



**POLİMERİK NANOPARÇACIKLARIN
KANSERDE İKİLİ İLAÇ TEDAVİSİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Didem KESGİN

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Sadık KAĞA

BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİMDALİ

Temmuz 2022

Bu tez çalışması 20.FEN.BİL.10 numaralı proje ile BAPK tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

POLİMERİK NANOPARÇACIKLARIN KANSERDE İKİLİ İLAÇ
TEDAVİSİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Didem KESGİN

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Sadık KAĞA

BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

Temmuz 2022

TEZ ONAY SAYFASI

Didem KESGİN tarafından hazırlanan “Polimerik Nanoparçacıkların Kanserde İkili İlaç Tedavisine Etkilerinin Araştırılması” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 25/07/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Sadık KAĞA

Başkan : Prof. Dr. Levent ÖZCAN
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Sadık KAĞA
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi

Üye : Doç. Dr. Sevim Feyza ERDOĞMUŞ
Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi,
Eczacılık Fakültesi

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
...../...../..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. İbrahim EROL
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI
Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

25/07/2022

Didem KESGİN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

POLİMERİK NANOPARÇACIKLARIN KANSERDE İKİLİ İLAÇ TEDAVİSİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Didem KESGİN

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Sadık KAĞA

Kanserin tedavisinde kemoterapi yaygın olarak kullanılan bir tedavi yöntemidir. Ancak spesifik olmayan biyodağılımı ve yan etkilerinden ötürü antikanser ilaçlarının uygulamalarında çeşitli kısıtlamalar bulunmaktadır. Kemoterapinin bu dezavantajı pasif ve aktif hedefleme mekanizmalarını kullanabilen nanotaşıyıcı sistemler ile giderilebilmektedir. Aynı zamanda klinikte kanser tedavisinde iki antikanser ilacın birlikte kullanılması etkin yöntemlerden biridir. Kanser tedavisindeki ikili ilaç uygulamalarında çoğu kez ilaçların hedef tümör dokusuna birlikte ulaşmaları istenmektedir. Ancak geleneksel ilaç uygulamalarıyla farklı farmakokinetik ve biyodağılım profillerine sahip ilaçları tümör dokusunda birlikte ve benzer oranlarda hedeflemek mümkün değildir. Bu nedenle ikili ilaç sistemlerinin ideal nanotaşıyıcılar kullanılarak hedefe yönlendirilmesi uygun bir stratejidir. Biyobozunur ve biyouyumlu polimerik nanoparçacıklar bu amaçla kullanılabilecek yapılardır. PEG-PLGA gibi amfifilik blok-ko-polimerler misel tipi polimerik nanoparçacık üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, PEG-PLGA bazlı ilaç taşıma sistemlerinin Kombrestatin A4 ve Dosetaksel ilaçları için uygunluğu *in vitro* testlerle belirlenmeye çalışılmıştır. Enkapsülasyon verimi, ilaç salımı ve sitotoksite açısından PEG-PLGA nanoparçacıklarının bu iki ilaç için uygun bir taşıma sistemi olduğu belirlenmiştir.

2022, xii + 70 sayfa

Anahtar Kelimeler: PEG-PLGA, Kanser, İkili Tedavi, İlaç Taşıma Sistemleri, Polimerik Nanoparçacık.



ABSTRACT

M.Sc. Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF POLYMERIC NANOPARTICLES ON DUAL DRUG THERAPY IN CANCER

Student Didem KESGİN

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biomedical Engineering

Supervisor: Asst. Prof. Sadık KAĞA

Chemotherapy is a widely used treatment method in the treatment of cancer. However, there are various limitations in the application of anticancer drugs due to their non-specific biodistribution and side effects. This disadvantage of chemotherapy can be overcome by the use of nanocarrier systems that can use passive and active targeting mechanisms. At the same time, the use of two anticancer drugs together is one of the effective methods in cancer treatment in the clinic. In dual drug applications in cancer treatment, it is often desired that the drugs reach the target tumor tissue together. However in conventional free drug applications, it is not possible to target drugs with different pharmacokinetic and biodistribution profiles together and at similar rates in tumor tissue. Therefore, targeting dual drug systems using ideal nanocarriers is an appropriate strategy. Biodegradable and biocompatible polymeric nanoparticles are structures that can be used for this purpose. Amphiphilic block-co-polymers such as PEG-PLGA are widely used in the production of micelle-type polymeric nanoparticles. In this study, the suitability of PEG-PLGA-based drug delivery systems for Combrestatin A4 and Docetaxel drugs was tried to be determined by in vitro tests. It has been determined that PEG-PLGA nanoparticles are a suitable transport system for these two drugs in terms of encapsulation efficiency, drug release and cytotoxicity.

2022, xii + 70 pages

Keywords: PEG-PLGA, Cancer, Dual Therapy, Drug Delivery Systems, Polymeric nanoparticle.



TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sadık KAĞA'ya,

Tezimin araştırma ve hücre testlerinin gerçekleştirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Elif KAĞA'ya,

Her konuda öneri ve eleştirileriyle yardımlarını gördüğüm hocalarıma,

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı canım annem, canım babam ve kardeşlerime,

Her zaman yanımda olan arkadaşlarım Büşra KESGİN'e, Tuğçe DEMİREL'e, Arş. Gör. Enes Ertan KULAKSIZ'a,

Yüksek lisans aşamasındaki desteği ve arkadaşlığından dolayı çalışma arkadaşım Gizem Fatma ERGÜNER'e,

Bu tez çalışması 20.FEN.BİL.10 numaralı proje kapsamında Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir teşekkür ederim.

Didem KESGİN
Afyonkarahisar 2022

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	4
2.1 Kanser.....	4
2.1.1 Kanser İstatistikleri	6
2.1.2 Kanser Tedavisi	6
2.1.2.1 Cerrahi Tedavi	7
2.1.2.2 Kemoterapi	7
2.1.2.3 Radyoterapi.....	9
2.1.2.4 Hormon Tedavisi	11
2.1.3 Kanserde Hedeflendirme	12
2.1.3.1 Pasif Hedefleme.....	12
2.1.3.2 Aktif Hedefleme	14
2.1.4 Kanserde Kombinasyon Tedavi.....	17
2.1.4.1 Kombrestatin A4	18
2.1.4.2. Dosetaksel.....	19
2.2 Nanoteknoloji	21
2.2.1 Polimerik Nanoparçacıklar	22
2.2.1.1 Polimerik Nanoparçacıkların Üretilmesinde Kullanılan Polimerler	24
2.2.1.2 Poli (laktik-ko-glikolik asit)	24
2.2.1.3 Polietilen Glikol.....	26
2.2.1.4 Poli (laktik-ko-glikolik asit)- blok- poli (etilen glikol)	27
3. MATERYAL ve METOT	30
3.1 Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	30
3.2 Kullanılan Cihazlar	31
3.3 PEG-PLGA Nanoparçacıkların Elde Edilmesi	31

3.4 Kritik Misel Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	32
3.4.1 Nile Red Stok Çözeltilisinin Hazırlanması	33
3.4.2 Nile Red Yüklü PEG-PLGA Nanoparçacıkların Elde Edilmesi.....	33
3.4.3 Kritik Misel Konsantrasyonu için Grafiğin Elde Edilmesi.....	34
3.5 PEG-PLGA Enkapsülasyon Verimi	34
3.5.1 Oil red O' nun Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması.....	34
3.5.2 PEG-PLGA nanoparçacıklarına Oil red O Yükleme Çalışmaları.....	34
3.5.3 Enkapsülasyon Veriminin Hesaplanması	36
3.5.4 Kombrestatin A4 Kapsülleme Veriminin Belirlenmesi.....	36
3.5.5 Dosetaksel Kapsülleme Veriminin Belirlenmesi	36
3.6 Oil red O Salım Çalışmaları	36
3.6.1 pH: 5,5 Asetat Tampon Çözeltilisi Hazırlanması	36
3.6.2 Oil red O Salım Deneyi	37
3.7 PEG-PLGA nanoparçacıkların TEM görüntülerinin elde edilmesi	38
3.8 Hücre Kültürü Çalışmaları	39
3.8.1 Hücre Ekilmesi	39
3.8.2 İlaç Çözeltilerinin Hazırlanması	39
3.8.2.1 Kombrestatin A4'ün Hazırlanması	39
3.8.2.2 Dosetakselin Hazırlanması	39
3.8.2.3 Kombrestatin A4 ve Dosetakselin Hazırlanması.....	40
3.8.3 İlaç Yüklü Nanoparçacıkların Hazırlanması.....	40
3.8.3.1 Kombrestatin A4 Yüklü PEG-PLGA Nanoparçacıkların Elde Edilmesi .	40
3.8.3.2 Dosetaksel Yüklü Nanoparçacıkların Elde Edilmesi	40
3.8.3.3 Kombrestatin A4 ve Dosetaksel Yüklü Nanoparçacıkların Elde Edilmesi	41
3.8.4 İlaç Uygulanması	41
3.8.5 MTT Analizi	41
4. BULGULAR	42
4.1 PEG-PLGA Nanoparçacıkların Kritik Misel Konsantrasyon Değerinin Saptanmasına Ait Bulgular	42
4.2 PEG-PLGA Nanoparçacıkların Yükleme Kapasitesinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular	44
4.2.1 Oil red O Kapsülleme Verimi	44
4.2.2 Kombrestatin A4 yüklü PEG-PLGA Nanoparçacıkların Kapsülleme Verimi	47
4.2.3 Dosetaksel yüklü PEG-PLGA Nanoparçacıkların Kapsülleme Verimi.....	47
4.3 Oil red O ile Salım çalışmasına ait Bulgular.....	48

4.4 PEG-PLGA Nanoparçacıklara ait TEM görüntüsü.....	50
4.5 Sitotoksosite Çalışmalarına ait Bulgular	51
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	54
6. KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ.....	70



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

g	Gram
mg	Miligram
mL	Mililitre
μ L	Mikrolitre
nm	Nanometre
C	Santigrat
Da	Dalton

Kısaltmalar

DMSO	Dimetil Sülfoksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
KMK	Kritik Misel Konsantrasyonu
MTT	3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür
PEG-PLGA	Poli(etilen glikol) - blok- poli (laktik- ko- glikolik)
PEG	Polietilen glikol
PLGA	Poli (laktik- ko- glikolik)
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskopu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Normal ve Hasarlı Hücre Bölünmesi	5
Şekil 2.2 Pasif hedefleme mekanizması şematik gösterimi	13
Şekil 2.3 Aktif hedefleme mekanizması şematik gösterimi	14
Şekil 2.4 Kombrestatin A4 kimyasal yapısı	19
Şekil 2.5 Dosetaksel kimyasal yapısı	20
Şekil 2.6 Nanoküre ve nanokapsül yapılarının şematik gösterimi	22
Şekil 2.7 Nanoküre ve nanokapsül yapılarına ilaç eklenmesi	23
Şekil 2.8 PLGA parçalanma ürünleri	25
Şekil 2.9 Polietilen glikol kimyasal yapısı	26
Şekil 2.10 PEG-PLGA kimyasal yapısı	26
Şekil 2.11 Misel Oluşumu şematik gösterimi	28
Şekil 3.1 PEG-PLGA öz toplanması şematik gösterimi	31
Şekil 3.2 Nile Red floresan boyasının kimyasal yapısı	31
Şekil 3.3 Nile Red yüklü PEG-PLGA nanoparçacıkların hazırlanması	32
Şekil 4.1 PEG-PLGA Polimerinin kritik misel konsantrasyonu	42
Şekil 4.2 Oil red O' ya ait kalibrasyon eğrisi	44
Şekil 4.3 Kombrestatin A4 ilacına ait kalibrasyon eğrisi	46
Şekil 4.4 Dosetaksel ilacına ait kalibrasyon eğrisi	46
Şekil 4.5 Oil red O salım grafiği	48
Şekil 4.6 Kombrestatin A4 (Grup 1) ve Kombrestatin A4 yüklü nanoparçacık (Grup 2) grubuna ait MTT analizi	50
Şekil 4.7 Dosetaksel (Grup 3) ve Dosetaksel yüklü nanoparçacık (Grup 4) gruplarına ait MTT analizi	52
Şekil 4.8 Kombrestatin A4 + Dosetaksel (Grup 5) ve Kombrestatin A4 + Dosetaksel yüklü nanoparçacık (Grup 6) gruplarına ait MTT analiz	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Polimerik Nanoparçacık sentezinde kullanılan polimer örnekleri	24
Çizelge 3.1 Kullanılan kimyasal malzemeler ve markaları.....	30
Çizelge 3.2 Kullanılan cihazlar ve markaları	31
Çizelge 3.3 1 mL aseton kullanılarak hazırlanan örneklere ait bilgiler.....	35
Çizelge 3.4 0,5 mL aseton kullanılarak hazırlanan örneklere ait bilgiler.....	35
Çizelge 4.1 KMK belirlenebilmesi için kullanılan örneklerin konsantrasyonu absorban değerleri	42
Çizelge 4.2 1 mL aseton kullanılarak hazırlanan örneklerin kapsülleme verimi	44
Çizelge 4.3 0,5 mL aseton kullanılarak hazırlanan örneklerin kapsülleme verimi	45
Çizelge 4.4 Sitotoksisite testi yapılan deney grupları.....	50

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa

Resim 3.4 Asetat Tampon çözeltisi hazırlaması.....	36
Resim 3.5 Oil red O salım deneyi örneklerinin hazırlanması ilk aşama.....	37
Resim 3.6 Oil red O salım deneyi örneklerinin hazırlanması ikinci aşama.....	38
Resim 3.7 Oil red O salım deneyi örneklerinin hazırlanması üçüncü aşama.....	38
Resim 4.1 PEG-PLGA nanoparçacıklarına ait TEM görüntüsü.....	40
Resim 4.2 Aseton buharlaştıktan sonra KMK analiz örnekleri.....	43
Resim 4.3 1 mL aseton içeren çözeltiler filtre edilmeden önce.....	45
Resim 4.4 1 mL aseton içeren çözeltiler filtre edildikten sonra.....	45
Resim 4.5 0,5 mL aseton içeren çözeltiler filtre edilmeden önce.....	46
Resim 4.6 0,5 mL aseton içeren çözeltiler filtre edildikten sonra.....	46
Resim 4.7 pH=7,4 olan örnekler inkübe edilmeden önce, 120 saat 37° C inkübe edildik sonra.....	50
Resim 4.8 pH= 5,5 olan örnekler inkübe edilmeden önce, 120 saat 37° C inkübe edildik sonra.....	51

1. GİRİŞ

Kanser, vücutta hücre bölünmesi esnasında oluşan mutasyonlu hücrenin baskılanamaması durumudur. Bu mutasyonlu hücre kontrolsüz olarak büyümeye ve çoğalmaya devam ederek kanser hücrelerini meydana getirmektedir. Kanser hücreleri bulundukları dokuda kalmaya devam etmekle birlikte çoğu zaman kan ve doku sıvıları yoluyla bulundukları bölgeden uzaklaşarak yayılma göstermektedirler (Hanahan ve Weinberg 2011). Kanser en çok ölüme sebep olan hastalıklar arasında ikinci sırada yer alması ve yakalanma sıklığı ile ölüm oranlarının giderek artması kanseri ciddi bir sağlık sorunu haline getirmektedir. Her yaşta, her bölgede görülen ve ölümcül olabilen kanserin Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ 2021) verilerine göre 20 yıl içinde en çok ölüme sebep olan birinci hastalık olacağı öngörülmektedir.

Kanser hastalığının geleneksel tedavisinde; cerrahi tedavi, kemoterapi, radyoterapi, immunoterapi ve hormon tedavisi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Bu tedavi yöntemleri tek başına kullanılabileceği gibi çoğu zaman birlikte de kullanılabilir. Kanser metastaz yapmadığı durumlarda cerrahi tedavi ve radyoterapi ile kanser daha başarılı bir şekilde kontrol altına alınabilirken metastaz yaptığı durumlarda tedavi potansiyelleri azalmaktadır (Kalyane vd. 2019). Geleneksel kemoterapi tedavisinde kanserli hücrelere özgü hedefli bir tedavi yapılmaması geleneksel tedavinin en büyük dezavantajlarından biridir. Terapötik ajanlar, bölünen hücreleri öldürme mekanizmasıyla çalıştığı için kanserli hücreleri öldürmesinin yanında sıklıkla bölünen sağlıklı doku ve hücreleri de öldürmektedir. Bunlara örnek olarak; bağışıklık sisteminde kan hücresi olan lökositler, kan pıhtılaşmasını sağlayan trombositler ve saç folikülleri verilebilir (Kakde vd. 2011). Geleneksel kemoterapi ilaçlarının düşük suda çözünürlük, dolaşım sistemindeki stabilitesinin zayıf olması, toksisitesinin yüksek olması, tümör dokularını hedefleyememesi, çoklu ilaç direnci geliştirmesi ve kemoterapötik ajanın hidrofobik olması gibi dezavantajları vardır (Mattheolabakis vd. 2012). Son yıllarda geleneksel kanser tedavisinin bu yan etkilerini azaltmak ve tedaviyi iyileştirmek amacıyla kanser hücrelerini hedef alan nanoteknolojik yaklaşımlar geliştirilmiştir.

Nanoteknoloji, nanometre boyutlarında yapılan mühendislik ve teknolojik çalışmaların

oluşturduğu bir alandır. Nano boyutlara inildikçe malzemelerin mekanik, elektriksel, kimyasal ve fiziksel özelliklerinde değişimler meydana gelmektedir. Boyut değişimi sayesinde kazanılan bu yeni özellikler nanoyapılı malzemelerin birçok alanda kullanılmasına olanak sağlar (Tekade vd. 2017). Nanoyapılı malzemeler Tıp ve Sağlık alanında; tıbbi görüntüleme, gen tedavisi, *in vitro* hedefleme, yara sargısı, implant ve ilaç taşıma sistemi olarak kullanılmaktadır (Ramos vd. 2017).

Tıp ve Sağlık alanında kullanılan nanoyapılı malzemeler, kanser tedavisi için de umut vadeden uygulamaları içermektedir. Arttırılmış yüzey alanına sahip nanoparçacıklar daha düşük dozlarda etken madde kullanımına olanak sağlayarak kemoteröpatik ilaçların yan etki riskini azaltmaktadır (Danhier vd. 2010). İlaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan nanoparçacık yapıları kanserli dokuların damar geçirgenliğinin fazla olması, düzensiz kan damarlarına sahip olması ve yapısı bozulmuş epitel hücrelerden oluşması sebebiyle pasif olarak kanser hücrelerini hedefleyebilir (Matsumura ve Maeda 1986).

Geleneksel kemoterapi tedavisinde tek bir ilacın kullanıldığı durumlarda bazı sorunlarla karşılaşmaktadır; hücre ve doku düzeyinde ilaç direnci, bazı tümör dokularının heterojenitesi, sert tümör dokularında ilaç girişinin ve etkinliğinin düşük olması ve toksisite oluşturmaması için dozun sınırlı oluşu bu sorunlardan bazılarıdır (Gong vd. 2019). Bu sebeplerle uzun yıllardır klinikte iki veya daha fazla kemoterapi ilacı birlikte kullanılmaktadır. Teoride kombinasyon kanser tedavisinin ilave toksik etkiler olmaksızın yüksek tedavi edici oranlara sahip olması beklenirken pratikte çoğu zaman daha yüksek toksisite ile karşılaşmakta ve beklenen sonuçlar elde edilememektedir (Lee ve Nan 2012). Kombinasyon tedavisindeki bu beklenmeyen etkileri azaltmak amacıyla; tümör dokusunun yapısı, tümörün çevresi ve tümör yolları gibi bilgilerin artması sayesinde yeni kombinasyon tedavileri geliştirilmeye başlanmıştır.

Kombinasyon kemoterapi tedavisindeki temel noktalardan biri ilaçların doğru zamanda ve aynı anda kanserli dokuya ulaşmasıdır. Ancak, ilaçların farmakokinetik ve fizikokimyasal özelliklerinin birbirinden farklı olması sebebiyle ortak bir taşıyıcı ile kanserli dokuya taşınmadığı sürece bu çok mümkün değildir (Zhang 2016). İlaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılan nanoyapılı malzemelerin, kanserde kombinasyon tedavinin

çoklu ilaç direnci, artan toksisite ve aynı anda kanserli dokuya ulaşma gibi yan etkilerini ortadan kaldırabileceği umut edilmektedir.

Bu tez çalışmasında, Dosetaksel ve Kombrastatin A4 kemoterapi ilaçları PEG-PLGA polimerik nanoparçacık yapısının içerisine yüklenmiş ve *in vitro* sitotoksosite testleri gerçekleştirilmiştir.



2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

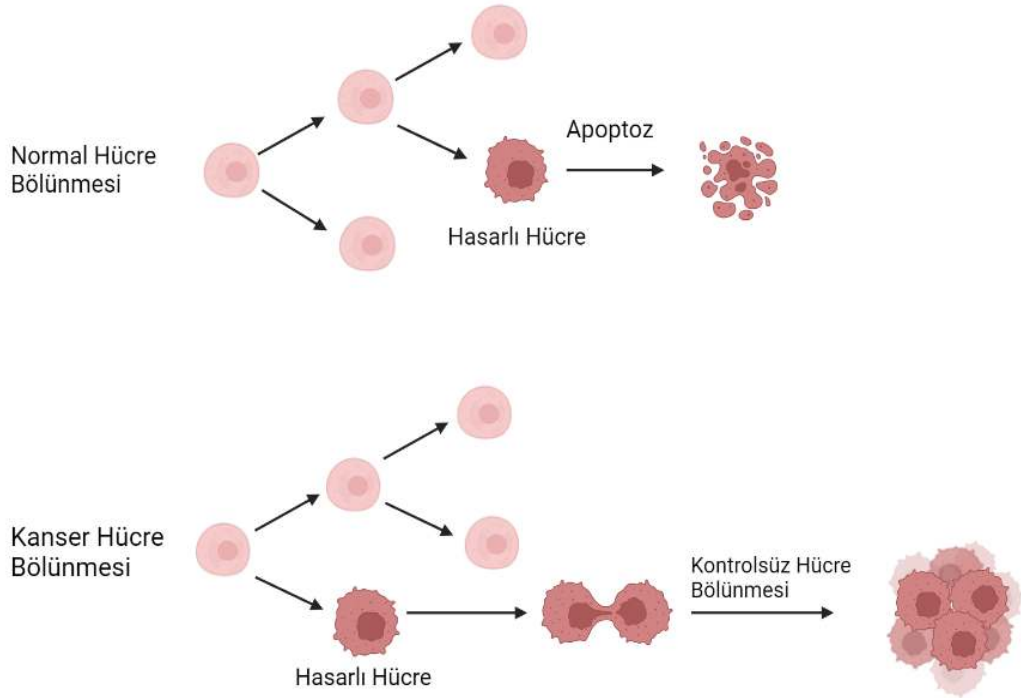
2.1 Kanser

Kanser, kayıtlı tarihlerden günümüze kadar insanlarda ve hayvanlarda sıklıkla rastlanan hastalıklardan biridir. İnsanda kanserin kayıtlı tarihine bakıldığında ilk kanser tanımının (kanser kelimesi birebir kullanılmasa dahi) M.Ö 3000 yılına ait olduğu görülmektedir. İlk kayıtlı kanser tanısı Edwin Smith papirüsünde yer almakta olup bir meme kanseri vakasıdır. M.Ö 1500 yılında yazılmış Ebers Papirüsünde ise cilt, rahim, rektum ve mide kanserlerinin kayıtlı olduğu görülmektedir (Lonardo vd. 2015). Kayıtlı kanser vakaları M.Ö 3000 yıllarına dayanmasına rağmen kanser kelimesi ilk defa M.Ö 400’de Yunan hekim Hipokrat tarafından kullanılmıştır. Hipokrat tümörlerin içlerini yengeçlere benzeterek Latince yengeç anlamına gelen karsinos ve karsinoma kelimelerini kullanmıştır (Papavramidou vd. 2010).

Kanser, bir hücre hastalığıdır. Vücudumuzda trilyonlarca hücre vardır, bu hücreler hücre bölünmesi adı verilen bir süreçle oluşur, büyür ve artık bölünemeyecek duruma geldiğinde ya da hasar gördüğünde ölürlər. Vücudumuzda her an hücre bölünmesi gerçekleşmekte ve vücudun ihtiyacına göre yeni hücreler oluşmaktadır. Hücrenin bölünmesini, büyümesini ve farklılaşmasını sağlayan mekanizmalardaki kontrolün kaybolduğu durumlarda hücre sürekli olarak büyümeye ve çoğalmaya başlar, bu durum sonucunda kanser gelişmektedir. Hücre büyümesini kontrol eden bu mekanizmanın bozulmasının sebebi, bazı genlerdeki normal dışı fonksiyonlardır. Bu fonksiyon bozuklukları genlerle ilgili olduğundan kanser oluşumundaki ilk sebep genetik bozukluklardır. Kanser hastalığına sebep olan bazı durumlara; proto-onkogenler, p53 tümör baskılayıcı geni, DNA yapısının onarımını sağlayan genler ve apoptoz düzenleyici genlerdeki hasarlar örnek olarak verilebilir.

Kanser oluşumuna sebep olan bir dizi sebep Hanahan ve Weinberg (2011) tarafından açıklanmıştır. Bu sebepler; P53 adı verilen tümör baskılayıcı genlerin inaktive olması, kontrolünü kaybeden onkogenlerin aktive olması, anjiyogeneizde artış, epigenetik modifikasyonların sebep olduğu genetik değişiklikler olarak sıralanabilir. Normal hücre

ve dokular, hücre bölünmesi ve büyümesi için salgılanan sinyalleri dikkate almakta ve aldığı sinyaller sonucu hareket etmektedir. Oluşan bu hasarlı hücreler ise alınan bu sinyalleri kontrol ederek istenmeyen şekilde kontrolsüz büyümeye ve çoğalmaya devam ederler (Hanahan ve Weinberg 2011). Şekil 2.1 de normal ve kanserli hücrelerin çoğalması gösterilmiştir. Bu hasarlı hücreler kanser hücresi olarak isimlendirilir. Bu kanser hücrelerinin kontrolsüz olarak büyüüp hızla bölünmesi sonucunda oluşturdukları katı, düzensiz yapıya ise tümör adı verilmektedir.



Şekil 2.1 Normal ve Hasarlı Hücre Bölünmesi.

Normal hücreler, işlevlerine göre farklı görüntülere ve boyutlara sahiptirler. Aynı işlevdeki hücreler birbirine benzer görüntülerde ve boyutlarda olurken, kanser hücreleri tamamıyla birbirinden farklı görüntülerde ve boyutlarda olmaktadır (Hanahan ve Weinberg 2011). Sağlıklı hücreler görevli oldukları bölgede kalma eğiliminde iken kanser hücreleri tümör dokusundan ayrılarak kan ya da lenf dolaşımına dâhil olabilir. Vücut sıvıları ile taşınan bu kanserli hücreler farklı dokulara giderek yayılma gösterir, bu yayılmaya metastaz denir.

2.1.1 Kanser İstatistikleri

Dünya Sağlık Örgütüne (DSÖ) bağlı Uluslararası Kanser Araştırma Ajansının (IARC) 15.12.2020 tarihinde yayınladığı istatistiklere göre 2020 yılında kanser vakalarının sayısı 19,3 milyon iken kanser nedeniyle ölen insanların sayısı ise 9,96 milyondur. IARC verilerine göre dünya çapında her 5 kişiden 1 tanesi kansere yakalanmakta ve erkeklerin 8 de 1'i ile kadınların 11 de 1'i kanser sebebiyle hayatını yitirmektedir (DSÖ 2020).

DSÖ verilerine göre bulaşıcı olmayan hastalıklar sebebiyle olan ölümler tüm ölümlerin %71'ini oluşturmaktadır. Bulaşıcı olmayan hastalıklar kronik hastalıkları içerir ve uzun bir sürece yayılır. Bu ölümlere ilk sırada kardiyovasküler hastalıklar sebep olurken en çok ölüme sebep olan ikinci hastalık ise kanserdir. Kanseri, 172 ülkenin 91 tanesinde 70 yaş ve altı ölümlerde birinci ya da ikinci sırada gelmektedir, 22 ülkede ise üçüncü ya da dördüncü ölüm nedeni olarak gelmektedir.

Değişen dünya düzeni ile birlikte yeni kanser vakalarının ve kanser sebepli ölümlerin artacağı öngörülmektedir. IARC verilerine göre 2040 yılında dünya çapında tespit edilen kanser vakası sayısının 2020 yılına göre %47 oranında artarak 28,4 milyon olacağı düşünülmektedir. 2020 yılında 9,96 milyon olan ölüm sayısının ise artarak 2040 yılında 16,3 milyonu bulacağı tahmin edilmektedir (İnt. Kyn. 1). Dünya çapında kanser vakalarına ve ölümlere bakıldığında; en çok tespit edilen kanser türleri sırasıyla meme kanseri (%12), akciğer kanseri (%11) ve kolorektal kanserdir (%10). En çok ölüme sebep olan kanser türleri ise akciğer kanseri (%18), kolorektal kanser (%9), mide kanseri (%8) ve karaciğer kanseridir (%8) (İnt. Kyn. 1).

2.1.2 Kanseri Tedavisi

Kanseri tedavisi kanserin tipine, yapısına, bulunduğu yere ve hastanın sağlık durumuna göre değişiklik göstermektedir. Kanseri tedavisinde; cerrahi yöntem, kemoterapi, radyoterapi ve hormon tedavisi yöntemleri en sık kullanılan tedavi yöntemleridir. Bu tedavi yöntemleri tek başına uygulanabildiği gibi birlikte de uygulanabilmektedir. Kanseri tedavisinde en sık kullanılan tedavi yöntemleri alt başlıklar halinde detaylıca anlatılmıştır.

2.1.2.1 Cerrahi Tedavi

Cerrahi tedavi, kanser tedavisinde kullanılan en eski ve ana tedavi yöntemlerinden biridir. Cerrahi tedavi, kanserin belirli bir bölgede toplandığı durumlarda tümörlü dokunun cerrahi işlemlerle vücuttan çıkarılması işlemidir (Wyld vd. 2014).

Cerrahi işlem; kanser tanısı koymak için biyopsi işlemi uygulanmasında, tümörün boyutunun tespit edilmesi ve yayılıp yayılmadığının anlaşılmasında, tümör ve tümörlü dokunun bazen tamamının bazen bir kısmının vücuttan uzaklaştırılması işleminde, palyatif amaçlı kanser yan etkilerinin giderilmesinde, vücudun işlevini geri kazandırma amaçlı kullanılmaktadır (Sullivan vd. 2015).

Cerrahi tedavinin küratif amaçlı kullanımı genellikle bölgesel olmakta ve kanserin yayılım yapmadığı, ilk evresinde olduğu durumlarda tercih edilmektedir. Cerrahi işlemden önce veya sonra cerrahi işleme ek tedaviler de kullanılabilmektedir.

Cerrahi işlem bölgesel tümörlerin çıkarılmasında avantaj sağlayan bir tedavi yöntemidir. Ancak kanserin metastaz yaptığı durumlarda tercih edilememesi, cerrahi işlemin narkoz altında gerçekleşmesi ve komplikasyon gelişme riski barındırması, bazı durumlarda kanserin tamamıyla vücuttan uzaklaştırılamaması, işlem esnasında sağlıklı doku ve hücrelere de bir ölçüde zarar vermesi ve cerrahi işlemle vücuttan kanserli organın çıkarılması gibi durumlar dezavantaj oluşturmaktadır (Chu vd. 2015).

2.1.2.2 Kemoterapi

Kanser kemoterapisi antikanser ilaçları ile kanser tedavisi olarak tanımlanır. Antikanser ilaçlar genellikle cerrahi ve radyoterapiyle birlikte multimodal tedavinin bir parçası olarak yer almaktadır. Kemoterapi, kendi içinde uzun bir döneme sahip, tek ya da çoklu kemoterapi ajanlarının kombinasyonlu ve döngülü olarak kullanıldığı bir süreçtir (Altmann vd. 2009).

Kemoterapi kavramının kökeni Birinci Dünya savaşında kullanılan hardal gazının

antikanser özelliğinin fark edilmesiyle başlamıştır (Papac 2002). Berenblum (1929)'un yaptığı çalışmada hardal gazının farelerde anti-kanserojen olduğunu tanımlamıştır (Berenblum vd. 1929). Adair ve Bagg (1931)'in yaptığı çalışmada cilt kanseri bulunan farelere lokal olarak hardal gazı uygulamış ve yaptıkları histopatolojik gözlemler sonucunda kanser dokusunun azaldığını raporlamışlardır (Adair ve Bagg 1931). Goodman ve Gilman, non hodgkin lenfomaya sahip bir hastada hardal gazı tedavisi deneyerek ve Birinci Dünya Savaşında hardal gazı zehirlenmesi nedeni ile hayatını kaybeden askerlerin otopsi raporlarına dayanarak hardal gazının, savaşta bir silah olarak kullanılması fikrinden ziyade antikanserojenik etkisinin sistemli bir şekilde farmakodinamik ve farmakokinetik etkilerinin araştırılmasını önerip modern kemoterapinin ilk adımlarının atılmasını sağlamışlardır.

Lucy Wills (1937)'in Harvard Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesinde folik asitin kanser hücresi proliferasyonu üzerinde etkili olabileceğini keşfetmişlerdir. Akut lenfoblastik lösemi hastası çocuklarda folik asit eksikliği nedeniyle takviye sonucu akut lenfoblastik lösemi (ALL) hücrelerinin proliferasyonunu uyardığını tespit etmişlerdir (Farber vd. 1948). Bunun üzerine Farber ve arkadaşları folat analogu olan aminopterin ve amethopterin (methotrexate)'i sentezlemişlerdir. Bu analoglar folat gerektiren enzim mekanizmalarını bloke ederek akut lenfoblastik lösemi hastası çocuklarda malignant hücre proliferasyonu engelleyerek normal kemik iliği dokusunun gelişmesine yardımcı olmuştur. Bu sayede kemoterapiye vitaminler ve hücre fonksiyonları üzerinden yeni bir bakış açısı kazandırılmıştır (Farber vd. 1948, Chabner ve Jr 2005).

Modern anlamda kemoterapinin başlangıcı 1950'li yıllarda George Hitchings ve Gertrude Elion'un çalışmaları ile olmuştur. Hitchings ve Elion, pürin analogu olan 6-mercaptopurine (6-MP) sentezleyerek de novo sentez basamağını baskılamıştır. Bu yolla büyümeye çalışan tümör hücrelerinin DNA ve RNA sentezinin ön basamaklarını kontrol altına alınıp proliferasyonlarını baskılanmıştır (Hitchings ve Elion 1954). Eli Lilly, antidiyabetik ilaç olarak kullanılan Vinca alkaloidinin tümör hücrelerinin proliferasyonu baskıladığı gözlemlenmiştir. Sonrasında yapılan çalışmalar ile Vinca alkaloidinin mikrotübül polimerizasyonunu engelleyerek hücre bölünmesini inhibisyonunu sağladığı gösterilmiştir (Chabner ve Jr 2005).

Hücre biyolojisinin gelişmesi ve hücre sinyal yollarının tanımlanması sayesinde hedef odaklı kemoterapi konsepti ortaya çıkmıştır. Renal hücreli karsinom, VHL geninin mutasyonu ve kaybıyla ortaya çıkan bir tümör türüdür. VHL geni normal hücrelerde anjiyogenezi düzenleyerek hücrelerin kontrolsüz büyümesini engellemektedir. Sherwood ve arkadaşları (1971)'nn yaptığı çalışmada PDGF ve VEGF büyüme faktörlerinin anjiyogenezi düzenlediğini tanımlanmış ayrıca SU-11248, Bayer 43-9006 gibi moleküller ile VEGF-2 reseptörü baskılanması ile anti-anjiyogenik etki mekanizması kullanılarak anti-tümör ilaç olarak kullanılabileceği göstermiştir (Sherwood ve Folkman 1971).

Ancak kemoterapi de tam anlamıyla etkin sonuçlar elde edilememesinin en temel sebebi, mevcut antikanser ajanlarının nonspesifik yapıları sebebiyle kanser hücrelerine zarar verdiği gibi sağlıklı doku ve hücrelere de zarar vermesidir. Antikanser ajanları bölünen hücreleri öldürme mekanizmasıyla çalışır ve bu durum sıklıkla bölünen sağlıklı hücrelerinin de ölmesine sebep olmaktadır. Bu hücrelere örnek olarak lökositler, trombositler ve saç folikülleri verilebilir (Kakde vd. 2011). Geleneksel kemoterapi ilaçlarının düşük suda çözünürlük, dolaşım sistemindeki stabilesinin zayıf olması, toksisitesinin yüksek olması, tümör dokularını hedefleyememesi, çoklu ilaç direnci geliştirmesi ve kemoterapötik ajanın hidrofobik olması gibi dezavantajları vardır (Mattheolabakis vd. 2012).

2.1.2.3 Radyoterapi

Radyasyon, kanser hücrelerini öldürmek amacıyla kullanılan fiziksel bir tedavi yöntemidir. İlk olarak bir tıp öğrencisi olan Emil Grubbe tarafından klinikte uygulanmıştır. O tarihten bu yana, radyasyon tedavisi teknolojiyle paralel bir şekilde gelişmiş ve kanser tedavisinde sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır.

Radyoterapi ilk olarak ilacın yetersiz olduğu durumlarda tercih edilmiş ve radyoterapi amaçlı radyoaktif radyum kullanılmıştır. Tedavinin ciddi yan etkileri tespit edildikten sonra radyoaktif radyum kullanımına sınırlamalar ve bazı kurallar getirilmiştir (Beyzadeoğlu vd. 2010).

Radyoterapi sırasında iyonlaştırıcı radyasyon kullanılmaktadır (Baskar vd. 2012). İyonlaştırıcı radyasyon içinden geçtiği dokuda enerji birikmesi yaparak hücrenin DNA yapısına zarar verir bu durum hücrenin bölünme ve çoğalmasını engelleyerek hücrelerin ölmesini sağlamaktadır (Jackson ve Bartek 2009). Radyasyon tedavisinin kanserli hücrenin DNA'sına zarar verip kanser hücrelerini ölüme götürmesi günler veya haftalar sürebilmektedir. Radyasyon tedavisi bittikten sonra dahi kanser hücreleri ölmeye devam etmektedir (Brady vd. 2006).

Radyoterapi, kanser tedavisinde cerrahi tedaviden sonra en çok kullanılan tedavi yöntemidir. Kanser vakalarının %50-60'ına radyoterapi uygulanmaktadır (Delaney vd. 2005). Tahmini olarak radyoterapinin küratif tedaviye katkısı %40 kadardır (Barnett vd. 2009).

Radyoterapi, iç ve dış olmak üzere iki temel tedavi yaklaşımı sunmaktadır. Hangi tedavi yönteminin uygulanacağı ise, tümörün türü, boyutu, vücutta bulunduğu yer, sağlıklı dokularla olan yakınlığı ya da kişinin genel sağlık durumu gibi birçok parametreye göre değişiklik göstermektedir. Dış radyoterapi, vücudun dışından tümörün bulunduğu konuma göre bir radyoterapi cihazından bölgesel radyasyon tedavisi uygulanmasıdır. İç radyoterapi ise sıvı veya katı kaynak kullanılmasına göre bölgesel ya da sistemik olarak uygulanabilmektedir. Katı kaynak kullanılarak uygulanan yöntemde kanserli bölgenin yakınına bir radyasyon kaynağı yerleştirilerek bölgesel bir tedavi uygulanırken, sıvı kaynak kullanılarak uygulanan yöntemde damar içi ya da yutma yoluyla sıvı kaynağın sistemik bir tedavi uygulanması sağlanmaktadır (Baskar vd. 2012).

Radyoterapi, küratif amaçlı kullanılabileceği gibi kanserin sebep olduğu bazı yan etkilerin azaltılabilmesi amacıyla palyatif olarak da kullanılabilmektedir. Radyoterapi tek başına ya da cerrahi yöntem, kemoterapi ve immünoterapi gibi tedavi yöntemleriyle birlikte kullanılmaktadır. Radyoterapi, cerrahi işlemden önce tümörün küçültülmesi, cerrahi işlem esnasında deriden geçmeden tümör dokusuna direkt radyasyon verilmesi ya da cerrahi işlemden sonra kalan mikroskobik boyuttaki kanser hücrelerinin öldürülmesinde kullanılabilmektedir (Baskar vd. 2012).

Radyoterapi uygulamasının bazı dezavantajları da mevcuttur. Radyoterapi uygulaması, kanserli hücrelerin DNA yapılarına zarar verirken sağlıklı bazı hücrelere de zarar vermektedir. Radyasyon sonrasında interfaz evresinde bulunan hücreler apoptoza uğrayarak ölebilirler (Hendry ve West 1997). Bazı kök hücreler ise radyasyona maruz kaldıktan sonra farklılaşır bu durum dokular arasında fibröz birikmesine ya da yara izi oluşumuna sebep olabilmektedir (Gordon Steel 2009). Radyasyon vücutta, iltihaplı sıvı birikmesine, inflamasyona, eriteme, kafa içi basınç artışına ve pulmoner fibrozise sebep olabilmektedir (Chen vd. 2002).

2.1.2.4 Hormon Tedavisi

Hormonlar, endokrin sistemi tarafından üretilen kan yolu ile doku ve organlara taşınarak doku ve organların çalışmalarını düzenleyici sinyaller veren kimyasal bileşiklerdir. Hormonlar yavaş ve zamanla etki eden bir mekanizmaya sahiptir. Hormonlar vücutta; büyüme ve gelişme, üreme, metabolizma gibi birçok farklı işlemin düzenlenmesini sağlamaktadırlar. Bazı hormonlar gen ekspresyonu ve hücre çoğalmasında güçlü etkilere sahiptirler. Bu hormonların normalden fazla olması kontrolsüz hücre çoğalmasına ve kanserli hücrenin oluşumuna neden olabilmektedir. Hormonal düzensizliklerden kaynaklanan tümörlere hormona bağımlı maligniteler denir ve bu tümörler normalden fazla hormon reseptör ekspresyonuna sahiptirler (Henderson ve Feigelson 2000).

Meme, prostat, yumurtalık, rahim veya tiroit kanseri gibi hormona bağlı kanser türlerinin tedavisinde hormon tedavisi kullanılmaktadır. Hormon tedavisi, hormona bağlı olarak büyüyen ve gelişen kanser türlerinin büyümesini yavaşlatmak ya da tamamen durdurmak için kullanılmaktadır. Hormon tedavisinde amaç vücuttaki bu hormonların üretimini engellenmek ya da hormon reseptörleri üzerinde değişikliklere sebep olarak yayılmalarını yavaşlatmak veya durdurabilmektir (Fairchild vd. 2015).

Hormon tedavisi, kanserin türü, yayılımı, yayıldığı uzaklığı, büyümenin hormonlar ile ilişkisi olup olmadığı gibi etkenlere bağlı olarak tercih edilmektedir. Hormon tedavisinin genellikle diğer kanser tedavileriyle birlikte kullanılması önerilmektedir. Hormon tedavisi, ameliyattan önce tümörün küçültülmesinde, uygulanan birincil tedavi

yönteminden sonra tümörün geri gelme riskinin azaltılmasında ya da tekrar oluşan kanser hücrelerinin yok edilmesinde kullanılabilmektedir. Hormon tedavisi oral yolla, enjeksiyon ile ya da cerrahi (hormon üreten organların vücuttan çıkarılması) yöntemle uygulanabilmektedir (Mitra vd. 2022).

Hormon tedavisi sistemsal bir tedavi yöntemidir ve diğer kanser tedavilerinde olduğu gibi bazı yan etkilere sahiptir. Hormon tedavisinin yan etkileri cinsiyete, alınan hormon miktarına, hormon türüne ve hastanın genel sağlık durumuna göre çeşitli farklılıklar göstermektedir. Bazı olası yan etkiler şu şekilde sıralanabilir; sıcak basması, cinsel isteksizlik, osteoporoz, vücuttaki kas erimesine bağlı olarak yağ oranında artış ve tükenmişlik. Yan etkiler tedavi süresince devam etmektedir, genellikle tedavi bitiminde ortadan kalkmaktadır (İnt. Kyn.2).

2.1.3 Kanserde Hedeflendirme

Geleneksel tedavi yöntemlerindeki kanserli dokuların hedeflenememesi ve yüksek terapötik etkinin oluşturduğu yan etkiler geleneksel tedaviyi kısıtlamaktadır. Bunun yerine son yıllarda, nano teknolojik yaklaşımlar kullanılarak terapötik etki artırılıp yan etkinin en aza indirilmesi ve ilgili kanser dokularının hedeflenmesi amaçlanmakta ve çalışmalar bu kapsamda gerçekleştirilmektedir (Tekade vd. 2017).

2.1.3.1 Pasif Hedefleme

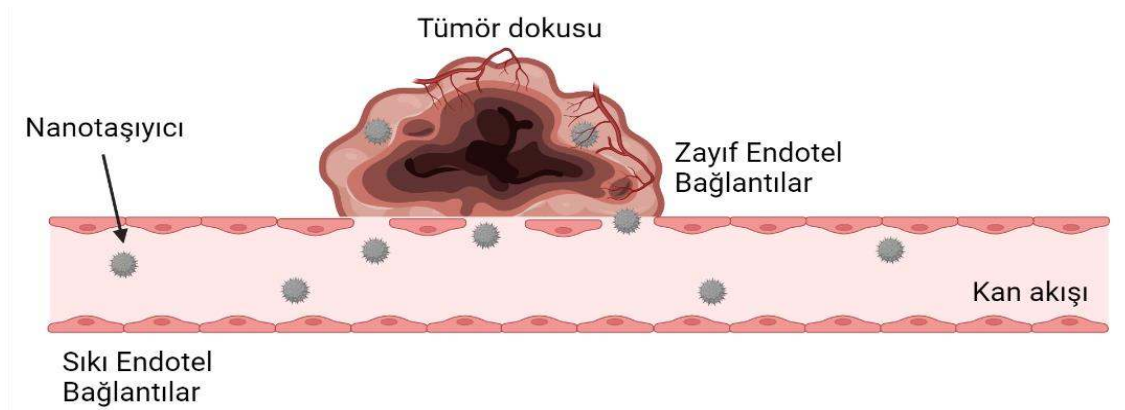
Kanserli hücrelerden oluşan dokuların damar yapısı sağlıklı dokulardaki damar yapısından oldukça farklıdır. Kanserli dokular sağlıklı dokulara göre kontrolsüz olarak büyüyen ve çoğalan yapılar oldukları için besin alımı ve oksijen gibi hücre büyümesine katkı sağlayan bileşenlere daha fazla ihtiyaç duymaktadırlar. Bu ihtiyacın karşılanabilmesi için anjiyogenez adı verilen yeni damar oluşumları meydana gelmektedir (Kalyane vd. 2019).

Normal kılcal damarlar kanser damarlarına göre sıralı, düzenli ve hasarsız bir yapıya sahipken, kanser dokularındaki damar sistemi aşırı geçirgenlik, bazal membran yokluğu

ve kıvrımlılık gibi sağlıklı dokularda olmayan anormal özelliklere sahiptir (Matsumura ve Maeda 1986). Sağlıklı dokulardaki bu sıkı yapı sebebiyle 2 nm'den daha büyük yapılar endotel hücreler arasından giremezler. Ancak kanser dokularındaki kan damarları farklı çaplara, endotel hücreleri arasındaki geniş açıklıklara, düzensiz şekillere ve anormal girintili çıkıntılı yapılara sahiptir. Bu durum, kanser dokularındaki geniş endotel açıklıklardan 10 ile 500 nm arasındaki yapıların kanserli dokuya girebilmesine olanak vermektedir. Bu durum artırılmış geçiş etkisi olarak adlandırılmaktadır (Kalyane vd. 2019).

Kanserli dokularda aynı zamanda damar sistemi içerisindeki bileşenlerin boşaltımını devre dışı bırakan ve bu bileşenlerin tümör dokusu içerisinde birikmesine yol açan lenfatik sistem zayıflığı mevcuttur. Kanserli doku içerisine giren bir yapı lenfatik sistem azlığı sebebiyle kolayca dışarıya çıkamaz bu etki ise alıkonma etkisi olarak adlandırılmaktadır (Byrne vd. 2008).

Kanserli dokulardaki bu damar geçirgenliği ve düşük lenfatik boşaltım sayesinde kanserli dokuların hedeflenmesine pasif hedeflendirme “EPR etki: artırılmış geçirgenlik ve alıkonma” denmektedir. Şekil 2.2 Pasif hedefleme mekanizmasını şematik olarak göstermektedir.



Şekil 2.2 Pasif hedefleme mekanizması şematik gösterimi.

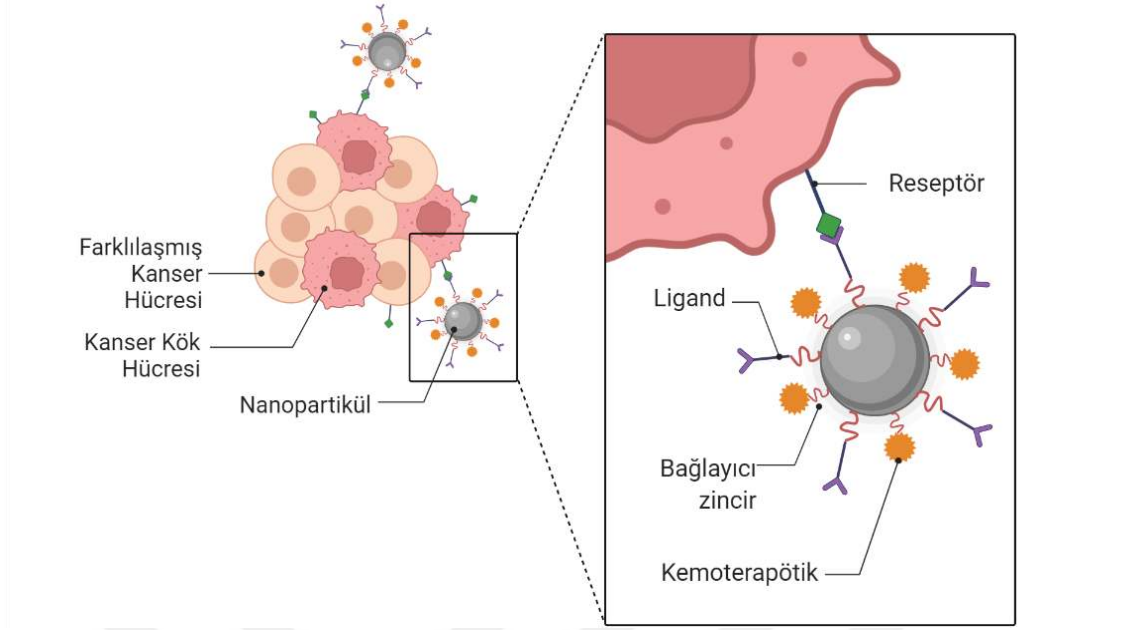
2.1.3.2 Aktif Hedefleme

Kanser hücrelerin yüzeyinde normal hücrelerden farklı olarak aşırı eksprese olan yüzey molekülleri bulunmaktadır (Shi vd. 2011). Nanotaşıyıcılar, kanserli hücrelerin yüzeyinde bulunan molekülleri ya da reseptörleri spesifik olarak tanıyarak bağlanan ligandlarla modifiye edilebilmektedir (Yu vd. 2010). Kanser hücrelerinin spesifik olarak hedeflenmesine aktif hedefleme denmektedir. Şekil 2.3 de Aktif hedefleme mekanizması şematik olarak gösterilmiştir.

Nanotaşıyıcılar üzerindeki ligandlar kanser hücrelerin yüzeyinde bulunan reseptörlere bağlanarak reseptör aracılı endositozun gerçekleşmesini sağlamaktadır. Bu şekilde hücre içerisine giren nanotaşıyıcılar antikanser ilaçlarını kanser hücresi içerisinde salmaktadır (Bertrand vd. 2014).

Nanotaşıyıcıların spesifik olarak kanserli dokuyu hedeflemesi ile sağlanan bazı avantajlar şu şekilde sıralanabilir; farmokokinetik ve farmakodinamik profillerin iyileşmesi, ilaç salımının kontrollü ve sürekli olması, arttırılmış özgüllük, hücre içi içselleştirmede artış, düşük sistemik toksisite (Bae 2009).

Hedeflenen moleküller arasında monoklonal antikorlar, nükleik asitler, peptitler, aptamerler, karbonhidratlar, amino asitler ve vitaminler bulunmaktadır (Danhier vd. 2010). En çok hedeflenen reseptörler arasında transferrin, folat reseptörleri, glikoproteinler ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) bulunmaktadır (Pietersz vd. 2017).



Şekil 2.3 Aktif hedefleme mekanizması şematik gösterimi.

Antikor Bazlı Hedefleme; antikorlar, nanotaşıyıcıların spesifik olarak hedeflemesi için kullanılan ilk moleküllerden biridir (Steinhauser vd. 2006). Kanserli hücre antijenine bağlanan ilk monoklonal antikor 1975 yılında geliştirilmiştir (Köhler ve Milstein 1975). Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından klinik uygulamalar için onaylanan ilk monoklonal antikor ise fare monoklonal antikor Muromonab CD3'tür (Thistlethwaite vd. 1984).

Günümüzde klinik deneylerden başarıyla geçen ve FDA tarafından onaylanan monoklonal antikor tedavileri mevcuttur. Monoklonal antikor aracılı hedefleme için potansiyel moleküller arasında insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER2), epidermal büyüme faktörü reseptörü EGFR ve prostata özgü olan membran antijeni bulunmaktadır (Bazak vd. 2015).

HER2, ekspresyonu meme kanserinde aşırı olan moleküllerden biridir ve meme kanserlerinin yaklaşık %25'inde bulunmaktadır (Nahta vd. 2006). HER2, kanserli hücrelerdeki ekspresyonu ve nanotaşıyıcıya antikor bağlanmasından sonra hücre içine alınması gibi özellikleri sayesinde meme kanserinde hedefli nanotaşıyıcı sistemleri için uygun bir hedef olarak görülmektedir (Wartlick vd. 2004). Monoklonal antikor trastuzumab HER2 reseptörünü hedefler ve HER2 pozitif meme kanserinde temel tedavi yöntemidir (Spector ve Blackwell 2009). Trastuzumab bağlanan nanotaşıyıcıların HER2

pozitif kanserde kanser hücrelerine spesifik olarak hedefleyebildiği çalışmalarla gösterilmiştir (Steinhauser vd. 2006). Trastuzumab bağlı nanotaşıyıcılar HER2 pozitif meme kanserinin erken teşhisi için görüntüleme ajanı olarak araştırılmış ve umut vadeditici sonuçlar elde edilmiştir (Adolphi vd. 2012). Görüntüleme için kullanılmasının yanında aynı zamanda antikanser ilaçların verilmesinde kullanılan nanotaşıyıcılara da bağlanmıştır (Day vd. 2010) .

Epidermal büyüme faktörü reseptörü, epitelyal kanser hücrelerinde normal hücrelere göre daha fazla ekspresyon göstermektedir. Cetuximab, epidermal büyüme faktörü reseptörüne yüksek seçicilik ile bağlanan ve kanser tedavisinde potansiyel olarak kullanılmasını sağlayan monoklonal antikordandır (Harding ve Burtneş 2005).

Prostate özgü membran antijeni, prostat kanseri hücrelerinin yanı sıra tümörlerin çoğunda aşırı bulunmaktadır (Hrkach vd. 2012). Anti- Prostate özgü membran antikoru olan J591, spesifik hedefleme, manyetik rezonans görüntüleme ve prostat tedavisi için nanotaşıyıcılara konjuge edilmektedir.

Aptamer Bazlı Hedefleme; aptamerler, ikincil ya da üçüncül üç boyutlara katlanabilen tek sarmallı yapıdan oluşan oligonükleotitlerdir. Proteinlere bağlanabilme yeteneğine sahiptirler (Ni vd. 2011). Aptamerler, yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahip hedefleme ajanlarıdır ve antikordlara eş değer sayılırlar. Aptamerler, spesifik olarak bir hedefe özgü olacak biçimde sentezlenmektedir.

Ligand Bazlı Hedefleme; kanser hücrelerini hedeflemek için, kanserli hücrelerde aşırı ekspresye olan yüzey reseptörlerine karşı yüksek seçiciliğe sahip ligandlar kullanılabilir. Transferrin gibi peptitleri ve folik asit gibi molekülleri hedeflemek için nanotaşıyıcı yüzeyleri spesifik ligandlarla konjuge edilmektedir.

Transferrin, hücrelere demir taşıyan bir tür glikoproteindir. Transferrin reseptörü kanser hücrelerinde aşırı ekspresye olmaktadır ve bu sebeple hedefleme için sıklıkla tercih edilmektedir (Amreddy vd. 2015, Santi vd. 2017).

Nükleotid sentezi kullanılan bir vitamin türü olan folik asit folat reseptörü ile spesifik olarak bağlanmaktadır. Folat reseptörünün alfa izoformu olan FR- α kanserli hücrelerin yaklaşık %40'ında aşırı eksprese olurken FR- β izoformu da kanser hücrelerinin yüzeyinde eksprese olmaktadır (Low ve Kularatne 2009). Bu nedenle folat reseptörlerinin hedeflenmesi için folat konjuge edilmiş nanotaşıyıcılar kanser tedavisi için sıklıkla kullanılmaktadır (Muralidharan vd. 2016, Samadian vd. 2016).

2.1.4 Kanserde Kombinasyon Tedavi

Kombinasyon kemoterapi, kanser tedavisi için birden fazla anti-kanser ilacın aynı anda kullanılmasıdır. Kombinasyon tedavinin klinikte kullanımı 50-60 yıl kadar geçmişe dayanmaktadır (Pritchard vd. 2012). 1960'larda kombinasyon kemoterapinin akut lenfositik lösemiye tedavi etmesi ile kemoterapide yeni bir çağ başlamıştır. 1970 yıllarında akciğer kanseri hastalarında kombinasyon kemoterapi çalışmaları yapılmış, tedavinin tek ve sıralı ilaç kullanımından daha başarılı olduğu bulunmuştur (DeVita ve Chu 2008). Yapılan çalışmalar ile genellikle kombine kemoterapi tedavileri hem metastatik kansere karşı hem de birincil cerrahi tedaviden sonra yüksek tekrar riski taşıyan hastalarda tekli ilaç kullanımından daha etkili olduğu kanıtlanmıştır (Chabner ve Jr 2005).

Antikanser ilaçlarının çoğunun terapötik aralıkları oldukça dardır. Çoklu ilaç direnci gelişmesine sebep olurlar ve biyolojik dağılımları spesifik değildir. Bu durum sağlıklı doku ve hücrelerde ağır yan etkilere sebep olmaktadır (Mayer vd. 2006). Kemoterapi ilaçları kanserli hücreleri hücre bölünmesinin farklı safhalarında etkilediğinden bir arada kullanılması ilaçlarının başarı oranlarını arttırmakta ve direncin önlenmesine yardımcı olmaktadır (Musgrove vd. 2011). Örnek olarak ilaçlardan biri DNA replikasyonunu bozarken, diğer bir ilaç anjiyogenezi durdurabilmektedir.

Mevcut kombinasyon kemoterapide, düşük ilaç dozları verilerek sistemik toksisitenin azaltılması ve ilaç etkinliğinin artırılması amaçlanmaktadır (Mayer vd. 2006). Kombinasyon kemoterapi ile çoklu ilaç direncinin üstesinden gelinmesi ya da geciktirilmesi, ilaç dozunun azalması ile sağlıklı doku ve hücrelerdeki toksisitenin azalması gibi avantajlar elde edilmektedir (Chou 2010).

Kombinasyon kemoterapi yapılırken dikkat edilmesi gereken bazı unsurlar şu şeklide sıralanabilir; kullanılan ilaçların toksisitelerinin birbiriyle örtüşmemesi, çoklu ilaç direncinin ortaya çıkmasını engellemek için farklı etki mekanizmasına sahip ilaçların birlikte kullanılması, kombinasyon tedavinin kanserin erken evrelerinde kullanılması (Harasym vd. 2007).

Kombinasyon tedavide ilaç etkinliklerinin iyi bilinmesi ve tasarlanması gerekmektedir. Belirli ilaçlar birlikte belirli oranlarda kullanıldığında sinerjistik etki oluşturabilirken bazıları yan etki oluşturabilir ya da antagonistik etki yaratabilmektedir (Pinto vd. 2011).

Gelişen teknoloji ile bu sınırlamaları ortadan kaldıran ilaç taşıma sistemleri geliştirilmiştir. Nanotaşıyıcı sistemler ilaçları yüklenen oranlarda kanserli hücrede toplayabilmektedir. Nanotaşıyıcı ilaç sistemleri, antikanser ilaçların yarı ömrünü ve stabilliğini arttırmakta, hidrofobik ve hidrofilik ilaçların farmakokinetik etkilerini arttırarak kanser dokusunda toplanarak ilaçların kontrollü salımını sağlamaktadır (Amirsaadat vd. 2021).

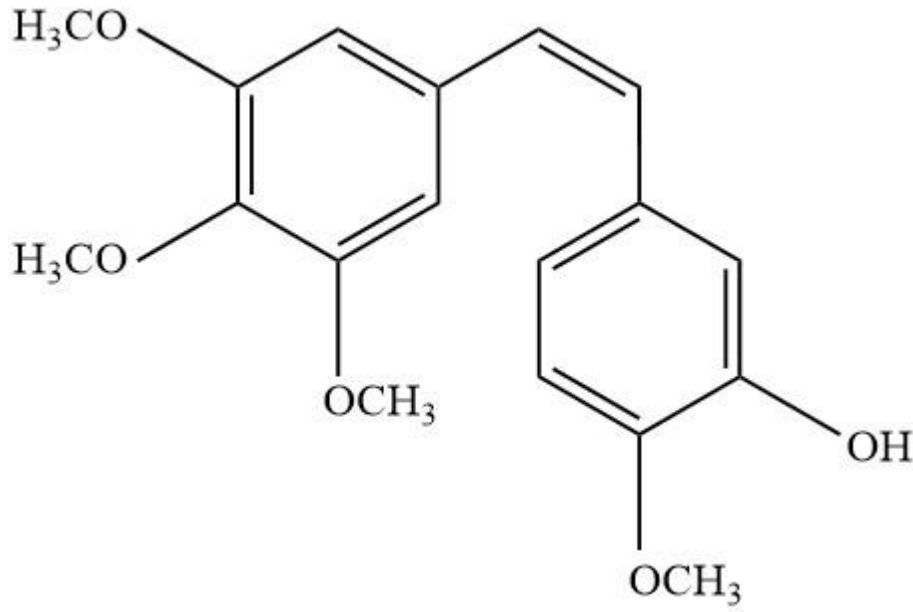
2.1.4.1 Kombrestatin A4

Kombrestatin A4 vasküler bozucu ajan olarak kullanılan bir antikanser ilacıdır. Kombrestatin A4, Pepptit (1989) tarafından Güney Afrika ağacı olan *Combretum caffrum* kabuğundan izole edilmesiyle elde edilen doğal bir bileşiktir (Pettit vd. 1989).

Kombrestatin A4 normal kan damarları ile kanser damarları arasında ayırım yaparak kanser damarlarını bozar ve vasküler damar bozulması sağlayarak kanser hücrelerinin apoptozunu sağlamaktadır (Patterson ve Rustin 2007).

Kombrestatin A4 aynı zamanda tübülün polimerizasyon inhibitörüdür. Mikrotübüller, hücrenin şeklinin korunması, hücre bölünmesi ve hücrenin hareketliliği gibi birçok göreve sahip olmakla birlikte en önemli görevleri mitoz bölünme esnasında mitotik iplikçikleri oluşturmaktır (Ems-McClung ve Walczak 2010). Mikrotübüllerin yapısı

bozulduğunda iğ iplikçikleri anormal bir hal almaya başlar ve hücre bölünmesi engellenmiş olur (Kaur vd. 2014). Mikrotübüllerin bu özelliği sayesinde kanser hücrelerinin bölünmesi engellenerek hücre ölümü sağlanabilmektedir. Mikrotübüllerin yapısında bağlanma için 3 bölge bulunmaktadır, bunlar kolşisin, takson ve vinka bölgeleridir (Guan vd. 2014). Kombrestatin A4 kolşisin bölgesine bağlanarak tübülün polimerizasyonunu inhibe ederek mitoz bölünmeyi durdurmaktadır (Chang vd. 2006). Kombrestatin A4, mitoz bölünmeyi durdurarak hücrelerin bölünmesini ve çoğalmasını engellemektedir. Mitoz bölünmenin durması hücrelerin ölümüne sebep olmaktadır. Kombrestatin A4, anti mitotik etki mekanizmasıyla kanserli hücrelerin ölmesini sağlayan antikanser ilaçlarından biridir. Kombrestatin A4'ün kimyasal yapısı Şekil 2.4 de gösterilmiştir.



Şekil 2.4 Kombrestatin A4 kimyasal yapısı.

2.1.4.2. Dosetaksel

Dosetaksel, taksan grubu ailesinin üyesi olan bir antikanser ilacıdır. *Vruba porsuk* ağacının yaprak özlerinden elde edilen paklitakselin daha güçlü yarı sentetik bir türevidir. (Du vd. 2018). 1980 lerde keşfedilmiş, 1986 da patenti alınmış ve 1995 yılında tıbbi kullanımı için FDA'dan onay almıştır (Kenmotsu ve Tanigawara 2015) . DSÖ' nün temel ilaçlar listesinde bulunmaktadır (DSÖ).

Sisplatin ile kombinasyon halinde prostat kanseri tedavisinde birinci tedavi adımı olarak onay almıştır. Küçük hücre dışı akciğer kanseri hastalarında Dosetaksel birinci basamak tedavidir (Du vd. 2018). Meme kanseri tedavisinde, yüksek riskli hastalar için önemli derecede sağ kalım oranı göstermektedir (Kim vd. 2016). Dosetaksel, oksaliplatin ve kapesitabin ile birlikte üçlü kombinasyon şeklinde ileri mide kanseri hastalarının tedavisi için de kullanılmaktadır (Ostwal vd. 2018).

The image displays the chemical structure of a morphine derivative, specifically a prodrug. The morphine core is substituted with a 3,4,5-trimethylbenzoyl group at the 3-position and an acetyl group at the 6-position. The morphine core is further substituted with a 3-O-benzoyl-L-phenylalanine ester group at the 3-position. The structure is shown in a skeletal format with stereochemistry indicated by wedges and dashes.

20

2.2 Nanoteknoloji

Nanoteknoloji, modern bilimin ve mühendisliğin geniş bir alanıdır. Nanoteknoloji terimi, boyutu nanometre düzeyinde yapıların oluşturulması ve kullanılmasını ifade etmektedir. Bu yapılar genellikle 1-100 nm (çoğunlukla birkaç yüz nm'ye kadar) civarında çapa sahiptirler (Tekade vd. 2017). Nanoteknoloji fikri ilk defa Feynman tarafından 'There's Plenty of Room at the Bottom' başlıklı konferans konuşmasında dile getirilmiştir. Feynman nanoteknoloji konseptini atomik düzeyde manipülasyonlar yapmak olarak ele almıştır (Hulla vd. 2015).

Nanoteknoloji terimi ilk olarak 1974 yılında Japon bilim adamı Norio Taniguchi tarafından kullanılmıştır. Taniguchi, nanoteknoloji terimini yarı iletken üretimi sürecinde kullanmış olup malzemelerin nanometre mertebesinde üretim yapılması, ayrıştırılması, sağlamlaştırılması ve deformasyonu üzerinde durmuştur (Bhatia, 2016).

Nanoteknoloji günümüzde savunma sanayi, enerji, tarım ve sağlık gibi birçok alanda geniş çaplı olarak yer almaktadır. Örneğin farmasötik uygulamalarda nanoteknoloji; tanısal biyosensörler, ilaç dağıtım sistemleri ve görüntüleme problemleri gibi tıbbi cihazlar üzerinde derin bir etkiye sahiptir. Gıda ve kozmetik endüstrisinde nanomalzemelerin kullanımı ile üretim, paketlenme, raf ömrü ve biyoyararlanım üzerindeki iyileştirmeler önemli ölçüde artmıştır (Jin vd. 2009).

Karbon nanotüpler, nanoteknolojinin önemli araştırma alanlarından biridir. En basit haliyle karbon nanotüpler grafen yapısındaki karbon atomlarının bir silindirik olacak şekilde kendi üzerine katlanmasıyla oluşmaktadır. Hilbert ve arkadaşları (1958) transmisyon elektron mikroskopisindeki ilerlemeleri sayesinde aslında üretilen nanofilamentlerin karbon nanotüpler olduklarını keşfetmişlerdir. Daha sonra karbon nanotüplerin sentezi konusunda çekirdek oluşturma ve büyütme işlemlerinin anlaşılması sağlanmıştır.

Nanoteknolojinin başlangıç dönemlerinde karbon nanotüpler ve diğer yapısal destek malzemesi üzerinde çalışılmıştır. 1900'lerin sonunda ise medikal cihazların daha hassas

olarak geliştirilmesinden ziyade direkt olarak kendisi medikal tedavinin içerisinde yer alan bir nanoform olan nanoparçacıklar ortaya çıkmıştır (Debbage, 2009).

2.2.1 Polimerik Nanoparçacıklar

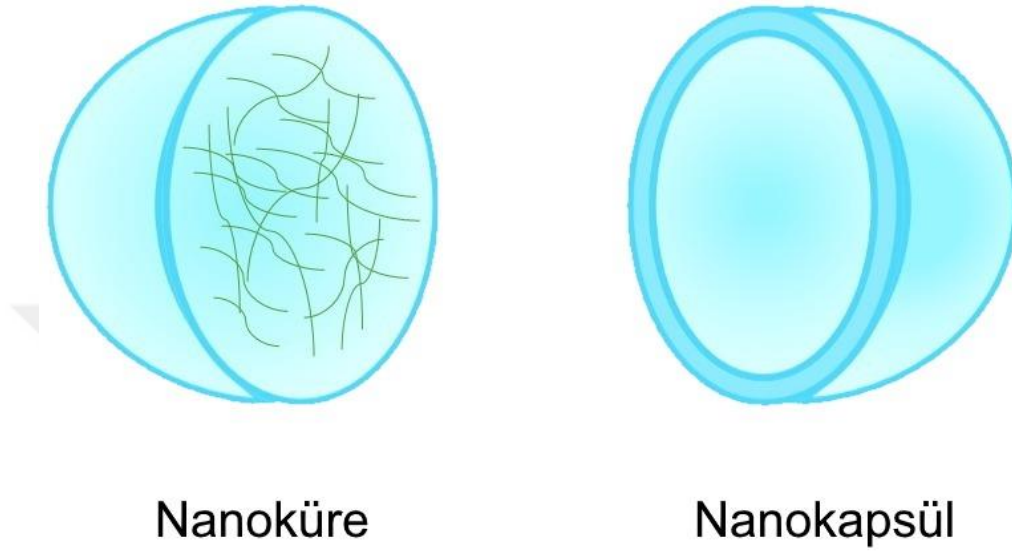
Polimerik nanoparçacıklar, boyutları genellikle 1 ile 100 nm arasında değişen katı parçacıklar olarak tanımlanmaktadır. Doğal, sentetik ya da yarı sentetik polimerlerden elde edilebilirler ve biyolojik olarak parçalanmayan ya da parçalanmayan polimerlerden oluşabilmektedirler (Sur vd. 2019).

İlk polimerik nanoparçacıklar 1994 yılında kullanıma girmiştir ve ilk polimerik nanoparçacıkların yapımında biyolojik olarak parçalanamayan polimerler kullanılmıştır. Ancak biyolojik olarak parçalanamayan polimerik nanoparçacıkların sistemik toksisite oluşturmaları, yüksek bağışıklık sistemi tepkisi oluşturmaları, alerjen olması sebebiyle tercih edilmemektedirler (Ramkumar vd. 2017). Biyolojik olarak parçalanabilen ve toksik olmayan polimerlerler vücut içinde bozunduğunda vücuttan atılmasına gerek olmaması durumu biyobozunur polimer kullanımını arttırmış ve nanoparçacık sistemleri için tercih edilir hale getirmiştir (Wen vd. 2019).

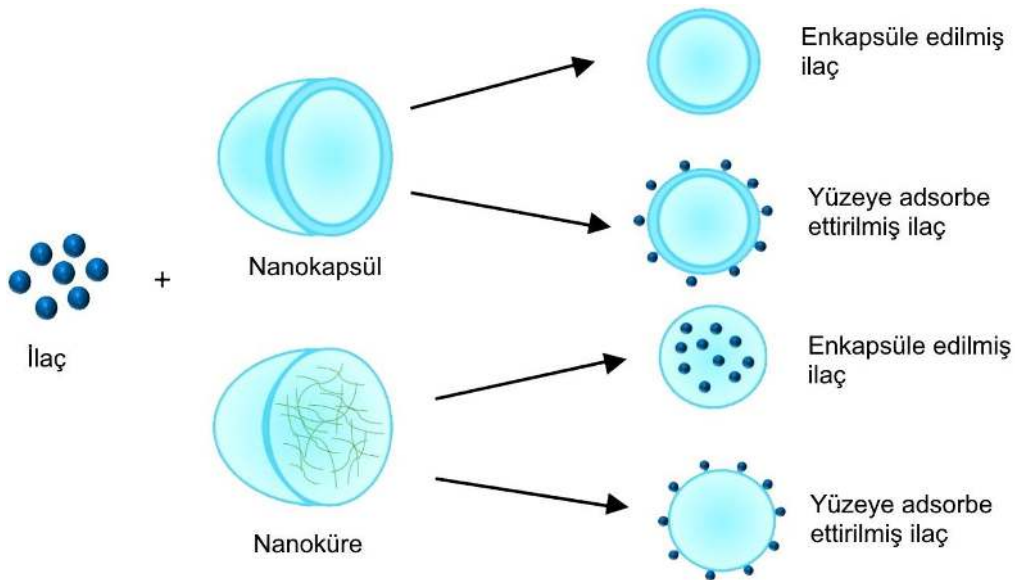
Polimerik nanoparçacıklar diğer nanoparçacık sistemleri ile kıyaslandığında bazı avantajları sebebiyle ilaç taşıyıcı sistemler için sıklıkla tercih edilmektedirler. Polimerik nanoparçacıkların geniş yüzey alanına sahip olmaları ve boyutlarının küçük olması sebebiyle hücreleri daha kolay bir şekilde hedefleyebilme yetenekleri polimerik nanoparçacıkları tercih edilen ilaç taşıma sistemlerinden biri yapmaktadır (Dey vd. 2016). Diğer nanoparçacıklara göre daha yüksek terapötik etkinlik gösterirler ve bu durum daha az toksisiteyi, daha az ilaç kullanımının yeterli olmasını sağlar. Polimerik nanoparçacıklar kolayca modifiye edilerek uyarlanabilir ve kontrol edilebilirler. İlaç yüklenmesi nispeten kolay ve ilaç yükleme kapasiteleri yüksektir (Ruiz-Gatón vd. 2018).

Polimerik nanoparçacıkların hazırlanmasına bağlı olarak ilaç taşıyıcı sistemler nanoküreler ya da nanokapsüller olarak ifade edilmektedirler. Nanoküre yapılarına ilaçlar adsorbe edilerek, disperse olarak ya da polimerik matris içerisinde çözündürülerek ilave

edilebilirler. Nanokapsüllerde ise ilaçlar polimerik membran ile çevrelenmiştir, sulu ya da yağlı bir çekirdek yapı içerisinde bulunmaktadır (Kakde vd. 2011). Nanoküre ve nanokapsül yapısı Şekil 2.6 da gösterilmiştir. Nanoküre ve nanokapsüllere ilaç eklenmesi Şekil 2.7 de gösterilmiştir.



Şekil 2.6 Nanoküre ve nanokapsül yapılarının şematik gösterimi.



Şekil 2.7 Nanoküre ve Nanokapsül yapılarına ilaç eklenmesi.

Polimerik nanoparçacıklar, nanoteknoloji, nanotıp, biyonanoteknoloji gibi alanlarda araştırılmakta ve sıklıkla kullanılmaktadır. Tıp alanında kullanımlarına; antikanser ilaçları, antiparaziter ilaçlar, peptitler ve proteinler gibi molekülleri taşıyıcı olarak, aynı

zamanda aşılarda ve tanıda kullanılmaktadır (Roco 2003).

2.2.1.1 Polimerik Nanoparçacıkların Üretilmesinde Kullanılan Polimerler

Polimerik nanoparçacık üretiminde doğal ya da sentetik polimerler kullanılmaktadır. İlk üretilen polimerik nanoparçacıklar doğal bir protein olan albüminden ya da poliakrilamid, polimetil metakrilat gibi biyolojik olarak parçalanamayan sentetik polimerlerden üretilmiştir. Polimerik nanoparçacık sentezinde kullanılan polimerlerin listesi Çizelge 2.1 de verilmiştir.

Çizelge 2.1: Polimerik nanoparçacık sentezinde kullanılan polimer örnekleri

Polimer Tipi	Polimer İsmi
Doğal Polimerler	Albümin Kitosan Jelatin Aljinat
Sentetik Polimerler	Poli(laktik asit) (PLA) Poli(glikolik asit) (PGA) Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) Poli(epsilon-kaprolakton) (PCL) Poli(izoheksilsiyanoakrilat) Poli(n-bütilsiyanoakrilat) Poli(akrilat) Poli(metakrilat) PLA-PEG PCL-PEG Poli(Etilen glikol) (PEG)

Tez kapsamında kullanılan PEG, PLGA ve PEG-PLGA polimerleri hakkında detaylı bilgi aşağıda verilmiştir.

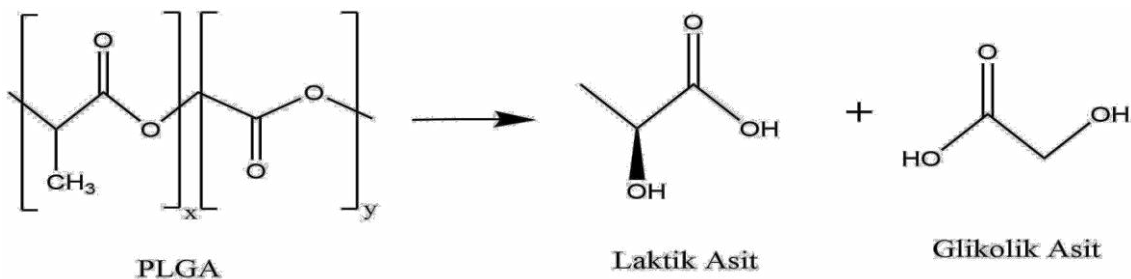
2.2.1.2 Poli (laktik-ko-glikolik asit)

Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), laktik asit ve glikolik asitin polimerizasyonu ile

oluşan poliester grubuna ait sentetik bir polimerdir. PLGA, laktik asit ve glikolik asit monomerlerinin halka açma kopolimerizasyonu ile oluşmaktadır. PLGA'nın polimerizasyonu esnasında monomer birimleri (laktik asit ve glikolik asit) birbirlerine ester bağlarıyla bağlanarak alifatik polyester oluşturmaktadır (Astete ve Sabliov 2012).

PLGA monomerlerinde ki (laktik asit ve glikolik asit) oranların değişimi polimerin kristallliğini, mekanik mukavemetini, şişme davranışını, biyolojik bozunma oranını, hidrofilikliğini ve salım profilini etkileyebilmektedir. Poliglikolik asit (PGA), suda düşük çözünürlük gösteren bir polimerdir. Polilaktik asit (PLA) ise PGA'nın aksine hidrofobik bir polimerdir. PGA ve PLA'nın bir kopolimeri olan PLGA, Laktik asit ve Glikolik asit oranı ve moleküler ağırlığına bağlı olarak polimerin bozunma hızı, ilaç salımı gibi özelliklerini değiştirmektedir.

PLGA biyolojik olarak parçalanabilir ve parçalanma ürünleri vücuttan doğrudan atılabilen ve toksik olmayan (CO_2 ve H_2O) yapılardır. PLGA, parçalanma ürünleri Şekil 2.8 de gösterilmiştir. PLGA, ester bağlarının bozulmasıyla laktat ve glikolat oluşturur. D-laktat atımından önce tekrar metabolize olmazken, L- laktat CO_2 dönüştürülerek akciğer ile atılabilmektedir. Glikolat ise direkt böbrek yoluyla atılabildiği gibi gliksilata oksitlenerek glisine, serin veya piruvata dönüştürülebilir. Tekrar krebs döngüsüne girerek CO_2 ve H_2O ya dönüşebilmektedir (Danhier vd. 2009).



Şekil 2.8 PLGA parçalanma ürünleri.

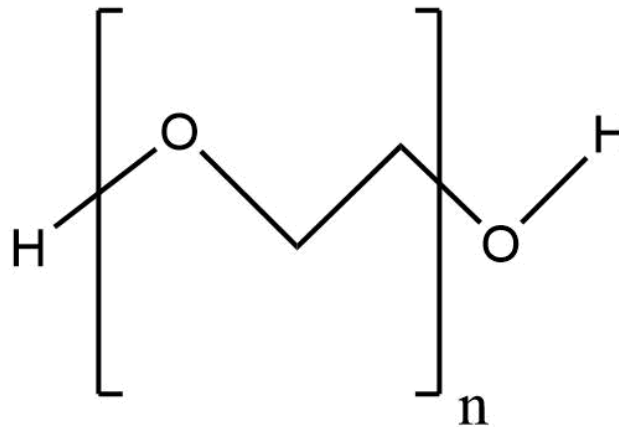
PLGA, biyoyumlu olması, biyobozunur olması, parçalanma ürünlerinin toksik olmaması, diğer polimerler ile karıştırılabilmesi ve hidrofilik ya da hidrofobik molekülleri kapsülleyebilmesi, etken maddenin bozunmadan korunabilmesi, gizlilik oluşturmak için yüzeyinin modifiye edilebilmesi, sürekli salım yapabilmesi gibi

özellikleri sebebiyle ilaç bazlı polimerik taşıyıcı sistemlerde tercih edilen bir polimerdir (Xu vd. 2017). PLGA, ilaç dağıtım sistemleri için tıbbi kullanım onayını FDA ve Avrupa İlaç Ajansından almıştır (Semete vd 2010).

2.2.1.3 Polietilen Glikol

Poli (etilen glikol) (PEG), 1859 yılında etilen glikol ile 1,2- dibromoetan bileşiğinin ısıtılmasıyla etilen glikollerin ayrışması sonucunda ortaya çıkmıştır (Fordtran ve Hofmann 2017). PEG, etilen glikol moleküllerinin eter bağlarıyla birbirlerine bağlanmasıyla ortaya çıkan non-iyonik, biyouyumlu, sentetik, hidrofilik bir polimerdir. PEG sentezi 300 Da ile 100.000 Da arasında geniş bir moleküler ağırlık aralığında olabilmektedir. PEG sentezi için en etkili yöntem, etilen oksidin asidik ya da bazik şartlarda polimerize edilmesidir (Thompson vd. 2008).

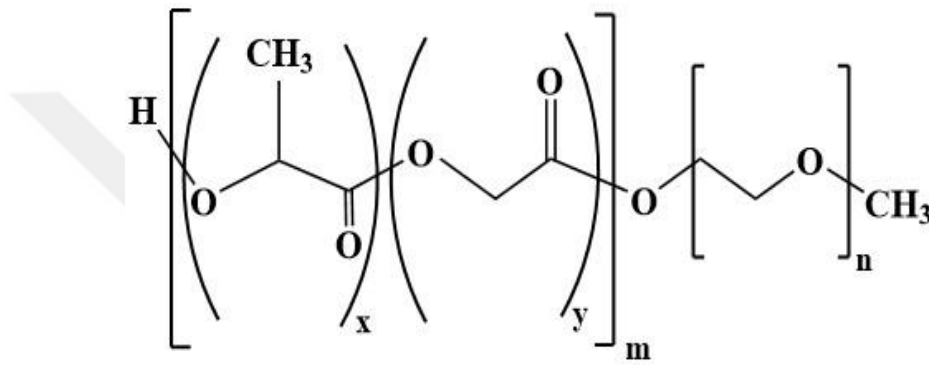
PEG, basit yapısı, iyonik olmaması, yüksek stabilitesi, suda ve organik çözücülerin çoğunda yüksek çözünürlüğe sahip olması, toksik olmaması gibi özellikleri sayesinde başta tıp alanında olmak üzere birçok alanda sıklıkla kullanılmaktadır (Kolate vd. 2014, Giorgi vd. 2014). PEG, toksik olmaması sebebiyle FDA tarafından insanlarda kullanımı onaylanmış polimerlerden biridir (Harris vd. 2001). Polietilen glikolün kimyasal yapısı Şekil 2.9 da gösterilmiştir.



Şekil 2.9 Polietilen glikol kimyasal yapısı.

2.2.1.4 Poli (laktik-ko-glikolik asit)- blok- poli (etilen glikol)

Poli (laktik-ko-glikolik asit)- blok- poli (etilen glikol) (PEG-PLGA), ilk olarak Gref ve arkadaşları (1994) tarafından sentezlenmiş ve PEG ile kaplanan PLGA mikropartiküllerinin özellikleri araştırılmıştır. PEG-PLGA misellerinin yarı ömründe artış meydana geldiği ve sadece %30'nun karaciğer tarafından yakalandığı tespit edilmiştir (Gref vd. 1994). PEG-PLGA kimyasal yapısı Şekil 2.10 da gösterilmiştir.



Şekil 2.10 PEG-PLGA kimyasal yapısı.

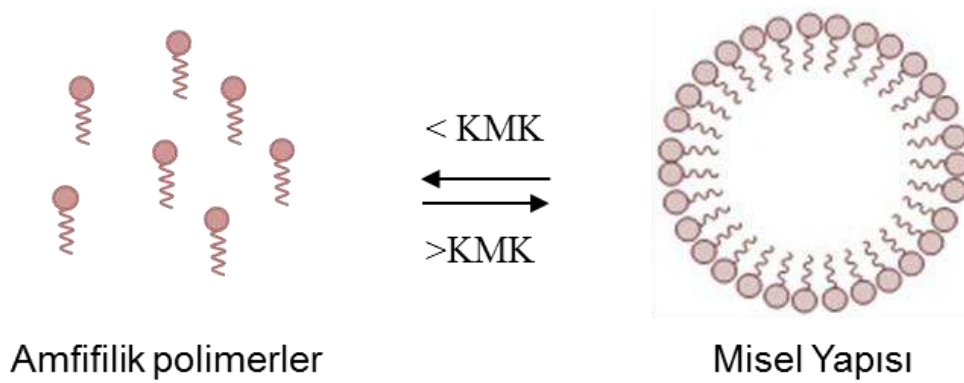
PLGA, biyobozunur ve biyoyumlu olması, kolayca modifiye edilebilmesi, sulu ortamda nano boyutta misel yapıları oluşturabilmesi, içerisine etken madde yüklenebilmesi gibi özellikleri sebebiyle ilaç taşıyıcı sistemlerde sıklıkla kullanılan polimerlerden biridir. Ancak vücudun hidrofobik yapıları yabancı olarak görmesi ve retikülo- endotelyal sistem (RES) tarafından tanınarak dalak ya da karaciğerden atılması PLGA polimerlerin önündeki en büyük sınırlamadır (Mirakabad vd. 2014). Bu sınırlamanın ortadan kaldırılabilmesi için birçok yüzey modifikasyonu geliştirilmiştir.

PLGA hidrofobik yapısı hidrofilik yüzey kaplaması ile gizlenerek biyolojik yarı ömrü arttırılabilmektedir. Bunun için en çok kullanılan yöntem hidrofilik ve non- iyonik olan PEG ile kaplanmasıdır (Mirakabad vd. 2014).

PEG-PLGA sulu ortamda kendiliğinden bir araya gelerek polimerik miselleri oluşturabilme özelliğine sahiptir. Amfifilik PEG-PLGA kopolimeri, hem hidrofilik hem de hidrofilik etken maddelerini yükleyebilmektedir (Mares vd. 2021). PEG'in hidrofilik

yapısı sayesinde misel oluşturduğunda uzun süreli kan dolaşımı sağlar ve ilaç etkinliğini artırır. Bu durum PEG-PLGA'nın EPR etki ile kanserli dokuda toplanmasını ve toksik ilaç dozunun azalmasına yardımcı olmaktadır (Thi vd. 2020).

Misel yapıları yüzey aktif olan maddelerin polar yapıdaki bir çözücü içerisinde bir araya gelerek oluşturduğu yapılardır. Yüzey aktif maddeler bir sıvının yüzey gerilimini azaltan, yapısında hem hidrofilik (polar uç) hem de hidrofobik (apolar uç) bileşikleri bir arada bulunduran ve amfifilik olarak adlandırılan maddelerdir (Hartley 1936). Yüzey aktif maddelerin hidrofilik ucu su gibi polar bir çözücü içerisindeyken su içerisinde kalıp onunla etkileşim halinde iken hidrofobik uç yüzeye doğru çıkma eğilimindedir. Çözücü içerisine yüzey aktif madde ilave edildikçe hidrofobik kısımlar yüzeyde toplanmakta ve suyun yüzey gerilimini düşürmektedir. Suyun yüzey gerilimi belli bir orana kadar düşmeye devam eder ve hidrofobik yapılar yüzeyde toplanır. Bu durum yüzey aktif madde belli bir konsantrasyona ulaştığında durur, hidrofobik kısımlar yüzeye doğru çıkmaz ve kendi içlerinde misel yapısı oluşturmaya başlarlar (Marangoni vd. 1991). Misel ve misel benzeri yapıların oluşmaya başladığı bu minimum konsantrasyon düzeyine ise Kritik Misel Konsantrasyonu denilmektedir. Misel oluşumu şematik gösterimi Şekil 2.11 de gösterilmiştir.



Şekil 2.11 Misel Oluşumu Şematik Gösterimi.

PEG-PLGA kopolimeri PEG hidrofilik ve PLGA hidrofobik olmak üzere amfifilik bir bileşiktir ve polar ortamda PEG-PLGA konsantrasyonu kritik misel konsantrasyonun

üzerindeyken misel oluşumu göstermektedir. Misel yapıları oluşmaya başladığında ortamdaki hidrofobik yapılar miselin hidrofobik kısmında kalıp hapsolurken hidrofilik yapılar polar çözücü içinde kalmaya devam etmektedir.

Bu değişimlerin ölçülmesinin yanı sıra organik boyalar kullanılarak floresan değişiminin tespit edilmesi ile de kritik misel konsantrasyonu değeri ölçülebilmektedir.



3. MATERYAL ve METOT

3.1 Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Bu araştırmada kullanılan tüm kimyasal malzemeler ve malzemelerin firmaları Çizelge 3. 1 de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Kullanılan kimyasal malzemeler ve markaları

Kimyasal Malzemeler	Kimyasal Malzemelerin Markaları
Poli(etilen glikol) metil eter-blok- poli (laktik- ko- glikolik) (PEG Mn: 5000 ve PLGA Mn: 7000)	Merck
Aseton	Merck
Nile Red	Merck
Sodyum Asetat Trihidrat	Riedel de Haen
Asetik asit	Sigma
Monosodyum Fosfat	Sigma
Disodyum Fosfat	Sigma
Oil Red O	Sigma
Ethanol	Sigma
PBS kristali	Merck
Thiazolyl blue tetrazolium bromide	Sigma
RPMI	Biowest
DMSO	Sigma
MCF-7 Hücre hattı	Merck
Fetal Bovine Serum (FBS)	Merck
Tripsin-EDTA	Biowest
Tripan Blue	Biowest
Streptomisin	Sigma

3.2 Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışması sürecinde kullanılan tüm cihazlar ve cihazların markaları Çizelge 3.2 de gösterilmiştir.

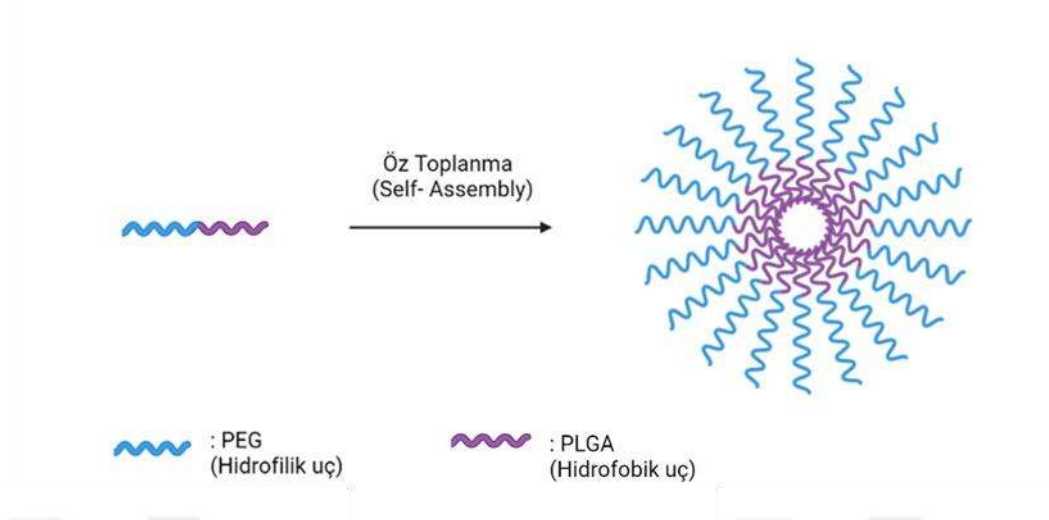
Çizelge 3.2: Kullanılan cihazlar ve markaları

Kullanılan Cihazlar	Cihazların Markaları
Vorteks	Dlab
Orbital Çalkalayıcı	İldam
Geçirimli Elektron Mikrokobu	JEM
Uv-Vis Spektrofotometre	Shamadzu
Hassas Terazı	Radwag
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Dlab
Etüv	Elektromag
pH metre	Mettler Toledo
Buzdolabı	Arçelik
İnkübatör	Nuve
Otomatik Pipet	Dlab
Çok kanallı pipet	Dlab
Otoklav	İldam
Saf su cihazı	Isolab
Santrifüj	Elektromag
Laminar Flow Kabin	Mikrotest
Derin Dondurucu	Faley
Mikroskop	Zeiss

3.3 PEG-PLGA Nanoparçacıkların Elde Edilmesi

PEG-PLGA polimerik nanoparçacıkları Emülsiyon Çözücü Buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. İlk adım olarak; 2 mg PEG-PLGA polimeri tartılmış ve üzerine 1 mL aseton eklenerek vorteks yardımıyla çözdürülmüştür. Daha sonra ise 1,5 mL saf su ilave edilmiş ve emülsiyon oluşturulmuştur. İkinci adımda ise çözelti bir gece orbital karıştırıcı düzeneğinde bekletilerek asetonun tamamen uçması sağlanmıştır. Sonuç olarak PEG-PLGA polimerik nanoparçacıkları elde edilmiştir. PEG-PLGA öz toplanması

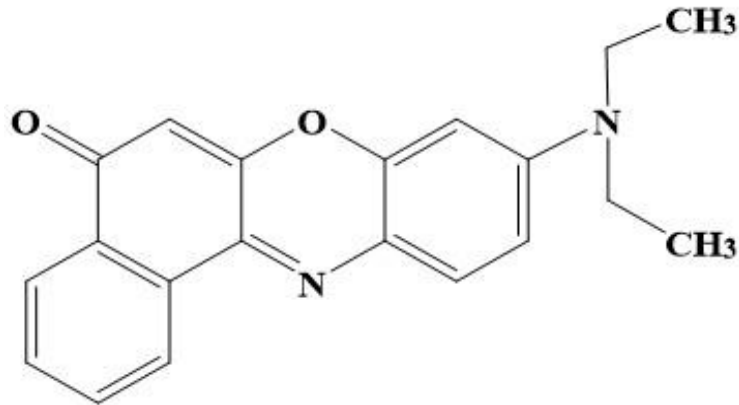
şematik olarak Şekil 3.1 de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 PEG-PLGA öz toplanması şematik gösterimi.

3.4 Kritik Misel Konsantrasyonunun Belirlenmesi

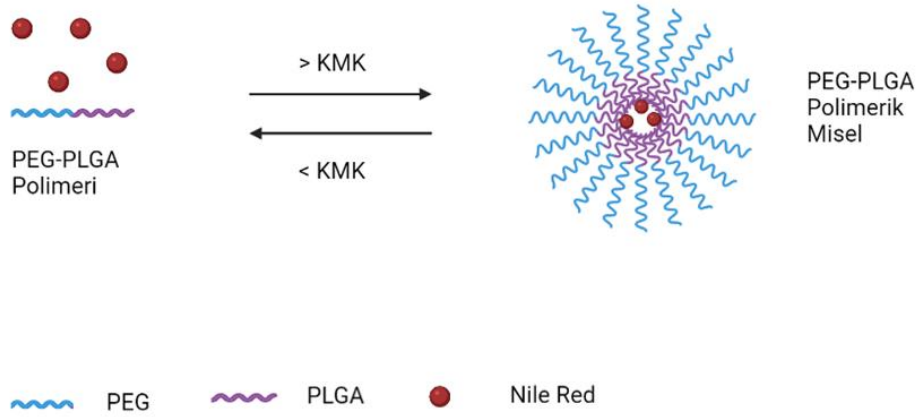
Bu çalışmada kritik misel konsantrasyonunun ölçülebilmesi için Nile Red boyası kullanılmıştır. Nile Red floresan prob olarak kullanılan bir boyadır, hidrofobiktir ve su gibi polar çözücüler içerisindeyken neredeyse hiç floresan özellik göstermezken polar olmayan ortamlarda absorpsiyon ve emisyon mavisi kaymaları yapmaktadır (Martinez 2016). Nile Red floerasan boyasının kimyasal yapısı Şekil 3.2 de gösterilmiştir.



Şekil 3.2 Nile Red floresan boyasının kimyasal yapısı.

Kritik misel konsantrasyonun belirlenebilmesi için floresan boyaların maksimum UV

absorbans değerlerindeki kaymaların kullanılması son yıllarda üzerine çalışılan bir konudur (Basu Ray vd. 2006). Nile Red yüklü PEG-PLGA nanoparçacıklarının hazırlanmasına ait şematik gösterim Şekil 3.3 de gösterilmiştir.



Şekil 3.3 Nile Red yüklü PEG-PLGA nanoparçacıklarının hazırlanması.

PEG-PLGA polimeri polar ortamda iken polimerin hidrofobik olan PLGA ucu kümelenerek bir araya gelmektedir. PEG-PLGA polimeri polar ortamdayken misel oluşturmaya başladığında Nile Red boyası PLGA kısmı içerisinde kalmaktadır. Bu esnada polar olmayan ortama geçiş yaptığı için spektrum üzerinde kayma yaşamaktadır. Bu değişim UV- spektrofotometre ile ölçülebilmektedir. Elde edilen absorbans değerleri misel oluşup oluşmadığı bilgisine ulaşılmasını sağlamaktadır.

3.4.1 Nile Red Stok Çözeltisinin Hazırlanması

Stok çözeltisi için 1,2 mg Nile Red tartılmış ve üzerine 6 mL aseton eklenerek vorteks yardımıyla çözünmesi sağlanmıştır. Stok çözeltisi alüminyum folyoya sarılarak +4 °C de muhafaza edilmiştir.

3.4.2 Nile Red Yüklü PEG-PLGA Nanoparçacıkların Elde Edilmesi

Nile Red yüklü nanoparçacıklar emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. İlk adım olarak; 3 mg PEG-PLGA polimeri 1 mL aseton eklenerek vorteks yardımıyla çözündürülmüştür. PEG-PLGA polimerine 0,5 mL Nile Red çözeltisi eklenmiş ve mor renkli bir çözelti elde edilmiştir. Mor renkli çözeltiye 1,5 mL saf su ilave edilmiş

ve pembe renkli bir emülsiyon oluşturulmuştur. İkinci adımda ise çözelti bir gece orbital karıştırıcı düzeneğinde bekletilerek asetonun tamamen uçması sağlanmıştır. Aseton tamamen uçtuktan sonra açık pembe renkli bir çözelti içerisinde Nile Red yüklü PEG-PLGA polimerik nanoparçacıkları elde edilmiştir.

3.4.3 Kritik Misel Konsantrasyonu için Grafiğin Elde Edilmesi

Kritik Misel Konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi için UV spektroskopi yöntemi kullanılmıştır. Nile Red yüklü PEG-PLGA çözeltileri asetonu seri seyreltme yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Her bir şişeye 250 µL aseton içinde çözünmüş PEG-PLGA polimeri ve sonra 100 µL Nile Red çözeltisi eklendikten sonra 1,5 mL saf su eklendi. Aseton tamamen buharlaştırıldıktan sonra ultra saf su içinde molariteleri $1,6 \times 10^{-1}$ M ve $1,6 \times 10^{-4}$ M arasında değişen 10 numune elde edilmiştir. Deney 3 tekrarlar yapılmıştır. Absorbans ölçümleri, spektrofotometre ile 532 nm uyarma dalga boyunda kaydedilmiştir. Grafik 3 tekrarın absorbans değerlerinin ortalaması alınarak çizilmiştir.

3.5 PEG-PLGA Enkapsülasyon Verimi

PEG-PLGA nanoparçacığının enkapsülasyon verimliliğinin tespit edilmesi için Oil red O, Kombrestatin A4 ve Dosetaksel kullanılmıştır. Enkapsülasyon verimliliği UV- Vis spektroskopisi ile belirlenmiştir.

3.5.1 Oil red O' nun Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Yükleme değerlendirmesi için ilk olarak Oil red O'nun farklı konsantrasyonlarda (0,005, 0,0125, 0,0250, 0,05, 0,125, 0,25, 0,5 mg/mL) çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerin absorbans değerleri UV-Vis Spektrofotometre cihazında 515 nm de ölçülerek standart kalibrasyon eğrisi elde edildi. Gerekli hesaplamaların yapılabilmesi için standart kalibrasyon eğrisi grafiğinin denklemi kullanılmıştır.

3.5.2 PEG-PLGA nanoparçacıklarına Oil red O Yükleme Çalışmaları

Yükleme kapasitesinin değerlendirilebilmesi için PEG-PLGA polimerinin içerisine (2

mg/0, 5 mL) 0,10 mg, 0,20 mg, 0,25 mg, 0,30 mg, 0,35 mg, 0,40 mg Oil red O emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak yüklenmiştir. Çözücü tamamen buharlaştırıldıktan sonra absorbans değerlerinin ölçülmesi için çözeltiler filtre edilmiştir. UV- Vis Spektrofotometre ölçümünde blank olarak saf su kullanılmış ve çözeltilerinin absorbans değeri 515 nm de ölçülmüştür. Yükleme çalışmalarında çözücü miktarları değiştirilerek çözücünün yükleme kapasitesine etkisine bakılmıştır. Örneklerin içeriği Çizelge 3.3 ve 3.4 de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 1 mL aseton kullanılarak hazırlanan örneklere ait bilgiler

PEG-PLGA Konsantrasyonu (mg/μL)	Oil red O Konsantrasyonu (mg/μL)	Saf su miktarı (mL)
2 mg/ 500 μL aseton	0,10 mg/ 500 μL aseton	3 mL
2 mg/ 500 μL aseton	0,20 mg/ 500 μL aseton	3 mL
2 mg/ 500 μL aseton	0,25 mg/ 500 μL aseton	3 mL
2 mg/ 500 μL aseton	0,30 mg/ 500 μL aseton	3 mL
2 mg/ 500 μL aseton	0,35 mg/ 500 μL aseton	3 mL
2 mg/ 500 μL aseton	0,40 mg/ 500 μL aseton	3 mL

Çizelge 3.4 0.5 mL aseton kullanılarak hazırlanan örneklere ait bilgiler

PEG-PLGA Konsantrasyonu (mg/μL)	Oil red O Konsantrasyonu (mg/μL)	Saf su miktarı (mL)
2 mg/ 250 μL aseton	0,10 mg/ 250 μL aseton	3 mL
2 mg/ 250 μL aseton	0,20 mg/ 250 μL aseton	3 mL
2 mg/ 250 μL aseton	0,25 mg/ 250 μL aseton	3 mL
2 mg/ 250 μL aseton	0,30 mg/ 250 μL aseton	3 mL
2 mg/ 250 μL aseton	0,35 mg/ 250 μL aseton	3 mL
2 mg/ 250 μL aseton	0,40 mg/ 250 μL aseton	3 mL

3.5.3 Enkapsülasyon Veriminin Hesaplanması

Kapsüllenme veriminin hesaplanması için aşağıda 3.1 denkleminde verilen eşitlik kullanılmıştır (Bomb vd. 2020). PEG-PLGA nanoparçacıklarının içerisine yüklenen oranlar kalibrasyon eğrisi grafiğinin denkleminde elde edilmiştir.

$$\text{Enkapsülasyon Verimi} = \frac{\text{Enkapsüle Olmuş Madde Miktarı}}{\text{Toplam Madde Miktarı}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.5.4 Kombrestatin A4 Kapsülleme Veriminin Belirlenmesi

Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması için 0,03 mg/mL ile 0,0004 mg/mL konsantasyonları arasında Kombrestatin A4 çözeltileri hazırlanmış ve Uv-Vis Spektrofotometre ile absorbans değerleri ölçülmüştür. Kombrestatin A4'ün absorbans değeri 259,7 nm de ölçülmüştür. Santrifüj ile dibe çöktürülen yüklenmeyen Kombrestatin A4 2 mL Dimetil Sülfoksit (DMSO) de çözöldü ve kalibrasyon grafiğinden yüklenmeyen ilaç tespiti yapılarak yüklenen toplam ilaç miktarına ulaşıldı.

3.5.5 Dosetaksel Kapsülleme Veriminin Belirlenmesi

Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması için 0,08 mg/mL ile 0,005 mg/mL konsantasyonları arasında Dosetaksel çözeltileri hazırlanmış ve UV-Vis Spektrofotometre ile absorbans değerleri ölçülmüştür. Dosetaksel maddesinin absorbans değerleri DMSO içerisinde 273,5 nm de ölçülmüştür. Santrifüj ile dibe çöktürülen yüklenmeyen Dosetaksel 2 mL DMSO da çözöldü ve kalibrasyon grafiğinden yüklenmeyen ilaç tespiti yapılarak yüklenen toplam ilaç miktarına ulaşılmıştır.

3.6 Oil red O Salım Çalışmaları

3.6.1 pH: 5,5 Asetat Tampon Çözeltisi Hazırlanması

1 litrelik 0,1 M pH: 5,5 Asetat tampon çözeltisi hazırlanması için 12,054 mg sodyum

asetat trihidrat yaklaşık 800 mL saf su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürülmüştür. Çözelti üzerine 70 mL asetik asit çözeltisi pH kontrol edilerek yavaş yavaş eklenmiş ve pH: 5,5 olduktan sonra çözelti saf suyla 1 L ye tamamlanmıştır.



Resim 3.1 Asetat Tampon çözeltisi hazırlanması.

3.6.2 Oil red O Salım Deneyi

Salım çalışmaları için Oil red O kullanılmıştır. 12 mg PEG-PLGA polimeri 1,5 mL asetonunda vorteks yardımıyla çözdürülerek stok polimer çözeltisi elde edildi. Oil red O stok çözeltisi için 1,2 mg Oil red O 1,5 mL aseton içerisinde çözüldü. Viallere 250 μ L polimer çözeltisi eklendi (Şekil 3.2). Polimer çözeltisi üzerine 0,250 μ L aseton içerisinde çözdürülmüş Oil red O çözeltileri eklendi (Şekil 3.3). 1, 2 ve 3 numaralı çözeltilere PBS (pH=7,4) ilave edildi. 4,5 ve 6 numaralı örnekler ise Asetat Tamponu (pH=5,5) ilave edildi. Çözeltiler bir gece boyunca orbital karıştırıcı düzeneğinde bırakılarak asetonun uçması sağlandı. Ertesi gün çözeltilerin UV- Vis spektrofotometre ile 515 nm de absorbans değerleri ölçüldü ve 37°C de inkübe edildi. 0, 24, 48 ve 96. saatlerde absorbans değerleri tespit edilmiştir. Yüzde salım 3 örneğin ortalamalarını alınarak hesaplanmıştır.



Resim 3.2 Oil red O salım deneyi hazırlanması ilk aşama.



Resim 3.3 Oil red O salım deneyi örneklerinin hazırlanması ikinci aşama.



Resim 3.4 Oil red O salım deneyi hazırlanması üçüncü aşama.

3.7 PEG-PLGA nanoparçacıkların TEM görüntülerinin elde edilmesi

PEG-PLGA nanoparçacıkların morfolojik özelliklerinin belirlenebilmesi için transmisyon elektron mikroskobu (TEM) kullanılmıştır. Hazırlanan nanoparçacıklar santrifüjlenerek süpernatant ayrılmıştır. Örnekler 100 μ L MiliQ su içerisinde süspanse edilmiştir. Süspanse edilen örnek karbon kaplı grid üzerine damlatılmış ve %2' lik uranil

asetatla 20 saniye kadar bekletilmiş ve boyanması sağlanmıştır. Su yardımıyla boyanın fazlası uzaklaştırılmış ve nanoparçacıklar 24 saat boyunca kurutulmuştur. Kuruyan nanoparçacıklar TEM ile incelenmiştir.

3.8 Hücre Kültürü Çalışmaları

3.8.1 Hücre Ekilmesi

Hücre kültürü çalışmalarında MCF-7 meme kanseri hücreleri kullanılmıştır. Hücreler %10'luk fetal bovin serumu (FBS) ve % 1 streptomisin içerikli RPMI medyumunda kültürlenmiştir. Kültürlenен hücreler, %5 lik CO₂ ile 37° C'de inkübe edilmiştir. Sitotoksikite deneyleri için hücreler, 96 oyuklu plakalara oyuk başına 5000 hücre konsantrasyonu gelecek biçimde 100 µL ekilmiş ve plakalar 24 saat boyunca %5 lik CO₂ ile 37° C'de inkübe edilmiştir.

3.8.2 İlaç Çözeltilerinin Hazırlanması

3.8.2.1 Kombrestatin A4'ün Hazırlanması

0,15 mg Kombrestatin A4 500 µL DMSO da çözündürülerek konsantrasyonu 10⁻³ M olan ilaç stoğu hazırlanmıştır. 10⁻³ M stok çözeltisinden 100 µL alınarak 900 µL RPMI besi yeri ile tamamlanmış ve seri seyreltme ile 10⁻⁴ M ile 10⁻¹² M arasında ilaç konsantrasyonları hazırlanmıştır.

3.8.2.2 Dosetakselin Hazırlanması

0,40 mg Dosetaksel 500 µL DMSO da çözündürülerek konsantrasyonu 10⁻³ M olan ilaç stoğu hazırlanmıştır. 10⁻³ M stok çözeltisinden 100 µL alınarak 900 µL RPMI besi yeri ile tamamlanmış ve seri seyreltme ile 10⁻⁴ M ile 10⁻¹² M arasında ilaç konsantrasyonları hazırlanmıştır.

3.8.2.3 Kombrestatin A4 ve Dosetakselin Hazırlanması

0,40 mg Dosetaksel ve 0,15 mg Kombrestatin A4 500 µL DMSO da çözdürülerek konsantrasyonu 10^{-3} M olan ilaç stoğu hazırlanmıştır. 10^{-3} M stok çözeltisinden 100 µL alınarak 900 µL RPMI besi yeri ile tamamlanmış ve seri seyreltme ile 10^{-4} M ile 10^{-12} M arasında ilaç konsantrasyonları hazırlanmıştır.

3.8.3 İlaç Yüklü Nanoparçacıkların Hazırlanması

3.8.3.1 Kombrestatin A4 Yüklü PEG-PLGA Nanoparçacıkların Elde Edilmesi

Kombrestatin A4 yüklü PEG-PLGA nanoparçacıklar emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlandı. 2 mg PEG-PLGA polimerine 0,15 mg Kombrestatin A4 eklendi ve 500 µL asetonla çözüldü. Çözelti üzerine 500 µL saf su ilave edildi ve emülsiyon oluşturuldu. Emülsiyon bir gece boyunca orbital karıştırıcıda bekletilerek asetonun uçması sağlandı.

Kombrestatin A4 yüklü nanoparçacıklar kullanılmadan önce 6000 rpm de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası yüklenmeyen ilaç miktarının tespit edilmesi için ependorf 3 kez saf su ile yıkandı ve saf su ile tekrar santrifüj edildi.

3.8.3.2 Dosetaksel Yüklü Nanoparçacıkların Elde Edilmesi

Dosetaksel yüklü PEG-PLGA nanoparçacıklar emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlandı. 2 mg PEG-PLGA polimerine 0,40 mg Dosetaksel eklendi. Çözelti üzerine 500 µL aseton eklenerek çözüldü ve 500 µL saf su ilave edilerek emülsiyon oluşturuldu. Emülsiyon bir gece boyunca orbital karıştırıcıda bekletilerek asetonun uçması sağlandı.

Dosetaksel yüklü nanoparçacıklar kullanılmadan önce 6000 rpm de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası yüklenmeyen ilaç miktarının tespit edilmesi için ependorf 3 kez saf su ile yıkandı ve saf su ile tekrar santrifüj edildi.

3.8.3.3 Kombrestatin A4 ve Dosetaksel Yüklü Nanoparçacıkların Elde Edilmesi

Kombrestatin A4 ve Dosetaksel yüklü PEG-PLGA nanoparçacıkları emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. 4 mg PEG-PLGA, 0,15 mg Kombrestatin A4 ve 0,40 mg Dosetaksel 500 µL aseton ile çözündürülmüş ve üzerine 500 µL saf su eklenerek emülsiyon oluşturulmuştur. Emülsiyon bir gece boyunca orbital karıştırıcıda bekletilerek asetonun uçması sağlandı.

Kombrestatin A4 ve Dosetaksel yüklü nanoparçacıklar kullanılmadan önce 6000 rpm de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası yüklenmeyen ilaç miktarının tespit edilmesi için ependorf 3 kez saf su ile yıkandı ve saf su ile tekrar santrifüj edildi.

3.8.4 İlaç Uygulanması

Tetrazolyum tuzlarının formazana dönüşmesi ile canlılık aktivitesi ölçülebilen 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi için 24 saat inkübe edilen MCF-7 hücrelerine ilaç uygulaması yapıldı. Dosetaksel, Kombrestatin A4, Kombrestatin A4 ve Dosetaksel kombinasyonu, Dosetaksel yüklü nanoparçacık, Kombrestatin A4 yüklü nanoparçacık, Kombrestatin A4 ve Dosetaksel yüklü nanoparçacıkların EC₅₀ değerlerinin belirlenebilmesi için hücrelere 10⁻⁴ ile 10⁻¹² M arasında ilaç konsantrasyonu uygulandı. Hücreler 48 saat boyunca %5 lik CO₂ ile 37° C'de inkübe edildi.

3.8.5 MTT Analizi

İlaçların 48 saat inkübasyonundan sonra oyuk başına 10 µL MTT (5mg/mL PBS) çözeltisi eklendi. Plaka %5 lik CO₂ ile 37° C'de 4 saat inkübe edildi. Daha sonra medyum aspire edilerek her bir kuyucuğa 100 µL DMSO ilave edildi ve 15 dakika daha inkübe edildi. Her bir kuyucuğun absorbansı ELISA okuyucu ile 570 nm de okundu ve EC₅₀ değerleri Graphpad prism programı kullanılarak hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1 PEG-PLGA Nanoparçacıkların Kritik Misel Konsantrasyon Değerinin Saptanmasına Ait Bulgular

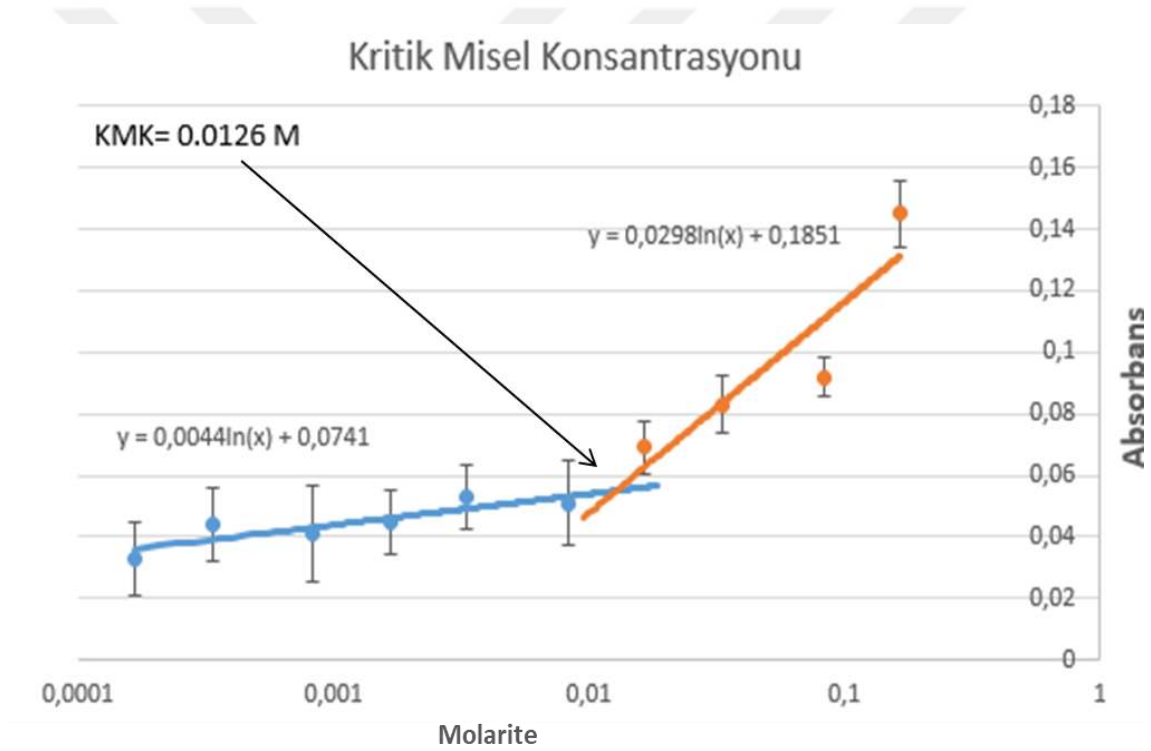
Çizelge 4.1 KMK belirlenebilmesi için kullanılan örneklerin konsantrasyonu ve absorbans değerleri

Konsantrasyon mg/MI	1. Serinin Absorbans Değerleri	2. Serinin Absorbans Değerleri	3. Serinin Absorbans Değerleri
0,000166	0,042	0,041	0,016
0,000833	0,055	0,048	0,019
0,000333	0,056	0,048	0,028
0,001660	0,056	0,048	0,031
0,008330	0,063	0,058	0,032
0,003330	0,063	0,058	0,039
0,016600	0,081	0,074	0,061
0,033300	0,090	0,090	0,070
0,083300	0,091	0,100	0,084
0,166000	0,148	0,156	0,130

Kritik misel konsantrasyonunun belirlenebilmesi için UV-Vis Spektrofotometre yöntemi kullanılmıştır. Deney 3 tekrarlar gerçekleştirilmiştir. Artan polimer konsantrasyonu ile birlikte Nile Red absorbans değerleri de artmıştır. Resim 4.2 de görüldüğü gibi 1’den 10’a doğru polimer konsantrasyonu giderek azalmaktadır. Bu durum Nile Red absorbansını değiştirir ve gözle görülür biçimde misel oluştuğunda pembe renk gözlemlenir.



Resim 4.1 Aseton buharlaştıktan sonra KMK analiz örnekleri.



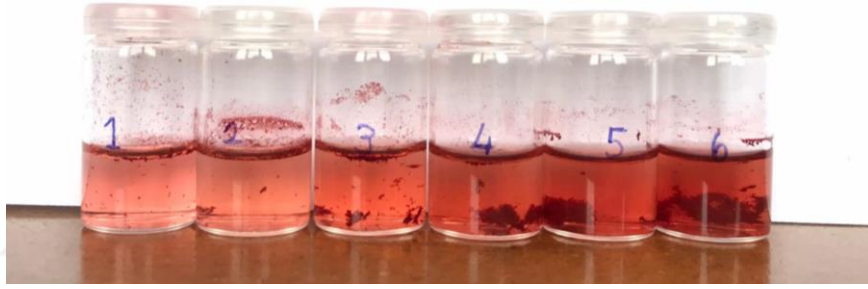
Şekil 4.1 PEG-PLGA polimerinin Kritik Misel Konsantrasyonu.

Konsantrasyonlar ve elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alınarak KMK grafiği elde edilmiştir. Şekil 4.1 de KMK grafiği yer almaktadır KMK noktası ok işareti ile gösterilmiştir. Elde edilen Kritik Misel konsantrasyonu grafiğindeki denklemlerden faydalanarak KMK değeri 0,0126 M olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu KMK değerinin üzerindyeen yani PEG-PLGA konsantrasyonu 0,0126 M değerinin üzerinde olduğunda polimerik miseller oluşmaya başlamaktadır.

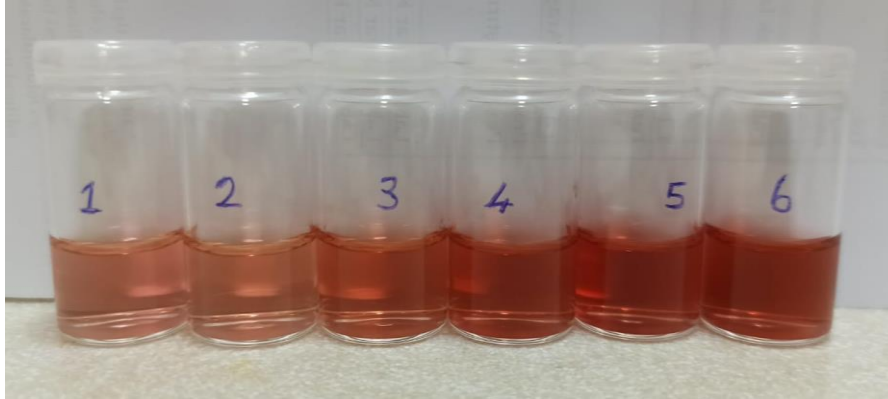
Çizelge 4.2 (Devam) 1 mL aseton kullanılarak hazırlanan örneklerin kapsülleme verimi

Polimer Konsantrasyonu (mg/ μ L)	Oil red O Konsantrasyonu (mg/ μ L)	Konsantrasyon	Yüklenen Oil red O miktarı	Kapsülleme Verimi
2 mg/ 500 μ L	0,30 mg/ 500 μ L	0,1740	0,058 mg	%19,33
2 mg/ 500 μ L	0,35 mg/ 500 μ L	0,2310	0,077 mg	%22
2 mg/ 500 μ L	0,40 mg/ 500 μ L	0,3158	0,1052 mg	%26,3

Resim 4.2 ile Resim 4.3'deki örneklerde toplam aseton miktarı 1 mL'dir. Toplam aseton miktarının 1 mL olduğu durumda kapsülleme verimi %9,85 ile %17,2 arasında değişmektedir.



Resim 4.2 1 mL aseton içeren çözelti filtre edilmeden önce.

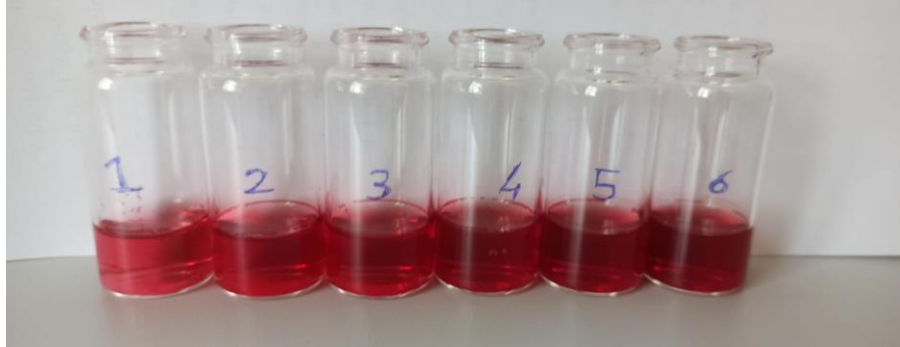


Resim 4.3 1 mL aseton içeren çözelti filtre edildikten sonra.

Resim 4.4 ile Resim 4.5'deki örneklerde toplam aseton miktarı 500 μ L'dir. Aseton miktarının azaltılıp 0,5 mL olduğu durumda ise kapsülleme verimi %19,33 ile %26,3 arasında değişmektedir.

Çizelge 4.3: 0,5 mL aseton kullanılarak hazırlanan örneklerin kapsülleme verimi

Polimer Konsantrasyonu (mg/ μ L)	Oil red O Konsantrasyonu (mg/ μ L)	Konsantrasyon	Yüklenen Oil red O miktarı	Kapsülleme Verimi
2 mg/ 500 μ L	0,10 mg/ 500 μ L	0,0558	0,0172 mg	%17,2
2 mg/ 500 μ L	0,20 mg/ 500 μ L	0,0592	0,0197 mg	%9,85
2 mg/ 500 μ L	0,25 mg/ 500 μ L	0,0889	0,0296 mg	%11,84
2 mg/ 500 μ L	0,30 mg/ 500 μ L	0,1361	0,0453 mg	%14,43
2 mg/ 500 μ L	0,35 mg/ 500 μ L	0,1484	0,0494 mg	%14,11
2 mg/ 500 μ L	0,40 mg/ 500 μ L	0,1620	0,054 mg	%13,5



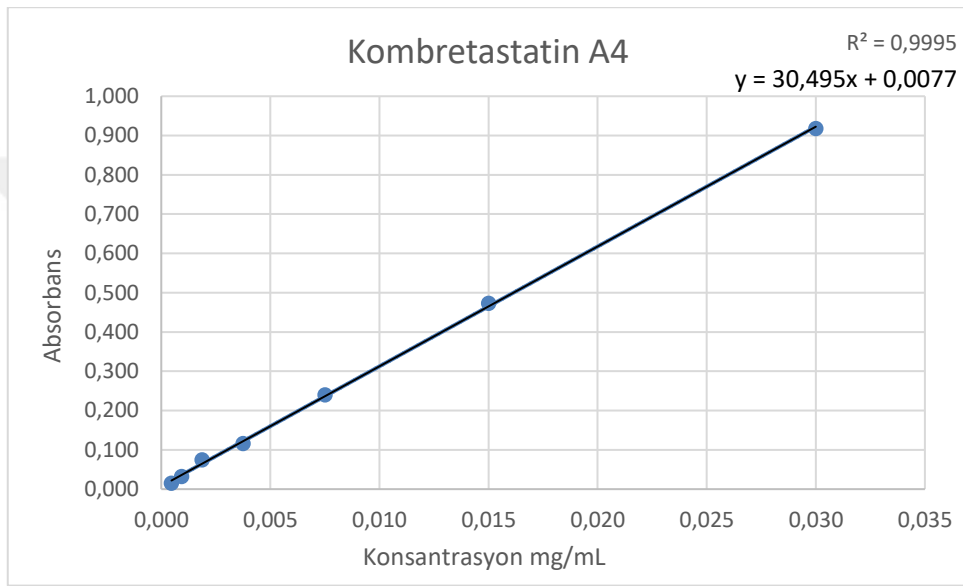
Resim 4.4 500 μ L aseton içeren çözeltiler filtre edilmeden önce.



Resim 4.5 500 μ L aseton içeren çözeltiler filtre edildikten sonra.

4.2.2 Kombrestatin A4 yüklü PEG-PLGA Nanoparçacıkların Kapsülleme Verimi

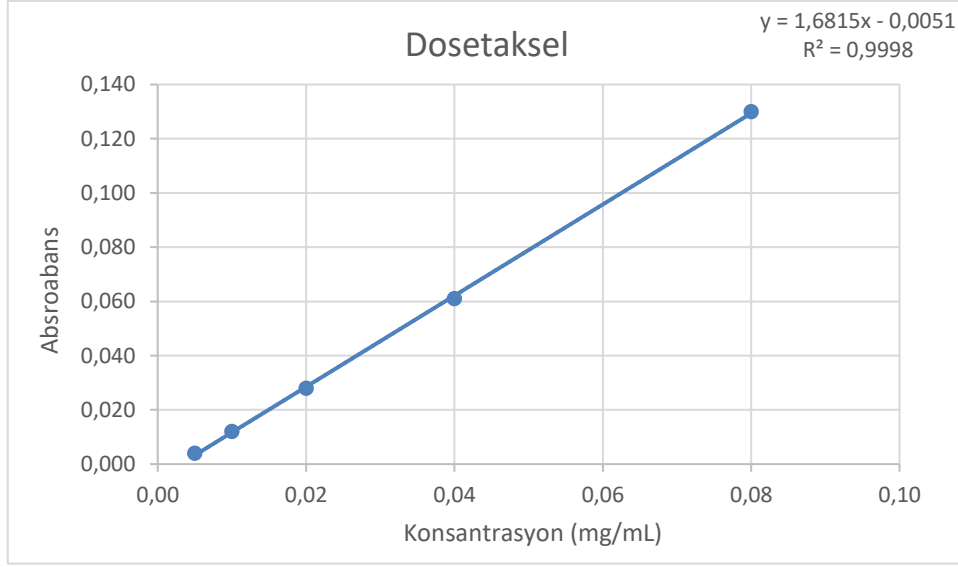
Yüklenen ilaç miktarının tespiti için Kombrestatin A4 ilacına ait kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi grafiği Şekil 4.3 de verilmiştir. Absorbans değeri ölçülerek grafik denkleminde yüklenmeyen miktar tespit edilmiştir. Yüklenmeyen ilaç miktarı 0,012 mg'dır. 0,15 mg ilacın 0,138 mg'ı yüklenmiştir. Kombrestatin A4'ün PEG-PLGA içerisine %92 verimle yüklendiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.3 Kombrestatin A4 ilacına ait kalibrasyon eğrisi.

4.2.3 Dosetaksel yüklü PEG-PLGA Nanoparçacıkların Kapsülleme Verimi

Yüklenen ilaç miktarının tespiti için Dosetaksel ilacına ait kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Grafik Şekil 4.4 de gösterilmiştir. Yüklenmeyen ilaç 2 mL DMSO da çözündürülmüş, absorbans değeri ölçülerek grafik denkleminde yüklenmeyen miktar tespit edilmiştir. Yüklenmeyen ilaç miktarı 0,22 mg'dır. 0,40 mg ilacın 0,18 mg'ı yüklenmiştir. Dosetaksel' in PEG-PLGA içerisine %45 verimle yüklendiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.4 Dosetaksele ait kalibrasyon eğrisi.

4.2.4 Kombrestatin A4 ve Dosetaksel yüklü Nanoparçacıkların Kapsülleme Verimi

Kombrestatin A4 ilacına ait kalibrasyon eğrisi grafiğinden yüklenmeyen ilaç miktarı tespit edilerek kapsülleme verimi hesaplanmıştır. Yüklenmeyen Kombrestatin A4 miktarının 0,022 mg olduğu tespit edilmiştir. Yüklenen Kombrestatin A4 miktarı 0,128 mg'dır. KombrestatinA4 enkapsülasyon verimi %85,3 olarak hesaplanmıştır.

Yüklenen Dosetaksel miktarının tespit edilmesi için Dosetaksel ilacına ait kalibrasyon eğrisi grafiği kullanılmıştır. Yüklenen Dosetaksel miktarının 0,13 olduğu tespit edilmiştir. Dosetaksel enkapsülasyon veriminin %32,5 olduğu hesaplanmıştır.

4.3 Oil red O ile Salım çalışmasına ait Bulgular

Salım çalışmaları yapılırken polimer içerisine 0,20 mg Oil red O yüklenmiştir. Resim 4.6 da ki 1, 2 ve 3 numaralı örnekler PBS pH=7,4 ortamında 37° C de inkübe edilmiştir. Resim 4.7 de ki 4, 5 ve 6 örnekleri ise asetat tampon çözeltisinde pH=5,5 ortamında 37° C de inkübe edilmiştir.

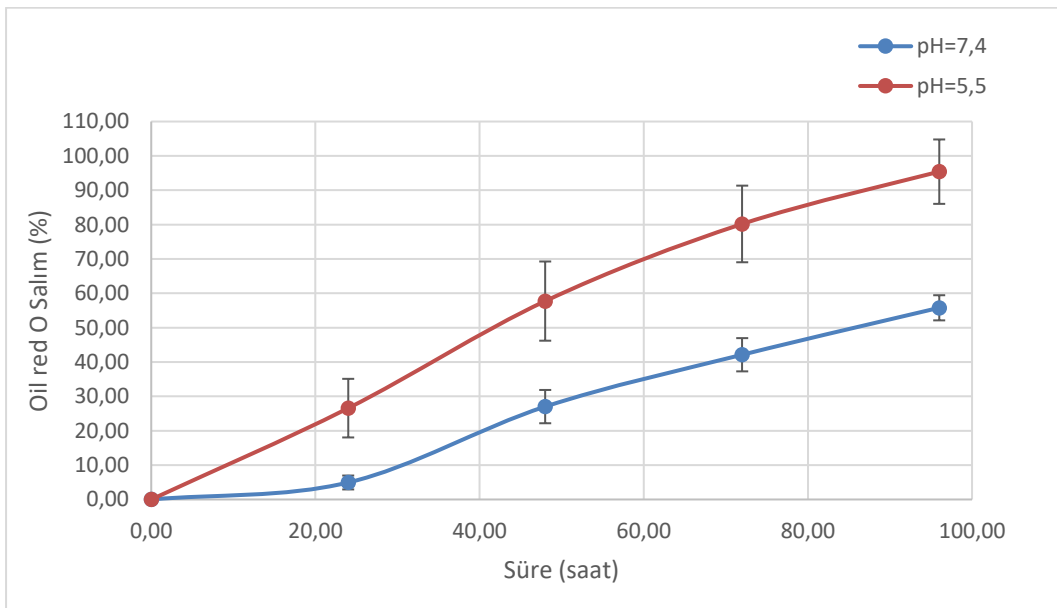
Çözeltiler 96 saat boyunca 37° C de inkübe edilmiştir. 24, 48, 72 ve 96. Saatlerde absorbans değerleri ölçülerek salım profili tespit edilmiştir.



Resim 4.6 pH=7,4 olan 1, 2 ve 3 numaralı örnekler inkübe edilmeden önce, 120 saat 37° C inkübe edildikten sonra.



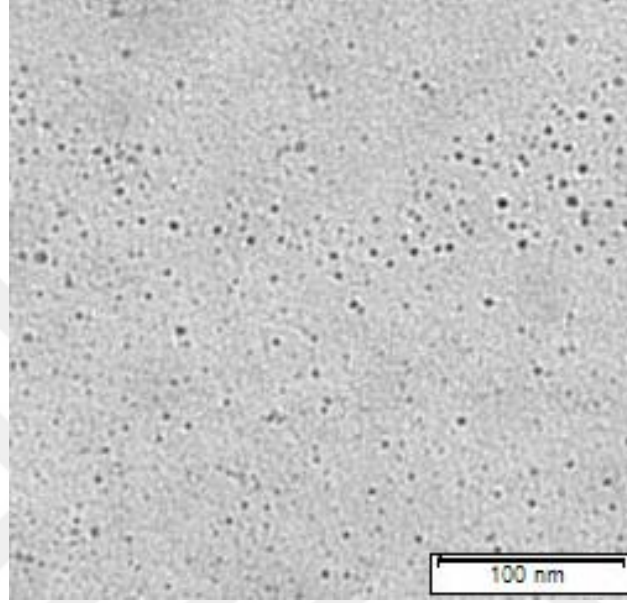
Resim 4.7 pH= 5,5 olan 4, 5 ve 6 numaralı örnekler inkübe edilmeden önce, 120 saat 37° C inkübe edildikten sonra.



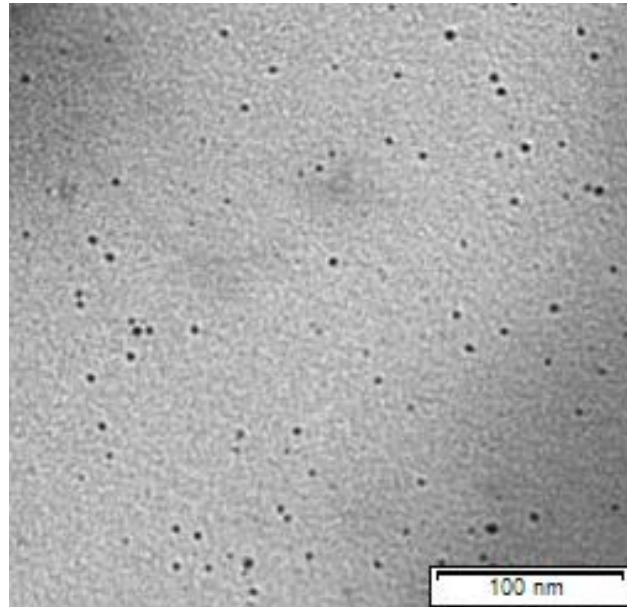
Şekil 4.5 Oil red O salım grafiği.

4.4 PEG-PLGA Nanoparçacıklara ait TEM görüntüsü

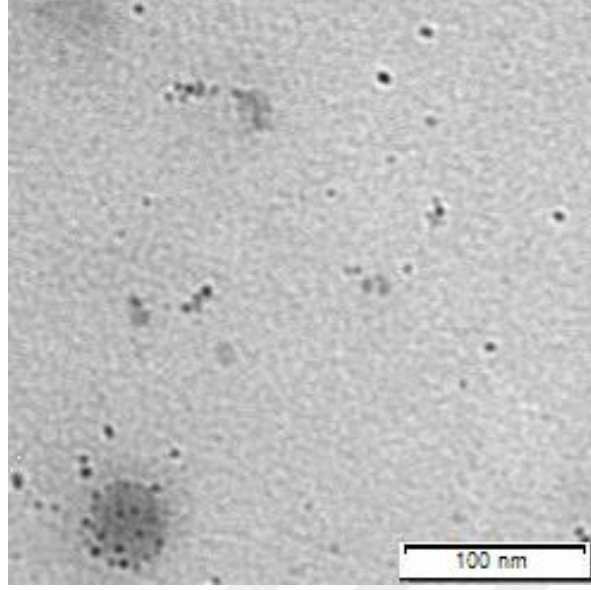
PEG-PLGA nanoparçacıkların TEM analizine göre boyutlarının ortalama 7-10 nm civarında olduğu tespit edilmiştir. PEG-PLGA nanoparçacıklarına ait TEM görüntüsü Resim 4.8, Resim 4.9 ve Resim 4.10 da gösterilmiştir.



Resim 4.8 Dosetaksel yüklü PEG-PLGA nanoparçacıklarına ait TEM görüntüsü.



Resim 4.9 Kombrestatin A4 yüklü PEG-PLGA nanoparçacıklarına ait TEM görüntüsü.



Resim 4.10 Kombrestatin A4 + Dosetaksel yüklü PEG-PLGA nanoparçacıklarına ait TEM görüntüsü.

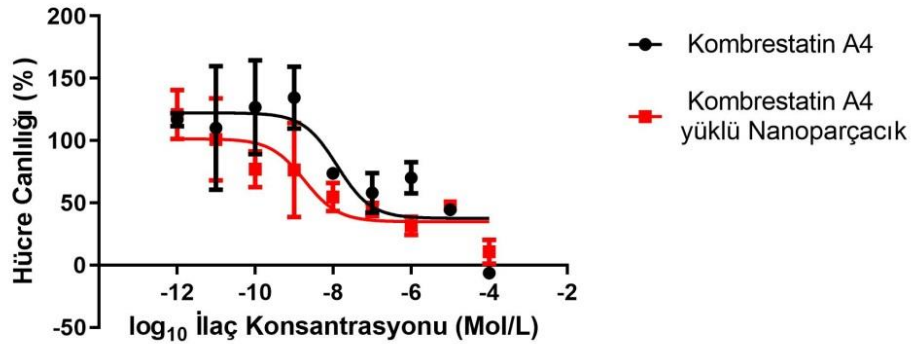
4.5 Sitotoksosite Çalışmalarına ait Bulgular

Kombrestatin A4 ve Kombrestatin A4 yüklü nanoparçacık, Dosetaksel ve Dosetaksel yüklü nanoparçacık, Kombrestatin A4 + Dosetaksel ve Kombrestatin A4 + Dosetaksel yüklü nanoparçacıkların EC_{50} değerinin ve sitotoksitelerinin belirlenebilmesi için 96 kuyucuklu plakalara 3 tekrarlı olacak şekilde hücreler ekilmiş ve MTT testi yapılmıştır. Çizelge 4.4 de sitotoksosite yapılan gruplar gösterilmiştir.

Çizelge 4.4 Sitotoksosite testi yapılan deney grupları

Gruplar	İlaç Konsantrasyonları
Grup 1	0,15 mg Kombrestatin A4
Grup 2	0,15 mg Kombrestatin A4 yüklü nanoparçacık
Grup 3	0,40 mg Dosetaksel
Grup 4	0,40 mg Dosetaksel yüklü nanoparçacık
Grup 5	0,15 mg Kombrestatin ve 0,40 mg Dosetaksel
Grup 6	0,15 mg Kombrestatin ve 0,40 mg Dosetaksel yüklü nanoparçacık

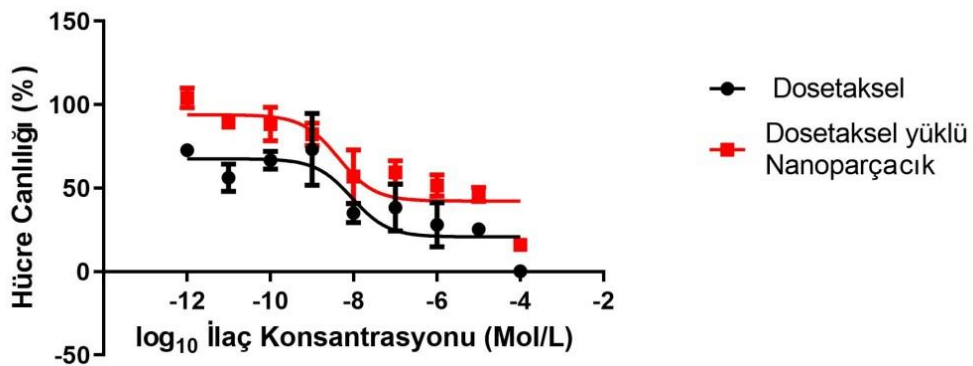
Kombrestatin A4 (Grup 1) ve Kombrestatin A4 yüklü nanoparçacığa (Grup 2) ait sitotoksosite sonuçları Şekil 4.6 da gösterilmiştir.



Şekil 4.6 Kombrestatin A4 (Grup 1) ve Kombrestatin A4 yüklü nanoparçacık (Grup 2) grubuna ait sitotoksosite sonuçları.

Sitotoksosite sonuçları Graphpad prism programı ile değerlendirilmiştir. Kombrestatin A4 (Grup 1) ilacının EC_{50} değeri = $1,267 \times 10^{-8}$ M ve Kombrestatin A4 yüklü nanoparçacığının (Grup 2) EC_{50} değeri = $1,830 \times 10^{-9}$ M olarak bulunmuştur. EC_{50} değerinin küçüklüğü toksisitenin büyüklüğünü ifade etmektedir. Kombrestatin A4 yüklü nanoparçacık grubuna ait EC_{50} değeri, Kombrestatin A4 ilacının EC_{50} değerinden daha düşüktür, bu durum Kombrestatin A4 yüklü nanoparçacık grubunun daha toksik olduğunu ifade etmektedir.

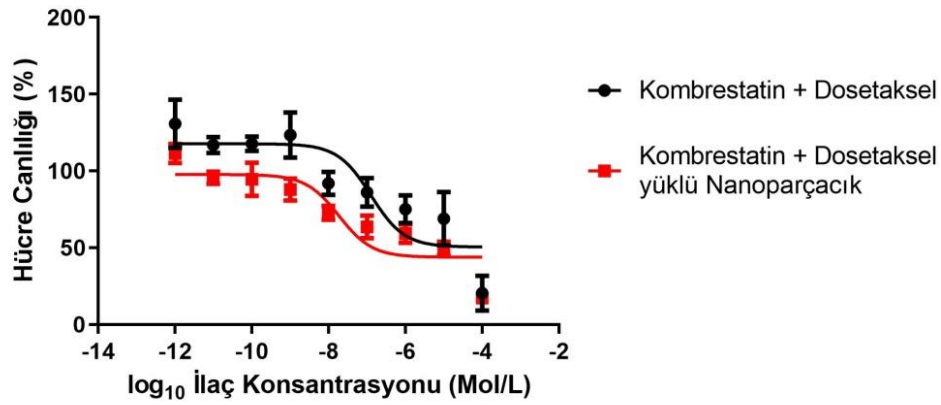
Dosetaksel (Grup 3) ve Dosetaksel yüklü nanoparçacık gruplarına (Grup 4) ait sitotoksosite sonuçları Şekil 4.7 de gösterilmiştir.



Şekil 4.7 Dosetaksel (Grup 3) ve Dosetaksel yüklü nanoparçacık gruplarına (Grup 4) ait sitotoksosite sonuçları.

Sitotoksosite sonuçları Graphpad prism programı ile değerlendirilmiştir. Dosetaksel (Grup 3) ilacının EC_{50} değeri = $9,112 \times 10^{-9}$ ve Dosetaksel yüklü nanoparçacık gruplarına (Grup 4) EC_{50} değeri = $4,321 \times 10^{-9}$ M olarak bulunmuştur.

Kombrestatin A4 + Dosetaksel (Grup 5) ve Kombrestatin A4 + Dosetaksel yüklü nanoparçacık gruplarına (Grup 6) ait sitotoksosite sonuçları Şekil 4.8 de gösterilmiştir.



Şekil 4.8 Kombrestatin A4 + Dosetaksel (Grup 5) ve Kombrestatin A4 + Dosetaksel yüklü nanoparçacık gruplarına (Grup 6) ait sitotoksosite sonuçları.

Sitotoksosite sonuçları Graphpad prism programı ile değerlendirilmiştir. Kombrestatin A4 + Dosetaksel'in (Grup 5) EC_{50} değeri = $1,278 \times 10^{-7}$ M ve Kombrestatin A4 + Dosetaksel yüklü nanoparçacık gruplarına (Grup 6) EC_{50} değeri = $1,866 \times 10^{-8}$ M olarak bulunmuştur.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışması kapsamında, klinikte kanser tedavisinde kullanılan Kombrestatin A4 ve Dosetaksel ilaçlarının PEG-PLGA polimerik nanoparçacıklarına yüklenmesi, PEG-PLGA'nın ikili tedavi için uygunluğunun *in vitro* testlerle tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla PEG-PLGA polimerik nanoparçacıkları üretilmiş, çeşitli hidrofobik boya molekülleri ve hidrofobik ilaçlar kullanılarak KMK, salım profili, enkapsülasyon verimi ve sitotoksosite gibi testlerle değerlendirilmiştir.

PEG-PLGA polimerik nanoparçacıkları TEM ile görüntülenmiş ve ortalama 7-10 nm boyutlarında düzgün küresel bir şekle ve boyuta sahip oldukları tespit edilmiştir.

Kritik misel konsantrasyonu, amfifilik kopolimerin misel oluşturma potansiyelini gösterir ve ilaç taşıma sistemleri için önemli bir parametredir (Gref vd. 1994). Literatüre göre kritik misel konsantrasyonu osmotik basınç, molar iletkenlik, yüzey gerilimi değişimi gibi parametrelerle ölçülebilir (Tan vd. 2010). Bunun yanı sıra organik boyaların emisyon ve absorpsiyonlarındaki değişimlerle de KMK ölçülebilmektedir (Elsev vd. 2007). Bu kapsamda, KMK ölçülmesi için Nile Red floresan boyası kullanılmıştır. Nile Red floresan probu polar ortamdayken herhangi bir renk vermezken polar olmayan ortama geçiş yaptığında spektrum üzerinde kayma yaparak renk vermeye başlamaktadır. Polimerik misel oluştuğunda Nile Red misel yapısının hidrofobik çekirdek kısmına hapsolür. Bu da misel olmayan ve Nile Red boyasının çözündüğü diğer çözeltilere göre daha farklı renkte görünmesine ya da farklı bir deyişle farklı bir dalga boyunda emisyon ve absorpsiyon yapmasına neden olur. Nano yapı içerisine yüklü Nile Red'in emisyon ve absorpsiyon değerleri belirli bir polimer konsantrasyonundan sonra hızlı bir şekilde artmaktadır. Hem dalga boyundaki kayma hem de polimer konsantrasyonuna bağlı absorpsiyondaki hızlı artışın analizi ile KMK'nın belirlenebileceği literatürde gösterilmiştir (Tajalli vd. 2008). Bu tez kapsamında, UV- Vis Spektrofotometre kullanılarak 532 nm de Nile Red absorpsiyonunun PEG-PLGA amfifilik blok-ko-polimerinin konsantrasyonuna bağlı değişimi kullanılarak Basu Ray ve arkadaşlarının kullandığı yöntemle KMK belirlenmiştir (Basu Ray vd. 2006). Elde edilen sonuçlardan KMK grafiği oluşturulmuş ve grafikten PEG-PLGA polimerik nanoparçacıkları için KMK değeri= 0,0126 M olarak tespit edilmiştir.

PEG-PLGA polimerinin kapsülleme verimliliği Oil red O, Kombrestatin A4, Dosetaksel yüklenerek tespit edilmiştir. Oil red O PEG-PLGA polimerik nanoparçacıkların içerisine farklı miktarlarda yüklenmiş ve kapsülleme verimi araştırılmıştır. Çözücü miktarının ve Oil red O miktarının değişimi gibi değişkenlerin enkapsülasyon verimini değiştirdiği tespit edilmiştir. En yüksek kapsülleme veriminin toplam çözücü miktarı 500 µL ve Oil red O miktarı 0,40 mg iken olduğu tespit edilmiştir. Oil red O kapsülleme verimi en az %9,85 ve en çok %26,3'tür.

PEG-PLGA polimerik nanoparçacıkların içerisine Dosetaksel yüklenmiş ve kapsülleme verimi hesaplanmıştır. Çözündürülmüş PEG-PLGA ortamına 0,40 mg Dosetaksel koyulduğunda ilacın 0,18 mg'ını nanoparçacık içerisine aldığı tespit edilmiştir. Dosetaksel için PEG-PLGA kapsülleme verimi %45'dir. 2013 yılında Wang ve arkadaşları PEG-PLGA içerisine Dosetaksel yüklemiş ve enkapsülasyon verimini %53,4 olarak tespit etmişlerdir (Wang ve diğerleri, 2013). 2017 yılında Rafiei ve Haddadi'nin yaptığı çalışmada ise PEG-PLGA içerisine yüklenen Dosetaksel kapsülleme veriminin %59,30 olduğu gösterilmiştir (Rafiei ve Haddadi, 2017). Literatürle kıyaslama yapıldığında Dosetaksel kapsülleme veriminin literatür ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Kombrestatin A4 kapsülleme verimi UV-Vis spektrofometre yöntemi kullanılarak kalan ilaç çözeltisinden hesaplanmıştır. 0,15 mg Kombrestatin A4' ün 0,138 mg'nın PEG-PLGA içerisine yüklendiği tespit edilmiştir. Enkapsülasyon verimi hesaplandığında %92 verimle yüklendiği görülmüştür.

Kanser mikro çevresi asidik pH gösterir ve nanoparçacıkların asidik ortamda daha hızlı parçalanmaları ve salım göstermeleri istenen bir durumdur. PEG-PLGA salım çalışmalarında Oil red O kullanılmıştır. Örnekler PBS (pH=7,4) ve asetat tampon (pH=5,5) çözeltilerinde 37° C de inkübe edilmiştir. PBS tamponda hazırlanan örnekler ilk 24 saatte %5 lik bir salım göstermiştir. 96. saate geldiğinde PEG-PLGA Oil red O'nun %56'sını salmıştır. pH=5,5 asetat tamponu içindeki örnekler ilk 24 saat içinde Oil red O'nun %26,58'ini salmışlardır. 96 saat içerisinde Oil red O %95 oranında salınmıştır. Her iki ortamda da salım olmasıyla birlikte asidik ortamdaki salım daha hızlı olmuştur. Gözle

görülür bir biçimde asidik ortamda bulunan örneklerin renkleri nötr ortama göre daha açık renkte görülmektedir. PEG-PLGA enzimatik salım çalışmaları incelendiğinde Babos ve arkadaşlarının (2018) yaptığı çalışmada PEG-PLGA polimerik nanoparçacıklarının içerisine Sorafenib and Doksorubisin yükleyerek PEG-PLGA'nın pH=5,5 da ki salım profilini incelemişlerdir (Babos, Biró, Meiczinger ve Feczko, 2018). Çalışmada her iki ilacın da asidik ortamda 150 saat içerisinde tamamen salındığı rapor edilmiştir. Nahar ve Jain'in (2009) yaptığı çalışmada PEG-PLGA polimerik nanoparçacıklarının içerisine amfoterisin B ilacını yüklemiş ve PBS ile asetat tampon çözeltilerinde salım profilleri incelenmiştir (Nahar ve Jain, 2009). Her iki tamponda da salım yapmakla birlikte asidik ortamda %91,7 oranında salım yaptığı ve asidik ortamda daha hızlı salındığı belirtilmiştir. PEG-PLGA'nın asidik ortamda daha hızlı salım yapması durumu literatürle benzerlik göstermektedir.

Kombrestatin A4 (Grup 1) 10^{-4} M ile 10^{-12} M konsantrasyon aralığında hücrelere uygulanmış ve MTT analizi yapılmıştır. Verilerin analizinde Graphpad prism yazılımı kullanılmıştır. Kombrestatin A4'ün EC_{50} değerinin $1,267 \times 10^{-8}$ M olduğu tespit edilmiştir. Kombrestatin A4 nanoparçacık (Grup 2) içerisine yüklendiğinde EC_{50} değeri $1,830 \times 10^{-9}$ M olarak hesaplanmıştır. Sitotoksikite sonuçlarına göre Kombrestatin A4 yüklü nanoparçacık grubunda Kombrestatin A4'ün ilaç salımına bağlı sitotoksikite gösterdiği belirlenmiştir. Nanoparçacık içerisine yüklenen Kombrestatin A4 ile Kombrestatin A4'ün EC_{50} değeri karşılaştırıldığında Kombrestatin A4 yüklü nanoparçacıkların Kombrestatin A4'e göre daha toksik olduğu gözlemlenmiştir. Hassan ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptığı çalışmada Kombrestatin A4 ilacı PLGA içerisine yüklenmiş ve serbest Kombrestatin ile sitotoksik olarak karşılaştırılmıştır. Kombrestatin A4'ün nanoparçacık içerisine yüklendiğinde daha toksik olduğu tespit edilmiştir. Kombrestatin yüklü nanoparçacığın Kombrestatine göre daha toksik olması literatürle benzerlik göstermektedir (Hassan vd. 2020). Kombrestatin A4 mikrotübül hedefleyici bir ilaçtır ve mikrotübül depolimerizasyonunu hızlandırmaktadır. Mikrotübül hedefleyici ilaçlar hücre içerisine girdiğinde mikrotübül fonksiyonlarını bozarak apoptozu tetiklerler. Kanserli hücreler gelişmiş endositoz aktivitesi göstererek polimerik nanoparçacıkları içselleştirir bu durum hücre içine alınan ilaç konsantrasyonunun artması anlamına gelmektedir. Bu, nanoparçacık içerisine Kombrestatin A4 yüklendiğinde sitotoksitenin

daha fazla olması durumunu açıklamaktadır (Ou vd. 2018).

Dosetaksel ilacı (Grup 3) 10^{-4} M ile 10^{-12} M konsantrasyon aralığında hücrelere uygulanmış ve MTT analizi yapılmıştır. Verilerin analizinde Graphpad prism yazılımı kullanılmıştır. Dosetaksel'in EC_{50} değeri $9,112 \times 10^{-9}$ M olduğu tespit edilmiştir. Dosetaksel nanoparçacık (Grup 4) içerisine yüklendiğinde EC_{50} değeri $4,321 \times 10^{-9}$ M olarak hesaplanmıştır. MTT analizi ile nanoparçacığa yüklü Dosetakselin ilaç salımına bağlı sitotoksikite gösterdiği belirlenmiştir. Nanoparçacık içerisine yüklenen Dosetaksel ile Dosetakselin'in EC_{50} değeri karşılaştırıldığında Dosetaksel'in Dosetaksel yüklü nanoparçacığa göre daha toksik olduğu görülmüştür. Gupta ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Dosetaksel yüklü PEG-PDLA ile Dosetaksel'in sitotoksikitesi karşılaştırılmış ve Dosetaksel'in daha toksik olduğu tespit edilmiştir. Dosetaksel'in daha toksik olması literatürdeki örnekle paralellik göstermektedir (Gupta vd. 2014). *In vitro* ortamda ilaç salım profilleri farklılık göstermekte ve bazı ilaçların bulundukları ortama göre salımı değişebilmektedir. İlaç salımının yavaş olduğu durumlarda nanotaşıyıcı sistemler serbest ilaca göre 48 saat gibi belirli zaman dilimlerinde daha az toksik etki gösterebilmektedir. Ancak çeşitli çalışmalarda nanotaşıyıcı sistemler *in vitro* koşullarda serbest ilaca göre daha az sitotoksik olsada *in vivo* denemelerde daha başarılı olmaktadır. Bu da daha uzun periyotlardaki *in vivo* anti- tümör çalışmalarında gerek EPR etkisi gerekse ilaç salımının tamamlanması sonucunda ortaya çıkan bir durum olarak açıklanmaktadır (Kağa 2016).

Kombrestatin A4 + Dosetaksel (Grup 5) ve Kombrestatin A4 + Dosetaksel yüklü nanoparçacık grupları (Grup 6) 10^{-4} M ile 10^{-12} M konsantrasyon aralığında hücrelere uygulanmış ve MTT analizi yapılmıştır. Verilerin analizinde Graphpad prism yazılımı kullanılmıştır. Kombrestatin A4 + Dosetaksel'in (Grup 5) EC_{50} değerinin $1,278 \times 10^{-7}$ M olduğu tespit edilmiştir. Kombrestatin A4 + Dosetaksel yüklü nanoparçacık grubunun (Grup 6) EC_{50} değeri ise $1,866 \times 10^{-8}$ M olarak hesaplanmıştır. MTT analizi sonuçlarına göre Kombrestatin A4 + Dosetaksel yüklü nanoparçacık grubunun (Grup 6), Kombrestatin A4 + Dosetaksel grubuna (Grup 5) göre daha düşük EC_{50} değerine sahip olduğu yani daha kuvvetli sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuç, *in vitro* ortamda PEG-PLGA polimeri ile elde ettiğimiz taşıyıcı platformun ilaçların serbest halde kullanıldığı kombinasyon uygulamasına göre daha sitotoksik olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında elde edilen veriler ışığında PEG-PLGA polimerik nanoparçacıklarının kanserin kombinasyon ilaç tedavisinde uygun ilaç taşıma platformu olduğu *in vitro* testlerle gösterilmiştir. Kontrol edilebilir ilaç salım profili PEG-PLGA ilaç taşıma sisteminin avantajlı yönlerinden biridir. Enkapsülasyon veriminin ise yüklenmesi planlanan moleküller arasında farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir. Hidrofobik boya molekülleri ile yapılan enkapsülasyon testlerinde enkapsülasyon veriminin metotda yapılan bazı değişikliklerle arttırılabildiği gösterilmiştir. Yapılan *in vitro* sitotoksisite çalışmaları sonucunda farklı ilaçların PEG-PLGA nanoparçacıklara yüklenmesi ile farklı sonuçlar doğurduğunu göstermiştir. Kombrestatin A4 ile yapılan çalışmalarda Kombrestatin A4 yüklü nanotaşıyıcının serbest Kombrestatin A4'e göre daha sitotoksik olduğunu gösterirken, Dosetaksel ile yapılan sitotoksite çalışmaları ise Dosetaksel grubunun Dosetaksel yüklü nanotaşıyıcı grubuna göre daha sitotoksik olduğunu göstermektedir. Bu iki durum da literatürde karşılaşılan durumlar olup ilaçların etki mekanizmaları, salım profilleri ve ilaçların kimyasal yapıları gibi çeşitli farklardan kaynaklanabilmektedir. Kombinasyon uygulamasının nanotaşıyıcı platformla karşılaştırılmasını belirlemek için yaptığımız sitotoksisite çalışmalarında ise Kombrestatin A4 ve Dosetaksel ilaçlarının birlikte PEG-PLGA nanoparçacıklarına yüklenmesiyle elde edilen formülasyonun (Grup 6) bu iki ilacın serbest halde aynı dozda uygulandığı gruba (Grup 5) göre daha sitotoksik etki gösterdiği elde edilen EC_{50} değerleriyle açıkça görülmektedir (Grup 6 $EC_{50}=1,866 \times 10^{-8}$ M ve Grup 5 $EC_{50}=1,278 \times 10^{-7}$ M). Bu da bu tez çalışmasının hipotezini oluşturan yargımızın doğruluğunu destekler niteliktedir. Tüm bu veriler birlikte ele alındığında *in vitro* düzeyde PEG-PLGA amfifilik blok-ko-polimerinin kombinasyon tedavisinde ideal bir nanotaşıyıcı olduğu söylenebilir. Özellikle *in vitro* testlerdeki sitotoksik parametreler ve nanotaşıyıcılarının bilinen EPR etkisi birlikte ele alındığında sistemik uygulamada da PEG-PLGA bazlı bu ilaç taşıma platformu ile ilaç uygulamalarına göre daha başarılı sonuçlar elde edileceği öngörülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Adolphi N L, Butler K S, Lovato D M, Tessier T E, Trujillo J E, Hathaway H J, vd., 2012, Imaging Of Her2-Targeted Magnetic Nanoparticles for Breast Cancer Detection: Comparison of Squid-Detected Magnetic Relaxometry and MRI, *Contrast Media & Molecular Imaging*, 7, 308–319.
- Amirsaadat S, Jafari-Gharabaghlou D, Alijani S, Mousazadeh H, Dadashpour M, Zarghami N, 2021, Metformin and Silibinin co-loaded PLGA-PEG Nanoparticles for Effective Combination Therapy Against Human Breast Cancer Cells, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 61, 102 –107.
- Astete C E, Sabliov C M, 2012, Synthesis and Characterization of PLGA Nanoparticles, *Journal of Biomaterials Science*, 17, 247–289.
- Babos G, Biró E, Meiczinger M, Feczkó T, 2018, Dual Drug Delivery of Sorafenib and Doxorubicin from PLGA and PEG-PLGA Polymeric Nanoparticles, *Polymers*, 10, 895 –902.
- Bae Y H, 2009, Drug Targeting and Tumor Heterogeneity, *Journal of Controlled Release*, 133, 2–3.
- Barnett G C, West C M L, Dunning A M, Elliott R M, Coles C E, Pharoah P D P, vd., 2009, Normal Tissue Reactions to Radiotherapy: Towards Tailoring Treatment Dose By Genotype, *Nature Reviews Cancer*, 9, 134 –137.
- Baskar R, Lee K A, Yeo, R and Yeoh K W, 2012, Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions, *International Journal of Medical Sciences*, 9, 193 –197.
- Basu Ray G, Chakraborty I and Moulik S P, 2006, Pyrene Absorption can be a Convenient Method for Probing Critical Micellar Concentration (CMC) and Indexing Micellar Polarity, *Journal of Colloid and Interface Science*, 294, 248–254.
- Bazak R, Hourri M, El Achy S, Kamel S, Refaat T, 2015, Cancer Active Targeting by Nanoparticles: A Comprehensive Review Of Literature, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 141, 769–784.
- Berenblum I, 1929, The Modifying Influence of Dichloro-Ethyl Sulphide on the

- Induction of Tumours in Mice By Tar, *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 32, 425–434.
- Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad O C, 2014, Cancer Nanotechnology: The impact of Passive and Active Targeting in the Era of Modern Cancer Biology, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 66, 2–25.
- Beyzadeoğlu M, Özyiğit G, Ebruli C, 2010, *Basic Radiation Oncology*, Springer, 575s, Berlin.
- Bhatia S, 2016, Natural Polymer Drug Delivery Systems: Nanoparticles, plants, and algae, *Natural Polymer Drug Delivery Systems: Nanoparticles, Plants, and Algae*, Springer, 225s, Switzerland.
- Brady L W, Heilmann H P, Molls M, 2006, *New Technologies in Radiation Oncology*, Springer, 567s, New York.
- Byrne J D, Betancourt T, Brannon-Peppas L, 2008, Active Targeting Schemes for Nanoparticle Systems in Cancer Therapeutics, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 1615–1626.
- Chabner B A, Jr T G R, 2005, Chemotherapy and the War on Cancer, *Nature Reviews Cancer*, 5, 65–72.
- Chang J Y, Hsieh H P, Chang C Y, Hsu K S, Chiang Y F, Chen C M vd., 2006, 7-Aroyl-Aminoindoline-1-Sulfonamides as A Novel Class of Potent Antitubulin Agents, *Journal of Medicinal Chemistry*, 49, 6656–6659.
- Chen Y, Williams J, Ding I, Hernady E, Liu W, Smudzin T, vd., 2002, Radiation Pneumonitis and Early Circulatory Cytokine Markers. *Seminars in Radiation Oncology*, 12, 26–33.
- Chou T C, 2010, Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using The Chou-Talalay Method, *Cancer Research*, 70, 440–446.
- Danhier F, Feron O, Pr  at V, 2010, To Exploit the Tumor Microenvironment: Passive and Active Tumor Targeting of Nanocarriers for Anti-Cancer Drug Delivery. *Journal of Controlled Release*, 148, 135–146.
- Danhier F, Lecouturier N, Vroman B, Jérôme C, Marchand-Brynaert J, Feron O, vd.,

- 2009, Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-Based Nanoparticles: In vitro and in vivo Evaluation. *Journal of Controlled Release*, 133, 11–17.
- Day E S, Bickford L R, Slater J H, Riggall N S, Drezek R A, West J L, 2010, Antibody-Conjugated Gold-Gold Sulfide Nanoparticles as Multifunctional Agents for Imaging and Therapy of Breast Cancer, *International Journal of Nanomedicine*, 5, 445–459.
- Debbage P, 2009, Targeted Drugs and Nanomedicine: Present and Future, *Current Pharmaceutical Design*, 15, 153–172.
- Delaney G, Jacob S, Featherstone C, Barton M, 2005, The Role of Radiotherapy in Cancer Treatment, *Cancer*, 104, 1129–1137.
- DeVita V T, Chu E, 2008, A History of Cancer Chemotherapy, *Cancer Research*, 68, 8643–8653.
- Dey A, Koli U, Dandekar P, Jain R, 2016, Investigating Behaviour of Polymers in Nanoparticles of Chitosan Oligosaccharides Coated with Hyaluronic Acid. *Polymer*, 93, 44–52.
- Du Q, Jiang G, Li S, Liu Y, Huang Z, 2018, Docetaxel Increases The Risk of Severe Infections in The Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis, *Oncoscience*, 5, 220–238.
- Elsey D, Jameson D, Raleigh B, Cooney M J, 2007, Fluorescent Measurement of Microalgal Neutral Lipids. *Journal of Microbiological Methods*, 68, 639–642.
- Ems-McClung S C, Walczak C E, 2010, Kinesin-13s In Mitosis: Key Players in the Spatial and Temporal Organization of Spindle Microtubules, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21, 276–282.
- Fairchild A, Tirumani S H, Rosenthal M H, Howard S A, Krajewski K M, Nishino M, vd., 2015, Hormonal Therapy in Oncology: a Primer For The Radiologist, *American Journal of Roentgenology*, 204, 620–630.
- Farber S, Diamond L K, Mercer R D, Sylvester R F, Wolff J A, 1948, Temporary Remissions in Acute Leukemia in Children Produced by Folic Acid Antagonist, 4-Aminopteroyl-Glutamic Acid (Aminopterin), *New England Journal of*

Medicine, 238, 787–793.

Fordtran J S, Hofmann A F, 2017, Seventy Years of Polyethylene Glycols in Gastroenterology: The Journey of PEG 4000 and 3350 From Nonabsorbable Marker to Colonoscopy Preparation to Osmotic Laxative, *Gastroenterology*, 152, 675–680.

Giorgi M E, Agusti R, De Lederkremer R M, 2014, Carbohydrate PEGylation, an Approach to Improve Pharmacological Potency, *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 10, 1433–1444.

Gong H Y, Chen Y G, Yu X S, Xiao H, Xiao J P, Wang Y, vd., 2019, Co-delivery of Doxorubicin and Afatinib with pH-responsive Polymeric Nanovesicle for Enhanced Lung Cancer Therapy, *Chinese Journal of Polymer Science*, 37, 1224–1233.

Gordon Steel G, 2009, The Case Against Apoptosis, *Acta Oncologica*, 40(8), 968–975.

Gref R, Minamitake Y, Peracchia M T, Trubetskoy V, Torchilin V, Langer R, 1994, Biodegradable Long-Circulating Polymeric Nanospheres, *Science*, 263, 1600–1603.

Guan Q, Han C, Zuo D, Zhai M, Li Z, Zhang Q, vd., 2014, Synthesis and Evaluation of Benzimidazole Carbamates Bearing Indole Moieties for Antiproliferative and Antitubulin Activities, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 87, 306–315.

Hanahan D, Weinberg R A, 2011, Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell*, 144, 646–674.

Harasym T O, Tardi P G, Harasym N L, Harvie P, Johnstone S A, Mayer L D, 2007, Increased Preclinical Efficacy of Irinotecan and Floxuridine Coencapsulated Inside Liposomes is Associated with Tumor Delivery of Synergistic Drug Ratios, *Oncology Research*, 16, 361–374.

Harding J, Burtneß B, 2005, Cetuximab: An Epidermal Growth Factor Receptor Chimeric Human-Murine Monoclonal Antibody, *Drugs of Today*, 41, 107–127.

Henderson B E, Feigelson H S, 2000, Hormonal Carcinogenesis, *Carcinogenesis*, 21, 427–433.

- Hitchings B G H, Elion G B, 1954, The Chemistry and Biochemistry of Purine Analogs, Annals of the New York Academy of Sciences, 60, 195–199.
- Hrkach J, Von Hoff D, Ali M M, Andrianova E, Auer J, Campbell T, vd., 2012, Preclinical Development and Clinical Translation of a Psma-Targeted Docetaxel Nanoparticle with a Differentiated Pharmacological Profile, Science Translational Medicine, 4, 39–45.
- Hulla J E, Sahu S C, Hayes A W, 2015, Nanotechnology: History and Future, Human and Experimental Toxicology, 34, 1318–1321.
- Jackson S P, Bartek J, 2009, The DNA-Damage Response in Human Biology and Disease, Nature, 461, 1071–1079.
- JH H, CM W, 1997, Apoptosis and Mitotic Cell Death: Their Relative Contributions to Normal-Tissue and Tumour Radiation Response, International Journal of Radiation Biology, 71, 709–719.
- Jin T, Sun D, Su J Y, Zhang H, Sue H J, 2009, Antimicrobial Efficacy of Zinc Oxide Quantum Dots Against *Listeria Monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis*, and *Escherichia coli* O157:H7, Journal of food science, 74, 46-52.
- Kakde D, Jain D, Shrivastava V, Kakde R, Patil A T, 2011, Cancer Therapeutics- Opportunities, Challenges and Advances in Drug Delivery, Journal of Applied Pharmaceutical Science, 1, 1–10.
- Kalyane D, Raval N, Maheshwari R, Tambe V, Kalia K, Tekade R K, 2019, Employment of Enhanced Permeability and Retention Effect (Epr): Nanoparticle-Based Precision Tools for Targeting of Therapeutic and Diagnostic Agent in Cancer, Materials Science and Engineering, 58, 1252–1276.
- Kaur R, Kaur G, Gill R K, Soni R, Bariwal J, 2014, Recent Developments in Tubulin Polymerization Inhibitors: an Overview, European Journal of Medicinal Chemistry, 87, 89–124.
- Kenmotsu H, Tanigawara Y, 2015, Pharmacokinetics, Dynamics and Toxicity of Docetaxel: Why The Japanese Dose Differs From The Western Dose, Cancer Science, 106, 497–504.

- Kim S B, Sayeed A, Villalon A H, Shen Z Z, Shah M A, Hou M F, vd., 2016, Docetaxel-Based Adjuvant Therapy for Breast Cancer Patients in Asia-Pacific Region: Results From 5 Years Follow-Up on Asia-Pacific Breast Initiative-I. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*, 12, 125–132.
- Köhler G, Milstein C, 1975, Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity, *Nature*, 256, 495–497.
- Lee J H, Nan A, 2012, Combination Drug Delivery Approaches in Metastatic Breast Cancer, *Journal of Drug Delivery*, 2012, 1–17.
- Lonardo A, Di Nasi S, Pulciani S, 2015, Cancer: We Should Not Forget The Past, *Journal of Cancer*, 6, 29–35.
- Low P S, Kularatne S A, 2009, Folate-Targeted Therapeutic and Imaging Agents for Cancer, *Current Opinion in Chemical Biology*, 13, 256–262.
- Lyseng-Williamson K A, Fenton C, 2005, Docetaxel: A Review of its Use in Metastatic Breast Cancer, *Drugs*, 65, 2513–2531.
- Mares A G, Pacassoni G, Marti J S, Pujals S, Albertazzi L, 2021, Formulation of Tunable Size PLGA-PEG Nanoparticles for Drug Delivery Using Microfluidic Technology, *Plos One*, 16, 39-45.
- Matsumura Y, Maeda H, 1986, A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs, *Cancer Research*, 46, 6387–6392.
- Mattheolabakis G, Rigas B, Constantinides P P, 2012, Nanodelivery Strategies in Cancer Chemotherapy: Biological Rationale And Pharmaceutical Perspectives, *Nanomedicine*, 7, 1577–1590.
- Mayer L D, Harasym T O, Tardi P G, Harasym N L, Shew C R, Johnstone S A, vd., 2006, Ratiometric Dosing of Anticancer Drug Combinations: Controlling Drug Ratios After Systemic Administration Regulates Therapeutic Activity in Tumor-Bearing Mice, *Molecular Cancer Therapeutics*, 5, 1854–1863.
- Milton Harris J, Martin N E, Modi M, 2001, Pegylation: A Novel Process for Modifying Pharmacokinetics, *Clinical Pharmacokinetics*, 40, 539–551.

- Mirakabad F S T, Akbarzadeh A, Milani M, Zarghami N, Taheri-Anganeh M, Zeighamian, vd., 2014, A Comparison Between the Cytotoxic Effects of Pure Curcumin and Curcumin-Loaded PLGA-PEG Nanoparticles on the MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line, *Artificial cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44, 423–430.
- Mitra S, Lami M S, Ghosh A, Das R, Tallei T E, Fatimawali, vd., 2022, Hormonal Therapy for Gynecological Cancers: How Far Has Science Progressed Toward Clinical Applications, *Cancers*, 14, 759-768.
- Muralidharan R, Babu A, Amreddy N, Basalingappa K, Mehta M, Chen A, vd., 2016, Folate Receptor-Targeted Nanoparticle Delivery of Hur-Rnai Suppresses Lung Cancer Cell Proliferation and Migration, *Journal of Nanobiotechnology*, 14, 1-17.
- Musgrove E A, Caldon C E, Barraclough J, Stone A, Sutherland R L, 2011, Cyclin D as a Therapeutic Target in Cancer, *Nature Reviews Cancer*, 11, 558–572.
- Nahar M, Jain N K, 2009, Preparation, Characterization and Evaluation of Targeting Potential of Amphotericin B-Loaded Engineered PLGA Nanoparticles, *Pharmaceutical Research*, 26, 2588–2598.
- Nahta R, Yu D, Hung M C, Hortobagyi G N, Esteva F J, 2006, Mechanisms of Disease: Understanding Resistance to HER2-Targeted Therapy in Human Breast Cancer, *Nature Clinical Practice, Oncology*, 3, 269–280.
- Ni X, Castanares M, Mukherjee A, Lupold S E, 2011, Nucleic Acid Aptamers: Clinical Applications and Promising New Horizons, *Current Medicinal Chemistry*, 18, 4206–4214.
- Ostwal V, Bose S, Sirohi B, Poladia B, Sahu A, Bhargava P, vd., 2018, Docetaxel/Oxaliplatin/Capecitabine (Tex) Triplet Followed by Continuation Monotherapy in Advanced Gastric Cancer, *Indian Journal of Cancer*, 55, 88–93.
- Papac R J, 2002, Origins of Cancer Therapy, *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 74, 391–398.
- Papavramidou N, Papavramidis T, Demetriou T, 2010, Ancient Greek and Greco – Roman Methods in Modern Surgical Treatment of Cancer, *Annals of Surgical Oncology*, 17, 665–667.

- Patterson D M, Rustin G J S, 2007, Vascular Damaging Agents, *Clinical Oncology*, 19, 443–456.
- Pettit G R, Singh S B, Hamel E, Lin C M, Alberts D S, Garcia-Kendal D, 1989, Isolation and Structure of the Strong Cell Growth and Tubulin Inhibitor Combretastatin A4, *Experientia*, 45, 209–211.
- Pietersz G A, Wang X, Yap M L, Lim B, Peter K, 2017, Therapeutic Targeting in Nanomedicine: The Future Lies in Recombinant Antibodies, *Nanomedicine*, 12, 1873–1889.
- Pinto A C, Moreira J N, Simões S, 2011, Combination Chemotherapy in Cancer: Principles, Evaluation and Drug Delivery Strategies, *Current Cancer Treatment- Novel Beyond Conventional Approaches*, 29, 1-24.
- Pritchard J R, Lauffenburger D A, Hemann M T, 2012, Understanding Resistance to Combination Chemotherapy, *Drug Resistance Updates*, 15, 249–257.
- Bomb K, Srivastava R, Bandyopadhyaya R, 2020, Dual Drug Delivery of Curcumin and Niclosamide Using PLGA Nanoparticles for Improved Therapeutic Effect on Breast Cancer Cells. *Journal of Polymer Research*, 27, 1–13.
- Rafiei P, Haddadi A, 2017, Docetaxel-Loaded PLGA And PLGA-PEG Nanoparticles for Intravenous Application: Pharmacokinetics and Biodistribution Profile, *International Journal of Nanomedicine*, 12, 935–947.
- Ramkumar V S, Pugazhendhi A, Gopalakrishnan K, Sivagurunathan P, Saratale G D, Dung T N B, vd., 2017, Biofabrication and Characterization of Silver Nanoparticles Using Aqueous Extract of Seaweed *Enteromorpha Compressa* and its Biomedical Properties, *Biotechnology Reports*, 14, 1–7.
- Ramos A P, Cruz M A E, Tovani C B, Ciancaglini P, 2017, Biomedical Applications of Nanotechnology, *Biophysical*, 9, 79–89.
- Ringel I, Horwitz S B, 1991, Studies with RP 56976 (taxotere): a Semisynthetic Analogue of Taxol, *Journal of the National Cancer Institute*, 83, 288–291.
- Roco M C, 2003, Nanotechnology: Convergence with Modern Biology And Medicine, *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 337–346.

- Ruiz-Gatón L, Espuelas S, Larrañeta E, Reviakine I, Yate L A, Irache J M, 2018, PEGylated Poly(anhydride) Nanoparticles for Oral Delivery of Docetaxel. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 118, 165–175.
- Sadık K, 2016, Smart Polymeric Prodrugs For Targeted Drug Delivery And Functionalizable Hydrogels For Biosensing Applications, Boğaziçi Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 274s, İstanbul.
- Samadian H, Hosseini-Nami S, Kamrava S K, Ghaznavi H, Shakeri-Zadeh A, 2016, Folate-Conjugated Gold Nanoparticle as a New Nanoplatfrom For Targeted Cancer Therapy, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 142, 2217–2229.
- Semete B, Booyesen L, Lemmer Y, Kalombo L, Katata L, Verschoor J, vd., 2010, In Vivo Evaluation of the Biodistribution and Safety of PLGA Nanoparticles as Drug Delivery Systems, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6, 662–671.
- Sherwood L M, Parris E E, Folkman J, 1971, Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications, *New England Journal of Medicine*, 285, 1182–1186.
- Shi J, Xiao Z, Kamaly N, Farokhzad O C, 2011, Self-Assembled Targeted Nanoparticles: Evolution of Technologies and Bench to Bedside Translation, *Accounts of Chemical Research*, 44, 1123–1134.
- Spector N L, Blackwell K L, 2009, Understanding the Mechanisms Behind Trastuzumab Therapy for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer, *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27, 5838–5847.
- Steinhauser I, Spänkuch B, Strebhardt K, Langer K, 2006, Trastuzumab-Modified Nanoparticles: Optimisation of Preparation and Uptake in Cancer Cells, *Biomaterials*, 27, 4975–4983.
- Sullivan R, Alatis O I, Anderson B O, Audisio R, Autier P, Aggarwal A, vd., 2015, Global Cancer Surgery: Delivering Safe, Affordable, and Timely Cancer Surgery, *The Lancet Oncology*, 16, 1193–1224.
- Sur S, Rathore A, Dave V, Reddy K R, Chouhan R S, Sadhu V, 2019, Recent

- Developments in Functionalized Polymer Nanoparticles for Efficient Drug Delivery System, *Nano-Structures & Nano-Objects*, 20, 100397.
- Tajalli H, Gilani A G, Zakerhamidi M S, Tajalli P, 2008, The Photophysical Properties of Nile Red And Nile Blue in Ordered Anisotropic Media, *Dyes and Pigments*, 78, 15–24.
- Tan C H, Huang Z J, Huang X G, 2010, Rapid Determination of Surfactant Critical Micelle Concentration in Aqueous Solutions Using Fiber-Optic Refractive Index Sensing, *Analytical Biochemistry*, 401, 144–147.
- Tekade R K, Maheshwari R, Soni N, Tekade M, Chougule M B, 2017, Nanotechnology for the Development of Nanomedicine, *Nanotechnology-Based Approaches for Targeting and Delivery of Drugs and Genes*, 339, 3–61.
- Thi T T H, Pilkington E H, Nguyen D H, Lee J S, Park K D, Truong N P, 2020, The Importance of Poly(ethylene glycol) Alternatives for Overcoming PEG Immunogenicity in Drug Delivery and Bioconjugation, *Polymers*, 12, 298–305.
- Thistlethwaite J R, Cosimi A B, Delmonico F L, Rubin R H, Talkoff-Rubin N, Nelson P. W, vd., 1984, Evolving Use of OKT3 Monoclonal Antibody for Treatment of Renal Allograft Rejection, *Transplantation*, 38, 695–700.
- Thompson M S, Vadala T P, Vadala M L, Lin Y, Riffle J S, 2008, Synthesis and Applications of Heterobifunctional Poly(ethylene oxide) Oligomers, *Polymer*, 49, 345–373.
- Wang Y, Chen H, Liu Y, Wu J, Zhou P, Wang Y, vd., 2013, Ph-Sensitive Pullulan-Based Nanoparticle Carrier of Methotrexate and Combretastatin A4 For The Combination Therapy Against Hepatocellular Carcinoma, *Biomaterials*, 34, 7181–7190.
- Wartlick H, Michaelis K, Balthasar S, Strebhardt K, Kreuter J, Langer K, 2004, Highly Specific Her2-Mediated Cellular Uptake of Antibody-Modified Nanoparticles in Tumour Cells, *Journal of Drug Targeting*, 12, 461–471.
- Wen C H, Hsu S C, Hsu S H, Chang S W, 2019, Molecular Structures and Mechanisms of Waterborne Biodegradable Polyurethane Nanoparticles, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 110–117.

- Wyld L, Audisio R A, Poston G J, 2014, The Evolution of Cancer Surgery and Future Perspectives, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 12, 115–124.
- Xu Y, Kim C S, Saylor D M, Koo D, 2017, Polymer Degradation and Drug Delivery in PLGA-Based Drug–Polymer Applications: A Review Of Experiments And Theories, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 105, 1692–1716.
- Yu B, Tai H C, Xue W, Lee L J, Lee R J, 2010, Receptor-Targeted Nanocarriers for Therapeutic Delivery to Cancer, *Molecular Membrane Biology*, 27, 286–297.
- Zhang R X, Wong H L, Xue H Y, Eoh J Y, Wu X Y, 2016, Nanomedicine of Synergistic Drug Combinations For Cancer Therapy – Strategies And Perspectives, *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 240, 489–495.

İnternet Kaynakları

- 1- [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer#:~:text=The%20problem-,Cancer%20is%20a%20leading%20cause%20of%20death%20worldwide%2C%20accounting%20for,lung%20\(2.21%20million%20cases\)%3B,27.02.2022](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer#:~:text=The%20problem-,Cancer%20is%20a%20leading%20cause%20of%20death%20worldwide%2C%20accounting%20for,lung%20(2.21%20million%20cases)%3B,27.02.2022)
- 2-<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/hormone-therapy#:~:text=Hormone%20therapy%20is%20used%20to,some%20prostate%20and%20breast%20cancers.&text=Hormone%20therapy%20is%20a%20cancer,hormone%20treatment%2C%20or%20endocrine%20therapy,15.04.2022>