP yüklü formülasyonu Liyofilizasyondan sonra	- 53,6 ± 0,348
C6 yüklü S2 formülasyonu Liyofilizasyondan sonra	- 40,5 ± 0,324
ETP ve C6yüklü S2 formülasyonu Liyofilizasyondan sonra	- 38,3 ± 0,117

3.2.6.3. Sonuç Formülasyonunun FTIR Analizine Ait Bulgular

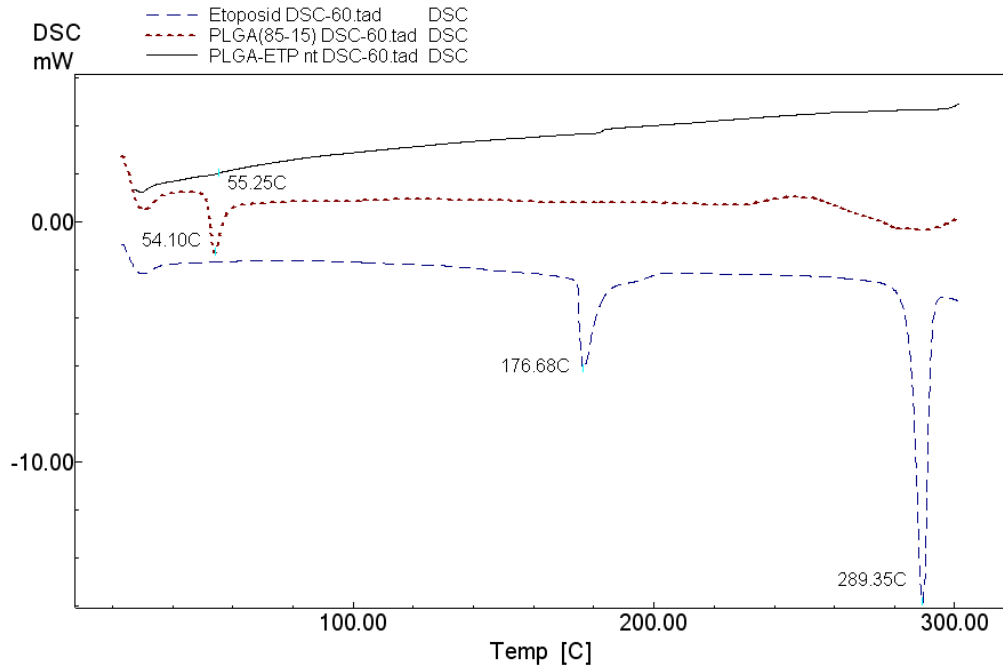
FTIR cihazı yapısında bulunan elmas kristali ile potasyum bromür kullanımına ihtiyaç kalmadan örnekleri FTIR spektrumlarının alınmasına imkan vermektedir. Nanotübüler partiküller doğrudan toz olarak cihazın elmas kristali olan özel bölmesine yerleştirilip, PLGA polimeri ise toz edilemediği için DCM ile film halinde hazırlanıp basıldıktan sonra $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ dalga aralığında FTIR spekturumu alınmıştır. Elde edilen ortak spektrum Şekil 3.45'te paylaşılmıştır.



Şekil 3.45. Sonuç formülasyonunun FTIR spektrumu

3.2.6.4. Sonuç Formülasyonunun DSC Analizine Ait Bulgular

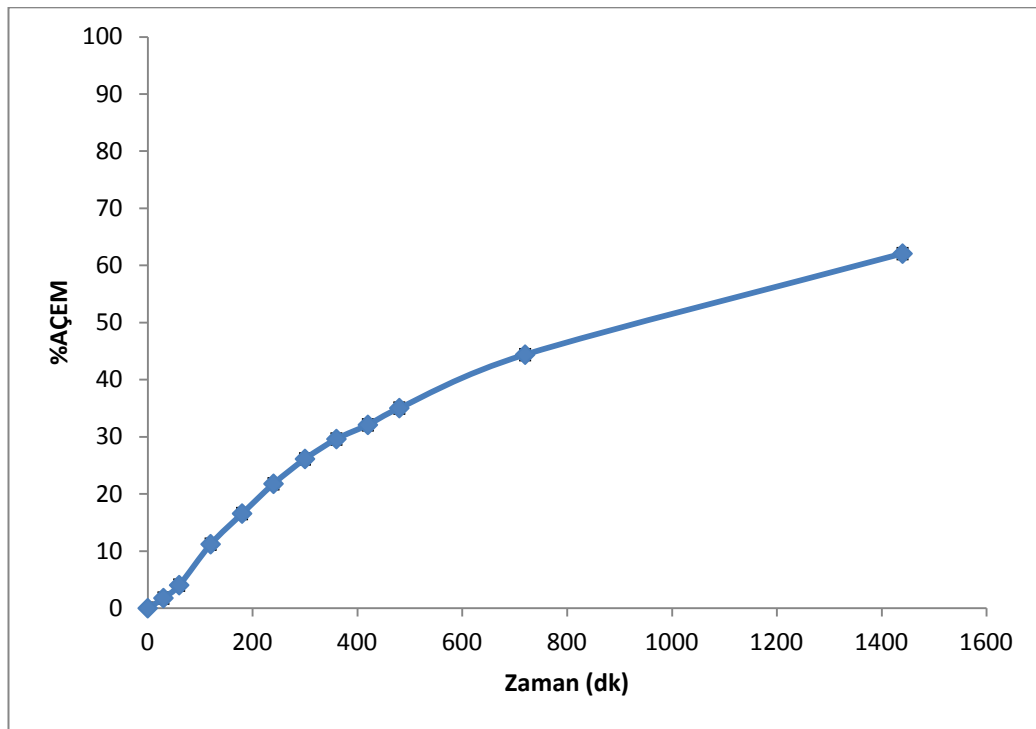
DSC kullanılarak nanotübüler partiküllerin ve ayrıca PLGA polimerinin termal analizleri yapılmıştır. 2,5 mg formülasyon ve ayrıca 2,5 mg PLGA polimeri tartılarak alüminyum panlar içine konulmuş ve preslenerek kapatıldıktan sonra cihaza yerleştirilmiştir. Çalışmada, 1 atm basınçtaki azot gazı (50ml/dakika) altında, 20-300 °C sıcaklık aralığında 10°C/dakika ısıtma hızında sıcaklık artırılarak termogramlar elde edilmiştir. Karşılaştırmalı görüntü Şekil 3.46'da paylaşılmıştır.



Şekil 3.46. Sonuç formülasyonunun DSC termogramı ve karşılaştırılması

3.2.6.5. Sonuç Formülasyonunun Etkin Madde Salım Çalışmasına Ait Bulgular

En yüksek etkin madde yükleme kapasitesine sahip olan S2 formülasyonundan 0,2mg ETP'ye eşdeğer oranda nanopartikül kullanılarak yapılan etkin madde salım çalışmasında 24 saatte etkin madde çıkışı tamamlanmış ve ardından salım platoya ulaşmıştır. Etkin madde salım çalışmasında ilk saatlerde hızlı salım etkisi (burst effect) gözlenmemiş, çıkış yavaş yavaş devam etmiş ve 24 saat sonunda %AÇEM $62,07 \pm 2,72$ olarak bulunmuştur. Üç paralel olarak gerçekleştirilen çalışmada tüm zaman noktalarında elde edilen veriler için standart sapma değerleri çok düşük çıkmıştır. Etkin maddenin *in vitro* salımı sırasıyla Sıfır derece, Birinci derece ve Higuchi kinetikleriyle değerlendirilmiş ve r^2 değeri en yüksek tespit edilen Higuchi kinetiğine ($r^2=0,9804$) uyum gösterdiği bulunmuştur.



Şekil 3.47. Sonuç formülasyonunun etkin madde salım grafiği (Ortalama±standart sapma, n=3)

3.2.7. Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular

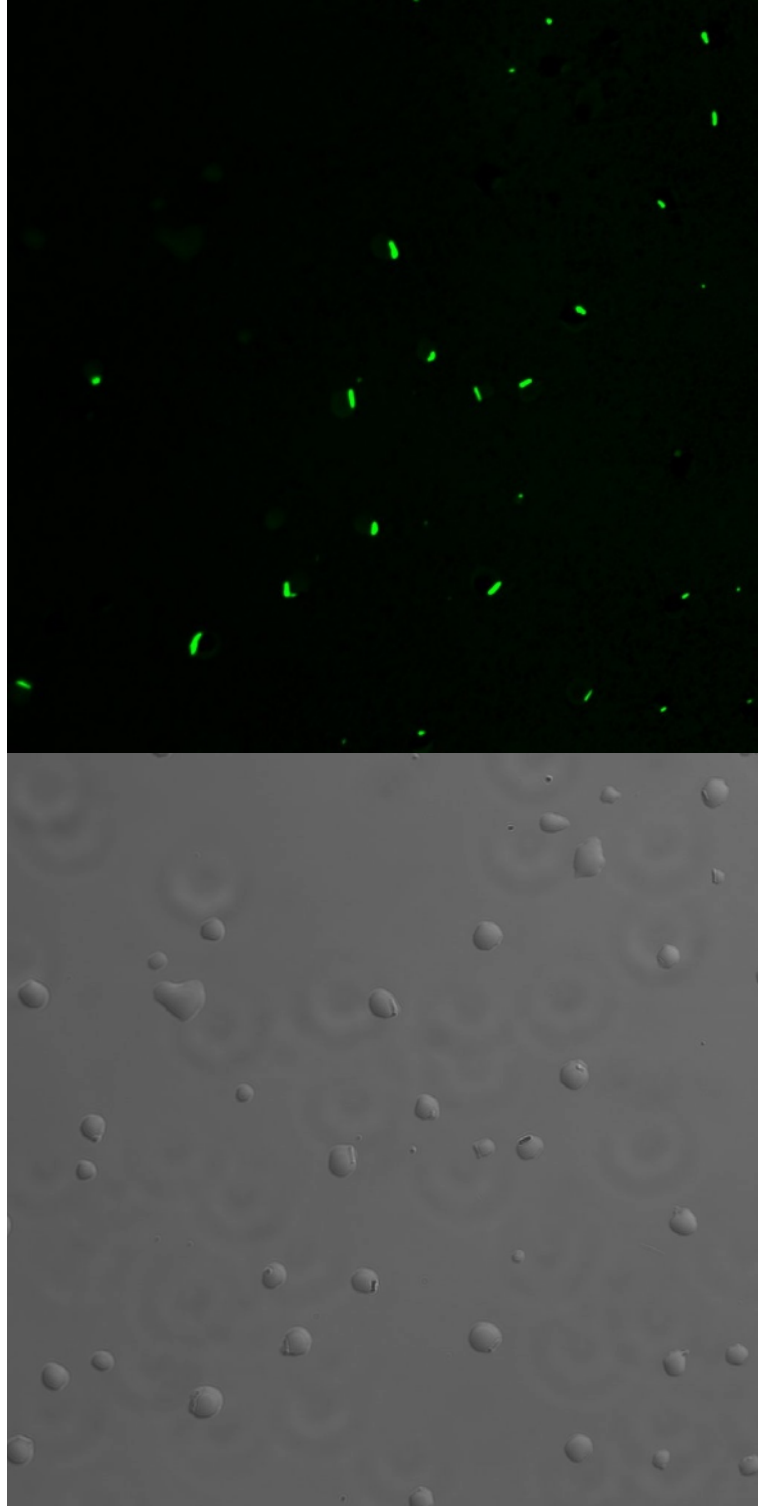
3.2.7.1. Hücresel Alım Çalışmalarına Ait Bulgular

Yöntem kısmında anlatıldığı gibi MCF7 hücreleri ve A549 hücreleri, C6 ile boyalı ETP yüklü nanotübüler yapılarla 2 saat ve 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süreleri sonunda hücreler % 4 formaldehitte sabitlenmiş ve konfokal mikroskop ile görüntülenmiştir. Şekiller, aynı resmin floresan görüntülü hali ve floresan görüntüsü olmadığı hali (negatifi) şeklinde ard arda verilmektedir. Bu sayede bütün hücrelerin sınırları, çekirdekleri ve hatta içlerine aldıkları nanoçubuğun yapısı bile net bir şekilde gözlenebilmiştir.

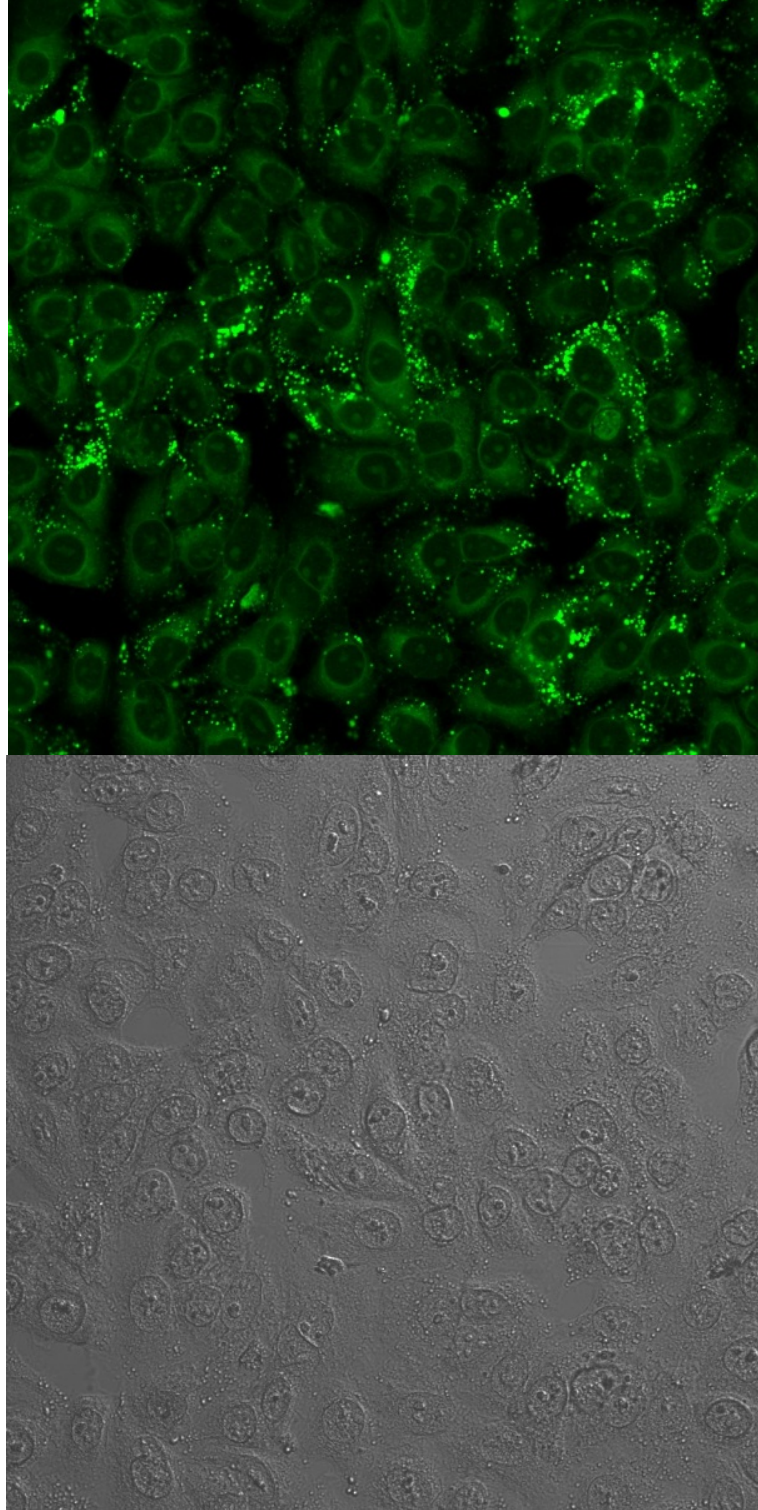
Şekillerde ilk önce PBS içinde disperse edilmiş C6 yüklü nanoçubukların floresan görüntüsü ve negatifi paylaşılmıştır. Bu görüntüde nanoçubukların belirgin olarak tek tek dağıldığı belirlenmiştir. Negatif görüntüsünde ise tek tek dağılan nanoçubukların tam etrafında mini baloncuklar olduğu tespit edilmiştir.

Devam eden şekillerde sırasıyla, A549 hücrelerinin 2. saatteki (Şekil 3.48) ve 4. saatteki (Şekil 3.49) görüntülerinin ardından, MCF7 hücrelerinin 2. ve 4. saatteki görüntüsü negatifleleriyle birlikte verilmiştir (Şekil 3.50 ve Şekil 3.51). Şekillerde de görüldüğü gibi neredeyse tüm hücreler floresan madde yüklenmiştir. Buna ek olarak inkübasyon süresi 2 saatten 4 saate çıkarıldığında hücre içinde yoğunlaşan floresan miktarının arttığı gözlenmiştir.

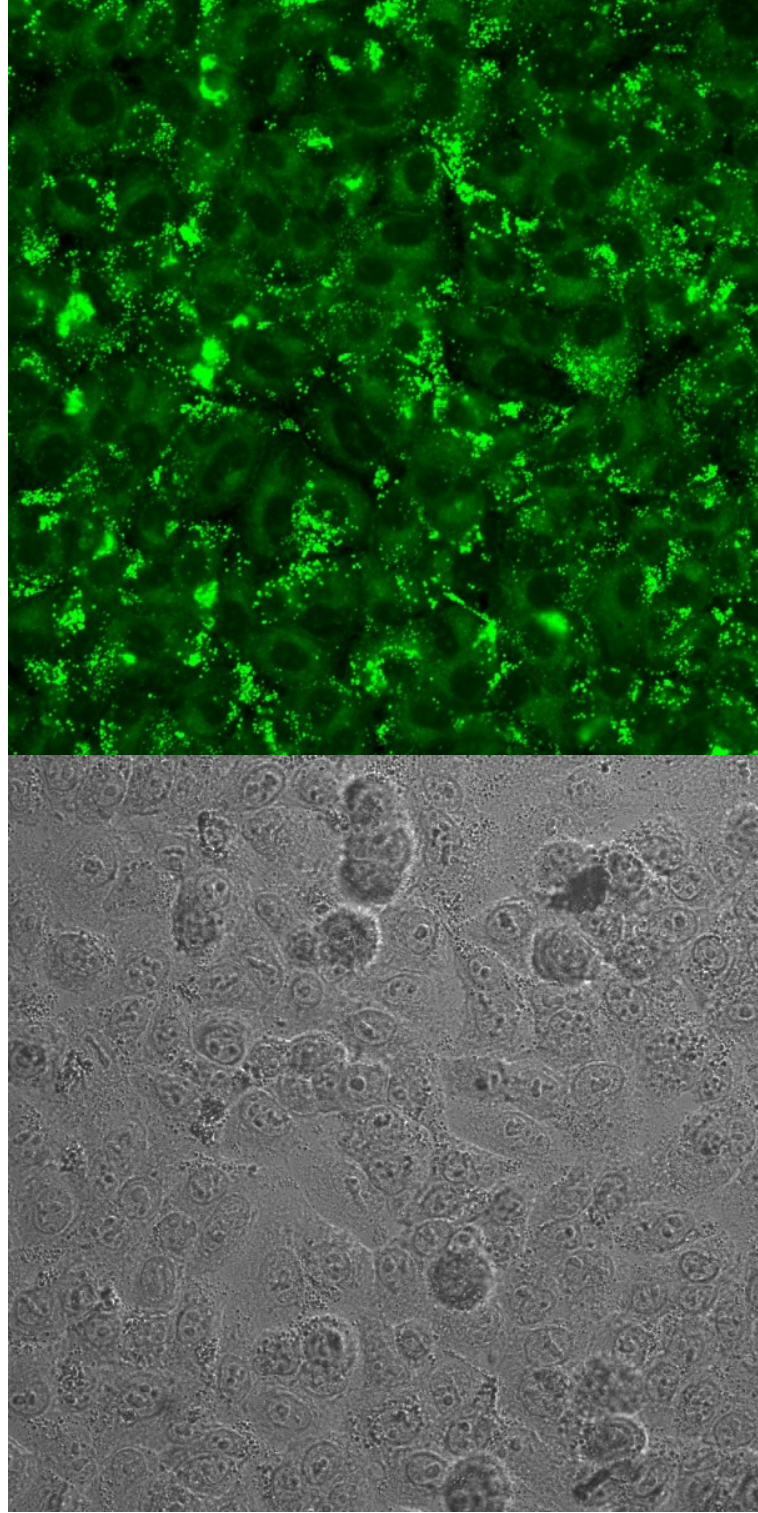
Özellikle daha iri olan MCF7 hücrelerinin negatifleleri dikkatle incelendiğinde, hücrelerin nanoçubukları almak için dışarı doğru uzantılar oluşturduğu net bir şekilde görülebilmiş, nanoyapıların hücre çekirdeği çevresinde ve hatta hücre çekirdeğin içinde yoğunlaştığı belirlenebilmiştir (Şekil 3.53).



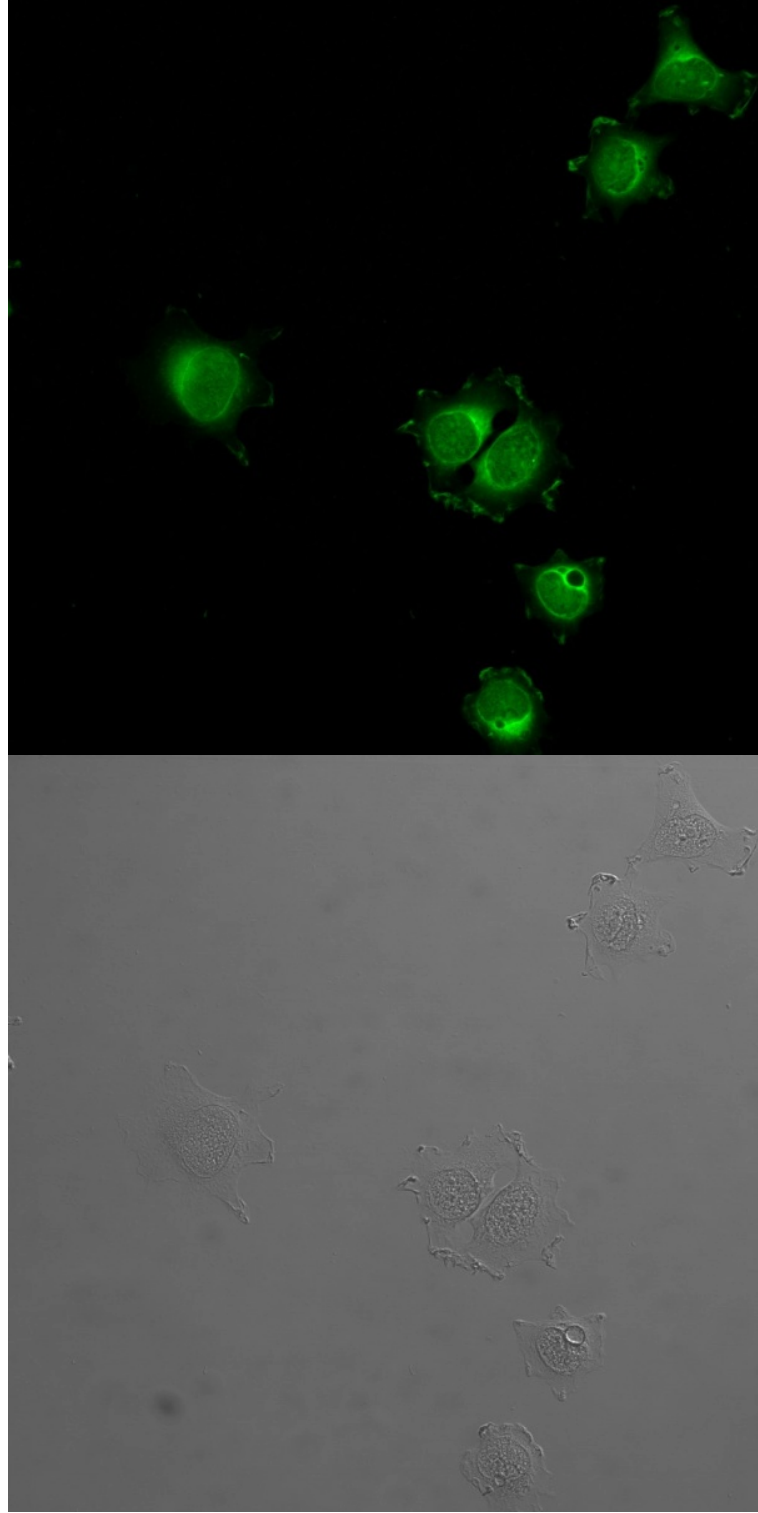
Şekil 3.48. C6 yüklü nanoçubukların floresan görüntüsü ve negatifi



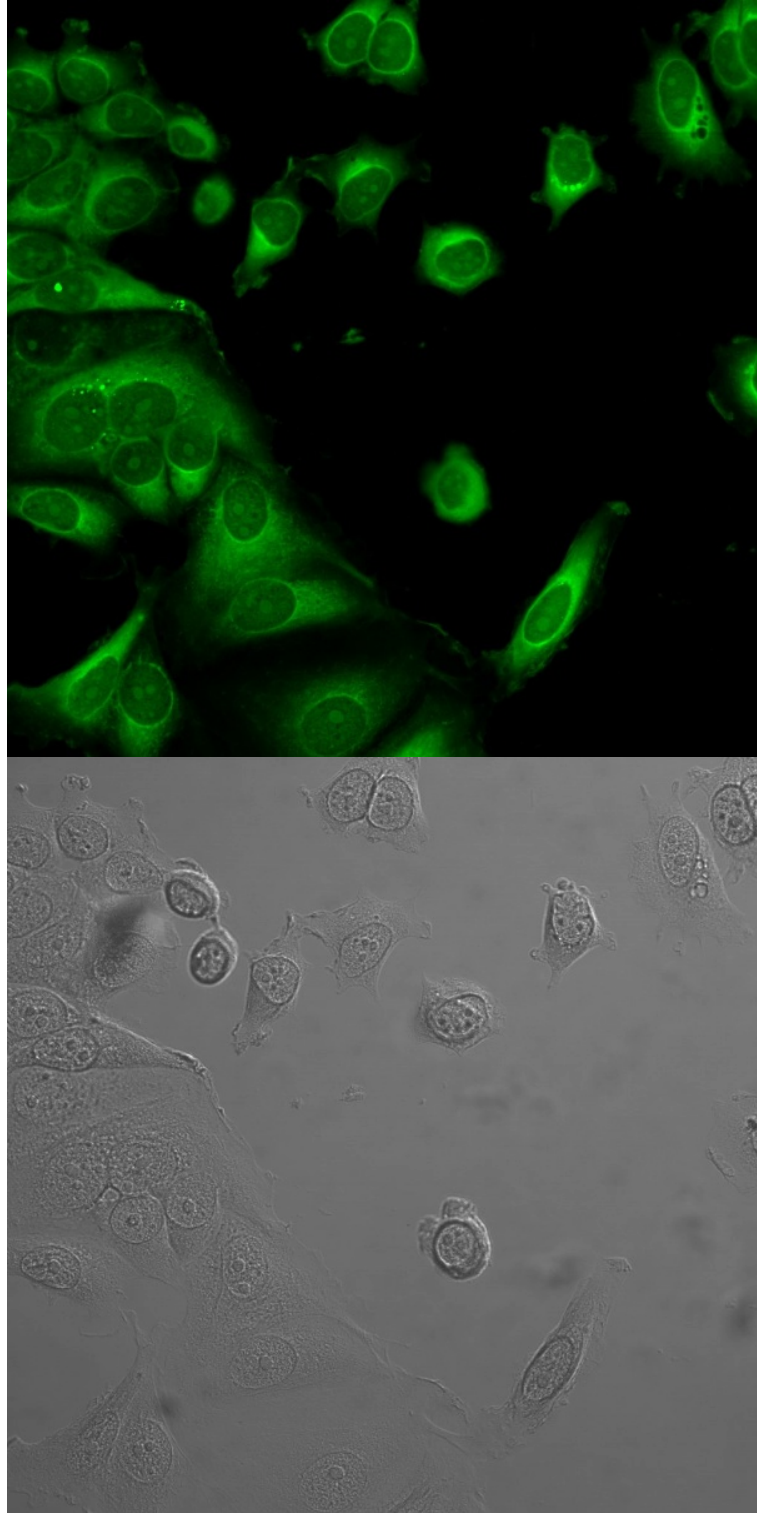
Şekil 3.49. A549 hücrelerinin 2. saatteki görüntüsü ve negatifi



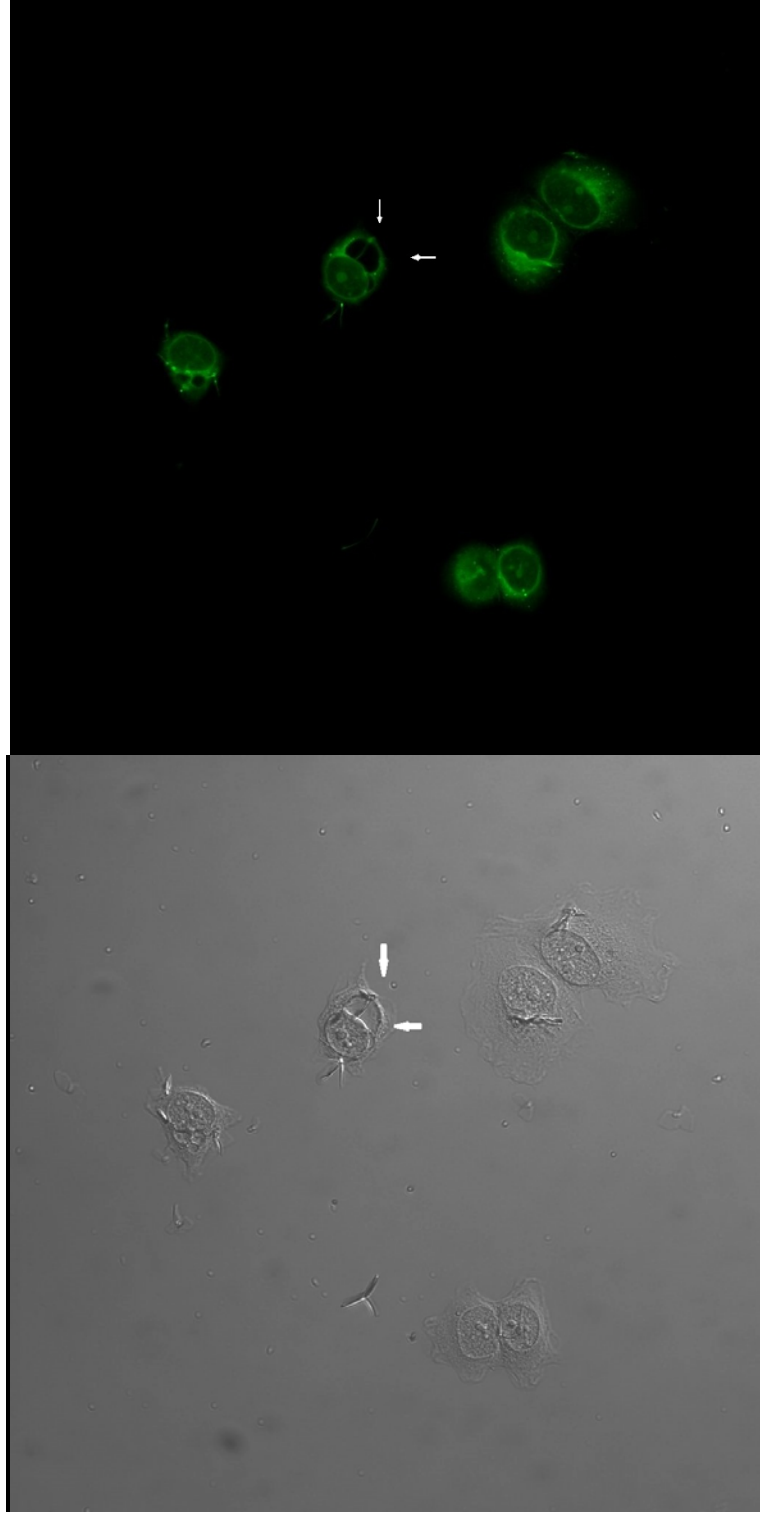
Şekil 3.50. A549 hücrelerinin 4. saatteki görüntüsü ve negatifi



Şekil 3.51. MCF7 hücrelerinin 2. saatteki görüntüsü ve negatifi



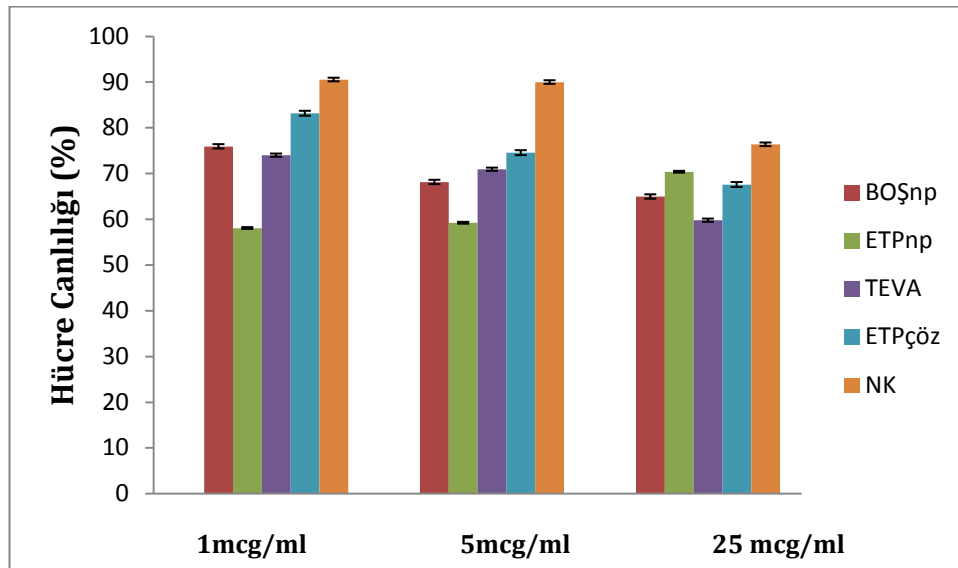
Şekil 3.52. MCF7 hücrelerinin 4. saatteki görüntüsü ve negatifi



Şekil 3.53. MCF7 hücresinin nanoçubuğu içine aldığı varsayılan görüntü ve negatifi

3.2.7.2. Kanser Hücrelerinde Sitotoksosite Çalışmalarına Ait Bulgular

A549 hücreleri üzerinde yapılan 48 saatlik sitotoksosite çalışmasında elde edilen bulgularda; hücelere hiçbir uygulama yapılmayan Kontrol grubu %100 canlı kabul edilmiştir. ETP yüklü nanopartiküllerin (ETPnp) sitotoksik etkisi 1µg/ml, 5µg/ml ve 25µg/ml doz için sırasıyla % 41,94±0,20, % 40,79±0,18 ve % 29,94±0,18 olarak bulunmuştur. Aynı dozlarda piyasadan temin edilen ETP enjeksiyonluk preparatı (TEVA) için sitotoksik etkiler sırasıyla % 26,00±0,35, %29,08±0,45 ve % 40,23±0,37 olarak tespit edilmiştir. Diğer taraftan piyasa preparatının yardımcı maddeleriyle aynı oranlarda hazırladığımız ETP çözeltisi (ETPçöz) için yine aynı dozlarda sırasıyla %16,85±0,54, %25,46±0,26 ve %32,43±0,43 sitotoksosite hesaplanmıştır. Negatif kontrol (NK) olarak kullandığımız ve sadece piyasa preparatının yardımcı maddeleriyle aynı oranlarda hazırladığımız grup için sitotoksosite değerleri sırasıyla % 9,47±0,30, %10,03±0,58 ve %23,64±0,40 olarak bulunmuştur. ETP içermeyen nanopartiküllerin (BOŞnp) de aynı dozlarda öldürücü etkisi sırasıyla %24,08±0,48, %31,87±0,25 ve %35,05±0,18 çıkmıştır. Bu sonuçlara göre elde ettiğimiz ETPnp'in 1µg/ml ve 5µg/ml dozda tüm gruplar arasında en yüksek sitotoksosite gösterdiği bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 3.54. Sitotoksosite çalışmasına ait grafik (Ortalama±standart sapma, n=6)

4. TARTIŞMA

4.1. ETP Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi

ETP'nin FTIR çalışmasından elde edilen spektrum (Şekil 3.1) etken maddenin açık formülüyle karşılaştırıldığında, belirleyici kimyasal grupları ifade eden absorpsiyon bantlarının çekilen FTIR spektrumunda da yer aldığı saptanmıştır. Belirleyici kimyasal gruplardan özellikle C=O gerilimi ve -OH gerilimi ETP'yi ifade eden karakteristik absorpsiyon pikleri 3389 cm^{-1} (O-H bandı), 2861 cm^{-1} (C-H bandı), 1254 cm^{-1} ve 1097 cm^{-1} (C-O bandı) olarak tespit edilmiştir. Yapılan literatür incelemeleri (Qin ve ark., 2013) sonucunda da ETP'ye ait belirleyici kimyasal gruplarını ifade eden absorpsiyon bantlarının (Şekil 3.2) aynı yerlerde olduğu görülmüştür.

DSC, kristal halindeki maddelerin erime noktaları, amorf maddelerin camsı geçiş sıcaklıkları, erime ısıları gibi pek çok fizikokimyasal özelliğini belirlemek için kullanılan önemli bir termal analizdir. Test örneği ile referansı aynı sıcaklıkta tutmak için gerekli enerjinin ölçülmesi esasına dayanır. Etken maddenin saflık, polimorfizm, çözünme, bozunma gibi analizlerinde, formülasyonlarda ise yardımcı maddelerle oluşan geçimsizlik çalışmalarında DSC yaygın olarak kullanılır. Şekil 3.3'de verilen ETP'nin DSC termogramında 176°C karşılık gelen ilk endotermik pikin ETP'nin erimesini, bundan hemen sonra çok az belirgin olan ekzotermik pikin sıcaklığın etkisiyle yeni bir polimorfuna kristalize olduğunu göstermektedir. Bunun devamında 289°C karşılık gelen pikin yeni oluşan polimorfun kristal erime noktasını (Şekil 3.4) belirten bir endotermik pik olduğu tespit edilmiştir (Solano ve ark., 2013).

HPLC analizine ait bulgulara Bölüm 3.1.4'de ETP'nin Asetonitril: pH 5,0 fosfat tamponu mobil fazında, asetonitril ortamında verdiği pikin literatürlere uygun olarak 220nm (Shirazi ve ark., 2001) dalga boyunda ölçülmesiyle 4,7 dakikada geldiği bulunmuştur. Bu yöntem için yapılan analitik validasyon çalışmasında doğruluk ve geri elde değerlendirmesinde hesaplanan % bağıl standart sapma (%BSS) değerleri kalibrasyonda %2'nin altında bulunmuştur. Bu miktar tayini yöntemlerinin doğruluğunu göstermektedir. Analitik yöntemin kesinliğini incelemek amacıyla yapılan deneylerde asetonitril ortamında yine %2'nin altında olan %BSS değerleri yöntemin tekrarlanabilir olduğunu ifade etmektedir.

Analitik validasyon parametreleri incelendiğinde ETP'nin miktar tayini için kullanılan analitik yöntemin sağlamlığı, doğruluğu, kesinliği ve tekrarlanabilirliği ispat edilmiştir. Kullanılan diğer maddelerle ve çözücülerle ETP pikinin HPLC'de hiçbir girişim yapmaması da yöntemin özgünlüğünü göstermektedir.

4.2. Nanoyapıların Üretimi ve İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Çalışmamızda nanotübüler yapıları elde etmek için kullandığımız membran ıslatma yöntemi, yüzey ıslanabilirliği ve kapiller kuvvetlerle yürüyen bir işlemdir. Bu yöntemde, düşük enerjili yani hidrofobik olan sıvı (polimer çözeltisi), yüksek enerjili yani inorganik ve iyonik olan katı (AAO) membranın dikey nanokanalcıklarının içine dağılmaktadır. Bu bilgiler ışığında nanoporlu membranları ıslatma yönteminde öncelikle polimer seçimi yapılmıştır. Antikanserojen etkili, hidrofobik karakterdeki etken maddemizin yükleneceği nanotübüler ilaç taşıyıcı sistemi elde etmek için öncelikle biyobozunur polimerler değerlendirmeye alınmıştır.

Etken madde yüklenecek olan formülasyonların hazırlanacağı polimerin seçiminde ETP'nin PCL ve PLGA ile hazırlanmış olan bir polimerik mikropartikül çalışmasından yola çıkılmıştır (Vivek ve ark., 2007). Yapılan çalışmada polimer/etken madde oranı, 20:1 olarak kullanılan formülasyonların tüm

mikropartiküller için en yüksek yükleme etkinliğine sahip olduğu belirtilmiş, kullanılan polimerler arasında ise PCL'nin en yüksek etken madde yükleme kapasitesine sahip polimer olarak bulunduğu söylenmiştir. Ayrıca PCL ile elde edilen mikropartikül formülasyonlarının en düşük hızlı çıkış etkisi (burst effect) göstererek en uzun sürede salım sağladığı belirtilmiştir. Bu sebeplerle ETP formülasyonlarını hazırlama açısından ilk ve en çok üzerinde durulan polimer PCL, başlangıç olarak ilk denenilen polimer/ETP oranı, 20:1 olmuştur.

4.2.1. Damlatma Yöntemiyle Elde Edilen Nanoyapıların Değerlendirilmesi

Membranları polimer çözeltisi damlatarak ıslatma (damlatma) yönteminde formülasyonları hazırlarken etken madde içeren polimer çözeltilerinde çözücünün seçiminin çok önemli olduğu belirlenmiştir. Çok iyi organik çözücünün polimer çözeltisi porlara dolmadan çabucak uçacağı, iyi olmayan çözücünün ise polimer zincirleri arasındaki koordinasyonu sağlayamayıp, polimer çözeltisini nanoporlara yeterince sürükleyemeyeceği belirtilmiştir (Schlitt ve ark., 2008).

PCL çözeltisinin aseton kullanılarak hazırlandığı çalışmalarda kloroforma göre aseton daha az uçucu bir çözücü olduğu için polimer çözeltisinin membran porlarının içine daha iyi sürüklendiği gözlenmiştir (Kurtoğlu ve Karataş, 2011). Ancak PCL'nin asetonda daha zor çözündüğü, çözünme süresinin uzadığı hatta %5 konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerde PCL'nin tamamen çözünmediği düşünülmüştür. Yapılan ön çalışmalarda polimer çözeltisi damlatılmadan önce AAO nanoporların yüzeyini iyonik olarak aktive etmek amacıyla AAO membranın su ile 1 dakika ultrasonik banyoda yıkanarak ön işleme tabii tutulmasının olumsuz etki ettiği gözlenmiştir. Membranın nanoporlarının su ile tıkanacağı, suyun kuruyamadığı veya polimer çözeltisini sürüklemeye işe yarayacağı öngörülen AAO'nun kendi iyonik dengesinin bozulmuş olabileceği düşünülmüştür. En olumlu sonuçlar AAO membran hiç bir ön işleme tabii tutulmadan ve kuru haldeyken polimer çözeltisinin damlatıldığı çalışmalarda elde edilmiştir. AAO membranın kendi orjinal iyonik dengesinin

polimer çözeltilisinin nanoporlara sürüklenmesinde gerekli olduğu ve bundan sonraki çalışmalarda hiç bir ön işlem uygulanmadan kullanılmasının en uygun işlem olduğu düşünülmüştür. Çalışmamızı olumlu şekilde yönlendiren ön çalışmalara ait F4 ve F5 formülasyonlarının görüntüleri sırasıyla Şekil 3.13 ve Şekil 3.14'de paylaşılmıştır ve TEM görüntülerinden de görüldüğü gibi yöntem umut vermiş ve bundan sonraki çalışmaların temelini oluşturmuştur.

4.2.2. Eritme Yöntemiyle Elde Edilen Nanoyapıların Değerlendirilmesi

Çalışma sonuçlarına göre, daha önce çözücü olarak kullanılan aseton yerine tercih edilen DCM, polimer çözeltilisini membranın nanoporlarına sürüklenme açısından daha başarılı bulunmuştur. Bu sebeple PCL ve etken maddenin ortak çözücüsü olarak çalışmalara DCM ile devam edilmiştir. Çünkü DCM iyi olarak adlandırılan çözücüler (good solvent), kötü olarak adlandırılan (bad solvent) arasında teta özellikte bir çözücüdür. Hem uçuculuğu hem polimeri çözme yeteneği iyidir (Schlitt ve ark., 2008).

Çalışmamızda TEM görüntülerinden elde edilen bulgulara göre, damlatma yöntemiyle elde edilen D1 ve D2 formülasyonlarında nanoyapılar serbest nanotübüler yapılar olarak karşımıza çıkmıştır. D2 formülasyonunda polimer/etken madde oranı, 10:1 olup D1 formülasyonuna (20:1) göre daha yüksek konsantrasyonda etken madde taşımaktadır. Şekil 3.15 incelendiğinde bu konsantrasyon farkının açıkça görüldüğü ve bunun nanoyapılara etken madde yüklendiğini gösterdiği düşünülmektedir (Kurtoğlu ve Karataş, 2012).

Eritme yöntemiyle elde edilen D3 ve D4 formülasyonlarına ait TEM görüntülerinin paylaşıldığı Şekil 3.16'da ise, nanotübüler yapıların birbirinden ayrılmadığı ve demetler halinde elde edildiği görülmektedir. Bunun sebebinin ise belirgin şekilde üretim yöntemine bağlı olduğu düşünülmektedir. D3 formülasyonundaki

polimer/etken madde oranı 20:1 ve D4 formülasyonundaki polimer/etkin madde oranı ise 10:1 olup yine TEM görüntülerinde bu konsantrasyon farkının gözlemlendiği düşünülmüştür.

Nanotübüler yapıların yüzeylerinin tam pürüzsüz olmasa da bütünlüklerinin iyi olduğu görülmüştür. Damlatma yöntemiyle elde edilen nanoyapıların çaplarının membranın por çapına (200 nm) yakın olduğu (Şekil 3.15) ve istenilen boyuta ulaştığı, eritme yönteminde ise, çapı 100 nm'nin altında nanoyapılar elde edildiği (Şekil 3.16) görülmüştür. Bunun sebebinin, eritme işleminde inorganik ve iyonik yapıları AAO'nun ısınırken daha yüksek enerjili bir hale gelmiş olması sebebiyle polimeri daha kuvvetli iterek por çapından ince ve uzun nanoyapılar elde edilmesi olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak membranı polimer eriyiği ile ıslatma yönteminin verimi çok az bulunmuş ve homojen ısı dağılımı gibi önemli parametreler sağlanamadığı için bu yöntemin bizim laboratuvar şartlarımızda nanoyapı elde etmek için etkin olmadığı düşünülmüştür. Membranı polimer çözeltisiyle ıslatma yönteminin çalışmamız için daha uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bu grup formülasyonlardan elde edilen model etken madde yüklü nanoyapıların görüntüleri iyi sonuçlar verince kurutularak elde edilen çok az miktarda toz nanopartikül etken madde tayini yapılması amacıyla DCM ile çözülmeye çalışılmıştır. Çok uzun süre karıştırılmasına rağmen nanoyapılarda hiçbir çözünme görülmeyince NaOH etkisiyle PCL'nin yapısında değişim olduğu düşünülmüş ve konuyla ilgili araştırmalar yapılmıştır. Öncelikle PCL'nin Şekil 2.1'de yer alan kimyasal yapısı incelenmiş polimerin terminal uçlarının karboksil (-COOH) asidik yapısıyla bittiği, monomerlerin (-COOH) gruplarının ester bağıyla birleşerek polimeri oluşturduğu görülmüştür. Zayıf asit yapılı polimerlerde ortam baziğe doğru kaydıka karboksilat anyonu (-COO⁻) ve buna bağılı olarak da sodyum karboksilat (-COONa) oluşarak polimerin NaOH ile temas eden yüzeyinin hidrofilikleştiği bulunmuştur. Bu tespitler Oyane ve ark., (2005) yaptığı çalışmanın sonuçlarıyla örtüşmektedir. Dahası NaOH'ın PCL üzerindeki bu etkisinden doku mühendisliği

için tasarlanan daha hidrofilik yüzeyli polimerik film ve implantların üretilmesinde faydalandığı bulunmuştur (Gümüşderelioğlu ve ark., 2011). Hatta NaOH'ın hidrofilikleştirici etkisinin asit özellikli PLGA ile elde edilen filmlerin yüzey modifikasyonunda kullanıldığı çalışmalara da rastlanmıştır (Park ve ark., 2005). NaOH'ın bu etkisi konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı söylenmiş PCL filmler üzerinde yapılan bir çalışmada 5 M konsantrasyonda 5 saat muamele sonucunda film yüzeylerinde değişim olduğundan bahsedilmiştir (Chong ve ark., 2007).

Bizim çalışmamızda ETP kullanılarak hazırlanan formülasyonlarda AAO membranı çözme işlemi, 0,5M NaOH'da gerçekleştirilmiş olsa da bu durum AAO membranı çözme süresini 6 saate uzatmış, uzayan çözme süresiyle PCL nanoyapılarının yüzeyi NaOH'ın ile daha uzun süre temas halinde kalmıştır. Bu sebeple PCL ile elde edilen nanoyapıların yüzeylerinin hidrofilikleşerek DCM'de çözünemediği sonucuna varılmıştır. İleriki çalışmalarda biyobozunur polimerlerle hazırlanacak formülasyonlarda AAO membranı çözmek için seyreltik fosforik asit çözeltisinin kullanılmasına karar verilmiştir.

4.2.3. Daldırma Yöntemiyle Elde Edilen Nanoyapıların Değerlendirilmesi

Daldırma yöntemi, hem nanoporların homojen dolmasına olanak vermiştir hem de polimer çözeltisinin porlara dolumu esnasında işlem sıkı kapalı kaplarda gerçekleştiği için organik çözücünün hızla uçması engellenerek buhar basıncı sabit tutulan ortamda etkin bir dolum sağlamıştır (Şekil 3.18-Şekil 3.21). Formülasyonlara ait üretim verimi artmış (Çizelge 3.5), etken madde yükleme tayini için yeterli miktar liyofilize toz elde edilebilmiştir.

Formülasyonlar hazırlanırken dikkat edilen en önemli nokta AAO membran belli zaman süresince polimer çözeltisinde bekletildikten sonra çıkartılırken alt ve üst yüzeyde biriken polimer çözeltisinin temizlenmesi olmuştur. Konuyla ilgili yapılan çalışmalardan (Lee ve ark., 2012; Wei ve ark., 2013) esinlenilerek kullanılan özel

dokulu laboratuvar mendilleri DCM ile ıslatılıp membranın üstü bastırılmadan yüzeyden silinmiş ve polimer tabakasının kuruyup yapışmadan nanoyapıların AAO çözünmesi esnasında serbestçe elde edilmesi sağlanmıştır. Daha önceki çalışmalarda AAO membranın üstünde incecik bir tabaka olarak kalan polimerin, membranın üst yüzeyinde kuruyup nanoyapıları serbest bırakmayan bir etken olduğu, bu sebeple membranların yüzeyinin temizlenmesinin çok önemli olduğu anlaşılmıştır. Yöntemle ilgili bazı çalışmalarda bu temizleme işlemi membran iyice kuruduktan sonra alüminyum tozuyla yapılırken (Huang ve ark., 2011), bazı çalışmalarda ise mekanik yöntemlerle üstte kalan polimer tabakası yok edilmiştir (Son ve ark., 2007). Laboratuvar ölçeğinde bizim kullandığımız silme işlemi en uygun temizleme işlemi olarak görülmüştür. Üretim verimi artınca membranı çözdükten sonra nanoyapılar ultrasantrifüj ile toplanabilmiş, ultrasaf su ile aynı koşullarda tekrar santrifüjlenerek 3 kez yıkanabilmiş ve bu sayede -40°C dondurulup, 48 saat süreyle liyofilize edilebilmiştir. Bu durum çalışmaların devamı açısından olumlu kabul edilmiştir.

Biyobozunur polimerlerden PCL ile yapılmış olan ön çalışmalarda, polimerin fonksiyonel gruplarına bağlı olduğu anlaşılan hassas yapısı nedeniyle, değerlendirmekte olduğumuz formülasyon parametrelerinin, özellikle etken madde yüklenmesine ait sonuçların net olarak belirlenemediği düşünülmüş, yöntemin optimizasyonu açısından başka polimerler ile çalışılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Bu sebeple, biyouygun olması sebebiyle klasik küresel nanopartikül çalışmalarında da kullanılan (Zhang ve ark., 2012) akrilat türevi poli (metil metakrilat) (PMMA), ilk aşamada çalışılmaya karar verilen polimer olmuştur. PMMA metakrilik asitin metil esteridir, bu sebeple dış uyarılara karşı daha stabil ve bu yöntemle işlenebilirliği daha kolay olan polimerlerdendir (Lezak ve ark., 2013). PMMA kullanılarak öngördüğümüz gibi formülasyon parametrelerinin sonuçları daha net gözlemlenilmiş ve özellikle etken madde yükleme etkinliği sonuçlarını yorumlayabileceğimiz bulgulara ulaşılabilmektedir.

Daldırma yöntemiyle elde edilen ilk grup formülasyonlarda (Çizelge 3.5) C1A-C4A kodlu formülasyonlar PMMA/ETP, 10:1 oranında hazırlanmış, farklı çözücü

sistemleri kullanılarak değerlendirilmişlerdir. TEM görüntüleri analiz edildiğinde, DCM kullanılarak hazırlanan C1A kodlu formülasyondan elde edilen nanoyapıların çapı yaklaşık 200 nm boyu ise yaklaşık 2,5 µm olarak görülmektedir (Şekil 3.18). DCM:DMF (4,5:0,5) kullanılarak hazırlanan C2A kodlu formülasyondan elde edilen nanoyapıların çapı yine yaklaşık 200 nm olmakla beraber boylarının mikrometrelerce uzadığı görülmektedir (Şekil 3.19). Aynı durum tek başına aseton ile hazırlanan C3A kodlu ve aseton:DMF (4,5:0,5) oranında hazırlanan C4A kodlu formülasyonlarda da görülmektedir. C3A formülasyonundan elde edilen düzgün ve homojen şekilli nanoyapılarda yine 200nm civarında partikül çapı ve 5-6 µm civarında uzunluk gözlenmiştir (Şekil 3.20). C4A formülasyonundan elde edilen yapılarda ise 200nm'ye yakın çap elde edilirken, uzunluklar 10 µm'yi aşmıştır (Şekil 3.21). DMF eklenen formüllerde nanoyapıların boyunun uzamasının, DMF'in polar yapısı nedeniyle AAO'nun iyonik yapısıyla etkileşerek (Huang ve ark., 2013) etken madde taşıyan polimeri membranın porlarına daha iyi sürüklemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Formülasyonları hazırlarken kullanılan çözücü sisteminin, etken maddeyle polimeri çözme özelliği ve uçuculuğu kadar, AAO membranın por duvarlarıyla olan ara yüzey etkileşiminin de çok önemli olduğu (Lee ve ark., 2012) anlaşılmıştır.

Burada dikkat edilmesi gereken bir diğer nokta, nanoyapıların **boy/en oranın** (konuyla ilgili çalışmalarda "aspect ratio" olarak adlandırılmıştır) artmasıyla etken madde yükleme etkinliklerinde de artış olmasıdır. Hem DCM ile hem aseton ile hazırlanan formüllerde çözücü sistemine DMF eklenerek nanoyapıların boyunun uzamasıyla, etken madde yükleme etkinlikleri de artmıştır (Çizelge 3.1). C1A kodlu formülasyonda yükleme etkinliği %1,8 iken C2A kodlu formülasyonda %2,2'ye çıkmış, C3A kodlu formülasyonda %1,1 iken C4A kodlu formülasyonda %4,4'e çıkmıştır.

Bu bulgular, nanotübüler yapıların ilaç taşıyıcı sistem olarak avantajları arasında gösterilen yüksek boy/en oranının nasıl bir etkisi olduğunu açıklamaktadır. İlaç taşıyıcı sistemin biyolojik bariyerlerden geçebilmesi 200 nm çap ile üretildiği düşünülürse aynı çapa sahip nanoyapılardan boy/en oranı daha büyük olan daha yüksek ilaç

taşıma kapasitesine sahip olacaktır (Schlitt ve ark., 2008). Aynı homojenlikte üretilen ve çapı 200nm olan silindirik nanoyapılardan, boy/en oranı=1 olan partiküle göre boy/en oranı=10 olan partikül 10 kat daha fazla hacme (l/r^2h) sahip olacak, dolayısıyla 10 kat daha fazla ilaç taşıyacaktır (Büyükserin ve ark., 2008).

Bu grup deneylerde C1A-C4A kodlu formülasyonları TEM görüntülerinden olumlu sonuçlar elde edilince, PMMA/ETP, 10:2 oranına ayarlanıp etken madde konsantrasyonu 2 katına çıkarılarak C1B-C4B kodlu formülasyonlar elde edilmiştir (Çizelge 3.1). Aynı işlem parametreleriyle elde edilen bu grup formülasyonlarda polimer/etken madde oranının, etken madde yükleme etkinliğini nasıl etki ettiği değerlendirilmiştir. C1A'da %1,8 olan ETP yükleme etkinliği C1B'de 2,1'e; C2A'da %2,2 olan ETP yükleme etkinliği C2B'de %2,4'e; C3A'da %1,1 olan ETP yükleme etkinliği C3B'de %1,5'e; C4A'da %4,4 olan ETP yükleme etkinliği C4B'de %4,5'e çıkmıştır. DCM'nin tek başına kullandığı formülasyonlarda (C1A ve C1B) ETP yükleme etkinliği, asetonun tek başına kullanıldığı formülasyonlardan (C3A ve C3B) daha yüksek bulunmuştur. Ancak asetonun DMF ile ortak kullanıldığı formülasyonlarda ETP yükleme etkinliği DCM'nin DMF ile ortak kullanıldığı formülasyonlardan daha yüksek çıkmıştır. Bu durum, asetonun DMF ile iyi bir çözücü sistemi oluşturarak polimerin membranın porlarına daha homojen dolumunu sağladığı şeklinde açıklanabilir.

4.2.3.1. Etken Madde Yükleme Etkinliği Artırma Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Etken madde yükleme etkinliğini artırma çalışmalarında polimer çözeltilerinde etken madde konsantrasyonları 10:1, 10:2, 10:3 olarak artırılmıştır. PMMA polimerlerinde ETP'nin çözelti içinde polimere oranı 10:3'den fazla olduğunda etken maddenin tam çözünemediği düşünülmüştür. Ayrıca polimere göre 10:3 oranından fazla ETP eklenmesinin, formülasyonun en önemli parametrelerinden birisi olan çözelti konsantrasyonunu fazlaca artırması nedeniyle olumsuz etki yaptığı tespit edilmiştir.

PMMA ile elde edilen A2 formülasyonunun Şekil 3.22 ve A3 formülasyonunun Şekil 3.23'de görüntülerinden nanoyapılarda etken madde yoğunluğuna bağlı olarak çap artışı olduğu düşünülse de düzgün ve homojen nanoyapılar elde edildiği belirlenmiştir. Şekil 3.24'de verilen PCL nanoyapıların görüntüsünde ortamda bulunan kirliliklerin nanoyapılara yüklenemeyen etken madde olduğu ve yıkamayla da tam uzaklaştırılamadığı düşünülmüştür.

Formülasyonlarda AAO membranı çözmek için kullanılan fosforik asit konsantrasyonunun %10'dan %8'e düşürülmesinin de formülasyonların genelinde etken madde yükleme etkinliğini olumlu olarak etkilediği düşünülmüştür.

Toplam çözücü miktarı ve polimer konsantrasyonu değiştirilmeden çözücü olarak DCM'ye belli oranda DMSO ilave edilmiştir. ETP bu organik solvanda iyi çözünmektedir. DMSO ilave edilen formülasyonlarda (Çizelge 2.5) etken maddenin gözle görülür şekilde daha hızlı çözüldüğü ve daha berrak çözeltiler elde edildiği kaydedilmiştir. ETP'nin en iyi çözüldüğü çözücülerden biri olmasına rağmen, çözeltilere DMSO eklenmesiyle etken madde yükleme kapasitesi yine beklenen artışı göstermemiştir. Bunun sebebi olarak DMSO'nun taşıdığı polimeri porlara sürükledikten sonra hızlı buharlaşan bir çözücü olmaması nedeniyle yeterli seviyede buharlaşmadığı için nanotüp oluşumunu desteklememesi ve DCM ile karıştırılan oranlarda uygun bir çözücü sistemi oluşturamaması gösterilebilir.

4.2.4. Vakum Yöntemiyle Elde Edilen Nanoyapıların Değerlendirilmesi

AAO membranı vakum kullanarak polimer çözeltisiyle ıslatma yöntemiyle elde edilen nanoyapıların değerlendirilmesin çok farkı nanofiber yapılar geliştirilmiştir. Vakumlu desikatör kullanarak elde ettiğimiz formülasyonlar orjinal olmaları ve literatürlerde bugüne kadar rastlanmamış bir bakış açısının membran yardımcılı nanofabrikasyon yöntemi ile birleştirilerek üretilmeleri sebebiyle çok değerlidirler.

Vakum kullanarak AAO membranının boyu kadar olan tüm porlara sıvı iletiminin homojen olarak sağlanması için geliştirdiğimiz bu yöntemle öncelikli olarak PMMA polimeriyle farklı formülasyonlar denenmiştir. Bu farklı teknikle elde edilen formülasyonların TEM görüntülerinde (Şekil 3.25, Şekil 3.26) gözlenen ortak karakter 200nm'den daha ince, içi boş nanotübüler yapıların elde edilmiş olmasıdır. Bu yöntemle polimer çözeltisinin porlara çok hızlı girmesi sebebiyle porların yüzeyini tam kaplamadan ve porların içerisini tam dolduramadan polimer şekil almış ve bunun sonucunda ince ve uzun nanofiber şeklindeki yapılar elde edilmiştir. Boylarının uzun olması nedeniyle elde edilen nanotübüler yapıların ultrasantrifüj sonrası serbestliğini koruyamadığı ve birbirleriyle girişim yaptığı gözlenmiştir. Vakum yöntemiyle elde edilen nanoyapılarda etken madde yükleme kapasitelerinin düşük çıkma nedeninin de (Çizelge 3.7) porların hızlı dolması sebebiyle homojen bir dolum sağlanamaması olduğu düşünülmektedir. Ancak elde edilen nanofiber görünümündeki bu yapıların etken madde salımı amacıyla geliştirilmeye çok uygun olduğu düşünülmüştür.

Bu yöntemle elde edilen farklı formülasyonların SEM görüntüleri Şekil 3.27 ve Şekil 3.28 ile paylaşılmıştır. TEM görüntülerinin aksine çok düzgün görünümlü polimerik nanofiberler elde edildiği görülmüştür (Kurtoglu ve Karataş, 2014). Ancak çalışmamızda beklentimiz çok uzun nanotübüler yapılar elde etmek değildir. Ayrıca kullanılan AAO membranının SEM'deki görüntülerinden (Şekil 3.29) üreticinin belirttiğinin aksine çok düzgün por yapısına sahip olmadığı, nanoyapılarda elde edilen düzensiz şekillerin buna bağlanabileceği düşünülmüştür.

4.2.5. Seçilen Daldırma Yöntemiyle Elde Edilen Yeni Formülasyonların Değerlendirilmesi

Çalışmalarımızda üretim yöntemleri arasında elde edilen nanoyapıların miktarına bakılarak en iyi üretim verimi ve en yüksek etken madde yükleme kapasitesi elde edilen yöntem "daldırma" yöntemi olmuştur. Bu yöntemle nanoyapıların şekilleri

homojen ve düzgün olduğunda etken madde yükleme etkinliklerinin de yüksek olduğu belirlenmiştir.

Daldırma yöntemiyle elde edilen yeni formülasyon grubunda (Çizelge 3.8) daldırma süresinin değerlendirildiği çalışmalar yapılmıştır. AAO membranlar 24,10 ve 4 saat boyunca polimer çözeltisine daldırılmıştır. Aynı zamanda PMMA-350 ve PMMA-996 polimerleri aynı işlem parametrelerine tabii tutularak polimerin molekül ağırlığına yönelik de değerlendirmeler yapılmıştır. Tüm formülasyon gruplarında PMMA-350'nin etken madde yükleme kapasitesi PMMA-996'dan yüksek bulunmuştur.

TEM görüntülerine bakıldığında (Şekil 3.30 ve Şekil 3.31) 24 saat daldırma süresinde elde edilen nanoyapıların şekillerinin düzgün ancak DMF etkisiyle fazlaca uzamış olduğu görülmektedir. Uzun olmalarına rağmen, etken madde yükleme etkinliklerinin beklenildiği gibi yüksek olmamasının, nanoporları dolduran polimer çözeltisindeki ETP'nin 24 saat gibi uzun zaman süresinde DMF'e geçmesi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca 4 saat süresinin de etkin bir dolum sağlamak için kısa olduğu tespit edilmiştir.

Tüm bu bulgular bir tarafa konulduğunda nanoyapılı bir partikül formülasyonunda %14,5 etken madde yükleme etkinliğiyle %3,35 etken madde yükleme kapasitesine ulaşılması dikkat çekicidir. Örneğin ETP'nin polimerik küresel nanopartiküllere yüklendiği bir çalışmada en iyi etken madde yükleme etkinliği %80,15 bulunmuş ancak bu formülün etken madde yükleme kapasitesi %1,44 çıkmıştır (Snehalatha ve ark., 2008). Her ne kadar üretim yöntemi gibi parametrelere bağlı olsa da ETP yüklü küresel nanopartiküllerde yüksek yükleme etkinliğine karşın etken madde yükleme kapasitelerinin düşük çıktığı görülmüştür (Callewaert ve ark., 2012; Yadav ve ark., 2014). Ancak bizim çalışmamızda ürettiğimiz silindirik yapılı nanoyapılarda bu durum farklı gelişmiştir. % 14,5 yükleme etkinliğine karşın %3,35 etken madde yükleme kapasitesi nanoyapının şekil özellikleriyle açıklanabilir. Daha önce de belirtilen boy/en oranının artışıyla silindirik yapının çapı değişmeden hacmi ve alanı artar ve böylelikle polimer etken maddeyi yükleyeceği daha geniş bir hacme ve salım

yapabileceği daha geniş bir yüzey alanına sahip olur. Ayrıca yüksek yükleme kapasitesine formülasyon açısından başka maddelere ihtiyaç duymadan polimerin nanoporlarda etken maddeyle birlikte matris bir yapı oluşturarak şekil alması da sebep olarak gösterilebilir.

Bunlara ek olarak bu ve bundan sonraki çalışmalarda elde edilen nanoyapılara ait Everji Dispersiv X-ray Spektroskopi (EDS) analizi, üretim sonunda nanoyapıların yüzeyinde inorganik alümina kalıntısı kalmadığının en önemli kanıtı olmuştur.

4.2.5.1. AAO Membranı Soğukta Çözme Tekniğiyle Elde Edilen Nanoyapıların Değerlendirilmesi

Çalışmalarda PMMA ile elde edilen sonuçların olumlu bulunmasının ardından, asıl kullanılması ve etken madde yüklenmesi planlanan biyobozunur polimerler için detaylı incelemeler yapılmıştır. Bu aşamaya kadar yapılan çalışmalar dikkatle değerlendirilmiş, her işlem basamağı üzerinde tek tek düşünülmüş ve yeniden araştırmalar yapılmıştır.

Yaptığımız çalışmalarda AAO membran polimer/etken madde çözeltisine daldırılıp uygun süre bekletilerek ara yüzey enerjisi ve kapiler etkiyle membranın porları dolmakta, ardından çözelti yüklü membran oda sıcaklığında kurumaya bırakıldığında çözücü sistemine dayalı olarak belirlenen süre kurutulmakta ve böylece nanoporların içinde etken madde yüklü polimer şekil almaktadır.

Yöntem tekrar gözden geçirildiğinde etken madde yüklü serbest nanotübüler yapıları elde ederken AAO membranı çözme koşullarının önemi anlaşılmıştır. AAO membranı çözmek için seyreltik fosforik asit çözeltileri kullanılan, biyobozunur polimerlerle nanoyapıların üretiminde daha başarılı olduğu görülmüştür. Fosforik asitin % 10'luk çözeltileriyle başladığımız AAO membranı çözme çalışmaları süre de göz önüne alınarak % 8'lik fosforik asit çözeltisiyle 6 saate kadar düşürülmüştür. Bu noktada AAO membran çözünürken uyguladığımız karıştırma işleminin ve ortam

sıcaklığının nanoyapıların serbest hale geçmesi üzerindeki etkisinin incelenmesine karar verilmiştir.

Yapılan karıştırma işlemi dolayısıyla ortama bir enerji verildiği ve az da olsa ısı oluştuğu düşünülmüştür. Ayrıca titanyum oksit nanotüplerinin elde edildiği bir çalışmada (Bae ve ark, 2008) AAO membranı çözen ortamın membrana temasında, ara yüzeylerde de bir enerji farkı oluşturması nedeniyle elde edilen nanotüplerin yan yüzeylerinden birleştiği ifade edilmiştir. Bu yaklaşımlara karşılık çözünme ortamını dışarıdan soğutarak bu enerjinin absorbe edilebileceği düşünülmüş ve AAO membranın çözündüğü kapaklı cam kaplar, soğuk su banyosunun içinde manyetik karıştırıcıya konulmuştur. Soğuk su banyosunun sıcaklığı sürekli olarak termometreyle kontrol edilmiş ve belli zaman aralıklarında eşit büyüklükteki buz parçaları atılarak ortam sıcaklığı 10-15°C'de sabit tutulmuştur. AAO membranı 6 saatte çözen % 8 fosforik asitin konsantrasyonu %7'ye düşürülmüş ve çözme işlemi 7 saatte tamamlanmıştır. Soğukta çözme işleminin olumlu katkısı ile PCL ile elde edilen S1 formülasyonun etken madde yükleme etkinliği % 10,25'e çıkmıştır (Çizelge 3.9).

Ama uygulamada esas fark yaratan sonuç kullanılan yeni biyobozunur polimerler ile sağlanmıştır. PMMA polimerinin daha önceki çalışmalarda olumlu katkısının nedenleri araştırılırken bu polimerin metakrilik asitin metil esteri (-COO-CH₃) olduğu görülmüştür. Biyobozunur polimerlerden bu üretim yönteminde iyi sonuçlar elde edilememesine bu polimerlerin (-COOH) gibi aktif fonksiyonel gruplara sahip olması sebep olarak gösterilebilir. Bu iki yaklaşım birleştirildiğinde fonksiyonel grubu açıkta olmayan yani ester yapısı içeren biyobozunur polimer arayışına girilmiştir. PLGA'nın değerlendirilmesi yapılırken "ester terminated" formunun (ePLGA) bulunduğu tespit edilmiştir. Bu polimere ek olarak bir de poli(laktik-kokaprolakton-ko-glikolik asit) (PLCG) polimeri de çalışmaya dahil edilmiştir. Ayrıca PMMA-350'nin poli(hidroksi etil metakrilat) ile 3:1 oranında karışımı kullanılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır.

Soğukta çözme yöntemi ve nanoyapıların birbirinden bağımsız ve tek tek elde edilmesini sağlamış, bu yaklaşım aynı zamanda etken maddenin polimer içinde daha iyi hapsolmasını ve dolayısıyla etken madde yükleme etkinliğini de artırmıştır. Ancak çalışmanın bu aşamasındaki en önemli noktanın, ePLGA'nın ester uçlarla biten yapıya sahip olması ve bunun formülasyon çalışmalarında değerlendirilmesi olduğu düşünülmektedir.

ePLGA ile elde edilen S2 formülasyonunun etken madde yükleme etkinliği %18,2 işlem etkinliği %84 olarak bulunmuş ayrıca boyut ve homojen şekil özellikleriyle de çalışmalarımıza bu polimerle devam edilme kararı alınmıştır. Teknolojik açıdan değerlendirilebilecek analizler, üretim tekrarlanabilirliği, zeta potansiyel analizi, formülasyonlarda DSC ve FTIR analizi, etken madde salım çalışmalarıyla devam eden çalışmalar kanser hücrelerine alım ve kanser hücreleri üzerinde sitotoksosite analizine kadar ilerletilmiştir.

4.2.6. Sonuç Formülasyon Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi

4.2.6.1. Üretim Tekrarlanabilirliğine Yönelik Bulguların Değerlendirilmesi

Çalışmalara sonuç formülü olarak belirlenen S2 formülünün tekrar edilmesi ve karakterizasyon sonuçlarının tekrar analiz edilmesiyle devam edilmiştir. S2 formülü ile etken maddesiz boş formül hazırlanmış ve hem ETP yüklü hem etken maddesiz formülasyonun SEM görüntüleri tekrar çekilmiş ve detaylı olarak incelenmiştir. Daha sonra formülasyon yapısının detaylı analizi için TEM görüntüleri de çekilmiş ve yine aynı homojenlikte 200 nm çaplı silindirik nanoyapılar elde edildiği görülmüştür. Formülasyonun etken madde yükleme etkinliği yine % 18 bulunmuş ve formülasyon üzerinde zeta potansiyeli, FTIR analizi, DSC analizi, etken madde salım çalışması, kanser hücrelerine alım ve kanser hücreleri üzerinde sitotoksosite çalışmalarına geçilmiştir.

4.2.6.2. Zeta Potansiyel Analizine Yönelik Bulguların Değerlendirilmesi

Zeta potansiyel arttıkça yüklü partiküller birbirini iter ve partikül agregasyonuna karşı daha stabil bir durum gösterirler. Elde edilen S2 formülasyonunun zeta potansiyel değerleri kullanılan ePLGA polimerinin negatif yük ($-\text{COO}^-$) taşıması sebebiyle negatif değerlerde bulunmuştur. ETP yüklü olan ve olmayan boş formülasyonların hem liyofilizasyon öncesi hem liyofilizasyon sonrası yüzey yükleri değişmemiş, zeta potansiyelleri -58,8 ile -37,2 aralığında bulunmuş ve dispersiyon olarak stabil kabul edilmişlerdir.

4.2.6.3. FTIR Analizine Yönelik Bulguların Değerlendirilmesi

S2 formülasyonundan elde edilen nanoyapıların FTIR spektrumunda, ETP'ye ait 3389 cm^{-1} 'de (O-H bandı), 2861 cm^{-1} 'de (C-H bandı), 1254 cm^{-1} 'de 1097 cm^{-1} 'de (C-O bandı) karakteristik piklerin görüldüğü ancak bazı piklerin formülasyondaki ETP'nin düşük yükleme etkinliğine bağlı olarak çok küçük kaldığı belirlenmiştir. Ayrıca PLGA'ya ait (-OH gerilimi) ($3200\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$), (-CH gerilimi) ($2850\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$), karbonil ($-\text{C}=\text{O}$) gerilimi ($1700\text{-}1850\text{ cm}^{-1}$) ve C-O geriliminin ($1050\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$) bulunduğu tespit edilmiştir. ETP'nin PLGA içinde homojen dağıldığı ve geçimsizlik göstermediği söylenebilir.

4.2.6.4. DSC Analizine Yönelik Bulguların Değerlendirilmesi

S2 formülasyonundan elde edilen nanoyapıların DSC termogramında sadece ePLGA'ya ait endotermik Tg pikinin küçük de olsa belirdiği görülmektedir. Etken maddeye ait piklerin DSC termogramında görülmemesi ETP'nin formülasyona amorf halde yüklendiğini ve homojen şekilde disperse olduğunu göstermektedir (Şekil 3.46).

4.2.6.5. Etken Madde Salımına Yönelik Bulguların Değerlendirilmesi

En yüksek etken madde yükleme kapasitesine sahip olan S2 formülasyonundan elde edilen nanotübüler yapıların etken madde salım çalışmasında 24 saat sonunda %AÇEM, $62,07 \pm 2,72$ (n=3) olarak bulunmuştur. Bu oran, işlem sırasında etken maddenin polimere iyi yüklendiğini ve nanoyapılar elde edilirken AAO membranı çözme esnasında polimerin etken maddeyi koruyabildiğini düşündürmüştür.

Çalışmanın ilk saatlerinde hızlı salım etkisi (burst effect) gözlenmemiş olması da AAO membran çözülerek uzaklaştırıldığı zaman süresinde sadece nanoyapıların yüzeyindeki ve yüzeyine yakın bölgelerindeki etken maddenin uzaklaşmış olduğunu göstermiştir. In vitro etken madde salım çalışmasında tüm zaman noktalarında elde edilen değerlerin standart sapmalarının çok düşük çıkması SEM ve TEM sonuçlarından da görüldüğü gibi elde edilen düzgün ve homojen şekil özelliklerine bağlanabilir. Etken madde salımının Higuchi kinetiğine ($r^2=0,9804$) uyum göstermesi matris tipi yapıdan difüzyonla salımın gerçekleştiğini göstermiştir (Şekil 3.47).

4.2.7. Hücre Kültürü Çalışmalarına Yönelik Bulguların Değerlendirilmesi

4.2.7.1. Hücresel Alım Çalışmalarına Yönelik Bulguların Değerlendirilmesi

Hem A549 hem de MCF hücreleri için konfokal mikroskop görüntülerinde (Şekil 3.49 - Şekil 3.52) görüldüğü gibi neredeyse tüm hücrelerde floresan madde yoğunluğu oluşmuştur. Bu durumda nanotübüler yapıların hücrelerin içine alındığı düşünülmüştür. Her iki hücre grubunda da 4. saatteki floresan madde yoğunluğunun 2. saatteki floresan madde yoğunluğundan fazla olması bu düşüncüyü kuvvetlendirmiştir. Ayrıca daha iri hücreler olan MCF7 hücrelerinde bazı görüntülerdeki (Şekil 3.53) dışarıya doğru olan uzantıların, nanoçubukların hücreye

alımı anında oluştuğu düşüncesi uyanmıştır. Yine özellikle MCF7 hücrelerinde sitoplazmanın yanı sıra hücre çekirdeğinde de görülen yoğun floresan bölgeler, nanoçubukların hücre çekirdeğine kadar girebildiğini düşündürmüştür.

4.2.7.2. Kanser Hücrelerinde Sitotoksosite Çalışmalarına Yönelik Bulguların Değerlendirilmesi

A549 hücreleri üzerinde yapılan 48 saatlik sitotoksosite çalışmasından elde edilen grafikteki (Şekil 3.53) bulgulara göre; 1µg/ml ve 5µg/ml konsantrasyonda uygulama yapılan gruplarda, ETP yüklü nanopartiküllerin sırasıyla %41,94 ve %40,79 sitotoksosite değerleriyle diğer tüm gruplardan özellikle de piyasa preparatından daha yüksek sitotoksosite gösterdiği bulunmuştur. Diğer taraftan 25µg/ml konsantrasyonda ise ETP yüklü nanotüplerin sitotoksik etkisi %29,64 yani 1µg/ml ve 5µg/ml konsantrasyon için bulunan değerlerden daha düşük çıkmıştır. Bu durumun, partiküllerin düşük etken madde yükleme kapasitesine bağlı olarak, 25µg/ml ETP konsantrasyonunu sağlayacak partikül miktarının çok olduğu ve iyi disperse edilemeden uygulandığı için hücrelerin üstünü kapatarak hücre içine alınamamasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Sitotoksosite çalışmasında (Şekil 3.53) 1µg/ml ve 5µg/ml konsantrasyonda uygulama yapılan gruplarda, ETP yüklü nanotübüler yapıların aynı konsantrasyonlar için sırasıyla; Boş nanopartiküllerden %17,86 ve %8,92, TEVA piyasa preparatından %15,94 ve %11,71, ETP çözeltisinden ise % 16,85 ve %15,33 daha yüksek sitotoksosite gösterdiği bulunmuştur. Bu durum etken maddenin kanser hücresine alınmasında ETP yüklenen nanotübüler yapıların olumlu katkı sağladığını düşündürmüştür. Etken maddesiz boş nanotüplerin de az miktarda sitotoksik etkisi görülmüş ve bu durumun sebebi aydınlatılamamıştır. Membran yardımcılı yöntemle üretilen nanoyapılarla herhangi bir sitotoksosite çalışmasına rastlanmadığı için etken maddesiz boş nanotüplerin gösterdiği sitotoksik etkinin, üretim yöntemine bağlı olup olmadığına dair bir yorum yapılamamıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda öne çıkan küresel olmayan silindirik yapılı polimerik nanopartiküllerin üretilmesi için yeni değerlendirilmeye başlayan bir yöntem olan "membran yardımcılı nanofabrikasyon yöntemiyle" ve bu yönteme ait "membranları ıslatma tekniği" kullanılarak polimerik nanotübüler yapıların üretilip, ilaç taşıyıcı sistem olarak değerlendirildiği bu tez çalışmasında aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

- Polimer ve etken maddeyi çözecek ortak çözücünün çok iyi seçilmesi gerektiği belirlenmiştir. Seçilecek çözücü ne çok uçucu olmalı, ne de polimerin bağlarını açamayacak kadar durgun özellikte olmalıdır.
- Çözücü sistemine polaritesi ve AAO membrana olan ilgisi nedeniyle çok düşük miktarda formülasyona eklenen DMF beklenen etkisini, nanotübüler yapıların boylarında uzama meydana getirerek göstermiştir.
- Kullanılan yöntemler arasında daldırma yöntemi en etkin yöntem olarak bulunmuştur. Kapalı bir sistem içinde işlem gerçekleştiği için membranın porlarına polimer çözeltisi etkin olarak dolup homojen nanoyapılar elde edilmiştir.
- Polimer konsantrasyonu, polimer/etken madde oranı, AAO membranın çözeltisiyle dolması için gereken süre ve AAO membranın kuruması için gereken sürenin kullanılan her yönteme göre değişiklik gösteren parametreler olduğu bulunmuştur.
- Kullanılan polimer ve etken madde açısından AAO membranı çözen seyreltik asit yada baz çözeltisinin cinsi, konsantrasyonu ve membranın çözülmesi için gereken süre çok önemli olduğu tespit edilmiştir.

- Vakumlu desikatör kullanılarak nanofiber benzeri yapılar elde edilmiştir. Bu yöntem kullanılarak membran yardımcılı nanofabrikasyon yöntemine yeni bir bakış açısı getirilmiştir.
- Bu yöntemle silindirik nanoyapılar hazırlarken polimerin seçiminin de çok önemli olduğu, fonksiyonel grupları açık bir polimer yerine ester yapılı bir polimer kullanmanın üretim verimi ve etken madde yükleme etkinliği açısından daha doğru olacağı bulunmuştur.
- Geliştirdiğimiz AAO membranı soğukta çözme yönteminin, nanoyapıların birbirinden bağımsız ve tek tek elde edilmesinde ve etken madde yükleme etkinliğinin artmasında katkı sağladığı bulunmuştur.
- Silindirik yapılı nanopartikül formülasyonunda önemli olduğu belirtilen boy/en oranının artışıyla silindirik yapının çapı değişmeden hacmi ve alanının arttığı bulunmuştur. Böylelikle etken maddenin yükleneceği daha geniş bir hacim olduğundan, düşük etken madde yükleme etkinliği olsa bile yüksek etken madde yükleme kapasitesine ulaşılabileceği görülmüştür.
- Silindirik yapılı nanopartiküllerin, geniş hacmin yanında, polimere yüklenmiş olan etken maddenin salınacağı daha geniş bir yüzey alanına sahip olduğu saptanmıştır.
- Sonuç olarak daldırma yöntemi ve AAO membranı soğukta çözme tekniğiyle, ester yapılı PLGA kullanılarak (10:2) polimer/etken madde oranıyla üretilen S2, biyobozunur polimerle hazırlandığı için tercih edilmiş ve en uygun formülasyon olarak seçilmiştir.
- S2 formülasyonu A549 kanser hücrelerine uygulandığında, 1 µg/ml ve 5 µg/ml konsantrasyonda değerlendirilen gruplar arasında en yüksek düzeyde sitotoksosite gösterdiği bulunmuştur.

Elde edilen sonuçlar ışığında aşağıda belirtilen çalışmalar yapılması önerilmektedir:

- Yapılan çalışmalara ek olarak elde edilen S2 formülasyonun da stabilite çalışmalarının yapılarak değerlendirilmesi uygun olacaktır.
- Bu formülasyonla birlikte olumlu sonuçlar veren ancak biyobozunur olmadığı için değerlendirilmeye alınmayan PMMA350/p(HEMA) (3:1) polimer karışımıyla hazırlanan S4 formülüne ait detaylı çalışmalar yapılması da planlanmaktadır.

ÖZET

Polimerik Nanotübüler Yapıların İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Hazırlanması ve Karakterizasyonu

İdeal bir ilaç taşıyıcı sistemin biyouygun ve biyoparçalanabilir özellikte olması, hedefine ulaşmak için kan dolaşımında uzun süre kalması ve etken maddeyi sadece hedef bölgede salması beklenmektedir. Bu amaçlara ulaşabilmek için farklı materyellerden, değişik şekillerde pek çok nanopartiküler sistem geliştirilmiştir. Son yıllardaki çalışmalarda çok çeşitli malzemelerden çok farklı boyutlarda küresel nanopartiküller elde edilmiş ve değerlendirilmiştir. Ancak küresel nanopartiküller, ilaç taşıyıcı sistem olarak bazı kısıtlamalarla karşılaşmaktadırlar.

Nanoküreler vücudun savunma sistemi olan makrofajlar nedeniyle kan dolaşımında sınırlı bir süre kalabilmektedirler. Buna karşılık son dönemde yapılan çalışmalarda, küresel olmayan, boyu uzatılmış ve silindirik şekilli nanotaşıyıcıların yapıları itibarıyla aynı hacimdeki küresel nanopartiküllere göre kan dolaşımında daha uzun süre kalabildiği ve daha iyi dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Biyodağılım üzerindeki belirgin etkisinin yanında partikülün şekli, nanoyapıların özellikle kanser hücresi içine endositoz yoluyla hücre içine alınmasında da önemli rol oynamaktadır.

Bu tezde nanotübüler taşıyıcılar, yeni nanofabrikasyon yöntemlerinden birisi olan “Membran Yardımcılı Nanofabrikasyon” yöntemiyle, Anodisc™ (Anodic Aluminum Oxide-AAO) membran kullanılarak hazırlanmış ve bu polimerik nanotübüler yapılar, ilaç taşıyıcı sistem olarak değerlendirilmiştir. Poli (ε-kaprolakton) ve poli (l-laktid-ko-glikolid) gibi biyobozunur polimerler ile polimetil metakrilat gibi biyobozunur olmayan polimerler kullanılarak, antikanserojen etken madde olan etoposid ile formülasyonlar hazırlanmış, formülasyonların TEM ve SEM analizleri ile yapıları incelenmiştir. Sonuç formülün etken madde yükleme kapasitesi, zeta potansiyelleri tayin edilmiş ve etken madde salım çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca antikanserojen aktivitenin tayini gözlemlemek amacıyla hücre kültürü çalışmaları yapılmış ve elde edilen nanoyapılar ilaç taşıyıcı sistem olarak uygun bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler: Biyobozunur polimerler, etoposid, nanotübüler yapılar, partiküler ilaç taşıyıcı sistem, sitotoksitesite.

SUMMARY

Preparation And Characterization of Polymer Nanotubular Structures As Drug Delivery Systems

The ideal drug delivery vehicle should be biocompatible and biodegradable, able to navigate through the circulatory system to reach the target and capable of releasing its therapeutic cargo only to the desired cells. In efforts to meet this goal, a variety of nanoscale structures have been developed by using a variety of different materials and shapes. In recent years, spherical nanoparticles with a variety of diameters have been created from a diverse range of materials.

Nanospheres suffer from several drawbacks as drug delivery vehicles because they remained in circulation for only a few hours. On the other hand, the findings in recent studies strongly suggest that non-spherical, elongated and cylindrical particles possess an inherent advantage over their spherical counterparts for drug delivery applications that require prolonged blood circulation and biodistribution. Besides dramatically affecting biodistribution, shape also plays an important role in the cellular internalization of nanocarriers via endocytosis. Particularly for cancer cells, related the investigations of some studies, shape effects on cellular internalization is a pertinent theme in drug delivery.

In this study, cylindrical nanostructures were produced by Anodisc™ (Anodic Aluminum Oxide-AAO) membrane, using a new fabrication method named “Template Assisted Nanofabrication” and these “One Dimensional Nanostructures” were evaluated as drug delivery system. Different types of biodegradable polymers like poly-ε-caprolacton, poly(l-lactide-co-glicolide) and non-biodegradable polymers like polymethylmethacrylates were used for the formulation to include antineoplastic agent etoposide. The formulations were evaluated by TEM and SEM analysis for the morphological properties. Final formulation was evaluated for zeta potential and active ingredient assay and dissolution studies. Furthermore antineoplastic activity of this nanoparticulate system was evaluated by cell culture studies and produced nanostructures were found convenient as drug delivery system.

Key Words: Biodegradable polymers, cytotoxicity, etoposide, nanotubular structures, particulate drug delivery system

KAYNAKLAR

- ABIDIAN, M.R., KIM, D.H., MARTIN, D.C. (2006). Conducting-polymer nanotubes or controlled drug release. *Adv. Mater.*, 18: 405–409.
- ADEREM, A., UNDERHILL, D. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev. Immunol.*, 17(1): 593–623.
- ALGAN, A.H., KARATAŞ, A. (2014) Development of Template Synthesis Method for Production Drug Loaded Nanotubular Structures. “16th International Pharmaceutical Technology Symposium” (IPTS-2014) September, 8-10, 2014, p.260-264
- AL-KAYSI, R.O., GHADDAR, T.H., GUIRADO, G. (2009). Fabrication of One-Dimensional Organic Nanostructures Using Anodic Aluminum Oxide Templates. *Journal of Nanomaterials*, 1-14
- ALLEN, T.M, CULLIS, P.R. (2004). Drug delivery systems: entering the mainstream, *Science*, 303(5665): 1818–1822.
- ALONSO, M.J. (2004). Nanomedicines for overcoming biological barriers. *Biomed Pharmacother*; 58: 168-172.
- ARNIDA, M., JANAT-AMSBURY, M.M., RAY, A., PETERSON, C.M., GHANDEHARI, H. (2011) Geometry and surface characteristics of gold nanoparticles influence their biodistribution and uptake by macrophages, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 77: 417–423.
- BALDWIN EL, OSHEROFF N. (2005) Etoposide, Topoisomerase II and Cancer. *Current Medicinal Chemistry, Anticancer Agents* 5: 363-372.
- BARRATT, G.M. (2000). Therapeutic applications of colloidal drug carriers, *Pharm. Sci. Technol. Today*, 3 (5): 163–171.
- BAE, C. YOO, H., KIM, S., LEE, K., KIM, J., SUNG, M.M., SHIN, H. (2008) Template-directed synthesis of oxide nanotubes: fabrication, characterization, and applications. *Chem Mater* 20(3): 756–767.
- BENDER R.P, JABLONKSY M.J, SHADID M., ROMAINE I, DUNLAP N, ANKLIN C, GRAVES DE, OSHEROFF N. (2008) Substituents on Etoposide That Interact with Human Topoisomerase II α in the Binary Enzyme-Drug Complex: Contributions to Etoposide Binding and Activity. *Biochemistry* 47: 4501-4509.
- BENINGO, K., WANG, Y. (2002). Fc-receptor-mediated phagocytosis is regulated by mechanical properties of the target, *J. Cell Sci.*, 115(4): 849.
- BERTRAND, N., LEROUX, JC. (2012). The journey of a drug-carrier in the body: An anatomo-physiological perspective *J Control Release*, 161(2): 152-163.
- BIRIS, A.S., MAHMOOD, M. (2010). Compositions comprising nanoparticles and apoptotic agents and methods of use. Patent Application US 2010/0285138 A1

- BRANNON-PEPPAS, L., BLANCHETTE, J.O. (2004). Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv. Drug Del. Rev.*, 56: 1649-1659.
- BYRNE, J.D., BETANCOURT, T. (2008). Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv. Drug Del. Rev.*, 60: 1615-1626.
- CALLEWAERT, M., DUKIC, S., VAN, G.L., VITTIER, M., GAFA, V., ANDRY, M.C., MOLINARI, M., ROULLIN, V.G. (2012). Etoposide encapsulation in surface-modified poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles strongly enhances glioma antitumour efficiency. *J. Biomed. Mater. Res. A* 101: 1319–1327.
- CALVO, P., VILA-JATO, J.L., ALONSO, M.J. (1996). Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, Nanoparticles, nanocapsules and nanoemulsions, as ocular drug carriers *J. Pharm. Sci.*, 85(5): 530-536.
- CHAMPION, J., MITRAGOTRI, S. (2006). Role of target geometry in phagocytosis, *Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A.*, 103(13): 4930-
- CHAMPION, J., MITRAGOTRI, S. (2009). Shape induced inhibition of phagocytosis of polymer particles, *Pharm. Res.*, 26 (1):244–249.
- CHAMPION, J.A., KATARE, Y.K., MITRAGOTRI, S. (2007). Particle shape: A new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers. *J Control. Release*, 121(1-2): 3–9.
- CHAUHAN, V.P., STYLIANOPOULOS, T., MARTÍN, J.D. (2012). Normalization of tumour blood vessels improves the delivery of nanomedicines in a size-dependent manner. *Nat Nanotechnol*; 7: 383-388
- CHEN, J.T., SHIN, K., LEISTON-BELANGER, J.M., ZHANG, M., RUSSELL, T.P. (2006). Amorphous Carbon nanotubes with tunable properties via template wetting, *Adv. Funct. Mater.*, 16:1476-1480.
- CHO, K., WANG, X., NIE, S., CHEN, Z.G., SHIN, D.M. (2008). Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer, *Clin. Cancer Res.*, 14 (5): 1310–1316.
- CHOI, H., LIU, W., MISRA, P., TANAKA, E., ZIMMER, J., IPE, B. ET AL., (2007). Renal clearance of quantum dots, *Nat. Biotechnol.*, 25 (10): 1165–1170.
- CHONG, MSK, LEE, CN, TEOH, SH (2007) Characterization of smooth muscle cells on poly(e-caprolactone)films. *Mater Sci Eng* 27: 309–312.
- DANDAGI, P., PATEL, P., PATIL, P., MASTIHOLIMATH, V., GADAD, A. (2011). Development and Characterization of Particulate Drug Delivery System for Etoposide. *Ind. J Novel Drug Del.*, 3(1): 43-51.
- DAUM, N., TSCHEKA, C., NEUMEYER, A., SCHNEIDER, M. (2012). Novel approaches for drug delivery systems in nanomedicine: effects of particle design and shape. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol.*, 4: 52-65.
- DAVIS, M.E., CHEN, Z., SHIN, D.M. (2008). Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov*; 7: 771-82

- DECUZZI, P., GODIN, B., TANAKA, T., LEE, S. Y., CHIAPPINI, C., LIU, X., FERRARI, M. (2010). Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles. *J. Control. Release*, 141: 320–327.
- DECUZZI, P., LEE, S., BHUSHAN, B., FERRARI, M. (2005). A theoretical model for the margination of particles within blood vessels, *Ann. Biomed. Eng.*, 33 (2):179–190.
- DECUZZI, P., PASQUALINI, R., ARAP, W., FERRARI, M. (2009). Intravascular delivery of particulate systems: does geometry really matter? *Pharm Res.*, 26(1); 235–243.
- DOSHI, N., MITRAGOTRI, S. (2009). Designer biomaterials for nanomedicine, *Adv. Funct. Mater.*, 19 (24): 3843–3854.
- DOSHI, N., MITRAGOTRI, S. (2010). Macrophages recognize size and shape of their targets, *PLoS One*, 5 (3): e10051
- DOSHI, N., PRABHAKARPANDIAN, B., REA-RAMSEY, A., PANT, K., SUNDARAM, S., MITRAGOTRI, S. (2010). Flow and adhesion of drug carriers in blood vessels depend on their shape: a study using model synthetic microvascular networks, *J. Control. Release*, 146: 196–200.
- DOSHI, N., ZAHR, A., BHASKAR, S., LAHANN, J., MITRAGOTRI, S. (2009). Red blood cell-mimicking synthetic biomaterial particles, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 106 (51): 21495.
- DOUGHERTY, S., LIANG J. (2009). Fabrication of segmented nanofibers by template wetting of multilayered alternating polymer thin films. *J. Nanopart. Res.*, 11: 743–747.
- ERNSTING, M.J., MURAKAMI, M., ROY, A., LI, S-D. (2013). Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. *J. Control Release*, 172: 782–94
- FAROKHZAD, O.C., LANGER, R. (2009). Impact of nanotechnology on drug delivery, *ACS Nano*, 3 (1): 16–20.
- FERRARI, M. (2005). Cancer nanotechnology: opportunities and challenges, *Nat. Rev. Cancer*, 5 (3):161–171.
- GENG, Y., DALHAIMER, P., CAI, S., TSAI, R., TEWARI, M., MINKO, T., DISCHER, D. (2007). Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery, *Nat. Nanotechnology*, 2(4): 249–255.
- GOVENDER, T., STOLNIK, S., GARNETT, M.C., ILLUM, L., DAVIS, S.S. (1999). PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *J. Controlled Release*, 57: 171–185.
- GRATTON, S.E.A., ROPP, P.A., POHLHAUS, P.D., LUFT, J.C., MADDEN, V.J., NAPIER, M.E., DeSIMONE, J.M. (2008). The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U SA*, 105(33):11613–11618.
- GÜMÜŞDERELİOĞLU, M., KAYA, B.F., BEŞKARDEŞ, I.G. (2011). Comparison of epithelial and fibroblastic cell behaviour on nano/micro-topographic PCL membranes produced by crystallinity control. *J Colloid Interf. Sci.* 358: 444–453.

- HANDE, KR. (1998). Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer*; 34:1514–1521.
- HILLEBRENNER, H., BUYUKSERIN, F., STEWART, J.D., MARTIN, C.R. (2007). Biofunctionalization and Capping of Template Synthesized Nanotubes. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 7: 2211–2221.
- HOU, S., WANG, J., MARTIN, C.R. (2005). Template-synthesized protein nanotubes, *Nano Lett.*, 5: 231–234.
- HOTZE, E.M., PHENRAT, T., LOWRY, G.V. (2010) Nanoparticle aggregation: challenges to understanding transport and reactivity in the environment. *J Environ Qual*; 39: 1909-1024.
- HSUEH, C.C., WANG, G.J., HSU, S., HUNG, H.S. (2008). Fabrication of Nanostructured PLGA Scaffolds Using Anodic Aluminum Oxide Templates *DTIP of MEMS and MOEMS published in "DTIP 2008, Nice : France (2008)"*
- HUGHES, G.A. (2005). Nanostructure-mediated drug delivery. *Nanomed. Nanotech. Bio. Med.*, 1: 22-30.
- JAIN, J., FERNANDES, C., PATRAVALE, V. (2010). Formulation development of parenteral phospholipid-based microemulsion of etoposide. *AAPS PharmSciTech* 11: 826–831
- JAIN, S., SINGH, S.R., PILLAI S. (2012). Toxicity Issues Related to Biomedical Applications of Carbon Nanotubes *J Nanomed Nanotechnol.*, 3(5):1-15.
- JANI, A.M.M., LOSIC, D., VOELCKER, N.H.(2013) Nanoporous anodic aluminium oxide: Advances in surface engineering and emerging applications. *Prog. Mater. Sci.*, 58 (5): 636–704.
- KHAJAVINIA, A., VARSHOSAZ, J., DEHKORDI, A.J. (2012). Targeting etoposide to acute myelogenous leukaemia cells using nanostructured lipid carriers coated with transferrin. *Nanotechnology* 23: 405101.
- KILIÇAY, E., DEMİRBILEK, M., TÜRK, M., GÜVEN, E., HAZER, B., DENKBAS, E.B. (2011). Preparation and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co3-hydroxyhexanoate) (PHBHHX) based nanoparticles for targeted cancer therapy. *Eur. J. Pharm. Sci.* 44: 310–320.
- KOHLER, D., SCHNEIDER, M., KRÜGER, M., LEHR, C.M., MÖHWALD, H., WANG, D. (2011). Template-assisted polyelectrolyte encapsulation of nanoparticles into dispersible, hierarchically nanostructured microfibers. *Adv Mater*; 23: 1376-1379
- KOKONOU, M., IOANNOU, G., REBHOLZ, C., DOUMANIDIS, C.C. (2013). Polymeric nanowires and nanopillars fabricated by template wetting. *J Nanopart Res.* 15: 1552-1564
- KURTOĞLU, A.H., KARATAŞ A. (2011). Preparation of polymeric one dimensional nanostructures for drug release. *17th International Symposium on Biomedical Science and Technology Symposium , (BIOMED 2011), November 23-25, 2011. p.201*

- KURTOĞLU, A.H., KARATAŞ A. (2012). Preparation of drug loaded polymeric one dimensional nanotubular structures. *10th International Symposium on pharmaceutical sciences (ISOPS 2012)*, June 26-29, 2012. p.232.
- LAMPRECHT, A., BENOIT, J.P. (2006). Etoposide nanocarriers suppress glioma cell growth by intracellular drug delivery and simultaneous P-glycoprotein inhibition. *J. Control Release* 112: 208–213
- LEE, C.W., WEI, T.H., CHANG, C.W., CHEN, J.T. (2012). Effect of Nonsolvent on the Formation of Polymer Nanomaterials in the Nanopores of Anodic Aluminum Oxide Templates. *Macromol. Rapid Commun.* 33: 1381–1387.
- LEE, S.Y., FERRARI, M., DECUZZI, P. (2009). Shaping nano-/micro-particles for enhanced vascular interaction in laminar flows. *Nanotechnology*, 20:495101.
- LEE, W.H., CHOI, J-S., KIM, H.Y., PARK, J-H., PARK, B.D., CHO, S.J., LEE, S-K., SURH, Y-J. (2010). Potentiation of etoposide-induced apoptosis in HeLa cells by co-treatment with KG-135, a quality-controlled standardized ginsenoside formulation. *Cancer Letters*, 294: 74–81.
- LEO, E., BRINA, B., FORNI, F., VANDELLI, M.A. (2004). In vitro evaluation of PLA nanoparticles containing a lipophilic drug in water-soluble or insoluble form. *Int. J. Pharm.*, 278: 133-141.
- LESNIAK, A., CAMPBELL, A., MONOPOLI, M.P. (2010). Serum heat inactivation affect protein corona composition and nanoparticle uptake. *Biomaterials* 31: 9511-9518
- LEVY, M.Y., BENITA, S. (1990). Drug release submicronized o/w emulsion: a new in vitro kinetic evaluation model. *Int. J. Pharm.*, 66: 29-37.
- LI, S.D., HUANG, L. (2010). Stealth nanoparticles: high density but sheddable PEG is a key for tumor targeting, *J. Control. Release*, 145(3): 178–181.
- LIANG, Z., SUSHA, A.S., YU, A., CARUSO, F. (2003). Nanotubes prepared by layer-by-layer coating of porous membrane templates, *Adv. Mater.*, 15:1849–1853.
- LITWINIEC, A., GACKOWSKA, L., HELMIN-BASA, A., ŻURYŃ, A., GRZANKA, A. (2013). Low-dose etoposide-treatment induces endoreplication and cell death accompanied by cytoskeletal alterations in A549 cells: Does the response involve senescence? The possible role of vimentin. *Cancer Cell Int.* 13: 9-31
- LIU, Y., TAN, J., THOMAS, A., OU-YANG, D., MUZYKANTOV, V.R. (2012). The shape of things to come: importance of design in nanotechnology for drug delivery. *Ther. Deliv.* 3(2): 181–194.
- MARTIN, J., MIJANGOS, C. (2009). Tailored Polymer-Based Nanofibers and Nanotubes by Means of Different Infiltration Methods into Alumina Nanopores. *Langmuir*, 25: 1181–1187.
- MASSUYEAU, F., DUVAIL, J.L., ATHALIN, H., LORCY, J.M., LEFRANT, S., WÉRY, J., FAULQUES, E. (2009). Elaboration of conjugated polymer nanowires and nanotubes for tunable photoluminescence properties. *Nanotechnology*, 20: 1-8.

- MATHAES, R., WINTER, G., BESHEER, A., ENGERT J. (2014) Non-spherical micro- and nanoparticles: fabrication, characterization and drug delivery applications. *Expert Opin. Drug Deliv.* 18: 1-12
- McCLENDONA, A. K., OSHEROFF, N. (2007) DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutation Research* 623: 83–97.
- MERKEL, T.J., CHEN, K., JONES, S.W., ET AL. (2012). The effect of particle size on the biodistribution of low-modulus hydrogel PRINT particles. *J Control Release*, 162: 37-44.
- MITRAGOTRI, S., LAHANN, J., (2009). Physical approaches to biomaterial design, *Nat. Mater.*, 8 (1):15–23.
- MOGHIMI, S., HUNTER, A., MURRAY, J. (2001). Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice, *Pharmacol. Rev.*, 53 (2): 283.
- MOHANTY, A.K., DILNAWAZ, F., MOHANTY, C., SAHOO, S.K. (2010). Etoposide-loaded biodegradable amphiphilic methoxy (poly ethylene glycol) and poly (epsilon caprolactone) copolymeric micelles as drug delivery vehicle for cancer therapy. *Drug Deliv.*, 17(5): 330-342.
- MONTECUCCO, A., BIAMONTI, G. (2007) Cellular response to etoposide treatment. *Cancer Letters*. 252: 9-18.
- MURO, S., GARNACHO, C., CHAMPION, J.A., LEFEROVICH, J., GAJEWSKI, C., SCHUCHMAN, E.H. et al., (2008). Control of endothelial targeting and intracellular delivery of therapeutic enzymes by modulating the size and shape of ICAM-1-targeted carriers, *Mol. Ther.*, 16 (8): 1450–1458.
- NAJAR, I.A., JOHRI, R.K. (2014) Pharmaceutical and pharmacological approaches for bioavailability enhancement of etoposide. *J. Biosci.* 39: 139-144.
- NIE, S., XING, Y., KIM, G., SIMONS, J. (2007). Nanotechnology applications in cancer, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 9 (2007) 257–288.
- NISHIYAMA, N. (2007). Nanocarriers shape up for long life. *Nat. Nanotechnology*, 2: 203-204.
- OWENS III, D.E., PEPPAS, N.A. (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, 307 (1): 93–102.
- OYANE A, UCHIDA M, CHOONG C, TRIFFITT J, JONES J, ITO A. (2005) Simple surface modification of poly([epsilon]-caprolactone) for apatite deposition from simulated body fluid. *Biomaterials*. 26: 2407-2413.
- PANYAM, J., LABHASETWAR, V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55: 329–347.
- PARK, G. E., PATTISON, M. A., PARK, K., WEBSTER, T. J. (2005). Accelerated Chondrocyte Functions on NaOH-Treated PLGA Scaffolds. *Biomaterials* 26: 3075–3086.

- PASQUALI, M., LIANG, J., SHIVKUMAR, S. (2010), Role of template and infiltration technique on resulting morphology of polymer nanostructures. *Mater Lett.* 64: 1943–1946
- PATLOLLA, R.R., VOBALABOINA, V. (2008). Folate-targeted etoposide encapsulated lipid nanospheres. *J. Drug Target.* 16: 269–275.
- PEER, D., KARP, J.M., HONG, S., (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol* 2: 751-760.
- PERRY, J.L., MARTIN, C.R., STEWART, J.D. (2011). Drug-Delivery Strategies by Using Template-Synthesized Nanotubes. *Chem. Eur. J.*, 17: 6296 – 6302.
- PINHEIRO, K.V., HUNGRIA, V.T., FICKER, E.S., VALDUGA, C.J., MESQUITA, C.H., MARANHÃO, R.C. (2006). Plasma kinetics of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with Hodgkin's and non- Hodgkin's lymphoma and a preliminary study on the toxicity of etoposide associated with LDE. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 57: 624–630
- PRAKASH, S., MALHOTRA M., SHAO, W., TOMARO-DUCHESNEAU, C., ABBASI, S. (2011). Polymeric nanohybrids and functionalized carbon nanotubes as drug delivery carriers for cancer therapy. *Adv. Drug Del. Rev.*, 63: 1340-1351.
- REDDY, L.H., SHARMA, R.K., CHUTTANI, K., MISHRA, A.K., MURTHY, R.R. (2004) Etoposide incorporated tripalmitin nanoparticles with different surface charge: formulation, characterization, radiolabeling, and biodistribution studies. *AAPS J* 6:e23.
- REDDY, L.H., ADHIKARI, J.S., DWARAKANATH, B.S.R., SHARMA, R.K., MURTHY, R.R. (2006). Tumoricidal effects of etoposide incorporated into solid lipid nanoparticles after intraperitoneal administration in dalton's lymphoma bearing mice. *AAPS Journal*, 8(2): E254-E262.
- REDDY, L.H., MURTHY, R.S. (2005) Etoposide-loaded nanoparticles made from glyceride lipids: formulation, characterization, in vitro drug release, and stability evaluation. *AAPS PharmSciTech.* 6: 158–166.
- REJMAN, J., OBERLE, V., ZUHORN, I., HOEKSTRA, D. (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis, *Biochem. J.*, 377: 159-169.
- SAADATI, R., DADASHZADEH, S., ABBASIAN, Z., SOLEIMANJAH, H. (2013). Accelerated blood clearance of pegylated plga nanoparticles following repeated injections: effects of polymer dose, peg coating, and encapsulated anticancer drug. *Pharm. Res.* 30: 985–995.
- SAHAY, G., QUERBES, W., ALABI, C. (2013). Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling. *Nat Biotechnol*; 31: 653-658.
- SAKURAI, Y., HATAKEYAMA, H., SATO, Y. (2013) Gene silencing via RNA and siRNA quantification in tumor tissue using MEND, a liposomal siRNA delivery system. *Mol Ther*; 21: 1195-1203.

- SALIOU, B., THOMAS, O., LAUTRAM, N., CLAVREUL, A., HUREAUX, J., URBAN T. (2013). Development and in vitro evaluation of a novel lipid nanocapsule formulation of etoposide. *Eur. J. Pharm. Sci.* 50(2): 172–180.
- SCHLITT, S., GREINER, A., WENDORFF, J.H. (2008). Cylindrical polymer nanostructures by solution template wetting, *Macromolecules*, 41: 3228-3234.
- SENGUPTA, S., TYAGI, P., VELPANDIAN, T., GUPTA, Y.K., GUPTA, S.K. (2000). Etoposide encapsulated in positively charged liposomes: pharmacokinetic studies in mice and formulation stability studies. *Pharmacol Res.*, 42: 459–464.
- SHAH, S., LIU Y., HU, W., GAO, J. (2011). Modeling particle shape-dependent dynamics in nanomedicine. *J. Nanosci. Nanotechol.* 11(2): 919-928.
- SHANG, L., NIENHAUS, K., NIENHAUS G.U. (2014). Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters *J. Nanobiotechnology*, 12(5): 1-11.
- SHARMA, G., VALENTA, D.T., ALTMAN, Y., HARVEY, S., XIE, H., MITRAGOTRI, S., SMITH, J.W. (2010). Polymer particle shape independently influences binding and internalization by macrophages. *J Control Release*, 147: 408–412.
- SHIN, H.C., ALANI, A.W., RAO, D.A., ROCKICH, N.C., KWON, G.S. (2009). Multi-drug loaded polymeric micelles for simultaneous delivery of poorly soluble anticancer drugs. *J. Control Release* 140: 294–300.
- SHIRAZI, F.H., BAHRAMI, G., STEWART, D.J., TOMIAK, E., DELORME, F., NOEL, D., GOEL, R. (2001). A rapid reversed phase high performance liquid chromatographic method for determination of etoposide (VP-16) in human plasma. *J Pharm Biomed Anal.* 25: 353–356.
- SIEWERT, M., DRESSMAN, J., BROWN, C., SHAH, V. (2003). FIP/AAPS guidelines for dissolution/ in vitro release testing of novel/special dosage forms. *Dissolution Technol.*, 10: 6–15.
- SNEHALATHA, M., VENUGOPAL, K. SAHA, R.N., (2008) Etoposide-loaded plga and pcl nanoparticles 1: preparation and effect of formulation variables, *Drug Deliv.* 15 (5) 267–275.
- SNEHALATHA, M., VENUGOPAL, K., SAHA, R.N., BABBAR, A.K., SHARMA, R.K. (2008). Etoposide loaded PLGA and PCL nanoparticles II: biodistribution and pharmacokinetics after radiolabeling with Tc-99m. *Drug Deliv.*, 15: 277–287.
- SON, S.J., BAI, X., LEE, S.B. (2007). Inorganic hollow nanoparticles and nanotubes in nanomedicine part 1. drug/gene delivery applications. *Drug Disc. Today*, 12: 650-656.
- SON, S.J., BAI, X., NAN, A., GHANDEHARI, H., LEE, S.B. (2006). Template synthesis of multifunctional nanotubes for controlled release, *J. Controlled Release*, 114: 143–152.
- STEINHART, M., WEHRSPORN, R.B., GOSELE, U., WENDORFF, J.H. (2004). Nanotubes by template wetting: A modular assembly system, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43: 1334-1344.

- STEINHART, M., WENDORFF, J.H., GREINER, A., WEHRSPORN, R.B., NIELSCH, K., SCHILLING, J., CHOI, J., GOSELE, U. (1997). Polymer nanotubes by wetting of ordered porous templates, *Science*, 296:
- STORM, G., BELLLOT, S., DAEMEN T., LASIC, D. (1995). Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 17 (1): 31–48.
- TAHARA, K., YAMAMOTO, H., KAWASHIMA, Y. (2010). Cellular uptake mechanisms and intracellular distributions of polysorbate 80-modified poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres for gene delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 75: 218–224
- TAO, S.L, DESAI, T.A. (2007). Aligned arrays of biodegradable poly (ϵ -caprolactone) nanowires and nanofibers by template synthesis. *Nano Lett.*, 7: 1463-1468.
- TAO, L., HU, W., LIU, Y., HUANG, G., SUMER, B.D., GAO, J. (2011) Shape-specific polymeric nanomedicine: emerging opportunities and challenges. *Exp Biol Med.*; 236(1): 20–29.
- TENZER S, DOCTER D, KUHAREV J. (2013). Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat Nanotechnol*; 8: 772-781.
- THOMAS, A., GOETTMANN, F., ANTONIETTI, M. (2008). Hard templates templates for soft materials: creating nanostructured organic material, *Chemistry of Materials*, 20, 3:738–755.
- TOY, R., HAYDEN, E., SHOUP, C., BASKARAN, H., KARATHANASIS, E., (2011). The effects of particle size, density and shape on margination of nanoparticles in microcirculation. *Nanotechnology*. 22(11): 11510
- TRUONG, N.P., WHITTAKER, M.R., MAK, C.W., DAVIS, T.P. (2014). The importance of nanoparticle shape in cancer drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 20: 1-14.
- TSURKAN, M.V., HAUSER, P.V., ZIERIS, A. (2013). Growth factor delivery from hydrogel particle aggregates to promote tubular regeneration after acute kidney injury. *J Control Release* 167: 248-255.
- UBRICH, N., BOUILLOT, P., PELLERIN, C., HOFFMAN, M., MAINCENT, P. (2004). Preparation and characterization of propranolol hydrochloride nanoparticles. *J. Controlled Release*, 97: 291-300.
- UKAWALA, M., CHAUDHARI, K., RAJYAGURU, T., MANJAPPA, A.S., MURTHY, R.S., GUDE, R (2012). Laminin receptor-targeted etoposide loaded polymeric micelles: a novel approach for the effective treatment of tumour metastasis. *J. Drug Target.* 20: 55–66
- VARSHOSAZ, J., HASANZADEH, F., ESLAMDOOST, M. (2012). Optimization of self-assembling properties of fatty acids grafted to methoxypoly (ethylene glycol) as nanocarriers for etoposide. *Acta Pharm.* 62: 31–44.
- VENKATARAMAN S., HEDRICK J. L., ONG Z. Y., (2011). The effects of polymeric nanostructure shape on drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.*, 63: 1228–1246.

- VIVEK, K., REDDY, L.H., MURTHY, R.S. (2007) Comparative study of some biodegradable polymers on the entrapment efficiency and release behavior of etoposide from microspheres. *Pharm Dev Technol*; 12(1): 79–88.
- WAGNER, V., DULLAART, A., BOCK, A.K., ZWECK, A. (2006) The emerging nanomedicine landscape. *Nat Biotechnol*; 24: 1211-1218.
- WANG, F., BRONICH, T.K., KABANOV, A.V., RAUH, R.D., ROOVERS, J. (2008). Synthesis and characterization of star poly(epsilon-caprolactone)-b-poly(ethylene glycol) and poly(L-lactide)-b-poly(ethylene glycol) copolymers: evaluation as drug delivery carriers. *Bioconjug. Chem.* 19: 1423–1429.
- WANG, J., BYRNE, J.D., NAPIER, M.E., DESIMONE, J.M. (2011) More effective nanomedicines through particle design. *Small*, 7: 1919–1931
- XIA, L., WEI, Z., WAN, M. (2010). Conducting polymer nanostructures and their application in biosensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, 341: 1–11.
- YADAV, S.K., SAWANT, K.K. (2010). Formulation optimization of etoposide loaded PLGA nanoparticles by double factorial design and their evaluation. *Curr. Drug Deliv.* 7: 51–64.
- YADAV, R., KUMAR, D., KUMARI, A., YADAV, S.K. (2014) Encapsulation of podophyllotoxin and etoposide in biodegradable poly-D-L-lactide nanoparticles improve their anticancer activity. *J. Microencapsulation* 31(3): 211-219.
- YAN, F., ZHANG, C., ZHENG, Y., MEI, L., TANG, L., SONG, C., SUN, H., HUANG, L. (2010). The effect of poloxamer 188 on nanoparticle morphology size, cancer cell uptake, and cytotoxicity. *Nanomedicine* 6(1): 170-178.
- YANG Y, HE Q, DUAN L, CUI Y, LI J. (2007). Assembled alginate/chitosan nanotubes for biological application. *Biomaterials* 28:(20) 3083–3090.
- YOO, J.W., DOSHI, N., MITRAGOTRI, S. (2010). Endocytosis and intracellular distribution of PLGA particles in endothelial cells: effect of particle geometry, *Macromol. Rapid. Commun.*, 31 (2): 142–148.
- YOO, J.W., DOSHI, N., MITRAGOTRI, S. (2011). Adaptive micro and nanoparticles: Temporal control over carrier properties to facilitate drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.*, 63:1247-1256.
- YORDANOV, G., SKROBANSKA, R., EVANGELATOV, A. (2012). Colloidal formulations of etoposide based on poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: preparation, physicochemical properties and cytotoxicity. *Colloids Surfaces B* 101: 215–222.
- YU, T., HUBBARD, D., RAY, A., GHANDEHARI, H. (2012) In vivo biodistribution and pharmacokinetics of silica nanoparticles as a function of geometry, porosity and surface characteristics. *J Control Release*; 163: 46-54.
- ZHANG, K., FANG, H., CHEN, Z., TAYLOR, J.S., WOOKEY, K.L. (2008). Shape effects of nanoparticles conjugated with cell-penetrating peptides (HIV Tat PTD) on CHO cell uptake, *Bioconjug. Chem.*, 19 (9): 1880–1887.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Aslıhan Hilal
 Soyadı : Algan
 Dogum yeri ve tarihi : 07.02.1980
 Uyrugu : TC
 Medeni durumu : Evli
 İletisim adresi ve telefonu : Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
 Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı - Ankara
 0(312) 203 3148

II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden eskiye dogru)

2008-2014 Doktora Eğitimi
 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Abd.
 2005-2008 Yüksek Lisans Eğitimi
 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Abd.
 2000-2004 Lisans
 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
 1991-1998 Orta öğrenim
 Konya Meram Anadolu Lisesi
 Yabancı dili İngilizce

III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden yeniye dogru)

Mayıs 2008 - Uzman Eczacı
 Aralık 2005 - AÜ Eczacılık Fakültesinden Araştırma Görevlisi
 Haziran 2004 - AÜ Eczacılık Fakültesinden mezun olarak Eczacı

IV- Mesleki Deneyimi

Aralık 2005- Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
 Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı - Araştırma Görevlisi
 2004 - 2005 Drog-san İlaçları San. ve Tic. A.Ş. - Ruhsatlandırma Sorumlusu

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği (TÜFTAD)

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınlar:

*YÜKSEL N., TÜRKMEN B., KURTOĞLU A.H., BAŞARAN B., ERKİN J., BAYKARA T. (2007) Lubricant Efficiency of Magnesium Stearate in Direct Compressible Powder Mixtures Comprising Cellactose®80 and Pyridoxine Hydrochloride. *FABAD* 32(4): 173-183.

*KURTOĞLU, A.H., KARATAŞ A. (2009) Yara tedavisinde güncel yaklaşımlar: Modern yara örtüleri. *Ank.Üniv Ecz. Fak. Derg.* 38(3):211-232 (2012’de basılmıştır)

* KARATAŞ, A., BÖLÜK, A., ALGAN, A.H. (2015). Poloxamer/Chitosan In Situ Gelling System for Ocular Delivery of Ofloxacin. *Current Drug Ther.* (Kabul aldı)

Posterler:

*KURTOĞLU A.H., BAYKARA T., Evaluation of Vaginal Tablets Containing Polycarbophil and Hydroxypropylmethylcellulose as Mucoadhesive Polymers, 3rd BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences, Antalya, 26-28 Ekim 2009. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* Vol:38 Issue:1 Supplement, Abstracts, P-050, S:133-135

*N. YÜKSEL, B. TÜRKMEN, A.H. KURTOĞLU, B. BAŞARAN, J. ERKİN, T. BAYKARA. A Study on Lubricant Efficiency of Magnesium Stearate in Direct Compressible Powder Mixtures. 9th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-2009), Ankara/Türkiye, 23-26 Haziran 2009.

*KURTOĞLU A.H, KARATAŞ A. Preparation of one dimensional polymeric nanostructures for drug release. 17th International Symposium on Biomedical Science and Technology, (BIOMED-2011) Ankara/Türkiye 23-25 November, 2011.

*KURTOĞLU A.H., KARATAŞ A. Preparation of drug loaded polymeric one dimensional nanotubular structures. In Abstract Book of “10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences” (ISOPS-2012)” June 26-29, 2012, Ankara/Türkiye. p-232.

*KURTOĞLU A.H, KARATAŞ A. PEKEL-BAYRAMGİL N. Ophthalmic drug delivery using electrospun poly(ε-caprolactone) fibers. In Abstract Book of “16th International Pharmaceutical Technology Symposium” (IPTS-2012)” June 26-29, 2012, Ankara/Türkiye. p.224-226.

*KARATAŞ, A., KURTOĞLU-ALGAN, A.H., TURHAN, F., PEKEL-BAYRAMGİL, N. (2013). Evaluation of Drug Release of Ofloxacin From Electrospun Poly (ε-caprolactone) Fibers. In Abstract Book of “*International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development*”, November, 28-30, 2013, Antalya/Türkiye. p.106

*ALGAN, A.H., KARATAŞ, A. (2014) Development of Template Synthesis Method for Production Drug Loaded Nanotubular Structures. .In Abstract Book of “16th International Pharmaceutical Technology Symposium” (IPTS-2014) September, 8-10, 2014, Antalya/Türkiye.

*ALGAN, A.H, KARATAŞ, A. (2014) Evaluation of template synthesis method for production of biodegradable nanotubular structures. AAPS Annual Meeting and Exposition, November 2-6, 2014, San Diego/CA, USA. T3168

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Projeler:

TÜBİTAK tarafından desteklenen 113S201 nolu " Etken madde salımı amacıyla polimerik nanotübüler yapıların hazırlanması ve karakterizasyonu" başlıklı projede bursiyer olarak görev almaktayım.

Seminerler:

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında "Yara tedavisinde güncel yaklaşımlar: Modern yara örtüleri" konulu bir seminer verdim (Mayıs, 2012).

VIII- Diğer Bilgiler

02-13 Mayıs 2011 tarihleri arasında GATA Komutanlığı'nda GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü Araştırma Geliştirme Merkezi Başkanlığı sorumluluğunda düzenlenmiş olan “5. Bilimsel Araştırmalarda Hayvan Deneyleri Kursu”na katıldım.