

**Anti-Kanser İlaç Salımına Yönelik Dendritik Polimer Sentezi
ve Hücre Kültürlerinde Uygulanması**

Proje No: 107T179

**Prof.Dr. Ufuk Gündüz
Prof. Dr. Güngör Gündüz
Araş Gör. Özlem Darcansoy İşeri
Araş. Gör. Meltem Demirel Kars**

**OCAK 2009
ANKARA**

ÖNSÖZ

Kanser çağımızın en büyük sorunlarından biridir. Kanserinin neden olduğu moleküler mekanizmalar yapılan her araştırmayla farklı bir boyut kazanmaktadır; ancak kansere neden olan faktörler ise hızla artmaya devam etmektedir. Bu nedenle kanser hastalarının sayısı yıllar geçtikçe artmaktadır. Kanserinin neden olduğu etkenlerin tespit edilmesi kadar kanser tedavilerinin etkinliği de önem taşımaktadır. Özellikle kanser kemoterapisinin sağlıklı dokuya zarar vermesi ve tümörlü dokuya istenilen dozda ulaşamaması nedeni ile yoğun yan etkilere maruz kalan hastalar, aynı zamanda kanser ilaçlarına da dirençlilik geliştirmektedir. Bu sorunların en aza indirilebilmesi için ise kullanılan ilaçlarının sadece tümörlü dokuya etki edebilmesi önemlidir. Kontrollü ilaç salım çalışmaları farklı taşıyıcılar kullanarak ilacın sağlam dokuya zarar vermeden istenilen dozun tümöre ulaşmasını amaçlamaktadır. Bu konuda çok fazla araştırma yapılmaktadır; çalışmaların bir kısmı bilinen taşıyıcıların geliştirilmesi üzerine odaklanırken bir kısmı ise yeni taşıyıcılar geliştirerek bu konudaki araştırmaların çeşitliliğini artırmaktadır.

Bu projede yeni tasarlanan aşırı dallı polimerin hidrofobik özellikli anti-kanser ilacı tutuklama ve kontrollü salım özellikleri araştırılmış, farklı tipteki hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir. Proje sonucunda ilaç tasarlanan aşırı dallı polimere etkili bir şekilde tutuklanmış kontrollü salımı gerçekleştirilmiştir. Aşırı dallı polimerin meme kanseri hücreleri üzerinde çok daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar tasarlanan aşırı dallı polimerin kontrollü ilaç salımı için uygulanabilirliğini göstermiş ve bu konuda yapılacak yeni araştırmalara ışık tutmuştur.

Bu çalışma 107T179 numaralı TUBİTAK projesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	2
İÇİNDEKİLER.....	3
TABLO LİSTELERİ.....	5
ŞEKİL LİSTELERİ.....	6
ÖZET.....	7
ABSTRACT.....	8
1. GİRİŞ.....	9
1.1 Kontrollü İlaç Salım Teknolojisi.....	9
1.2 İlaç Salım Sistemlerinde Kullanılan Yöntemler.....	9
1.3 İlaç Salım Teknolojisinde Polimerik Sistemler.....	10
1.3.1 Dendritik Polimerler.....	10
1.3.1.1 Dendritik Polimerlerin İlaç Salımında Kullanılması	11
1.3.2 Aşırı Dallı Polimerlerin Sentezi ve İlaç Salımı Çalışmalarında Kullanılması	12
1.4 Yağ Asitlerinin İlaç Salımında Kullanılması	13
1.4.1 Risinoleik asit.....	13
1.5 Tamoksifen	13
2. GEREÇLER VE YÖNTEM.....	15
2.1 Aşırı Dallı Polimer Sentezi için Gereçler.....	15
2.2 İlaç Tutuklanması, Salım ve Hücre Kültürü Çalışmaları için Gereçler.....	15
2.3 Hint Yağından Yağ Asidi Üretimi.....	15
2.4 Aşırı Dallı Polyester Sentezi.....	16
2.5 Aşırı Dallı Reçine Üretimi	18
2.6 Tamoksifenin ADR Nanoparçacıklarına Yüklenmesi.....	19
2.7 Tamoksifen Salım Çalışmaları.....	20
2.8 ADR'nin Biyoyıkım Çalışmaları.....	20
2.9 Karakterizasyon Yöntemleri.....	20
2.9.1 FTIR-Raman Spektroskopisi.....	21
2.9.2 Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi.....	21
2.9.3 Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi.....	21
2.9.4 Parçacık Boyut Analizi	21
2.9.5 Tamoksifen Tutuklama ve Salımı için HPLC Analizleri.....	21
2.9.6 Hücre Kültürü Çalışmaları.....	22
2.9.7 Hücre Proliferasyon Analizi.....	22
2.9.8 Hücre Sayımı.....	23

2.9.9 İstatiksel Analiz.....	24
3. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	25
3.1 Aşırı Dallı Reçine Sentezi ve Karakterizasyonu.....	25
3.1.1 FTIR Spektroskopisi Sonuçları.....	25
3.1.2 Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi.....	26
3.1.3 Nükleer Manyetik Rezonans Sonuçları.....	27
3.2 Tamoksifen'in ADR'ye Yüklenmesi.....	29
3.3 ADR-Tamoksifen Nanoparçacıklarının FTIR Analizi.....	30
3.4 Parçacık Boyut Analizleri.....	32
3.5 Tamoksifen Salımı.....	33
3.6 ADR'nin Yıkım Çalışmaları.....	35
3.7 Sitotoksite Analizleri.....	36
3.7.1 ADR Nanoparçacıkların MCF-7 Hücre Hatlarına Uygulanması.....	36
3.7.2 ADR Nanoparçacıkların RPMI-8226 ve U-266 Hücre Hatlarına Uygulanması.....	40
4. SONUÇ.....	41
5. REFERANSLAR.....	42

TABLO LİSTELERİ

Tablo 3.1. ADR'nin saflaştırılmadan önce ve sonra yapılan büyüklükçe ayırma kromatografisi.....	27
Tablo 3.2. ADR ve farklı miktarlarda tamoksifen yüklenmiş ADR'nin parçacık boyutu sonuçları.....	32
Tablo 3.3. ADR-Tamoksifen ve Tamoksifenin 48, 72, 96 saat inkübasyon sonunda belirlenen IC ₅₀ değerleri.....	38

ŞEKİL LİSTELERİ

Şekil 1.1. Kontrollü ilaç salımında kullanılan nanoparçacık türleri.....	10
Şekil 1.2. Makromolekül sınıfları.....	11
Şekil 1.3. AB _x tipi monomer kullanılarak gerçekleştirilen aşırı dallı polimer sentezi.....	12
Şekil 1.4. Risinoleik asitin kimyasal yapısı.....	13
Şekil 1.5. Tamoksifenin kimyasal yapısı.....	14
Şekil 2.1. Aşırı dallı reçine sentezi için kullanılan deneysel düzenek.....	16
Şekil 2.2. Tek kademeli aşırı dallı polyesterin oluşumu.....	17
Şekil 2.3. İki kademeli aşırı dallı polyesterin oluşumu.....	18
Şekil 2.4. Yağ asitlerinin ADP ile esterleşmesi sonucu oluşan ADR'nin teoriksel şeması.....	19
Şekil 2.5. HPLC yöntemi kullanılarak belirlenen tamoksifen kalibrasyon grafiği.....	22
Şekil 3.1. Hint yağı asitlerinin FTIR spektrometrik sonuçları.....	25
Şekil 3.2. Aşırı Dallı Polyester ve Aşırı Dallı Reçine FTIR spektrometresi sonuçları.....	26
Şekil 3.3. (a) ADR yapısının sahip olduğu karbon atomları (b) ADR'nin ¹³ C NMR'daki kayma değerleri.....	28
Şekil 3.4. Tamoksifenin ADR nanoparçacıklarına tutuklanma yüzdesi.....	29
Şekil 3.5. ADR ve tamoksifen yüklenmiş ADR nanoparçacıklarının FTIR sonuçları.....	31
Şekil 3.6. 2,66 µg/mg ve 8 µg/mg tamoksifen yüklenmiş ADR'nin ve boş ADR'nin parçacık boyut şeması.....	33
Şekil 3.7. Tamoksifenin ADR'den salımı. Salım çalışmaları forfat tamponuna (0,01M, pH 7,4) % 5 DMF eklenerek gerçekleştirilmiştir.....	34
Şekil 3.8. 2,66 µg/mg ve 8 µg/mg yüklenmiş tamoksifenin toplam salım profilleri.....	35
Şekil 3.9. ADR'nin 0,01 M Fosfat tampon solüsyonu (FTS) ve %2 Lipaz eklenmiş fosfat tampon solüsyonunda moleküler ağırlık değişimi.....	36
Şekil 3.10. ADR, ADR-Tamoksifen nanoparçacıklarının MCF-7 hücre hatlarına 96 saat uygulandıktan sonra belirlenen hücre proliferasyon değerleri.....	37
Şekil 3.11. ADR-Tamoksifen ve Tamoksifen nanoparçacıklarının MCF-7 hücre hatlarına 48, 72 ve 96 saat uygulandıktan sonra belirlenen hücre proliferasyon değerleri.....	39

ÖZET

Günümüzde uygulanan kanser kemoterapisinin tümörlü hücelere yeterli etkiyi gösterememesi ve uygulanan ilaçların yarattığı yan etkiler nedeniyle, son yıllarda bu sorunların giderilmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Yapılan bu araştırmaların temel prensibi, ilacın kanser hücresine hedeflenerek doğru zaman ve miktarda kontrollü olarak uygulanmasıdır. Polimerler ilaç salımı çalışmalarında en çok tercih edilen biyomateryaller arasındadır. Dendritik polimerler de sahip olduğu özellikler sayesinde son yıllarda ilaç salımı çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Aşırı dallı yapısı, aktif uç molekülleri, fiziksel ve kimyasal özelliklerinin kontrol edilebilmesi sayesinde dendritik polimerler sadece ilaç salımında değil pek çok alanda da avantaj sağlamaktadırlar.

Bu çalışmada öncelikle yeni aşırı dallı reçine (ADR) sentezlenmiş ve elde edilen polimerik nanoparçacıkların özellikleri belirlenmiştir; sonrasında ise nanoparçacıklara tamoksifen yükleme ve ilaç salım çalışmaları yapılmıştır. %73 oranında tutuklanan tamoksifenin ADR'de neden olduğu parçacık boyutu değişimi ve ADR'nin tamoksifenle olan etkileşimi incelenmiştir. İlaç salım çalışmalarında *Pseudomonas sp.* lipazı ve sodyum dodesil sülfat (SDS) kullanılmış ve salım hızında artış belirlenmiştir. Lipazın ADR'nin yıkımı üzerindeki etkileri de incelenmiş ve enzim kullanıldığında ADR'nin yıkım hızının oldukça arttığı belirlenmiştir. Tamoksifen tutuklanmış ADR'nin tek sıralı yapışkan meme kanseri (MCF-7) ve multipl myelom süspansiyon (RPMI-8226, U-266) hücre hatları üzerindeki etkinliği belirlenmiştir. ADR'ye yüklenmiş tamoksifenin MCF-7 üzerinde çok daha etkili olduğu belirlenirken RPMI-8226 ve U-266 hücrelerinin üremelerinde herhangi bir değişim tespit edilememiştir. ADR'ye yüklenmiş tamoksifenin, serbest tamoksifene göre 48, 72 ve 96 saat inkübasyon süresinde sırasıyla 108, 100 ve 29 kat daha toksik olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak hazırlanan nanoparçacıkların ilaç salımındaki etkinliği ilk kez gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar klinik alanda yapılacak çalışmalara da ışık tutacaktır.

Anahtar Kelimeler: Kontrollü ilaç salımı, aşırı dallı reçine, nanoparçacık, tamoksifen.

ABSTRACT

Current methods of chemotherapy require novel drug delivery systems due to leading serious side effects and inefficiency of drug administration. In recent years many studies are developed to apply the drug at right time and to target tissues by sustained release system. Polymers are one of the mostly used biomaterials in drug delivery. Particularly dendritic polymers are preferred due to its several advantages. Highly branched structure, multiple sites of attachment, well-defined size and controllable physical-chemical properties make these biomaterials advantageous not only in drug delivery studies, but also in various fields.

In this study hyperbranched resin nanoparticles (HBR) were firstly synthesized and characterized then they were used for tamoxifen loading and delivery. Tamoxifen were loaded by 73% of efficiency and particle size changes and drug polymer interactions were investigated. Lipase from *Pseudomonas sp.* and sodium dodecyl sulfate (SDS) was used in drug delivery conditions and they significantly increased tamoxifen release rate. Molecular weight changes of HBR showed that lipase has a significant effect on HBR degradation. Tamoxifen loaded HBR were applied on monolayer breast cancer (MCF-7) and multiple myeloma suspension (RPMI-8266 and U-266) cells. Loaded tamoxifen showed effective anti-proliferative activity on MCF-7 cells while the effect was not significant on viability of RPMI-8266 and U-266 cells. Tamoxifen loaded HBR were 108, 100 and 29 fold more efficient relative to free tamoxifen after 48, 72 and 96 hours of incubation respectively. As a result, the efficiency of the HBR nanoparticles in drug delivery was shown. These types of carriers may be useful in future studies for clinical applications.

Keywords: Controlled drug delivery, hyperbranched resin, nanoparticle, tamoxifen

1. GİRİŞ

1.1 Kontrollü İlaç Salım Teknolojisi

Kemoterapinin temel amacı, tümör hücrelerinin hedeflenerek öldürülmesi ve sağlam dokuların zarar görmemesi olmalıdır. Ancak kullanılmakta olan kemoterapötik ajanlar birçok yan etkiyi de beraberinde getirmektedir (ORIVE, 2005). Bazı durumlarda vücutta aşırı toksik etki yaratması ve sağlam dokuların ölümüne neden olmasıyla kemoterapötik ajanlar, hastaların sağlığını tehdit eder hale gelmiştir. Bunun yanı sıra, metabolizma yoluyla ilaçların hızlı atılımı, vücutta istenilen doz oranının çok kısa süre tutulabilmesine yol açmaktadır (ALLEN, 2004) .

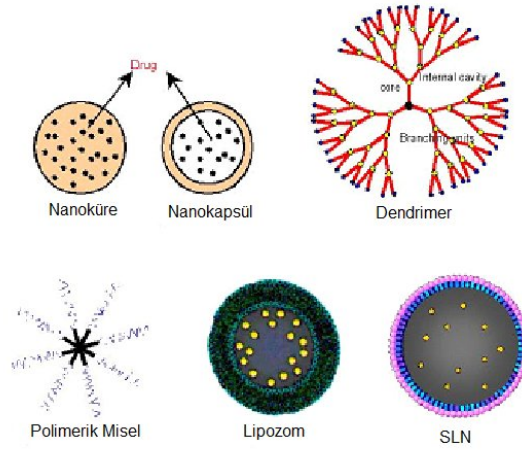
Kemoterapötik ajanların etkinliğini artırabilmek ve yan etkilerini azaltabilmek amacıyla ilaç salımı sistemlerinde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir (PILLIAI, 2001). Kontrollü ilaç salım sistemi ile toksik ilaçların sağlam dokulara ulaşması büyük ölçüde engellenir ve bu sayede klasik yöntemlerin neden olduğu yan etkilerde ciddi azalma görülür. Bunun yanı sıra bu sistemler sayesinde ilaç, tümör dokusuna ulaşana kadar korunur ve fizyolojik ortamda erken bozunması önlenir. Ayrıca ilacın vücuttan hızla atılma eğilimi kontrollü salım sistemleri kullanılarak önlenebilir, bu sayede ilacın vücutta belirli süre tutulabilmesi için yüksek doz uygulanmasına gerek kalmaz. Hedeflenen dokuya ulaşan ilaç miktarının düşük olması suboptimal terapötik etkilere de neden olabilir ve ilaç dirençliliği gelişebilir. İlaç salımı teknolojisinin bu tür sorunların çözümünde de kullanılması amaçlanmaktadır.

Bunun yanı sıra tümör dokularının diğer dokulara oranla damar yapısının yüksek geçirgenlik ve kalıcılık sağlayan etkisi (enhanced permeation retention effect) sayesinde salım sisteminde kullanılan ajanlar tümöre ulaşan ilaç konsantrasyonunun artmasını sağlar ve bir anlamda ilaç tümöre bu taşıyıcılar sayesinde doğal yollarla da hedeflenmiş olur (ALLEN, 2004).

1.2 İlaç Salım Sistemlerinde Kullanılan Yöntemler

İlaç salım sistemlerinde özellikle 1µm'den küçük olan nanoparçacıkların 1-1000 µm arasında olan mikroparçacıklara göre daha avantajlı olduğu gözlemlenmiştir (ORIVE, 2005). Nanoparçacıklar hücre içine alınma oranı daha fazladır ve böylece ilaç salım işlemi hücrenin farklı kısımlarında gerçekleştirilebilir. Bu tip parçacıklar aynı zamanda liganda daha etkili bağlanması sayesinde ilaç hedefleme yöntemlerinde de

kullanılabilirler (VOGLESON, 2001). Kullanılma yöntemlerine ve kullanılan biyomalzemeye göre ilaç salımı için kullanılan nanosistemler farklılık göstermektedir. Son yıllarda en çok çalışılmakta olan nanosistemlerden bazıları nanokapsüller, nanoküreler, misel, seramik nanoparçacıklar, lipozomlar ve dendiritik polimerlerdir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Kontrollü ilaç salımında kullanılan nanoparçacık türleri (ORIVE, 2005).

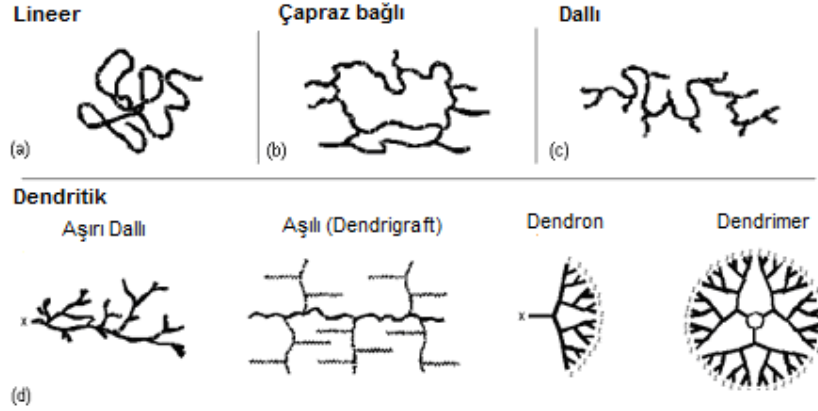
1.3 İlaç Salım Teknolojisinde Polimerik Sistemler

İlaç salım teknolojisinde en çok çalışılan ve en fazla avantaja sahip olan biyomalzemeler polimerlerdir. Polimerler, aynı yapıdaki küçük ve basit kimyasal birimlerin tekrarlanarak birleşmesiyle oluşan kompleks moleküllerdir. Polimeri oluşturan başlangıç molekülüne monomer adı verilir (PEPPAS, 2004; ORIVE, 2005). Polimerler lineer yapıda olup, çapraz bağlar kurarak ya da dallanarak üç boyutlu yapılarını oluştururlar. Polimerler moleküler ağırlığının, kimyasal yapısının, termal ve mekanik özelliklerinin kontrol edilebilmesiyle ilaç salım teknolojisiyle birlikte birçok farklı alanda da en çok tercih edilen yapılardır.

1.3.1 Dendiritik Polimerler

Dendiritik polimerler lineer, çapraz ve dallı polimer sınıflarından sonra gelen dördüncü sınıf makromoleküllerdir (KLAJNERT,2000) (Şekil 1.2). Dendiritik polimerler, aşırı dallı, aşılı, dendron ve dendrimer olarak dört alt gruba ayrılırlar (TOMALIA, 2002). Bu yapılar genel olarak çekirdek molekül ve dallanma birimlerinden oluşurlar. Dendrimerler monomerlerin eşit ve simetrik olarak dallanmasıyla oluşurken, aşırı dallı polimerler ise

simetrik olmayan ve düzensiz dallanarak oluşurlar. Bu iki yapı ilaç salımı, teşhis, görüntüleme gibi tıpta ve ilaç sektöründe çeşitli alanlarında kullanılmakta ve özellikle son yıllarda bu yapılar üzerine yapılan çalışmalar artmaktadır (FRECHET, 2003).



Şekil 1.2. Makromolekül sınıfları; lineer (a), çapraz bağlı (b), dallı (c), dendritik (d) (TOMALIA, 2002).

1.3.1.1 Dendritik Polimerlerin İlaç Salımında Kullanılması

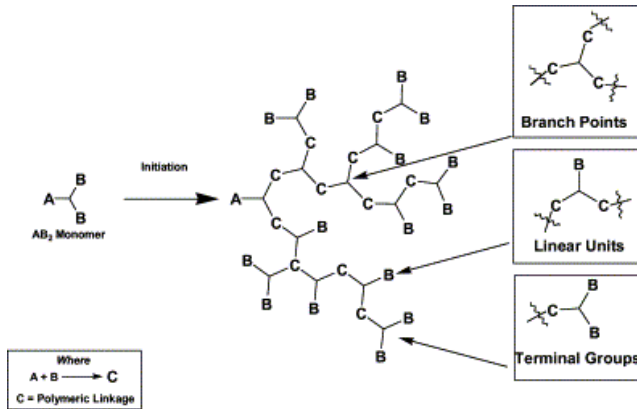
Dendritik polimer ve dendrimer sistemleri diğer ilaç salımı sistemleriyle karşılaştırıldığında birçok avantaja sahip oldukları görülür. Bunlardan en önemlisi aşırı dallı yapılarıyla aynı anda birçok ilacı tutuklayıp, hedefleyici gruplarına bağlanabilmesidir. Bununla birlikte dendritik polimerler ve dendrimerlerin moleküler ağırlığı, kimyasal ve fiziksel yapısı ve yapısal şekli diğer polimerlere oranla daha kolay kontrol edilebilmektedir (TWYMAN, 2004). Bunun dışında dendritik polimerler diğer küçük çaptaki parçacıklara oranla tümör dokusuna daha kolay ulaşım uzun süre kalabilirler.

Dendritik polimer türleri ilaca iki şekilde bağlanabilir. İlaç polimerle kovalent bağ oluşturmadan zayıf bağlarla dallar arasına tutuklanabilir. Bu tür tutuklama yönteminde ilacın polimerden kontrolsüz olarak salımını engellemek için çeşitli yardımcı biyolojik veya sentetik yapılar kullanılabilir. İkinci olarak ilaç polimerle kovalent bağ oluşturabilir. Bu tür bağlanma yöntemi ile ilacın çözünürlüğü artırılabilir ve ilacın neden olduğu toksik etki hedef dokuya ulaşmaya kadar azaltılabilir (GILLIES, 2005).

Tüm bu özellikleriyle dendrimerlerin ve dendritik polimerlerin yakın bir gelecekte ilaç salım teknolojisinde önemli bir rol oynayacağı şüphesizdir.

1.3.2 Aşırı Dallı Polimerlerin Sentezi ve İlaç Salımı Çalışmalarında Kullanılması

Aşırı dallı polimerler dendrimer sentezi ile karşılaştırıldığında çok daha kolay ve yüksek miktarda elde edilebilirler. Dendrimer sentezinde gerekli olan yoğun saflaştırma işlemleri aşırı dallı polimer sentezinde gerek olmadığından bu polimer türünün sentezlenmesi mali açıdan daha kolaydır. Tek aşamalı polimerizasyon tekniği ile AB_x tipi monomerler, katalizör kullanılarak ve sisteme yavaş eklenerek aşırı dallı polimeri oluşturabilirler (Şekil 1.3). Bu yöntemle sentezlenen polimerlerin moleküler ağırlık dağılımı daha düşüktür ve kontrol edilmesi de daha kolaydır (BHARATHI, 2000; ZAGAR, 2002; CHENG, 2003).



Şekil 1.3. AB_x tipi monomer kullanılarak gerçekleştirilen aşırı dallı polimer sentezi (JESSANI, 2004).

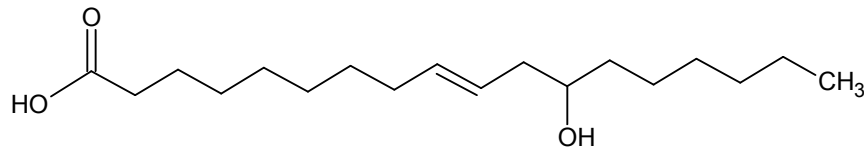
Farklı türde polimerler dallı olarak sentezlenebilir ve ilaç salımında kullanılabilirler. Poliester bu amaçla kullanılan polimer türlerinden biridir. Suda çözümleri ve biyolojik olarak daha fazla uyum sağlamaları nedeniyle tercih edilen polimerler arasındadır. Özellikle alifatik poliesterler farmakolojik olarak inaktif olması ve metabolizma yoluyla vücuttan atılabilmesiyle ilaç salım çalışmalarında önemli rol oynamaktadırlar (JESUS, 2002). Aşırı dallı alifatik polyesterler kullanarak çeşitli ilaç salım çalışmaları yapılmaktadır. Dimetilolpropiyonik asit ve polietilenoksinin esterleşmesiyle oluşturulan dallı polimerlerden doksorubisin salım çalışmaları, BoltornTM (H2O) dallı polimeri kullanılarak tasarlanan aşırı dallı polimerden daidzeinin kontrollü salımı bu tür çalışmalara örnektir (JESUS, 2002; ZOU, 2005).

1.4 Yağ Asitlerinin İlaç Salımında Kullanılması

Yağ asitleri özellikle suda çözünmeyen ilaçların kontrollü salımında kullanılmaktadırlar. Polimerlerle birlikte kullanıldığında, taşıyıcıların daha esnek olmasını ve erime sıcaklığının düşük olmasını sağlarlar, bu sayede bu yapılar vücuda enjekte edilebilir veya deri altından da uygulanabilir. Yağ asitleri polimerlerin hidrofobik özelliğini artırır, bu sayede suda çözünmeyen ilaçların tutuklanması ve daha uzun sürede kontrollü salımı sağlanır (SOKOLOSKY-PAPKOV, 2008).

1.4.1 Risinoleik asit

Risinoleik asit hint yağında %85-90 oranında bulunur ve hint yağından kolaylıkla elde edilebilir. Dokuzuncu karbonunda çift bağ, on ikinci karbonunda hidroksil grubu vardır ve bu fonksiyonel gruplar risinoleik asite ayrıcalık sağlar (JAIN, 2008). Risinoleik asitin kimyasal yapısı Şekil 1.4'te gösterilmektedir. Kozmetikte, kolonyada, losyonlarda ve banyo yağlarında da kullanılan risinoleik asit, son yıllarda ilaç salımı çalışmalarında da tercih edilmektedir. Örnek olarak, poli(sebasik asit-ko-risinoleik asit) kullanılarak yapılan bir çalışmada, anti-kanser ilaç olan paklitaksel uzun süreli ve kontrollü olarak salınmıştır (SHIKANOV, 2004). Risinoleik asit-laktik asit kopolimerlerinin kullanıldığı bir başka çalışmada ise uzun süreli ilaç salımı dışında polimerlerin biyoyıkım özellikleri de gösterilmiştir (SLIVNIAK, 2006).

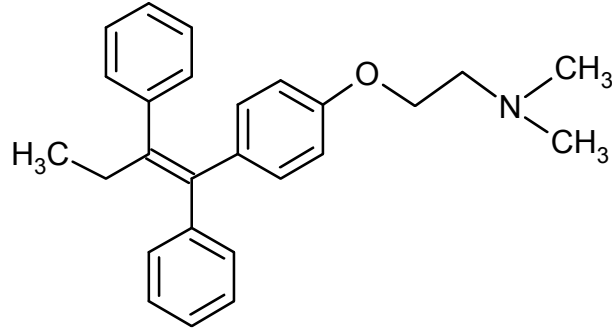


Şekil 1.4. Risinoleik asitin kimyasal yapısı.

1.5 Tamoksifen

Tamoksifen anti-östrojenik, hidrofobik yapıda bir kemoterapi ilacıdır (Şekil 1.5). Meme kanseri türlerinde etkili olduğu bilinmektedir, özellikle menapoz sonrası gelişen meme kanseri türlerinde kullanılmaktadır. Tamoksifen temel olarak meme kanseri türlerinde kullanılmasına rağmen östrojen reseptörleri bulunan çeşitli kanser türlerinde de etkili

olduğu bilinmektedir. Bu türlerden biri de multipl myelom kanser türüdür. Yapılan çalışmalarda tamoksifenin bu kanser türünde hücre poliferasyonunu azalttığı ve apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (FASSAS, 2001). Tamoksifen, uygulandığı kanser türlerinde etkili olmasına rağmen ilacın istenilen dokuda tutulamaması nedeniyle kanın pıhtılaşması gibi çeşitli yan etkilere neden olmakta, rahim dokusunun kansere dönüşme riskini artırmaktadır (SINGH, 2006). Tüm bu yan etkileri en aza indirebilmek için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Kontrollü ilaç salım sistemleri etkili sonuç verebilecek önemli çalışma alanları arasında yer almaktadır.



Şekil 1.5. Tamoksifenin kimyasal yapısı.

2. GEREÇLER VE YÖNTEM

2.1 Aşırı Dallı Polimer Sentezi için Gereçler

Hint yağı (Akzo Nobel Kemipol), sodyum hidroksit (NaOH), para-toluen sülfonik asit (p-TSA), potasyum hidrojen ftalat (KHP), sodyum klorür (NaCl) Merck A.G.'den (Almanya) sağlanmıştır. Sülfürik asit (95-98%), (H_2SO_4), magnezyum sülfat hepta hidrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) Sigma-Aldrich'den (ABD); dimetilol propiyonik asit, dipentaeritritol Perstorp AB'den (İsveç) sağlanmıştır. Toluen Best Kimya'dan, isopropil alkol Volkan Boya'dan, nitrojen gazı ise Oksan'dan temin edilmiştir.

2.2 İlaç Tutuklanması, Salım ve Hücre Kültürü Çalışmaları için Gereçler

Tamoksifen, fosfat tampon tuzu, N,N dimetilformamid, lipaz (Tip XIII, *Pseudomonas sp.*) Sigma-Aldrich'den (ABD); metanol, trietilen amin, asetonitril and orto-fosforik asit, trietilen amin Merck'den (Almanya); diyaliz tüpü (MwCo 3500, Çap 26mm) Serva'dan (Almanya) temin edilmiştir. Sodyum dodesil sülfat, Applichem'den (Almanya); RPMI 1640 besi ortamı [(1x), 2.0g/l $NaHCO_3$ sabit glutamin], fetal bovin serum Biochrom Ag.'den (Almanya); tripsin-EDTA solüsyonu (0.25% Trypsin&EDTA), gentamisin sülfat (50mg/ml), mavi trifan solüsyonu (0.5%), hücre proliferasyon kiti (XTT bazlı renk ölçme analizi) Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek'den (İsrail) temin edilmiştir.

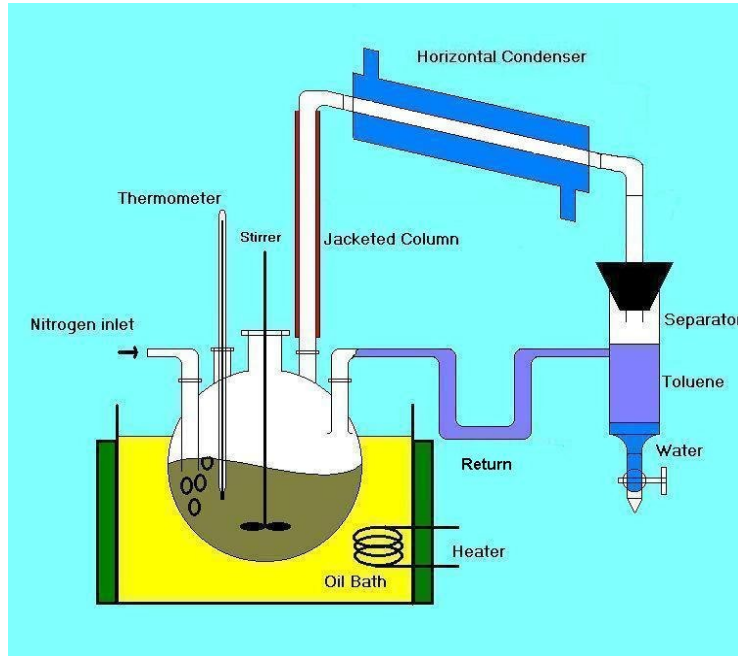
2.3 Hint Yağından Yağ Asidi Üretimi

Yağ asitlerinin hint yağından elde edilmesi için öncelikle sabunlaşma yöntemi kullanılmıştır. Sabunlaşma işlemi için 1:1 oranında hacimli damıtık su ve etanol karışımı oluşturulur. Tepkimenin başlaması için stokiyometrik miktarda sodyum hidroksit bu karışımda çözülmüştür. Ardından aynı hacimde hint yağı eklenmiş ve tepkime mekanik karıştırıcı, geri akışlı (refluks) sisteminde, 80°C'de başlatılmıştır. Tepkime sonunda gliserin ve yağ asitleri birbirinden ayrıştırılmıştır. Gliserin ve diğer inorganik maddeleri sistemden uzaklaştırmak için tepkime sonunda karışım sodyum klorür içeren suyla karıştırılmıştır. Bu yöntemle, üstte kalan sabun fazı alınıp önce suda çözülmüş, ardından saf yağ asidi elde edilebilmesi için ortama sülfürik asit eklenmiştir. Ayrıştırılan yağ asitleri birkaç kez saf suda yıkandıktan sonra santrifüj ve $MgSO_4$ yardımıyla sudan ve diğer inorganik maddelerden ayrıştırılmıştır.

Sonuç olarak risinoleik asit (%85-95), oleik asit (%2-6), linoleik asit (%1-5), linolenik asit, stearik asit ve palmitik asit (%0.5-1) içeren hint yağı asitleri elde edilmiştir. Yağ asitlerine 10°C sıcaklıkta ve 15-20 dakika boyunca santrifuj yapılmış, erime noktası farklılığı sayesinde stearik asit, palmitik asit ve oleik asit katılarak diğer yağ asitlerinden ayrıştırılmıştır. Kullanılmış olan bu yöntem sonucunda maliyeti düşük, bununla birlikte bol miktarda risinoleik asit hint yağından elde edilmiştir

2.4 Aşırı Dallı Polyester Sentezi

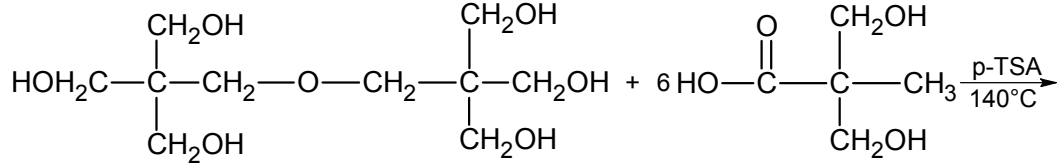
Çalışmada dipentaeritritol çekirdek molekül olarak kullanılmış ve bu molekülün altı hidroksil uç grubuyla esterleşmesini sağlayabilmek için ortama stokiyometrik miktarda dimetilolpropiyonik asit (DMPA) eklenmiştir. Para toluen sülfonik asit (p-TSA) katalizör olarak kullanılmıştır. Birinci aşamada 140°C'de azot atmosferi altında ve mekanik karıştırıcılı geri akışlı (reflusu) sistemde aşırı dallı polyester sentezlenmiştir. Deney düzeneği Şekil 2.1'da gösterilmektedir.



Şekil 2.1. Aşırı dallı reçine sentezi için kullanılan deneysel düzenek (BAT, 2005).

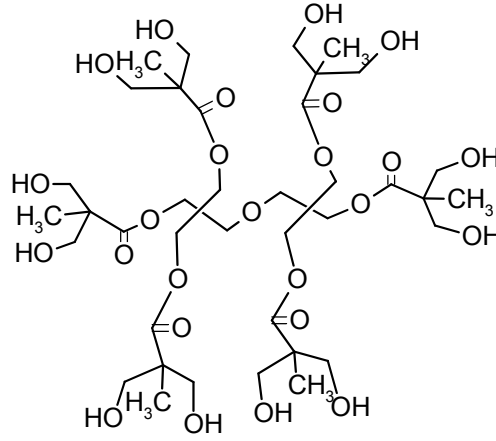
Tepkime sonucunda ortaya çıkan su, toluen kullanılarak azotropik damıtma ile uzaklaştırılmıştır. Ortama tekrar uygun miktarda DMPA eklendikten sonra tepkime aynı koşullarda tekrar başlatılmış ve bunun sonucu olarak da iki kademeli aşırı dallı

polyester'in (ADP) oluşumu sağlanmıştır. ADP yapısının oluşumu Şekil 2.2 'de ve Şekil 2.3'de gösterilmektedir.



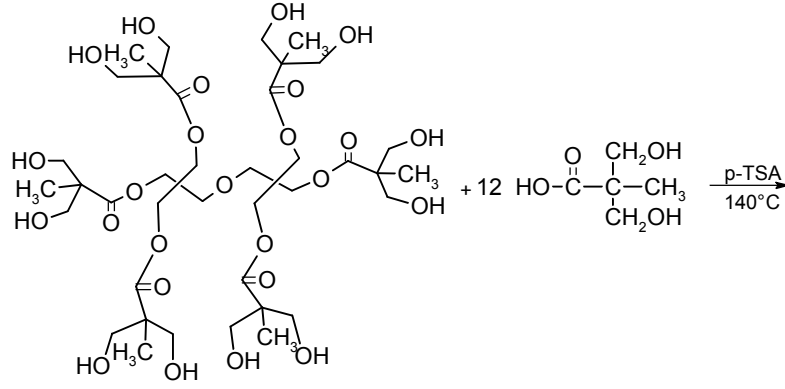
Dipentaeritritol

DMPA



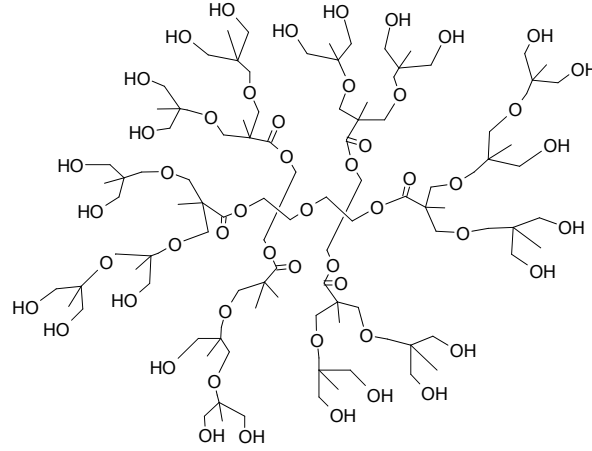
ADP (Tek Kademeli)

Şekil 2.2. Tek kademeli aşırı dallı polyesterin oluşumu şematik olarak gösterilmiştir.



ADP (Tek Kademeli)

DMPA



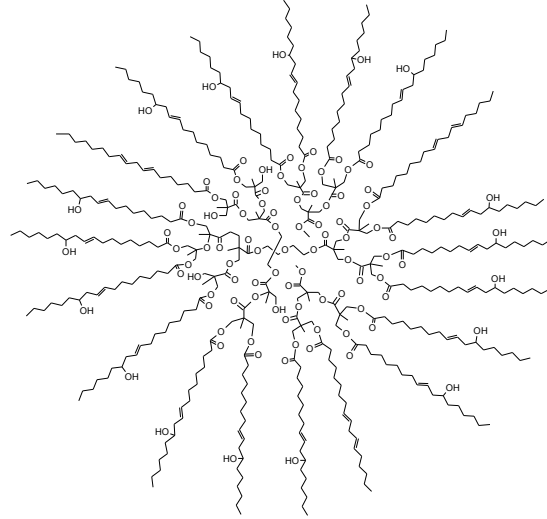
ADP (iki Kademeli)

Şekil 2.3. İki kademeli aşırı dallı polyesterin oluşumu şematik olarak gösterilmiştir.

2.5 Aşırı Dallı Reçine Üretimi

Hint yağı asitlerinin hidroksil grupları ile esterleşmesini sağlayabilmek için ADP'ye stokiyometrik miktarda yağ asidi eklenmiştir ve aynı katalizör kullanılarak, 220°C sıcaklıkta tepkime başlatılmıştır. Yağ asitleri esterleşmeye başladıktan sonra elde edilen aşırı dallı reçineden (ADR) örnekler alınarak asit sayısı saptanmış ve tepkimenin ilerleyişi izlenmiştir. Asit sayısı, potasyum hidroksitin ortamdaki yağ asitlerini nötrale etme ilkesine dayanır. İstenen asit

sayısı elde edildikten sonra sistem durdurulmuştur. Sentezlenen ADR'nin yapısı aşağıdaki şekilde verilmektedir (Şekil 2.4). ADR yapısına girmeyen dipentaeritritol ve DMPA ve yağ asitlerinin ortamdaki uzaklaştırılması amacıyla elde edilen yapı metanolle yıkanmıştır. Oluşan aşırı dallı reçine metanolde çökerken, çözünen diğer maddeler ortamdaki uzaklaştırılmıştır.



Şekil 2.4. Yağ asitlerinin ADP ile esterleşmesi sonucu oluşan ADR'nin teoriksel şeması.

2.6 Tamoksifenin ADR Nanoparçacıklarına Yüklenmesi

Tamoksifen N,N dimetilformamid'de (DMF) çözülmüş, ve belirli derişimde hazırlanan ilaç ADR nanoparçacıklarıyla karıştırılmıştır. Karışım oda sıcaklığında, gece boyunca, 300 rpm'de çalkalanmıştır. Bağlanmayan ilaçları sistemden uzaklaştırmak için karışım metanol içerisinde çözülmüş, daha sonra çözeltiye 15.000 rpm'de 30 dakika santrifüj yapılmıştır. Üst fazdaki sıvı, metanolde çözünen ve ADR'ye bağlanmayan tamoksifenden ve ADR'nin sentezi sırasında tepkimeye girmemiş moleküllerden oluşurken, çökelek ADR-tamoksifen parçacıkları içermektedir. Çökelti kurutulduktan sonra, tutuklama etkinliğinin belirlenebilmesi için DMF'de çözülmüş ve tutuklanan tamoksifen yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak belirlenmiştir. HPLC analiz koşulları 2.9.5'de detaylı olarak verilmektedir.

Örneklerdeki tamoksifen miktarı belirlendikten sonra tutuklama etkinliği aşağıdaki gibi hesaplanmıştır:

$$\text{Tutuklama Etkinliği (\%)} = \frac{\text{Tutuklanan İlaç Miktarı}}{\text{Yüklenen İlaç Miktarı}} \times 100 \quad (2.1)$$

2.7 Tamoksifen Salım Çalışmaları

Tamoksifen yüklenmiş ADR nanoparçacıkları DMF'de çözülmüş ve diyaliz tüplerine konulmuştur (MwCo: 3500). Salım, 0,01M pH 7,4 fosfat tamponunda gerçekleştirilmiştir. Tamoksifenin suda çözünmesini artırabilmek için, iki farklı yöntem denenmiştir. Birinci yöntemde fosfat tamponuna % 5 oranında DMF eklenmiş, ikinci yöntemde ise % 0,5 oranında sodyum dodesil sülfat (SDS) ve % 2 oranında *Pseudomonas sp.* lipazı eklenmiştir. İki farklı yöntem kullanılmasının nedeni, sonuçlar ve tartışma kısmında detaylı olarak açıklanmıştır. İki deney grubunda da örnekler, 37°C'de, 150 rpm'de çalkalanmıştır. Belirli aralıklarla salım ortamı yenilenmiş ve örneklerdeki tamoksifen miktarı HPLC ile ölçülmüştür.

2.8 ADR'nin Biyoyıkım Çalışmaları

ADR'nin yıkım hızının ve özelliğinin belirlenebilmesi için öncelikle belirli miktarlardaki ADR, 4 kuyulu petri kutulara konulmuş, üzerine 3 ml fosfat tamponu eklenmiştir (0,01 M pH 7,4). Örneklerin yarısına % 2 oranında lipaz eklenmiş ve 50 rpm'de, 37°C'de çalkalanmışlardır. Belirli aralıklarla ADR'den örnekler alınarak yüksek geçirgenlik kromatografında (GPC) moleküler ağırlık değişimi ölçülmüştür. Ölçümler sırasında tetrahidrofuran çözücü, polisitiren ise standart olarak kullanılmıştır. GPC ölçümleri ODTÜ Merkezi Laboratuvarları'nda ücret karşılığı gerçekleştirilmiştir.

2.9 Karakterizasyon Yöntemleri

Kimyasal karakterizasyon yöntemi için yapılan tüm analizler, ODTÜ Merkezi Laboratuvar, AR-GE Ölçme ve Eğitim Merkezi'nde yapılmıştır.

2.9.1 FTIR-Raman Spektroskopisi

Elde edilen yağ asitlerinin, aşırı dallı polyesterin ve aşırı dallı reçinenin kimyasal gruplarının belirlenebilmesi ve kimyasal etkileşiminin anlaşılabilmesi için FTIR spektrometresi kullanılmıştır. Bruker IFS 66/S, FRA 106/S, RAMANSCOPE cihazı analiz için kullanılmıştır. Katı örnekler KBr ile çökelek haline getirilmiştir (300 mg KBr için 1 mg örnek kullanılmıştır).

2.9.2 Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi

Sentezlenen maddenin moleküler ağırlığının belirlenmesi için kullanılmıştır. Sayıca-ortalama moleküler ağırlık (Mn), ağırlıkça ortalama moleküler ağırlık (Mw) değerleri ile yapının çoklu dağılım oranı (Poly dispersity index) belirlenmiştir. Örnekler tetrahidrofuran organik çözücüsünde çözülmüş, genel kalibrasyon yöntemi ile de PL-GPC 220 cihazı kullanılarak moleküler ağırlığı belirlenmiştir.

2.9.3 Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi

Aşırı dallı reçinenin sentezlenmesi için kullanılan moleküllerin ve aşırı dallı reçinenin kimyasal yapılarının anlaşılması, sentezle birlikte oluşan bağların tespit edilebilmesi için sıvı karbon ve proton NMR'si kullanılmıştır. Polimerler dötoro dimetil sülfoksit (DMSO) organik çözücüsünde çözülmüş, Bruker AVANCE 300 MHz (~7 Tesla) spektrofotometresi kullanılarak analiz yapılmıştır.

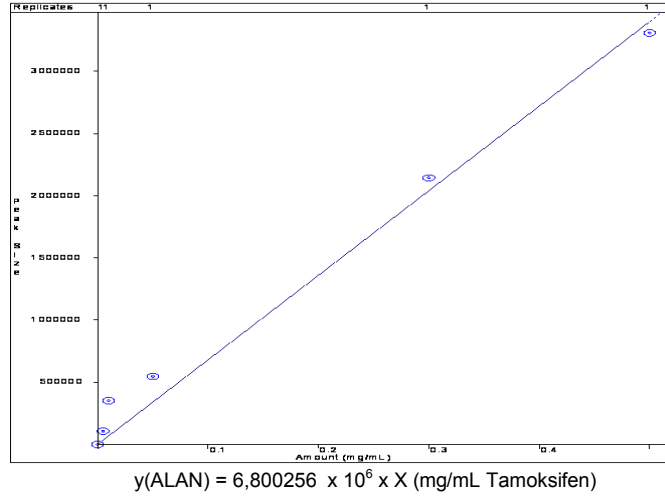
2.9.4 Parçacık Boyut Analizi

Bn analiz yöntemi ile ADR nanoparçacıklarının tamoksifen yüklenmesinden sonra boyutlarındaki değişim incelenmiştir. Dimetilformamid'de çözülen reçine suyla seyreltilmiş ve parçacık boyut analiz cihazı ile boyut dağılımı belirlenmiştir. Ölçümler 24°C'de Malvern Nano Zeta Size Nanoseries Nano-ZS cihazında gerçekleştirilmiştir.

2.9.5 Tamoksifen Tutuklama ve Salımı için HPLC Analizleri

Yüklenen ve salınan tamoksifen miktarını tespit edebilmek için Microsorb MV C18 (4,6x 250mm, 5mm) kolonu kullanılmıştır. Mobil faz için metanol: su: trietilamin (93:7:0,01) karışımı kullanılmıştır. 1 ml/min akış hızında, oda sıcaklığında ve

tamoksifenin ışığa hassas olması nedeni ile ışısız ortamda çalışılmıştır. Florasan dedektör kullanılarak $\lambda_{ems} = 375 \text{ nm}$ $\lambda_{exc} = 260 \text{ nm}$ dalga boylarında derişimleri belirlenmiştir (LONG, 2004). Ortamda bulunan tamoksifen miktarını belirlemek için öncelikle kalibrasyon grafiği oluşturulmuş, ardından bu grafik kullanılarak derişim değerleri belirlenmiştir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. HPLC yöntemi kullanılarak belirlenen tamoksifen kalibrasyon grafiği.

2.9.6 Hücre Kültürü Çalışmaları

Meme kanseri (MCF-7) ve multipl myelom (RPMI-8226, U-266) hücre hatları için RPMI-1640 besi ortamı kullanılmıştır. Hücrelerin üreme miktarı % 80-90 olduğunda besi ortamı yenilenmiş ve hücreler pasajlanmıştır. MCF-7 hücrelerini 75cm²lik hücre kabından ayırştırmak için tripsin-EDTA enzimi uygulanmıştır. Birbirinden ayrılan hücrelerin bir kısmı atılmış ve yerine taze besi ortamı eklenmiştir. RPMI-8226 ve U-266 hücre hatlarının yapışma özelliği olmadığından hücre sayısı arttığında hücrelerin bir kısmı doğrudan atılmış ve yeni besi ortamı eklenmiştir. Hücreler nemli % 5'lik CO₂ inkübatöründe üretilmiştir.

2.9.7 Hücre Proliferasyon Analizi

Hücre proliferasyon analizi, formazan bileşeni kullanarak yaşayan hücrelerdeki mitokondri enzim aktivitesine göre belirlenir. XTT seti, bu yaşayan hücrelerin tetrazolyum bileşeninin turuncu formazan tuzuna dönüştürülmesinde kullanılır. Oluşan

renk değişimi belirli dalgaboyunda spektrofotometre kullanılarak ölçülür. Yaşayan hücre miktarı ne kadar fazla olursa renk değişimi, dolayısıyla spektrofotometrede okunan değer o kadar fazla olur (BIOLOGICAL INDUSTRIES, 2002).

Çalışmada kullanılan yöntemde 96 kuyulu plakalar kullanılmıştır. Öncelikle 100 µl RPMI-1640 besi ortamı tüm kuyulara eklenmiş sonrasında yüksek konsantrasyondaki polimer ilk kuyuya eklendikten sonra ve sırasıyla yatay yönde seri seyreltme yapılmıştır. Polimer çözeltisi öncelikle ideal miktardaki DMSO'da çözünmüş ardından RPMI besi oramı ile seyreltilmiştir. En son olarak her kuyuya MCF-7 hücrelerinden 5000, RPMI-8226 ve U-266 hücrelerinden 10000 adet ekilmiştir. Yaşayan hücrelerin sayım yöntemi bir sonraki bölümde açıklanmıştır. Hücrelerin ekilmesinin ardından plakalar 37°C'de 48, 72 ve 96 saat boyunca CO₂ inkübatöründe bekletilmişlerdir. İnkübasyon sonunda XTT ve aktivatör solusyonları her bir plakaya uygulandıktan sonra karanlıkta 2-5 saat arasında plakalar inkübatörde bekletilmişlerdir. En son aşamada ise oluşan renk değişimi SPECTRAmax 340PC ELISA okuyucusunda 500 nm'de okunmuştur. Renk değişimi okuma işlemi ODTÜ Merkezi Laboratuvarları'nda ücret karşılığı yapılmıştır.

Hücre proliferasyon eğrileri kontrol grupları dikkate alınarak belirlenmiştir. Toksikite etkileri ise hücrelerin yarısını öldürebilmek için yeterli olan doz (IC₅₀) hesaplanarak belirlenmiştir. IC₅₀ değerleri, hücre üreme eğrilerinin logaritmik denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır.

2.9.8 Hücre Sayımı

Hücre sayımı için öncelikle MCF-7 hücreleri tripsin ile kaldırılıp taze besi ortamında homojen olarak dağıtıldıktan sonra sayılmıştır. RPMI-8226 ve U-266 hücreleri ise doğrudan sayılmıştır. Mavi trifan solüsyonu ile belirli miktardaki hücreler 10 kere seyreltilmiş ve toplam 1 ml olan karışımdan örnek alınarak ışık mikroskopunda hemositometre yardımı ile sayılmıştır. 1 ml'de bulunan hücre aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır. 4×10^6 sayısı hemositometrenin hacmi dikate alınarak hesaplanan katsayıdır.

Hücre sayısı/ml= Karede bulunan ortalama hücre sayısı x Seyreltme faktörü x $4 \cdot 10^6$
(2.2)

2.9.9 İstatiksel Analiz

“Minitab Statistical Software, 2-sample t-test ” (Minitab Inc, ABD) istatiksel hesaplamalar için kullanılmıştır ($\alpha= 0.05$).

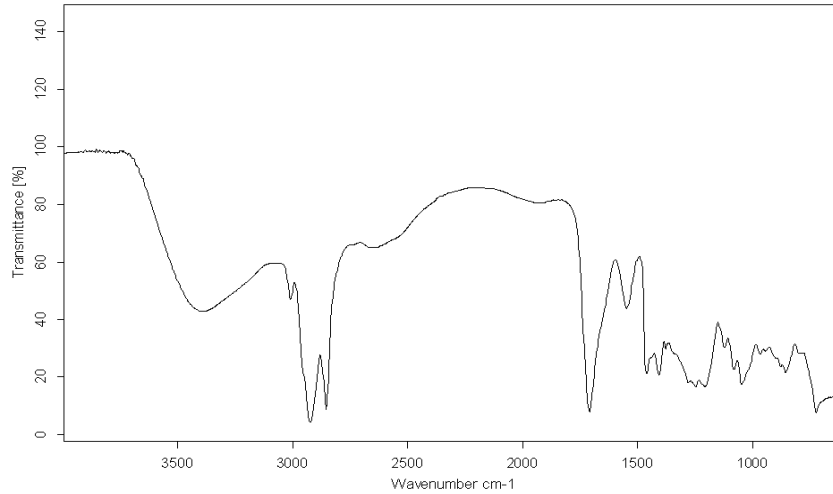
3. BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1 Aşırı Dallı Reçine Sentezi ve Karakterizasyonu

ADR yapısının hidrofobik ilaçları verimli şekilde tutuklayabilmesi için hidrofobik özelliğinin olması gerekmektedir; ancak su bazlı ortamda salım çalışmalarının yapılabilmesi ve *in-vitro* koşullarda hücre hatları üzerinde uygulanabilmesi için orta düzeyde bir hidrofobik yapı tercih edilmiştir. Bu nedenle ADR sentezi asit sayısı 38.8 olduğunda durdurulmuştur.

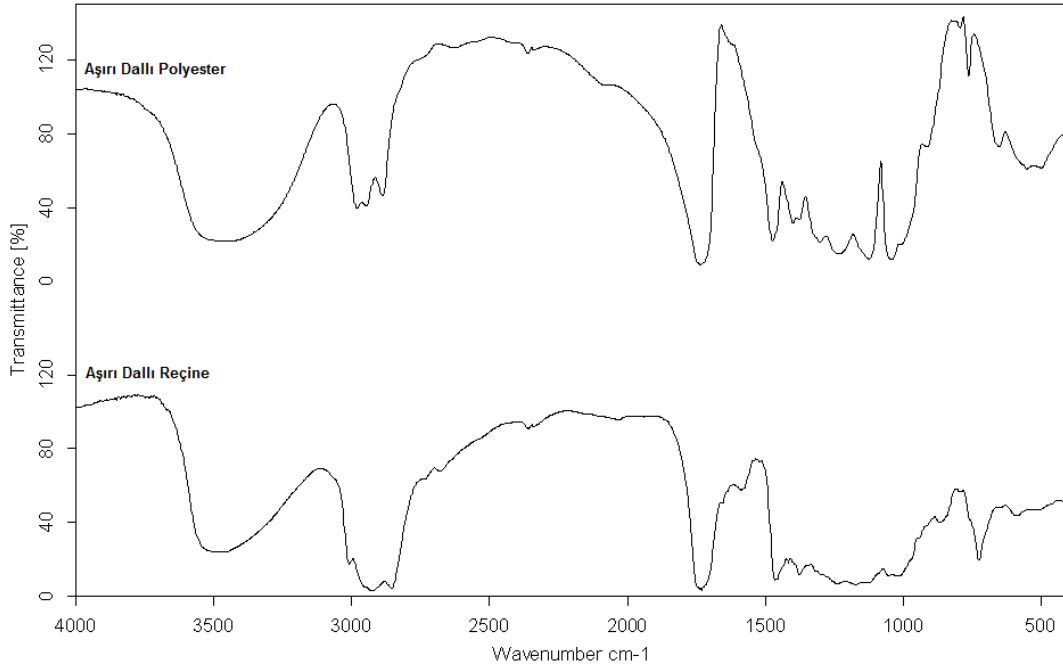
3.1.1 FTIR Spektroskopisi Sonuçları

Hint yağından elde edilen yağ asitlerinin FTIR sonuçları Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Risinoleik asitin on ikinci karbonunda bulunan hidroksil grupları 3400 cm^{-1} 'de soğurma değeri vermiştir. Doymamış yağların olefinik C-H bağları 3016 cm^{-1} 'de değer verirken, alifatik C-H gerilmesi ise 2928 cm^{-1} ve 2856 cm^{-1} noktalarında belirgin tepe noktaları vermektedir. 1713 cm^{-1} tepe noktası yağ asitlerinin karboksil uç gruplarını göstermektedir. 1464 cm^{-1} noktası metilen grubunu, 724 cm^{-1} deki tepe noktası ise yağ asidi zincirinde bulunan metilen birikimini göstermektedir.



Şekil 3.1. Hint yağ asitlerinin FTIR spektrometrik sonuçları

Şekil 3.2, aşırı dallı polyester (ADP) ve aşırı dallı reçinenin (ADR) FTIR sonuçlarını göstermektedir. Dipentaeritritolün ve DMPA'nın reaksiyona girmesiyle yapıda oluşan ester fonksiyonel grupları 1740 cm^{-1} değerinde belirgin tepe noktası vermiştir. Eter grupları ise 1131 cm^{-1} noktasında tepe noktası vermiştir. ADR'nin FTIR sonuçlarında aşırı dallı polyester'de de gözlemlendiği gibi 3500 cm^{-1} tepe noktasın hidroksil gruplarına denk gelmektedir. Bu noktada hem bağlanan risinoleik asitlerin hem de yağ asitlerinin bağlanamadığı taraflardaki hidroksil grupları tepe noktası vermiştir. Yağ asitlerinin olefinik C-H gerilmesi 3015 cm^{-1} noktasında gözlemlenmiştir. 1740 cm^{-1} fonksiyonel ester gruplarını, 1245 cm^{-1} noktası ise alifatik polysterde bulunan O=C-O-C gerilmesini göstermektedir. Yağ asitlerinin metilen zincirleri ise 725 cm^{-1} noktasında gözlemlenmiştir.



Şekil 3.2. Aşırı dallı polyester ve aşırı dallı reçine FTIR spektrometresi sonuçları

3.1.2 Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

Saflaştırılmış ve saflaştırılmamış ADR örneklerinin moleküler ağılık dağılımı Tablo 3.1'de verilmiştir. Sistemde tepkimeye girmeyen moleküllerin moleküler ağırlığının düşük olması nedeni ile moleküler ağılık dağılımını fazlaca etkilemesi beklenmemektedir. Tablo 1 'de de görüldüğü gibi ADR 'nin saflaştırılmasından önce ve sonra elde edilen sonuçlar arasında belirgin bir fark bulunmamaktadır. Molekül ağılık

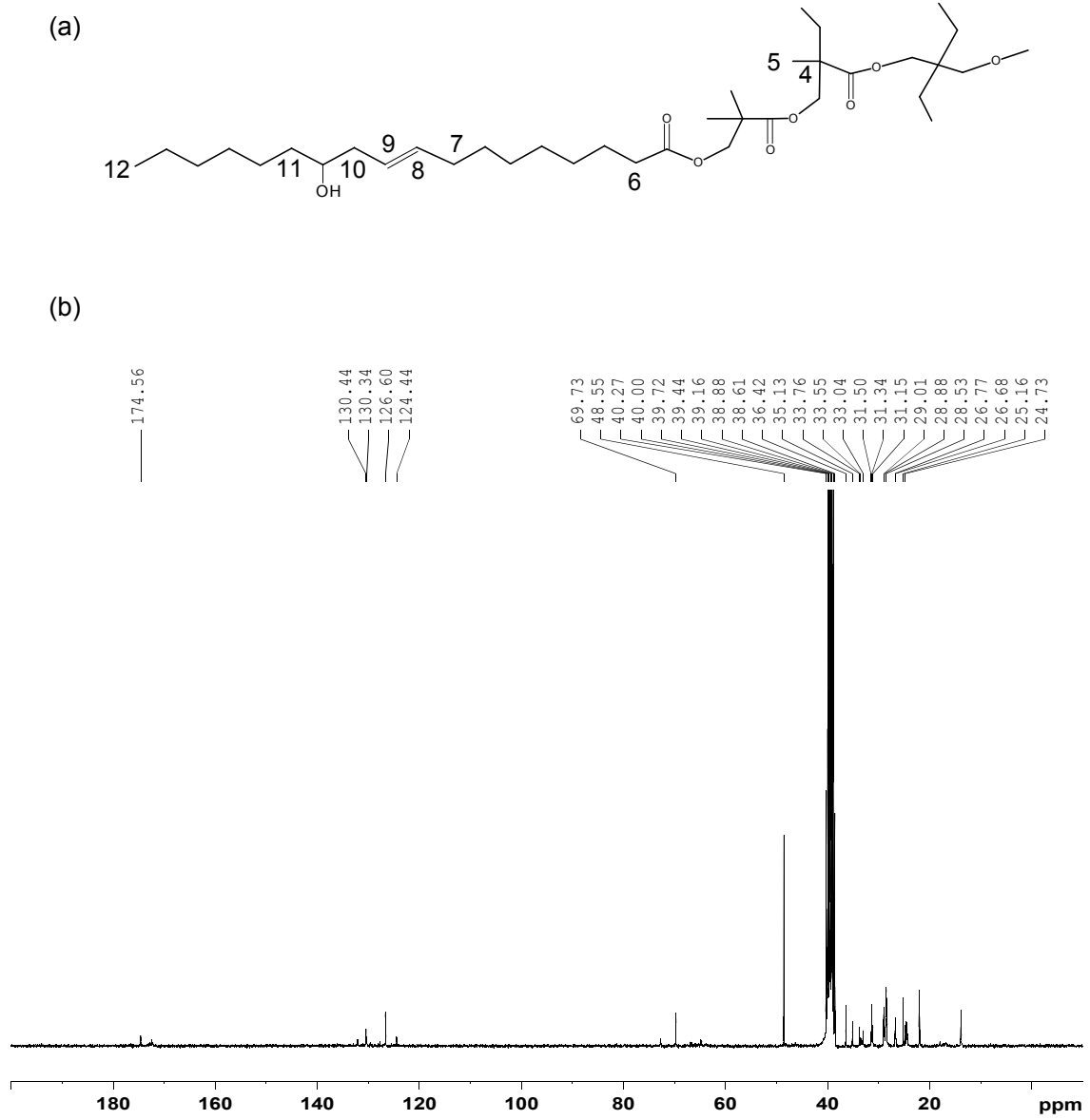
dağılım oranı iki koşulda da benzer değerler vermektedir. Ayrıca bu değer 2'ye yakın olması da yoğunlaşma polimerizasyonu için beklenen bir değerdir.

Tablo 3.1. ADR'nin saflaştırılmadan önce ve sonra yapılan büyüklükçe ayırma kromatografisi sonuçları (Ortalama \pm Standard tahmin hatası (STH), n=2).

	<u>Mn (g/mol)</u>	<u>Mw (g/mol)</u>	<u>Mn/Mw</u> (Çoklu dağılım)
<u>ADR</u>	8546 \pm 2400	21989 \pm 3901	2.58 \pm 0.056
<u>ADR (metanolle saflaştırılmış)</u>	10913 \pm 90	23099 \pm 3142.5	2.11 \pm 0.27

3.1.3 Nükleer Manyetik Rezonans Ölçümleri

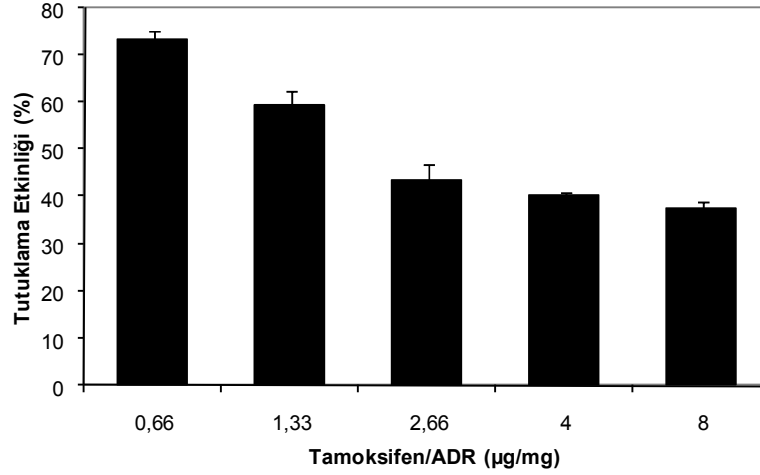
ADR nanoparçacığının sahip olduğu karakteristik karbon atomları Şekil 3.3a'da ADR'nin tek dalı üzerinde gösterilmiştir. Karbon atomları üzerinde verilen numaralar yapılan ^{13}C NMR analizinde elde edilen değerlere karşılık gelmektedir. 1 numara ile gösterilen dipentaeritritolün eter karbon atomları Şekil 3.3b'de 69.73 ppm'e karşılık gelmektedir. Ester karbon atomları ise Şekil 3.3a'da 2 numarayla gösterilmiş ve Şekil 3.3b'de 174.56 ppm'e karşılık gelmiştir. 3 ve 4 numaralı karbon atomları sırasıyla 31.34ppm ve 26.68 ppm tepe noktasına karşılık gelmiştir. Karboksil esterin yanında bulunan 6 numaralı karbon atomu ise 40.27 ppm'e karşılık gelmektedir. 'Cis' $-\text{CH}=\text{CH}-$ karbon atomları ve komşu karbon atomları Şekil 3.3a'da 7, 8 ve 9 olarak numaralandırılmıştır ve sırasıyla 48.55 ppm, 130.00 ppm ve 124.44 ppm'e karşılık gelmektedir. Hidroksil grubuna bağlı 12. karbon atomun yanında bulunan karbon atomları 40.00 and 38.61 ppm'e denk gelmiş ve 10 ve 11 olarak numaralandırılmıştır. Son olarak 5 ve 12 numaralı metil karbon atomları ^{13}C NMR analizinde 24.73 ppm ve 14.1ppm'e denk gelmektedir.



Şekil 3.3. (a) ADR yapısının sahip olduğu karbon atomları tek dal üzerinden gösterilmiştir ve (b) ADR'nin ^{13}C NMR'daki kayma değerleri gösterilmiştir.

3.2 Tamoksifen'in ADR'ye Yüklmesi

Çalışmalar sırasında ADR'yi saflaştırmak için kullanılan metanolün bağlanmayan tamoksifeni uzaklaştırmada da etkili olduğu belirlenmiştir. Tamoksifenin ADR'ye uygulanmasının ardından karışım 300 rpm'de oda sıcaklığında gece boyunca karıştırılmıştır. Karışım daha sonra metanol içinde çözülmüş, ADR nanoparçacıkları metanol içinde çökmeye başlarken, bağlanmayan tamoksifen ve ADR sentezi sırasında tepkimeye girmemiş moleküller metanolde çözülmüşlerdir. Santrifüjün ardından metanol uzaklaştırılmış, çöken ADR-tamoksifen yapısının tamoksifen yüzdesi belirlenmiştir.



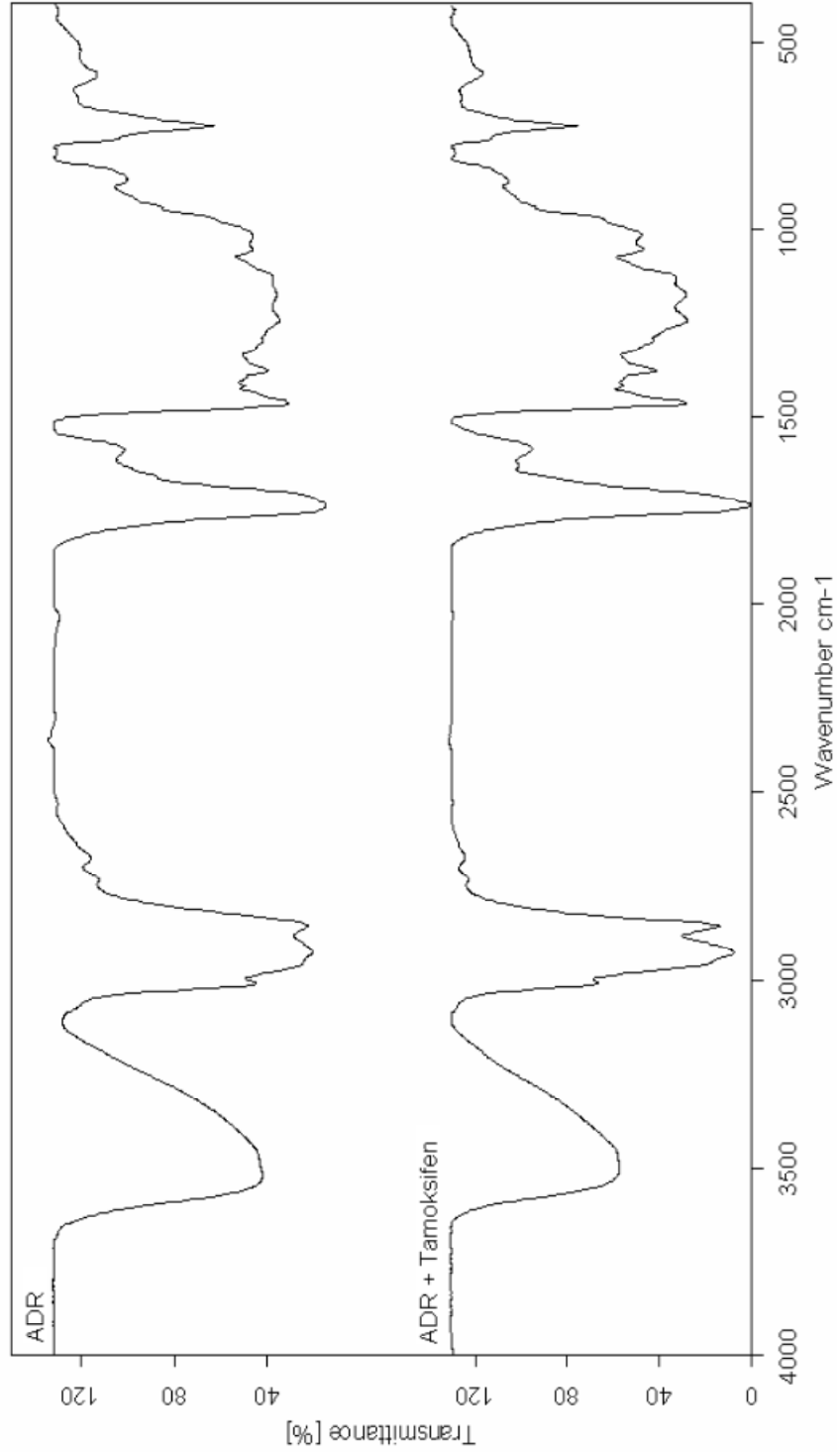
Şekil 3.4. Tamoksifenin ADR nanoparçacıklarına tutuklanma yüzdesi (µg tamoksifen/mg ADR)

ADR nanoparçacıklarının yüklenme etkinliğinin belirlenebilmesi için farklı oranlarda ADR ve tamoksifen kullanılmış ve tutuklama etkinlikleri HPLC yöntemi ile belirlenmiştir. Şekil 3.4, µg tamoksifenin mg ADR'ye yüklenme oranını göstermektedir. Şekilde belirtilen derişim değerleri ilk yüklenen ilaç miktarını göstermekte, yüzde grafikleri ise tutuklanan ilaç yüzdesini vermektedir. Yüzdeler genel olarak incelendiğinde tamoksifenin başarıyla ADR nanoparçacıklarına yüklendiği tespit edilmiştir. En fazla tutuklama oranı 0,66 µg/mg derişimi için % 73 olarak belirlenmiştir. Yüklenen ilaç miktarı arttıkça tutuklama veriminde düşüş tespit edilmiş ve en yüksek tamoksifen miktarında (8 µg/mg), % 45 tutuklama belirlenmiştir. Yüklenen miktar

arttıkça verimin düşmesinin nedeni nanoparçacığın doyum noktasına ulaşması ve ilacı daha fazla tutuklayamaması olabilir.

3.3 ADR-Tamoksifen Nanoparçacıklarının FTIR Analizi

Tutuklanan tamoksifenin ADR yapısında neden olduğu kimyasal değişiklikleri belirlemek için ilaç yüklenmiş parçacıkların FTIR spektrofotometresi ile analizleri yapılmıştır. ADR-tamoksifen FTIR sonuçları Şekil 3.5'de gösterilmektedir. İlaç yüklenmiş ve yüklenmemiş ADR'nin FTIR sonuçları karşılaştırıldığında tamoksifenin ADR yapısı üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir. Tamoksifen ADR'ye tutuklanmış olması durumunda ilacın kimyasal gruplarının FTIR ile gözlemlenmesi gerekirdi, ancak hiçbir yeni tepe noktası tespit edilmemiştir. Bu nedenle tamoksifenin ADR'ye kimyasal bağlarla değil, fiziksel olarak bağlandığı önermesi yapılabilir. FTIR sonuçlarında herhangi bir değişiklik olmaması tamoksifen miktarının az olması ve ADR'nin kimyasal gruplarının tamoksifenin kimyasal gruplarını maskeleyesinden kaynaklanabilir. Benzer sonuçlar çeşitli çalışmalarda da elde edilmiştir (TAYADE, 2004; VISHNU, 2007).



Şekil 3.5. ADR ve tamoksifen yüklenmiş ADR nanoparçacıklarının FTIR sonuçları.

3.4 Parçacık Boyut Analizleri

Parçacık boyut analizleri ilaç salım çalışmalarında önemli rol oynamaktadır. Elde edilen parçacığın tümör epitel bariyerlerinden geçebilecek büyüklükte olması gerekir. Parçacıklar için ideal boyut oranı < 500 nm olmalıdır (DONG, 2004; ZHANG, 2006).

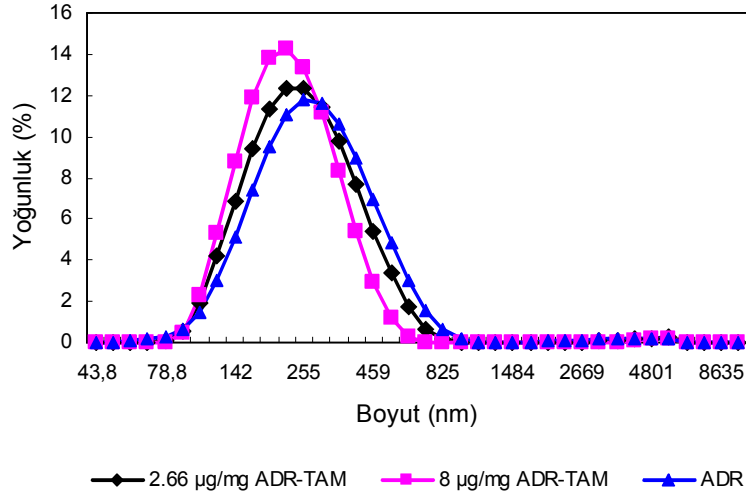
Tablo 3.2. ADR ve farklı miktarlarda tamoksifen yüklenmiş ADR'nin parçacık boyutu sonuçları.

Örnekler	μg tamoksifen /mg ADR	Tutuklanma oranı (%)	Parçacık Boyutu (nm)	Çoklu dağılım oranı
ADR	-	-	276,5 \pm 8,6	0,187 \pm 0,005
ADR-TAM	2,66	40 \pm 1,4	232,2 \pm 2,7	0,172 \pm 0,002
	8	37,5 \pm 1,7	206,9 \pm 0,01	0,142 \pm 0,012

Tamoksifen yüklenmiş ADR ve boş ADR nanoparçacıklarının parçacık boyut analizi Tablo 3.2 'de verilmiştir. Parçacıkların boyut dağılım şeması ise Şekil 3.6' da verilmiştir.

Tablo 3.2'de görüldüğü gibi boş ADR nanoparçacıklarının boyutu 276,5 nm olarak belirlenmiştir. DMF'de çözülmüş ADR parçacıklarında çok az bir miktar alınmış ve suda seyreltilmesinin ardından parçacık boyutu belirlenmiştir. Sonuçlar ADR parçacıklarının hidrofobik özelliği nedeni ile suda birleşmiş olabileceğini göstermektedir.

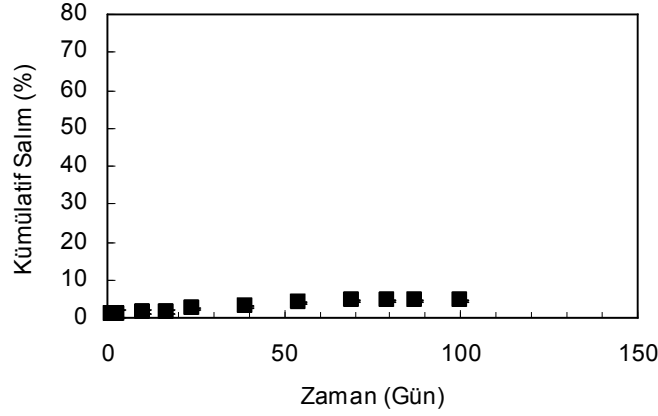
Tamoksifen ADR parçacıklarına yüklendikten sonra yapılan analizlerde parçacık boyutunda azalma belirlenmiştir. Özellikle tamoksifenin derişimi 2,66 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 'den 8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 'a çıktığında parçacık değeri 232 nm'den 207 nm'ye düşmüştür. ADR'nin yağ asidi zincirleri tamoksifeni tutuklarken parçacıkların çapı küçülmüş olabilir. Bu tür nanoparçacıkların sudaki çözünürlüğünün düşük olması ve hidrofobik ilaçlarla daha kuvvetli etkileşime girmesi farklı araştırmalarda da tespit edilmiştir (CHU, 2003; MAILLARD, 2005).



Şekil 3.6. 2,66 µg/mg ve 8 µg/mg tamoksifen yüklenmiş ADR'nin ve boş ADR'nin parçacık boyut şeması.

3.5 Tamoksifen Salımı

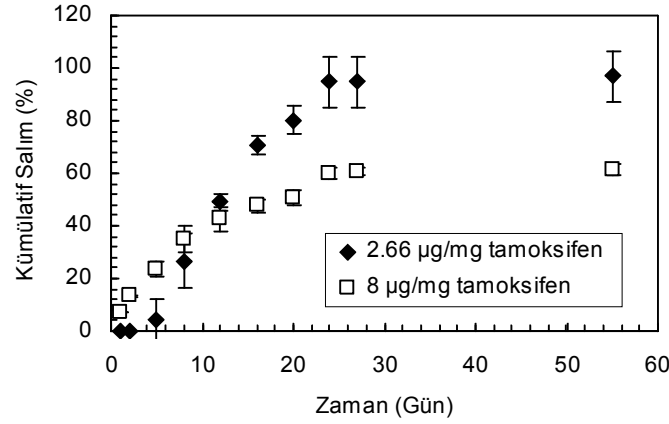
ADR nanoparçacıklarının ve tamoksifenin suda tamamen çözünmemesi nedeni ile salımı başlatabilmek için öncelikle tamoksifen yüklü ADR, DMF'de çözünmüş, ardından diyaliz keselerine aktarılmıştır. Salım için 2,66 µg/mg miktarında tamoksifen kullanılmıştır. Hidrofobik yapıdaki tamoksifenin sudaki çözünürlüğü azdır, bu nedenle salınan tamoksifenin çözünürlüğünün artırılabilmesi için ortama %5 oranında DMF eklenmiştir. Salım başladıktan sonra belirli aralıklarla salım ortamı yenilenmiş, salınan ilaç miktarları HPLC ölçümleri ile belirlenmiştir. Salım sonucu Şekil 3.7'de gösterilmektedir. Sonuçlar incelendiğinde tamoksifenin bu salım koşullarında çok yavaş salındığı tespit edilmiştir. 17 günün sonunda salımda bir artış gözlemlenmiştir. Salımdaki artış 69 günün sonunda sabitlenmiş ve toplam % 5 oranında salım tespit edilmiştir.



Şekil 3.7. Tamoksifenin ADR'den salımı. Salım çalışmaları fosfat tamponuna (0,01M, pH 7,4) % 5 DMF eklenerek gerçekleştirilmiştir.

Salımın yavaş ve çok yetersiz olması nedeni ile salım şartlarında değişiklik yapılmıştır. Öncelikle % 5 DMF tamoksifenin suda çözünmesini sağlamak için yeterli değildir, bu nedenle salınan ilaç diyaliz tüpüne veya deney kabının duvarına yapışmış olabilir. Literatürde tamoksifenin salımı için kullanılan sodyum dodesil sülfatın % 0,5 oranında eklenmesine karar verilmiştir. Ayrıca ADR'nin de suda tamamen çözünmemesi tamoksifenin salımını yavaşlatmış olabilir bu sorunun giderilebilmesi ve ADR'nin yıkımının arttırılabilmesi için *Pseudomonas sp.* lipazı salım ortamına % 2 oranında eklenmiştir. *Pseudomonas sp.* lipazı literatürde poliesterlerin ve polimerlerin ester bağlarının kırılmasında ve polimerlerin yıkım sürelerinin kısılmasında kullanılmaktadır (MIAO, 2005). Lipazın ADR nanoparçacıkları üzerindeki etkileri 3.6'da verilmiştir. 8 µg/mg ve 2,66 µg/mg yüklenmiş tamoksifenin bu koşullardaki salımı Şekil 3.8'de görülmektedir. Elde edilen sonuçlar ışığında lipazın ve SDS'nin tamoksifen salım hızını oldukça arttırdığını göstermiştir. 2,66 µg/mg'dan tutuklanan tamoksifenin beşinci günden itibaren salımı hızı artmaya başlamış ve salım oranı 55 gün için %87 olarak belirlenmiştir. 8 µg/mg'da tutuklanan tamoksifen ise 20 gün boyunca düzenli olarak salınmış ve toplam 55 gün içinde % 61 oranında salım görülmüştür. İki konsantrasyonun salım profilleri incelendiğinde yüklenen ilaç derişimi artırılınca salımda azalma olduğu görülmüştür. Literatürde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Skolosky-Popkov (SOKOLOSKY-PAPKOV, 2008), risinoleik asit bazlı polianhidrid kopolyesterlerden paklitaksel salımını incelemişler ve ilaç derişimi arttırıldığında salımda azalma tespit etmişlerdir. Bu azalmaya neden olarak hidrofobik ilacın miktarı

arttırıldığında suyun polimerler içine girme miktarının azalması, ve polimerin ilacı daha yavaş bırakması gösterilmektedir. Elde edilen bu sonuç bizim çalışmamız için de geçerli olabilir. Hidrofobik yapıdaki tamoksifen ve hidrofobik yapıdaki ADR nanoparçacıkları fosfat tamponunda daha güçlü etkileşime girmiş olabileceğinden ilaç miktarının artırılması salımı yavaşlatmış olabilir.



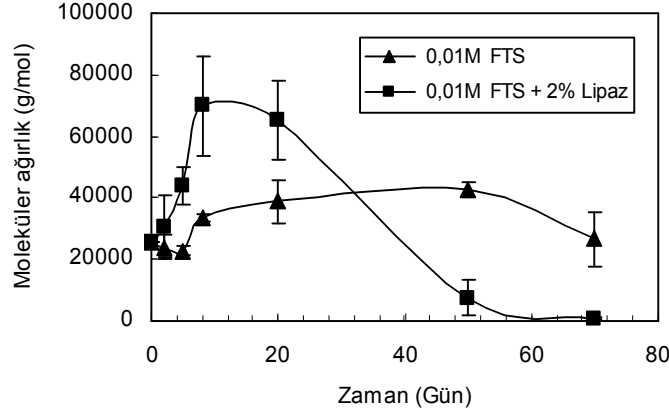
Şekil 3.8. 2,66 µg/mg ve 8 µg/mg yüklenmiş tamoksifenin toplam salım profilleri.

3.6 ADR'nin Yıkım Çalışmaları

İlaç salımı çalışmalarında polimerlerin biyoyıkım özelliğinin olması önemlidir. Çalışmanın bu aşamasında ADR nanoparçacıklarının fosfat tamponuna eklenen %2 (4mg/ml) lipazla moleküler ağırlığındaki değişimi incelenmiştir (Şekil 3.9).

İlk 10 gün ADR'nin enzimli ve enzimsiz ortamda moleküler ağırlığında artış belirlenmiştir. İlk aşamada hidrolizle ayrılan yağ asitleri, sonrasında ADR'nin hidrojen bağlarla birbirine bağlanmasına neden olmuş olabilir. ADR nanoparçacığındaki bu değişim parçacıkların birleşmesine ve moleküler ağırlığının artmasına neden olabilir (HECKER, 1998; CHAWLA, 2002). Lipaz yağ asitlerinin kırılmasını arttırmış olabileceğinden parçacıklar arasında oluşan bağlar enzimsiz ortama göre daha fazla olabilir, bu nedenle lipaz eklenmiş ortamda ilk aşamada moleküler ağırlık artışı daha fazla olmuş olabilir. Onuncu günden sonra lipaz varlığında nanoparçacıkların moleküler ağırlığında hızlı bir düşüş tespit edilmiş ve 70 gün içinde nanoparçacıklar tamamen yıkıma uğramıştır. Lipazın ADR nanoparçacığında neden olduğu değişim

parçacık analizi, ağırlık viskozite değişimi veya FTIR analizleri gibi analizlerle ileriki çalışmalarda daha detaylı olarak incelenebilir.



Şekil 3.9 ADR'nin 0,01 M Fosfat tampon solüsyonu (FTS) ve %2 Lipaz eklenmiş fosfat tampon solüsyonundaki moleküler ağırlık değişimi. Örnekler 37°C'de 50 rpm'de çalkalanmıştır.

3.7 Sitotoksosite Analizleri

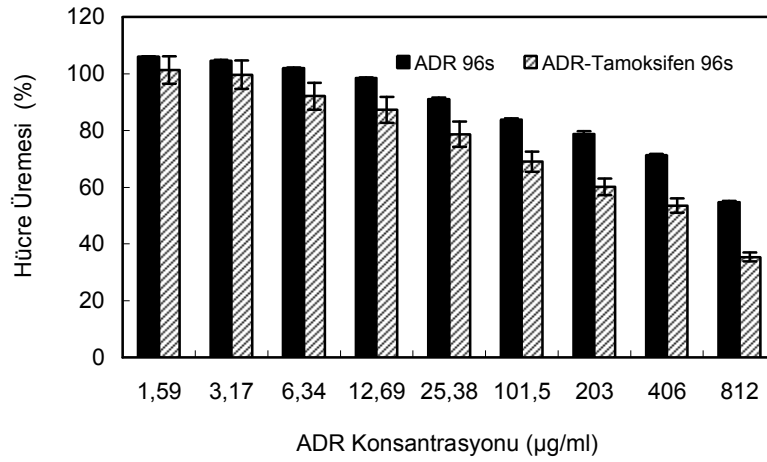
Bu çalışmada tasarladığımız ADR nanoparçacıklarının hücreler üzerinde etkinliğini belirleyebilmek için farklı özellikte hücre tipleri denenmiştir. Laboratuvarımızda mevcut olan multipl myelom RPMI-8226 ve U-266 süspansiyon hücre hatları ile meme kanseri MCF-7 tek sıralı yapışkan hücre hatları denenmiş ve ADR nanoparçacıkların hangi hücre hattında daha etkin olduğu tespit edilmiştir.

Sitotoksosite analizleri için kullanılması gereken ilaç ve ADR miktarı ADR'nin suda çözünmesi ve tamoksifeni tutuklama miktarları göz önünde bulundurularak hesaplanmıştır. ADR'nin suda çözünmesini sağlayabilmek için nanoparçacıklar öncelikle DMSO'da çözülmüştür. Hücrelere zarar vermeyecek ideal DMSO miktarı %10 (v/v) olarak belirlenmiştir.

3.7.1 ADR Nanoparçacıkların MCF-7 Hücre Hatlarına Uygulanması

İlaç yüklenmemiş ADR nanoparçacıklarının hücreler üzerindeki toksik etkisi tespit edilmiştir. 1,59 µg/ml ile 812 µg/ml derişim aralığında ADR hücreler üzerine 96 saat

süre ile uygulanmıştır. Şekil 3.10 ilaç yüklenmemiş ve ilaç yüklenmiş ADR nanoparçacıklarının hücreler üzerindeki etkilerini göstermektedir. Konsantrasyon değerleri kullanılan ADR nanoparçacıkları cinsinden hesaplanmıştır. İlaç yüklenmemiş 812 µg/ml ADR'nin hücreler üzerinde orta düzeyde toksik etki yarattığı görülmüştür. Bu doz uygulandığında yaşayan hücre oranı % 52,6 olarak tespit edilmiştir. Bunun dışında uygulanan diğer dozlar hücre üzerinde önemli bir toksik etki yaratmamıştır. Buna karşın yüksek dozda ilaç yüklenmiş ADR nanoparçacıklarının MCF-7 hücreleri nin çoğalmalarını engelleyebildiği gösterilmiştir.



Şekil 3.10. ADR, ADR-Tamoksifen nanoparçacıklarının MCF-7 hücre hatlarına 96 saat uygulandıktan sonra belirlenen hücre üreme yüzdeleri. Sonuçlar Ortalama ± STH olarak verilmiştir (n=2).

Hücre üreme eğrilerinin logaritmik denklemine göre hesaplanan IC_{50} değerleri Tablo 3.3'de verilmiştir. İlaç yüklenmiş ve ilaç yüklenmemiş ADR'nin toksik etkisi IC_{50} sonuçlarında daha belirgindir. ADR-Tamoksifenin IC_{50} değeri 0,44 olarak belirlenirken ADR için bu değer 11,12 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar ADR'ye bağlı tamoksifenin yaklaşık 25 kez daha toksik etkiye neden olduğunu göstermektedir. Burada nanoparçacıklara bağlı ilacın etkili bir şekilde hücre çoğalmasının engelleyebildiğini görmekteyiz.

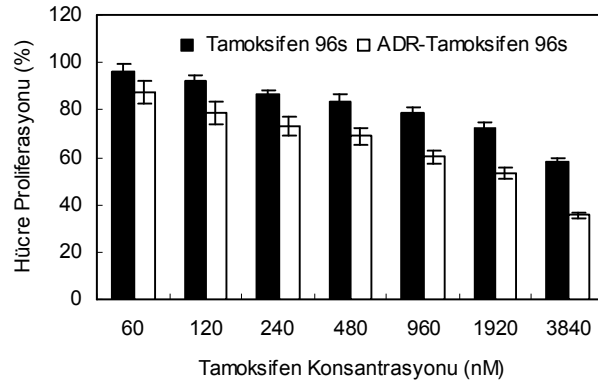
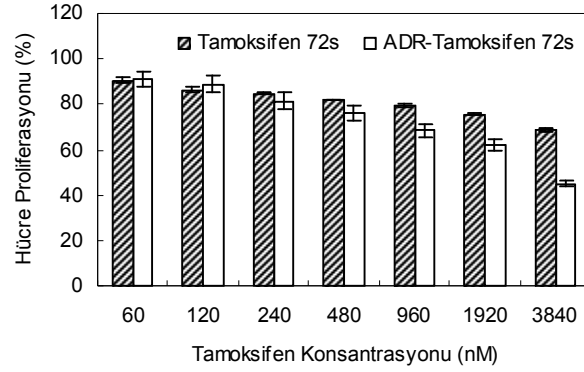
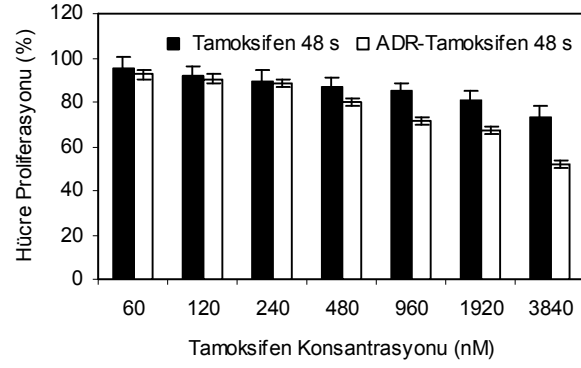
ADR-Tamoksifen nanoparçacıklarının serbest tamoksifene göre ne kadar etkili olduğu belirlemek için serbest tamoksifen MCF-7 hücrelerine uygulanmıştır. Şekil 3.11 farklı inkubasyon sürelerinde belirlenen karşılaştırmalı hücre üreme yüzdelerini

göstermektedir. Serbest tamoksifen konsantrasyonları tutuklanan tamoksifen değerlerine göre hesaplanmıştır. Her üç farklı inkübasyon süresinde de ADR-tamoksifen nanoparçacıklarının hücreler üzerindeki toksisitesi gözlemlenmektedir. Özellikle 96 saat inkübasyon sonunda ADR'ye yüklenmiş tamoksifenin serbest tamoksifene oranla tüm dozlarda daha fazla toksik etkiye neden olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). 72 ve 48 saat inkübasyon sonunda ise en yüksek dört doz serbest tamoksifene göre daha fazla toksik etki sağlamıştır. Uygulanan en yüksek ADR-Tamoksifen dozu için hücre proliferasyonu 48 saatte % 52, 72 saatte % 45 ve 96 saatte % 35.4 olarak tespit edilmiştir.

Hücre çoğalmasındaki bu fark IC_{50} değerlerinde de tespit edilmiştir. Tablo 3.3'de verilen IC_{50} sonuçlarında ADR-tamoksifen, tamoksifen arasındaki fark inkübasyon süresi arttıkça kapanmasına rağmen nanoparçacığa yüklenmiş tamoksifenin kayda değer etkinliği gözlemlenmektedir.

Tablo 3.3. ADR-Tamoksifen ve Tamoksifenin 48, 72, 96 saat inkübasyon sonunda belirlenen IC_{50} değerleri (Ortalama \pm STH, n=2)

IC_{50} (μ M)	48 s	72 s	96 s
ADR-Tamoksifen	8,52 \pm 0,08	3,58 \pm 0,75	2,1 \pm 0,02
Tamoksifen	921 \pm 2,81	360 \pm 2,5	60,9 \pm 3,7



Şekil 3.11. ADR-Tamoksifen ve Tamoksifen nanoparçacıklarının MCF-7 hücre hatlarına 48, 72 ve 96 saat uygulandıktan sonra belirlenen hücre proliferasyon değerleri. Sonuçlar ortalama \pm STH olarak verilmiştir (n=2).

ADR-Tamoksifen'in MCF-7 üzerindeki etkinliği MCF-7 hücrelerinin sahip olduğu farklı özelliklerle açıklanabilir. Bu hücrelerin zarında bulunan bazı pompa proteinleri sitotoksik ilaçların hücre dışına atılmasına neden olurlar. Özellikle P-gp, BCRP, MRP-1 gibi pompaların üretimi hücre dirençliliği ile birlikte artar (COLEY, 2008). Serbest tamoksifen hücre dışına bu pompalarla atılıyor olabilir. Ancak nanoparçacıklara yüklenmiş ilaçların dışarı pompalanması daha yavaşlamış veya engellenmiş olabilir. Bu tür nanoparçacıklar hücre zarına yapışıp endositoz yoluyla içeri alınabilirler. Pompalar nanoparçacıklara bağlı ilacı tanımamış ve hücre dışına atılmamış olabilir (VAULTHER, 2003). Sonuç olarak ADR nanoparçacıkları tamoksifenin hücre içinde daha fazla kalmasını ve daha etkin olmasını sağlamış olabilirler.

Salım çalışmalarında 96 saat sonunda %12,5 tamoksifenin salındığı tespit edilmiştir. Hücre sitotoksisite analizlerinde ise nanoparçacıklara tutuklanmış tamoksifenin serbest ilaca göre çok daha etkili olduğu belirlenmiştir. Nanoparçacıkların boyutlarının 500nm'den küçük olması nedeni ile hücre içine endozomal yolla alınmış olabileceği düşünülmektedir. MCF-7 hücresi içindeki enzimler, pH farklılıkları ve lizozomal yıkım ilacın nanoparçacıklardan daha hızlı salınmasını sağlamış olabilir (ULBRICH, 2004). Diyaliz yoluyla tamoksifen salımı ve hücre kültüründe tamoksifen salımı birbirinden oldukça farklı çalışmalardır, bu nedenle bu iki deneyde farklı sonuçlar elde edilmiştir. ADR-Tamoksifenin MCF-7 hücreleri üzerindeki yüksek etkinliğini daha detaylı açıklayabilmek için yeni araştırmalar gerekmektedir.

3.7.2 ADR Nanoparçacıkların RPMI-8226 ve U-266 Hücre Hatlarına Uygulanması

ADR nanoparçacıklarının süspansiyon RPMI-8226 ve U-266 multipl myelom hücre hatları üzerindeki etkileri incelenmiştir. Tamoksifenin ADR'ye yüklenişi ve ilacın bu şekilde hücreler üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Sitotoksisite analizleri sonucunda tamoksifen yüklenmiş ve boş ADR nanoparçacıklarının en yüksek dozda bile myeloma hücre çoğalmasını engelleyemediği belirlenmiştir. Hidrofobik özelliği olan ADR nanoparçacıklarının öncelikle DMSO'da çözünmesi gerekli olduğu için kullanılan ADR miktarı daha fazla arttırılamamıştır. Aynı miktarda kullanılan ADR'ye yüklenmiş tamoksifenin MCF-7 hücre hatlarındaki etkinliği bir önceki bölümde detaylı olarak verilmiştir. Elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda ADR nanoparçacıklarının tek sıralı yapışkan hücre tipi olan MCF-7 hatları için uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

4. SONUÇ

Kemoterapinin neden olduğu sorunları en aza indirmeyi amaçlayan kontrollü ilaç salımı araştırmalarında hızlı ve etkili sonuçlar elde edebilmek için kullanılan taşıyıcıların çeşitliliğinin ve veriminin artması önemlidir. Özellikle ilaç salımında etkili olacak polimerlerin bu tür araştırmalarda kullanılmasıyla farklı ilaç tiplerine göre özgün taşıyıcı sistemler geliştirilebilir.

Yapılan bu çalışmada tasarlanan aşırı dallı polimerlerin sahip olduğu avantajların ilaç salımında kullanılması amaçlanmıştır. Aşırı dallı polimerlere risinoleik asitle hidrofobik özellik kazandırılmıştır. Elde edilen aşırı dallı reçine nanoparçacıklarının özellikleri, moleküler ağırlık, FTIR, parçacık boyutu, ¹³C NMR analizleri ile belirlenmiştir. Bu parçacıkların hidrofobik bir anti-kanser ilaç olan tamoksifenin etkili olarak tutuklayabildiği ve kontrollü olarak salımını yapabildiği belirlenmiştir. Yaptığımız araştırma sonucunda ADR'nin tamoksifenin %73 oranında tutukladığı; lipaz ve SDS eklendiğinde salım ise farklı konsantrasyonlardaki tamoksifenin % 87 ile %61 oranında salındığı belirlenmiştir. Molekül ağırlık ölçümleri lipazın ADR nanoparçacıklarının yıkımını arttırdığını göstermiştir. İlaç tutuklanmış ADR nanoparçacıklarının farklı hücreler üzerindeki etkileri sitotoksitesite analizleri ile tespit edilmiştir. Tek katmanlı yapışkan hücre tipindeki MCF-7 hücre hatlarının üreme yüzdesi, tamoksifenin tutuklanmış ADR nanoparçacıkları uygulandığında azalmıştır. Farklı inkübasyon sürelerinde uygulanan tutuklanmış tamoksifen, serbest ilaca göre MCF-7 çoğalmasını daha fazla engellemiştir, bu nedenle nanoparçacıkların hücreler üzerine etkili olduğu tespit edilmiştir. Ancak ADR'nin süspansiyon özellikteki RPMI-8226 ve U-266 hücre hatları üzerinde etkin olamadığı gösterilmiştir. Bu hücrelerin proliferasyonu uygulanan en yüksek dozdaki ADR nanoparçacıklarına karşı bile değişkenlik göstermemiştir. Bu nedenle myelom hücreleri için ADR nanoparçacıklarının uygun olmadığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak yapılan bu çalışmada, tasarlanan polimerin kontrollü ilaç salımında ve MCF-7 hücre hatları üzerinde etkinliği gösterilmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlar yeni ilaç sistemleri tasarımlarında kullanılarak etkili kemoterapi ajanları geliştirilmesine katkıda bulunacaktır.

5. REFERANSLAR

ALLEN M.T., Cullis P.R., Drug Delivery System Entering the Main Stream, *Science*, 303 (5665), 1818 – 1822, (2004).

BAT, E., *Synthesis and Characterization of Hyperbranched and Air Drying Fatty Acid Based Resins*, (Phd Thesis), Middle East Technical University, (2005).

BHARATHI P., Moore J.S., Controlled Synthesis of Hyperbranched Polymers by Slow Monomer Addition to Core, *Macromolecules*, 33, 3212-3218, (2000).

BIOLOGICAL INDUSTRIES,. *Cell Proliferation Assay with XTT Reagent Protocol*, (2002).

CHAWLA J.S., Amiji M.M., Biodegradable Poly(ϵ -caprolactone) Nanoparticles for Tumor Targeted Delivery of Tamoxifen, *International Journal of Pharmaceutics*, 249, 127-138, (2002).

CHENG K-C., Effect on Feed Rate on Structure of Hyperbranched Polymers Formed by Stepwise Addition of AB₂ Monomers into Functional Cores, *Polymer*, 44, 1259-1266, (2003).

CHU H., Liu N., Wang X., Jiao Z., Chen Z., Morphology and in vitro release kinetics of drug-loaded micelles based on well-defined PMPC-b-PBMA copolymer, *International Journal of Pharmaceutics*, Article in press, (2009).

COLEY H. M., Mechanisms and Strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer, *Cancer Treatment Reviews*, 34, 378-390, (2008)

DONG Y., Feng S.S., Methoxy Poly(ethylene glycol) Poly(lactide) (MPEG-PLA) Nanoparticles for Controlled Delivery of Anticancer Drugs, *Biomaterials*, 25, 2843–2849, (2004).

FASSAS A. B., Bolanos A.P., Shanholtz C., Cottler M., Tricot G., Tamoxifen-based Treatment Induces Clinically Meaningful Responses in Multiple Myeloma Patients

with Relapsing Disease After Autotransplantation, *Leukemia&Lymphoma*, 42, 1323–1328, (2001).

FRECHET J.M.J., Dendrimers and Other Dendritic Macromolecules: From Building Blocks to Functional Assemblies in Nanoscience and Nanotechnology, *Journal of Polymer Science: Part A : Polymer Chemistry*, 41, 3713–3725, (2003).

GILLIES E.R., Fréchet J.M.J., Dendrimers and Dendritic Polymers in Drug Delivery, *Drug Discovery Today*, 10, 35-43, (2005).

HECKER R., Fawell P.D., Jefferson A., The Agglomeration of High Molecular Mass Polyacrylamide in Aqueous Solutions, *Journal of Applied Polymer Science*, 70, 2241-2250, (1998).

JAIN J.P., Modi S., Kumar N., Hydroxy Fatty Acid Based Polyanhydride as Drug Delivery System: Synthesis, Characterization, *In Vitro* Degradation, Drug Release, and Biocompatibility, *Journal of Biomedical Materials Research*, 84(3), 740-752, (2008).

JESSANI N., Humphrey M., McDonald W. H., Niessen S., Masuda K., Gangadharan B., Yates J. R., Mueller B. M., Cravatt B. F., Carcinoma and Stromal Enzyme Activity Profiles Associated with Breast Tumor Growth *In Vivo*, *Proceedings of National Academy of Sciences*, 101(38), 13756-13761, (2004).

JESUS P. L. O., Ihre R. H., Gagne H., Frechet J. M. J., Polyester Dendritic Systems for Drug Delivery Applications: *In vitro* and *In vivo* Evaluation, *Bioconjugate Chemistry*, 13, 453-461, (2002).

KLAJNERT B., Bryszewska M., Dendrimers: Properties and Applications, *Acta Biochimica Polonica*, 48, 199-208, (2000).

LONG B.J., Jelovac D., Handratta V., Thiantanawat A., MacPherson N., Ragaz J., Goloubeva O.G., Brodie A.M., Therapeutic Strategies Using the Aromatase Inhibitor Letrozole and Tamoxifen in a Breast Cancer Model, *Journal of the National Cancer Institute*, 96,456-65, (2004).

MAILLARD S., Ameller T., Gauduchon J., Gougelet A., Gouilleux F., Legrand P., Marsaud V., Fattal E., Sola B., Renoir J.M., Innovative Drug Delivery Nanosystems Improve The Anti-Tumor Activity *In Vitro* and *In Vivo* of Anti-Estrogens in Human Breast Cancer and Multiple Myeloma, *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 94, 111–121, (2005).

MIAO Z.M., Cheng S.X., Zhang X.Z., Zhuo R.X., Synthesis, Characterization and Degradation Behavior of Amphiphilic Poly- α,β -[N-(2-hydroxyethyl)-L-aspartamide]-g-poly(ϵ -caprolactone), *Biomacromolecules*, 6, 3449-3457, (2005).

ORIVE G., Hernández R. M., Gascón A. R., Pedraz J. L., Micro and Nano Drug Delivery Systems in Cancer Therapy, *Cancer Therapy*, 3, 131-138, (2005).

PEPPAS B. L., Blanchette J. O., Nanoparticle and Targeted Systems for Cancer Therapy, 56, 1649-1659, (2004).

PILLIAI O., Dhanikula A. B., Phanchangula R., Drug Delivery: an Odyssey of 100 Years, *Current Opinion in Chemical Biology*, 5, 439-446, (2001).

SHIKANOV A., Vaisman B., Krasko M.Y., Nyska A., Domb A.J., Poly(sebacic acid-co-ricinoleic acid) Biodegradable Carrier for Paclitaxel: *In Vitro* Release and *In Vivo* Toxicity, *Journal of Biomedical Materials Research*, 69(1), 47-54, (2004).

SINGH G., New chemotherapy delivery methods, *International Biopharmaceutical Association Publication*. <http://www.ibpassociation.org/IBPA_articles/feb2006issue/New_Chemo_by_Gurdeep.doc> Son giriş tarihi: 10 Mayıs 2008, (2006).

SLIVNIAK R., Ezra A., Domb A.J., Hydrolytic Degredation and Drug Release of Ricinoleic Acid-Lactic Acid Copolyesters, *Pharmaceutical Research*, 23(6), 1306-1312, (2006).

SOKOLOSKY-PAPKOV M., Shikanov A., Kumar N., Vaisman B., Domb A.J., Fatty Acid Based Biodegradable Polymers-Synthesis and Applications, *Bulletin of the Israel Chemical Society*, 23,12-17, (2008).

TAYADE P.L., Kale R.D., Encapsulation of Water Insoluble Drug by a Cross-Linking Technique: Effect of Process and Formulation Variables on Encapsulation Efficiency, Particle Size, and *in vitro* Dissolution Rate, *AAPS PharmSci*, 6(1), 1-8, (2004).

TOMALIA D.A., Fréchet J. M. J., Discovery of Dendrimers and Dendritic Polymers: A Brief Historical Perspective, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 40, 2719–2728, (2002).

TWYMAN L. J., King A. S. H., Burnett J., Martin I. K., Synthesis of Aromatic Hyperbranched PAMAM Polymers”, *Tetrahedron Letters*, 45, 433-435, (2004).

ULBRICH K., Subr V., Polymeric Anti-Cancer Drugs With pH-Controlled Activation, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 1023-1050, (2004).

VAULTIER C., Dubernet C., Chauvierre C., Brigger I., Couvreur P., Drug Delivery to Resistant Tumors: The Potential of Poly(alkyl cyanoacrylate) Nanoparticles, *Journal of Controlled Release*, 93, 151-160, (2003).

VISHNU Y.V., Chandrasekhar K., Ramesh G., Rao Y.M., Development of Mucoadhesive Patches for Buccal Administration of Carvedilol Current Drug Delivery, 4, 27-39, (2007).

VOGLESON C. T., Advances in Drug Delivery Systems, *Modern Drug Discovery*, 5(4), 439-446, (2001).

ZAGAR E., Zigon M., Characterization of a Commercial Hyperbranched Aliphatic Polyester Based on 2,2-Bis(methylol)propionic Acid, *Macromolecules*, 35, 9913-9925, (2002).

ZHANG Z., Feng S.S., The Drug Encapsulation Efficiency, *In Vitro* Drug Release, Cellular Uptake and Cytotoxicity of Paclitaxel-Loaded Poly(lactide)–Tocopheryl Polyethylene Glycol Succinate Nanoparticles, *Biomaterials*, 27, 4025–4033, (2006).

ZOU J., Shi W., Wang J., Bo J., Encapsulation and Controlled Release of a Hydrophobic Drug Using Novel Nanoparticle Forming Hyperbranched Polyester, *Macromolecular Bioscience*, 5, 662-668, (2005).

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 107T179
Proje Başlığı: Anti-Kanser İlaç Salımına Yönelik Dendritik Polimer Sentezi ve Hücre Kültürlerinde Uygulanması
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Prof. Dr. Ufuk Gündüz (Proje Yürütücüsü), Prof. Dr. Güngör Gündüz, Araş. Gör. Özlem Darcansoy İşeri, Araş. Gör. Meltem Demirel Kars
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü 06531 Eskişehir Yolu Ankara
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01/07/2007- 01/01/2009
Öz (en çok 70 kelime) <p>Bu çalışmada öncelikle ADR nanoparçacıkları sentezlenmiş, özellikleri belirlenmiş sonrasında ise bu parçacıklara tamoksifen yüklenmiştir. Tamoksifenin ADR'ye kimyasal bağlarla yüklenmediği ve ADR'nin parçacık boyutunda azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Tamoksifenin salım hızı lipaz ve sodyum dodesil sülfat kullanıldığında artmış ve tamoksifen konsantrasyonuna bağlı olarak salım hızındaki farklılıklar incelenmiştir. Lipazın ADR'nin yıkımını arttırdığı belirlenmiştir. ADR'ye yüklenmiş tamoksifenin meme kanseri üzerinde daha etkili olduğu belirlenirken multipl myelom üremelerinde herhangi bir değişim tespit edilememiştir.</p>
Anahtar Kelimeler: Kontrollü ilaç salımı, aşırı dallı reçine, nanoparçacık, tamoksifen
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input type="checkbox"/> <small>Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.</small>
Projeden Yapılan Yayınlar: <p>GÜÇ, E., Gündüz G., Gündüz, U., Hidrofobik Yapıdaki Anti-Kanser İlaçların Salımına Yönelik Aşırı Dallı Reçine Sentezi ve Özelliklerinin Belirlenmesi, II. Ulusal Polimer Bilim ve Teknoloji Kongresi, Sözlü Sunum, Şanlıurfa, (30 Nisan, 2 Mayıs 2008).</p>

GÜÇ, E., Gündüz, G., Gündüz, U., Synthesis of Fatty Acid Based Hyperbranched Polymers and Application in Drug Delivery, 5th International Symposium on High-Tech Polymer Materials, Sözlü Sunum, Pekin/Çin, (26-30 Ekim 2008).

Tez

GÜÇ, E., Synthesis and characterization of fatty acid based hyperbranched polymers for anti-cancer drug delivery, (Yüksek Lisans Tezi), (2008).