

**pH DUYARLI POLİSEBASİK ANHİDRİT BAZLI
NANOKÜRELERİN İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM OLARAK
HAZIRLANMASI**

Proje No: 111M385

Prof. Dr. Nesrin HASIRCI
Prof.Dr. Vasıf HASIRCI
Shahla Bagheri Fam

EYLÜL 2012
ANKARA

Özet

pH DUYARLI POLİSEBASİK ANHİDRİT BAZLI NANOKÜRELERİN İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM OLARAK HAZIRLANMASI

Son yıllarda, özellikle kanser hastalığında teşhis ve tedavi amaçlı kullanılmak üzere, nano boyutta çeşitli organik ve inorganik sistemlerin geliştirilmesi büyük önem kazanmıştır ve bu konuda yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Farmasötik açıdan bakıldığında, ideal bir ilaç taşıyıcı, küçük parçacık boyutunda ve yüksek ilaç yüklenme kapasitesinde olmalı, kanda uzun süre dolaşabilme özelliği göstermeli, biyobozunur olmalı ve bozunduğu kimyasallar olumsuz yan etki göstermeden vücut tarafından kolayca emilebilmelidir. Polisebasik anhidritler, iyi biyouyumluluk, kontrollü ve yüzeyden bozunma özelliği ve düşük maliyet gibi tercih edilen özellikleri nedeni ile ilaç taşıyıcı sistemlerin yapımında ümit veren polimerlerdir. İlaç taşıyıcı sistemler konusunda yapılan son gelişmeleri göz önüne alırsak, özgün ilaç taşıyıcı yaklaşımları, nano boyuttaki taşıyıcıların kanser hücrelerine hedeflenmesini ve sadece o bölgede salım yaparak etkin olmasını sağlayacak tasarımların geliştirilmesini yönündedir. Bu nedenle, etkin tümör-hedefli terapi için, taşıyıcının kimyasal yapısının yanı sıra, tümör tespit edebilme, sıcaklık veya pH duyarlılığı gibi kriterler de önem taşımaktadır. Bu çalışmanın amacı, kanser ilaç taşıyıcısı olarak polisebasik anhidrit (PSA) nanokürelerin tasarlanması ve sentezlenmesi yanı sıra akıllı ve pH duyarlı bir nano ilaç taşıyıcı sistem elde etmek amacıyla ilaç yüklü matrisin pH duyarlı bir molekül ile kaplanmasıdır. Polihistidin, pH duyarlı molekül olarak seçilmiş ve hazırlanan PSA nanoküreler polihistidin ile kaplanmıştır. PSA nano taşıyıcılara Doksorubisin kanser ilacı yüklenmiş, nano taşıyıcılar polihistidin ile kaplanarak pH duyarlı yapılmış ve bu sistemlerden ilaç salım kinetiği, asidik, nötr ve bazik olarak hazırlanan üç farklı pH tampon çözelti ortamında incelenmiştir. Nano parçacıkların fiziksel ve kimyasal özellikleri, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), dinamik ışık saçılım spektrometresi (DLS), ultraviyole ve görünür ışık absorpsiyon spektroskopisi (UV-VIS), parçacık boyut ölçücü (PA) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Polisebasik anhidrit, Polihistidin, pH duyarlılık, Nanoküre, İlaç taşıyıcı

Abstract

PREPARATION OF pH RESPONSIVE POLYSEBACIC ANHYDRIDE BASED NANOSPHERES AS DRUG CARRIER SYSTEMS

In the recent years, development of various organic and inorganic nano sized systems to be used especially in cancer for diagnosis and therapy has gained great interest, and intense research is carried out on this subject. In pharmaceutical aspect, an ideal drug carrier should have high loading capacity with small particle size, demonstrate prolonged circulation in the blood, should be biodegradable and the metabolite chemicals should be bio-absorbable by the body without causing any negative side effect. Polysebacic anhydrides are promising polymers in the formation of drug delivery systems because of their preferable properties such as good biocompatibility, controlled surface erosion and low cost. Regarding as the recent trends for drug delivery system design, the novel approaches for drug carriers are mainly based on development of nano size drug carriers which are targeted to cancer cells and release the drug only in that area. Thus, for an effective tumour-targeted delivery, further criteria such as detection of tumour and sensitivity to temperature or pH, besides its chemical structure gains importance. In this study, the aim is to design and synthesize polysebacic anhydride (PSA) nano spheres as anti cancer drug carrier, and to coat the drug-loaded matrix with a pH sensitive molecule in order to get an intelligent and pH sensitive nano drug carrier system. Polyhistidine was chosen as pH sensitive molecule and the prepared PSA nanospheres were coated with polyhistidine. PSA nano carriers were loaded with Doxorubicin anti-cancer drug, nano spheres were coated with polyhistidine in order to introduce pH sensitivity, and the drug release kinetics from these systems were examined in three different buffer media prepared as acidic, neutral and basic media. The physical and chemical properties of the nano particles were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), dynamic light scattering (DLS), ultraviolet and visible absorption spectroscopy (UV-VIS), particle sizer (PA), and scanning electron microscopy (SEM).

Keywords: Polysebacic anhydride, Polyhistidine, pH responsive, Nanosphere, Drug carrier

Önsöz

Bu proje, kanser terapisine yönelik nano boyutta ve pH duyarlı özgün ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarımı, sentezi ve optimizasyonuna yönelik bir çalışma olup TÜBİTAK tarafından 111M385 proje koduyla 15 Haziran 2011 – 15 Haziran 2012 tarihleri arasında ‘Hızlı Destek’ projesi olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Özet	ii
Abstract	iii
Önsöz	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLO DİZİNİ	viii
KISALTMALAR	ix
1 GİRİŞ	10
2 GENEL BİLGİLER	13
2.1 İlaç taşıyıcı sistemler.....	13
2.2 Çalışmanın Amacı.....	20
2.3 Çalışmanın Özgün Değeri.....	21
3 GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1 Malzemeler.....	23
3.2 Yöntem.....	24
3.2.1 Polimer Sentezi	24
3.2.2 İlaç içeren nanokürelerin hazırlanması	25
3.2.3 pH duyarlı nanokürelerin hazırlanması.....	26
3.3 Karakterizasyon	27
3.3.1 PSA karakterizasyonu.....	27
3.3.1.1 PSA'nın kimyasal analizi.....	27
3.3.1.2 PSA'nın molekül ağırlık analizi.....	27

3.3.2	Nanokürelerin karakterizasyonu	27
3.3.2.1	Taramalı Elektron Mikroskopisi	27
3.3.2.2	Parçacık Boyutu Analizi	28
3.3.2.3	Histidin kaplı nanokürelerin analizi	28
3.3.3	Doksorubisin (DOX) çalışmaları	28
3.3.3.1	Doksorubisin enkapsülasyon verimi	28
3.3.3.2	In situ Doksorubisin salımı	29
4	BULGULAR VE TARTIŞMA	30
4.1	Polimer karakterizasyonu.....	30
4.2	Nanokürelerin karakterizasyonu	32
4.3	Polihistidin kaplama karakterizasyonu	36
4.4	Doksorubisin enkapsülasyon verimi	37
4.5	İn situ Doksorubisin salımı	37
5	SONUÇ.....	41
5.1	Öneriler ve yapılması gerekenler	41
	Referanslar.....	43
	Tübitak Proje Özet Bilgi Formu.....	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Değişik ilaç salım sistemlerinde kandaki etkin madde düzeyinin zamana göre değişimi. A) Kontrollü salım sistemi, B) Uzatılmış etkili yüksek doz salım sistemi, C) Konvansiyonel ve düşük doz salım sistemi	14
Şekil 2.2.	Kontrollü salım sistemleri. a) Kütle difüzyon, b) Membran difüzyon, c) Kimyasal parçalanma	15
Şekil 2.3.	Polisebasik anhidrit molekülünün tekrarlayan birimi	16
Şekil 2.4.	Poli(L-histidin) kimyasal yapısı	18
Şekil 3.1.	Sebasik asitin polimerleşme reaksiyonu	24
Şekil 3.2.	Çift emülsiyon yöntemi ile ilaç içeren nanokürelerin hazırlanması	26
Şekil 4.1.	SA monomeri ve PSA polimerinin FTIR spektrası	30
Şekil 4.2.	H-NMR spektrumları, (a) Sebasik asit, (b) Polisebasik anhidrit	31
Şekil 4.3.	Dokso rubisin içeren nanokürelerin SEM fotoğrafları. (a ve b) P2T4; (c ve d) P2PVA4	35
Şekil 4.4.	Dokso rubisin içeren PSA nanokürelerin tanecik boyut dağılımı. a) P2PVA; b) P2T4	35
Şekil 4.5.	FTIR spektrumları. a) Dokso rubisin içeren PSA nanoküreler, b) Polihistidin ile kaplanmış Dokso rubisin içeren PSA nanoküreler, c) Saf polihistidin	36
Şekil 4.6.	Dokso rubisin salımının üç farklı pH ortamında kalibrasyon eğrisi	38
Şekil 4.7.	Polihistidin kaplama öncesi ve sonrası PSA nanokürelerden pH 7.4 ortamında Dokso rubisin salımı	39
Şekil 4.8.	pH duyarlı nanokürelerden farklı pH ortamlarında Dokso rubisin salımı	40

TABLO DİZİNİ

Tablo 3.1.	Kimyasallar ve alındıkları firmaların listesi	23
Tablo 3.2.	Nanokürelerin hazırlanmasında değişen parametreler	25
Tablo 4.1.	Nanokürelerin sabit PSA derişiminde hazırlanış parametreleri ve SEM mikrografları	32
Tablo 4.2.	Nanokürelerin sabit çözelti ortamında hazırlanış parametreleri ve SEM mikrografları	33

KISALTMALAR

CIP	Ciproflo xacin
DLS	Dinamik ışık saçılım spektrometresi
DOX	Doksorubisin
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
PA	Parçacık boyut ölçücü
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PSA	Polisebasik anhidrit
SA	Sebasik asit
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
UV-VIS	Ultraviyole ve görünür ışık absorpsiyon spektroskopisi

1 GİRİŞ

Çağımızın hastalığı olarak bilinen kanser, halen teşhis ve tedavisi zor olan bir hastalıktır. Bunun nedeni kanser tiplerinin ve hücre çeşitliliğinin çok olması ve geliştirilen ilaçların her tür kanser hücresine karşı etkin olamamasıdır. Son yıllarda, malzeme bilimi ve nano teknolojinin gösterdiği büyük ivme, hem akıllı malzemeler yapımına hem de mikro ve nano boyutta sistemlerin tasarımına olanak sağlamıştır. Bu ilerlemenin katkısıyla ve yoğun araştırmalar neticesi, özellikle kanser hastalığında teşhis ve tedavi amaçlı kullanılmak üzere nano boyutta çeşitli organik ve inorganik sistemler geliştirilmiştir. Bunların içinde tedavi amaçlı olan nano ilaç taşıyıcı sistemleri büyük önem taşımaktadır. İlaç taşıyıcı sistemler, ilacın sürekli ya da tedavinin belirli bir anında istenilen bölgede salınmasını sağlarlar. Taşıyıcı sistemler, taşıdıkları ilaçların farmakokinetiğini etkiledikleri gibi, ilacın biyolojik ortamda biyodağılımını da etkilemektedirler. Farmasötik açıdan bakıldığında, ideal bir ilaç taşıyıcı biyobozunur ve biyouyumlu olanın yanısıra, ilaç taşıma kapasitesi yüksek, parçacık boyutu küçük, kanda uzun süre yan etki göstermeden dolaşabilme, ve istenilen bölgede lokal olarak etki gösterebilecek duyarlıkta olmalıdır.

Geleneksel ilaçla tedavi yöntemleri (oral, intravenöz, topikal vb.) kullanılarak alınan kanser ilaçlarının, vücut içinde belli bölgelerde, fizyolojik ve anatomik koruyucu mekanizmalar nedeniyle, yeterli terapötik konsantrasyonu sağlayabilmesi ve etkin olabilmesi oldukça güçtür. Örneğin, kan-beyin zarı engeli ilaçların etkin olarak beyindeki hücrelere ulaşabilmesini engelleyen bir faktördür. Kanser ilaçlarının özellikle tümör bölgelerinde etkili olabilmesi için oldukça yüksek dozlarda verilmesi gerekir. Ancak, toksik etkilerinin de yüksek olduğu bilinen bu ilaçların yüksek konsantrasyonlarda verilmesiyle birlikte vücut içinde oluşan sistemik yan etkiler artmakta, kanser hücreleri ile birlikte diğer sağlıklı hücreler olumsuz etkilenmekte ve belki de bu şartlarda, vücut direncinin de düşmesi sonucu çok ciddi daha değişik problemler ortaya çıkmaktadır. Yan etkileri daha düşük olan yeni bir ilacın geliştirilmesi ve tedavi amaçlı kullanılması çok maliyetli olduğu gibi, ortalama 10 yıldan daha fazla süren laboratuvar araştırmalarını ve geliştirme faaliyetlerini gerektirmektedir. Hayvan deneylerinin ve pre-klinik uygulamaların maliyeti ise çok yüksektir. Dolayısıyla, ilaç firmaları genellikle sıfırdan yeni ilaç geliştirmek yerine, FDA onaylı ve piyasada var olan ilaçların kullanım süresini ve etkinliğini arttırmak amacıyla, hedefli kontrollü salım sistemleri oluşturmak ve yeni tasarımlar yapmak yolunu tercih etmektedirler.

İlaç uygulanmasında sıklıkla kullanılan klasik yöntemlerden biri olan enjeksiyon yoluyla ilaç alımı yan etkilerin sık görüldüğü ve yüksek maliyetli bir tedavi yöntemidir. Enjeksiyonla ilaç uygulanmasında ilacın kan plazmasındaki derişimi, ilacın etkin olduğı düzeyin çok üzerine çıkabilir veya bunun tam tersi olarak etkin düzeyin çok altında kalabilir. Etkin madde bir polimere bağlanarak uygulandığı zaman, polimerin vücut içinde hidrolitik veya enzimatik kontrollu biyobozunması nedeni ile, ilacın salım hızı ve salım miktarı rahatlıkla kontrol edilebilmektedir. İdeal ilaç tedavisinde, ilacın hasta dokuya doğrudan hedeflenmesi, ve istenilen bölgede belli süre ve konsantrasyonda etki göstermesi arzu edilir. Bu tür hedefli ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi çalışmaları özellikle son 20 yılda çok artmıştır. Bu çalışmalar, genelde polimerik malzemelerin kullanımı ile nano ilaç taşıyıcı ve ilaç hedefleyici, aynı zamanda kontrollu salım sağlayan nano sistemlerin tasarımı, yapımı ve etkilerinin araştırılması üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu amaçla, çeşitli lipozomlar, biyobozunur polimerler ve hız kontrollu ilaç salım sistemleri geliştirilmiştir ve yoğun olarak araştırılmaktadır (HASIRCI, 2007). Polianhidrit nano veya mikro küreler, içerdikleri ilacı uzun sürede ve sabit miktarlarda salım özelliğı gösterdikleri için, ilaç taşıyıcı ve kontrollu salım sağlayan sistemlerin oluşturulmasında tercih edilen polimerler olmuşlardır. Özellikle polisebask anhidrit (PSA), biyoyumluluğı, yüzeyden başlayan kontrollu bozunma özelliğı ve düşük maliyetli olması nedeni ile ilaç taşıyıcı yapımında önemli bir polimerdir.

Kanser hücrelerinin bulunduğu bölgelerin sağlıklı dokuya göre daha düşük pH değerinde ve daha yüksek sıcaklıkta olduğu bilindiğı için, sıcaklık ve pH değerlerine duyarlı maddelerden hazırlanmış kanser ilacı taşıyıcı sistemler üzerinde oldukça yoğun araştırmalar yürütülmektedir. Bu sistemler, invivo ortamında, sağlıklı dokuya göre daha düşük pH ve daha yüksek sıcaklık gösteren tümör bölgelerine geldiklerinde biyobozunmaya başlayarak içlerinde bulunan ilaçların salımını etkin olarak bu bölgelerde gerçekleştirirler. Ayrıca, nano ilaç taşıyıcı sistemlere kanser hücrelerini tanıyabilecekleri antikolar bağlanması ve sistemin tümöre hedeflenmesi de son senelerin en yoğun çalışılan konuları arasındadır.

İdeal bir ilaç taşıyıcının, tanecik boyutu küçük ve ilaç yüklenme kapasitesi yüksek olmalı, kan dolaşım sisteminde uzun süre kalabilmeli, belli süre zarfında bozunabilmeli ve bozunduğı zaman ortaya çıkan kimyasallar olumsuz yan etki göstermeden vücut tarafından kolayca emilebilmelidir. Ayrıca, ilaç yüklü nano sistemlere eklenecek duyarlı moleküller ile tümör bölgesini teşhis edebilmek, sistemi o bölgeye hedefleyebilmek ve ilacın özellikle o

bölgede salımını ve etkin olmasını sağlayabilmek mümkün görünmektedir. Tümör bölgelerinin pH değerinin normale göre daha asidik ve sıcaklığında normalden yüksek olduğu göz önüne alınırsa pH veya sıcaklık duyarlı moleküller ile de ilaç salımını kontrol edebilmek mümkün görünmektedir.

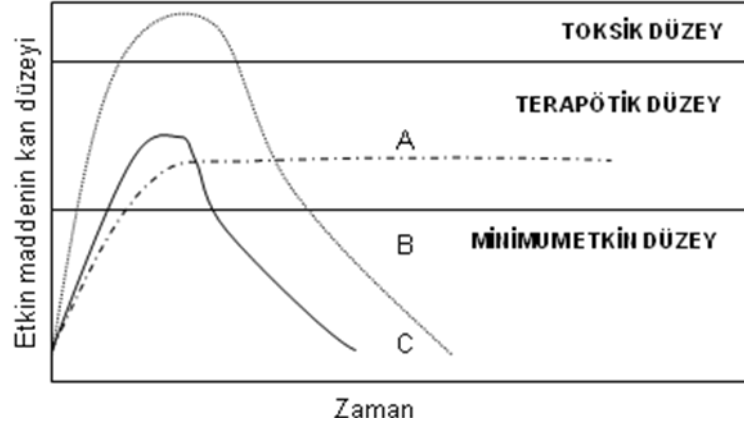
Bu çalışmada, polisebasik anhidrit bazlı ve nano boyutta özgün ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması, kanser ilacı yüklenen taneciklerin pH duyarlı polihistidin ile kaplanarak çevre asiditesine duyarlı hale getirilmesi ve özellikle diğer dokulara göre daha asidik olduğu bilinen tümör bölgesinde ilaç salımı sağlaması amaçlanmıştır. Bu amaç için öncelikle monomerinden başlayarak polisebasik anhidrit (PSA) sentezi laboratuvarımızda yapılmıştır. Saflaştırılan PSA kullanılarak, Doksorubisin ilacı ile yüklü olan PSA nanoküreleri hazırlanmıştır. Hazırlanış şartlarının nanokürelerin boyut ve şekli üzerindeki etkileri incelenmiş ve bu şartlar optimize edilmiştir. Daha sonra ilaç yüklenen PSA nanoküreler, pH duyarlı bir molekül olan polihistidin ile kaplanmıştır. Hazırlanan sistemlerden ilaç salım profilleri, asidik, nötral ve bazik olarak hazırlanan üç farklı pH değerindeki tampon çözelti ortamlarında incelenmiştir. Nanoparçacıkların fiziksel ve kimyasal özellikleri, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), dinamik ışık saçılım spektrometresi (DLS), ultraviyole ve görünür ışık absorpsiyon spektroskopisi (UV-VIS), parçacık boyut ölçücü (PA) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edilmiştir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 İlaç taşıyıcı sistemler

İlaçları, ağızdan oral yolla aldığımız gibi, damara veya kalçaya yapılan enjeksiyon yolu ile de alabiliriz. Damara verilen ilaçlar kısa zamanda kan dolaşımına katıldığı için vücudun gerekli bölgelerine kolayca ulaşabilir. Ağızdan alınan tablet ve kapsül halindeki ilacın ise önce sindirim sistemine ve sonra kana geçmesi belli bir zaman alır. Bu yöntemler ile alınan ilaçların, belli aralıklarla, örneğin 6, 8 veya 12 saatte bir yenilenmesi gerekir. Kandaki ilaç derişiminin etkin olduğu bir bölge vardır. İlaç alındıktan bir süre sonra, kandaki ilaç derişimi artar ve daha sonra hızla azalır. İlaç derişimindeki etkin süre, ilacın parçalanıp metabolize edilme ve sistemden uzaklaştırılma hızına bağlıdır. Kandaki ilaç derişiminin düzeyi etkin dozun altında veya üstünde olabilir. Eğer ilk ilaç dozu çok fazla olursa ikinci dozu almak için gereken zaman birimi uzar ancak bu durumda da istenmeyen yan etkiler (baş dönmesi, mide bulantısı vb.) gözlenir. Yüksek dozdaki ilaç alerjik veya toksik etkiler göstermeye başlayabilir. İlaç derişiminin etkin düzeyin altına düşmesi durumunda ise ilaç hiç bir etki göstermeyeceği için boşa harcanmış olur. Ayrıca, oral veya enjeksiyon yoluyla alınan bir ilaç, kan dolaşım sistemine katılacağı için vücut içerisinde tüm bölgelere dağılır ve vücudun tümünün ilaç tarafından etkilenmesine, uzun süreli uygulamalarda ise aktif madde birikimine bağlı toksik etkilere sebep olabilir. Bu durumlarda tercih edilen uygulama, ilacı istenilen etkin dozda ve istenilen süre içinde vücuda verebilecek kontrollu salım sistemleri kullanmaktır.

Kontrollu salım sistemleri, içerdikleri ilacı, kanda olması gereken etkin ve minimum seviyede (istenilen dozda ve istenilen süre için) salacağından dolayı, hem ilaç beklenen etkiyi gösterecek hem de vücut içinde sistematik yan etkiler minimum düzeye indirgenecektir. Değişik ilaç salım sistemleri için kandaki etkin madde düzeyinin zamana göre değişimi Şekil 2.1' de gösterilmiştir. Kontrollu salım sistemi kullanıldığında, kandaki ilaç düzeyi etkin ve sabit dozda olmanın yanısıra salım da uzun süreli olmaktadır. İlacın etkinliği, ilacın metabolize olma hızı kadar taşıyıcı sistemin parçalanma süresine de bağlıdır. Taşıyıcı hidrolitik veya enzimatik bozunmaya çok kısa sürede giderse, ilacın kana karışma hızı da çok hızlı olacaktır. Dolayısıyla, taşıyıcı sistem olarak seçilen polimerlerin biyolojik ortamdaki bozunma hızları ilaçların etkinliği açısından önemlidir.



Şekil 2.1. Değişik ilaç salım sistemlerinde kandaki etkin madde düzeyinin zamana göre değişimi. A) Kontrollü salım sistemi, B) Uzatılmış etkili yüksek doz salım sistemi, C) Konvansiyonel ve düşük doz salım sistemi

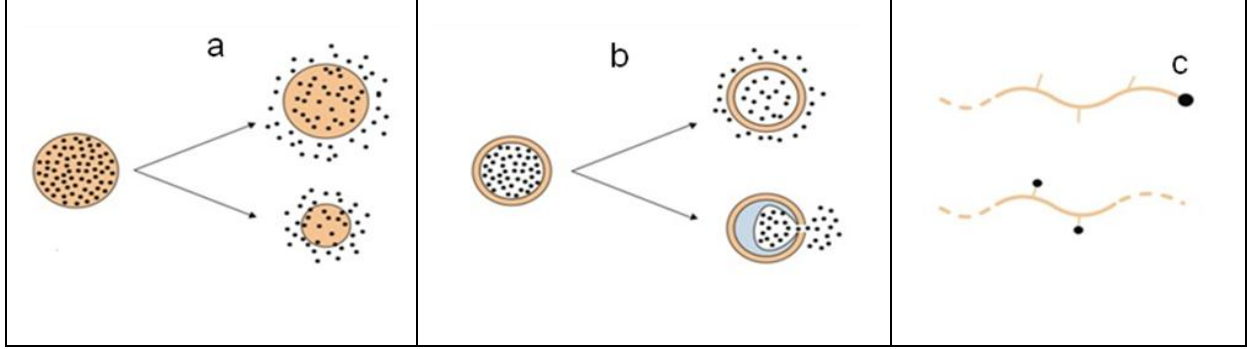
Son yıllarda nanoteknoloji alanındaki ilerlemelere paralel olarak, nano boyuttaki ilaç taşıyıcı polimerik parçacıklar artan bir ilgi görmektedirler. Uzun süreli ilaç tedavisi gerektiren kanser, diyabet gibi hastalıklarda kontrollü salım yapan ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanılması büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, çok çeşitli organik ve/veya inorganik malzemeler kullanılarak, çok farklı formlarda, örneğin zar, lif, tüp, mikro veya nano tanecik gibi şekillerde taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Bunların içinde de en büyük önemi, teşhis ve tedavi amaçlı tasarlanan mikro ve nano boyutta yapılan ve kanser ilacı içeren taşıyıcı sistemler taşımaktadır. Bu sistemler içlerine veya üzerlerine eklenecek farklı moleküller sayesinde ışığa veya manyetik alana da duyarlı hale getirilerek aynı anda hem teşhis hem de tedavi amacıyla kullanılabilirler.

İlaç taşıyıcı sistemler uygulama yerlerine göre sınıflandırılabilirler gibi etkin madde salım mekanizmalarına göre de iki şekilde sınıflandırılabilirler:

1) Difüzyon kontrollü sistemler (bu sistemler kütle ve membran sistemler olarak iki gruba ayrılabilirler).

2) Kimyasal parçalanma kontrollü sistemler (bu sistemler polimer zincirine bağlı ilacı kimyasal olarak kırılma neticesi ortama salarlar)

Difüzyon kontrollu sistemler etkin maddenin polimer matrisinden difüzlenererek çıkmasına, kimyasal parçalanma kontrollu sistemler ise ilacın bağlı olduğu polimerden koparak çıkmasına dayanır. Bu sistemler şematik olarak Şekil 2.2 de gösterilmiştir.



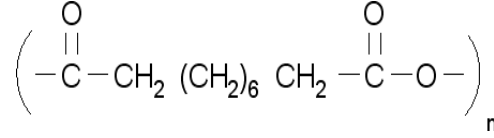
Şekil 2.2. Kontrollu salım sistemleri. a) Kütle difüzyon, b) Membran difüzyon, c) Kimyasal parçalanma

Kütle sistemleri mikro veya nano kürelerin içlerinin ilaç yüklenmesi ile, membran sistemleri ise ilacın kapsül gibi zarla kaplanması ile elde edilirler. Her iki sistemde de ilaç salımı, ortamda bulunan sıvının sisteme difüzyonu ve ilacı çözerek dışarı alması ile sağlanır. Ayrıca, bu sistemler pH veya sıcaklık duyarlı yapılabilirler ve ortamın şartlarına bağlı olarak şişme gösterebilir ve salım kinetiğini etkileyebilirler. Polimer zincirlerine bağlanan ilaçlar ise, hidrolitik ve enzimatik bozunmalar sonucu ortaya çıkarlar. Tüm sistemlerde önemli olan husus, kullanılan polimerlerin mutlaka biyouyumlu ve biyobozunur olması ve hiç bir yan etki yaratmadan vücut tarafından kolayca emilebilmesidir.

Günümüzde ilaç taşıma sistemlerinin gerekli hücreye, özellikle kanser hücrelerine aktif veya pasif olarak hedeflenmesi söz konusudur. Etkili bir pasif hedefleme için, taşıyıcı sistemin, nano parçacık olması yanı sıra, sıcaklık veya pH duyarlılığı gibi özelliklere de sahip olması avantaj sağlar. Bu nedenle, pH değerine duyarlı biyopolimerler, hedeflendikleri çevre şartlarına duyarlı ilaç taşıyıcı sistemlerin oluşturulmasında kullanılmaktadırlar.

Polianhidritler ve özellikle polisebasik anhidrit (PSA), kolay formülasyon, etkili ilaç yükleme, biyouyumluluk, biyobozunurluk, kontrollu kütle aktarımı gibi avantajlar nedeniyle ilaç taşıyıcı sistemlerin yapımında önem taşımaktadır (LEONG ve ark., 1985). PSA makromolekülünün tekrarlayan biriminin kimyasal yapısı Şekil 2.3' te verilmiştir. Polimerin ana zincir yapısında bulunan anhidrit bağları (-CO-O-CO-), sulu ortamda hidrolitik olarak

kırılarak iki karboksilik asit grubu yaratır. Böylelikle, başlangıçta katı olan polimer daha küçük ve çözünebilen parçacıklara ayrışır (LAURENCIN ve ark., 1990; MATHIOWITZ ve ark., 1992).



Şekil 2.3. Polisebasik anhidrit molekülünün tekrarlayan birimi

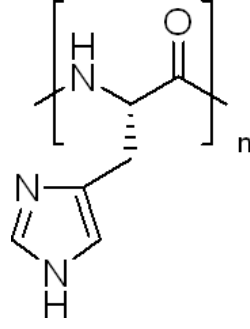
Polianhidritlerin biyobozunur ilaç taşıyıcı sistem yapımında kullanılabileceği ilk kez 1983 yılında Rosen ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir. (ROSEN ve ark., 1983). Daha sonra, 1990'larda, BCNU ilacını (Carmustine; 1,3-bis[2-chloroethyl]-1-nitro-sourea) taşıyıcı sistemlerin yapımında ve beyin tümörlerinin tedavisinde klinik olarak uygulanmıştır (BREM ve ark., 1995).

Polianhidritlerin bozunması yüzeysel olarak ve kontrollü olarak ilerler, buna bağlı olarak ilaç salım hızı değişir. Ayrıca onların sundukları degradasyon hızı pH düşürülerek azalmaktadır (FU ve ark., 2001). Polianhidrit yapımında kullanılan monomerin yapısını değiştirerek ve/veya kullanılan ko-polimerlerin oranını değiştirerek ilaç salım kinetiğini ayarlamak ve salım sürelerini günlerden aylara kadar uzayan bir sürece yaymak mümkün olabilmektedir (TAMADA ve ark., 1992). Bu nedenle, bazı bilim insanları alifatik ve bazıları aromatik yapıda olan yüzlerce farklı anhidrit hazırlamıştır. Ancak, bunların içinde sadece polisebasik anhidrit ve ondan hazırlanan türevleri kontrollü salım sistemlerinin tasarımında kullanılmaya başlanmıştır (KRASKO ve ark., 2003; ZHANG ve ark., 2004). Bazı sistemler FDA tarafından onaylanmıştır. Bunlardan biri, poli(1,3-bis-p-karboksifenoksi propan-ko-sebasik asit) (20:80 CPP:SA) kopolimeridir ve Carmustine ilacının beyin tümörü tedavisinde kullanılması için FDA tarafından onaylanmıştır (DANG ve ark., 1996; BREM ve ark., 1996).

Daha önce de bahsedildiği gibi farklı monomerler kullanılarak değişik kimyasal yapıda polianhidritler hazırlanabilir. Kimyasal yapının ve hazırlanış şartlarının kontrol edilmesi ile, hazırlanacak polianhidrit yapıların bozunma özellikleri ve buna bağlı olarak salım kinetikleri değiştirilebilir (KIPPER ve ark., 2002; SHEN ve ark., 2002; PFEIFER ve ark., 2005). Etkin madde içeren taşıyıcı sistemlerin diğer bir önemli uygulaması ise şeker hastalığının tedavisinde kullanılan insülin salımını gerçekleştirilmesidir. Bu amaca yönelik olarak, Furtado fumarik asit ile kopolimerleştirilmiş PSA türevlerini, insülin salımı için kullanmıştır (FURTADO ve ark., 2008). Diğer bir çalışmada, ciprofloksacin (CIP) ilacının kısa süreli salımı amacıyla kullanılan osmotik pompa implantında tüp şeklindeki poli(glisero1-kosebasik asit) polimeri kullanılmış, sistemde yaratılan bir mikro açıklık aracılığıyla kontrollu salım sağlanmış ve açıklık büyüklüğünden bağımsız olarak, sıfırıncı derece salım kinetiği gözlemlendiği rapor edilmiştir (TOBIAS ve ark., 2010).

Farmasötik uygulamalardaki son gelişmeleri göz önünde bulundurursak, ilaç taşıma sistemlerindeki özgün yaklaşımlar, özellikle kanser hücrelerine hedeflenen ilaç salımına yönelik yeni sistemlerin geliştirilmesi yönündedir. Bu nedenle, etkin terapi için, taşıyıcının kimyasının yanı sıra, tümöre hedeflilik, sıcaklık veya pH'a duyarlılık gibi kriterler de önem taşımaktadır. 2010'da Zhao ve ekibinin yaptığı çalışmada, PSA-poli(etilen glikol)-karboksifenoksi propan kullanılarak yapılmış terpolimerin sıcaklığa duyarlı olduğu, Doksorubisin kanser ilacı içeren terpolimer misellerinden ilaç salımının sıcaklıkla değiştiği belirtilmiştir (ZHAO ve ark., 2010).

Kanın normal pH değeri 7.4 civarında sabit iken, kanser hastalarında tümör hücrelerinin ölçülen pH değerlerinin asidik bölgeye kaydığı ve 4,7 - 5,5 aralığında olduğu gözlemlenmiştir. Tümöre bağlı bu tür pH değişimi, asiditeye duyarlı sistemlere yüklenen kanser ilaçların tümör dokusunda seçici salımı için ideal bir tetikleyici olarak kabul edilmiştir. Örneğin, poli(L-histidin), histidin monomerlerindeki imidazol gruplarının protonlanmasıyla, asiditeye bağlı hücre zarı füzyonuna uğrayan bir poliamino asittir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Poli(L-histidin) kimyasal yapısı

Yapıdaki imidazol gruplarının pKa değeri yaklaşık 6 civarındadır ve aminoasit molekülünün genel pKa değeri 6,5'tir. Böylece, pH'nın 6'dan düşük olduğu ortamlarda imidazol halkası büyük ölçüde protonlanır ve bu nedenle polihistidin endozomal hücre zarından geçiş özelliği kazanır. Kanser tümör bölgelerinde pH değerinin asidik bölgede olduğu göz önüne alınırsa, poli(L-histidin) temelli bir polimerik sistemin kanser tedavisinde kullanılabileceği, kanser ilaçların hücre içine geçişi ve sitozolik iletiminin olabileceği ve bu yolla tedavinin çok etkin hale getirilebileceği öngörülebilir. Ancak, sentez sırasında poli(L-histidin)'in moleküler ağırlık kontrolünün zor olması ve organik çözücülerde yüksek moleküler ağırlıklı olan polimerlerin çözünürlüğünün çok düşük olması gibi faktörler, poli(L-histidin) bazlı ilaç taşıyıcı sistemlerin üretimini ve kullanımını kısıtlamaktadır.

Histidin ağırlıklı peptit yapılarının, pH değerinin 6.4 civarında olduğu durumlarda hücre membranı içine geçme potansiyelini ve etkinliğini incelemek amacıyla, DNA-poli(lizin) kompleks katyonik yapıları histidinlenmiş ve insan hücre kültürü üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Yaklaşık 100 nm boyutlarındaki histidinlenmiş poli(lizin)lerin transfeksiyon miktarının histidinlenmemiş olanlara nazaran 3-4 kat arttığı rapor edilmiştir (BELLO ve ark, 2001). Başka bir çalışmada, DNA taşımak amacıyla poli(L-histidin) ve poli(L-lizin) graft kopolimeri kullanılmış ve üretilen sistemin 293T hücrelerinde transfeksiyonu arttırdığı gözlemlenmiştir (BENNS ve ark., 2000). Lee ve ekibinin 2003 yılında gerçekleştirdiği bir çalışmada da, poli(L-histidin)-poli(etilen glikol) diblok kopolimeri kullanılarak pH-duyarlı miseller hazırlanmış ve pH değerinin 7,2'nin altında olduğu ortamlarda misel kararlılığının azaldığı, bu nedenle de oluşturulan sistemin, asidik olduğu bilinen katı tümörlerin tedavisinde uygulanabileceği belirtilmiştir (LEE ve ark., 2003-a). Poli(L-histidin), poli(etilen glikol) ve

poli(L-laktik asit) kopolimerinden oluşan yeni bir pH-duyarlı misel sistemi de aynı grup tarafından hazırlanmış ve bu sistemlerin bir kısmına folat bağlanarak ilaç salımı incelenmiştir. In vitro deneyler sonucunda, folat bağlanmış misellerde görülen ilaç salımının daha hızlı olduğu ve bu sistemin folat reseptörü içeren tümör hücrelerinin yok edilmesinde oldukça etkin olduğu gösterilmiştir (LEE ve ark., 2003-b). Başka bir çalışmada, poli(L-histidin) - poli(etilen glikol) - folat ve poli(L-laktik asit) - poli(etilen glikol) - folat blok kopolimerleri karışımından misel yapısı oluşturulmuş ve PHSM/f olarak adlandırılan bu yapılardan Doksorubisin kanser ilacının salımı gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda, katı tümör hücreleri içerisindeki kanser ilacı birikme oranının, serbest kanser ilacı verilen örneklerdekine göre 20 kat fazla olduğu saptanmıştır. Bu nedenle, PHSM/f sisteminin, ilaç direnci yüksek tümör tedavisinde etkin olabileceği öngörülmüştür (LEE ve ark., 2005). Aynı grubun başka bir çalışmasında, poli(histidin-fenilalanin) - poli(etilen glikol) ve poli(L-laktik asit) - poli(etilen) glikol - folat kopolimerleri karışımından miseller oluşturulmuş, deneysel araştırmalarla belirlenen optimum kopolimer oranları kullanılarak hazırlanan misel yapılardan endozomal pH'ta Doksorubisin salımı incelenmiştir. Araştırma sonunda, Doksorubisin yüklenmiş misellerin Doksorubisin dirençli tümör hücrelerinde bile tümör yok edici özellik sergilediği rapor edilmiştir (KIM ve ark., 2008).

Polihistidin pH duyarlılık özelliği gözlenmiştir ve polihistidin değişik polimerler ile farklı kombinasyonları hazırlanarak ilaç taşıyıcı sistemleri yapılmıştır. Ancak, polihistidin, bozunması yüzeyden başlayarak kontrollü ilerleyen ve biyoyumlu bir polimer olan polisebasik asit ile birlikte kullanılmamıştır. Bu çalışmada, polisebasik asidin monomerinden başlayarak sentezlenmesi, nanopartikül yapımında kullanılması yanı sıra bu sistemlerin polihistidin ile pH duyarlı yapılması planlanmıştır.

2.2 Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı, kanser tedavisinde kullanılmak üzere, kontrollü ve hedeflenmiş ilaç salımı yapabilecek pH duyarlı polimerik nanoküre ilaç taşıyıcı sistemler geliştirmektir.

Kanser ilacı taşıyan sistemleri yapmak amacıyla polisebasik anhidrit (PSA) sentezlenmiş ve nanoküre yapımında kullanılmıştır. Nanokürelerin yapımında uygulanan şartlar (çözücü ve sürfaktan tipi, polimer derişimi ve molekül ağırlığı gibi) değiştirilerek elde edilen nanokürelerin homojen olması sağlanmış ve hazırlama şartları optimize edilmiştir. Doksorubisin kanser ilacı yüklenerek hazırlanan nanokürelerin dış yüzeyleri, pH değişimine duyarlı bir biyopolimer olan polihistidin ile kaplanmıştır. Bunun amacı, pH değeri asidik bölgeye kayan tümör bölgesinde ilaç etkinliğini arttırabilmektir. Ayrıca polysebasik anhidritin düşük pH değerlerinde uzun süreli bozunmasından faydalanarak (FU ve ark., 2001), tümör bölgesinde kontrollü, uzun süreli ve etkin salım elde edilmesi amaçlanmıştır.

Bilindiği gibi, kanser ilacı olarak kullanılan kimyasalların yan etkileri oldukça fazladır ve bundan kurtulmak için, ilacı az miktarda ve etkin kullanmak gerekmektedir. Bunun için önerilen metod, ilacın tümör bölgesine hedeflenmesi ve böylece vücudun sağlıklı bölgelerine dağılmadan sadece tümör bölgesinde etkin olmasıdır. Tümör bölgesinin pH ve sıcaklığının diğer sağlıklı dokulara göre farklı olması, bu parametrelere duyarlı sistemlerin tedavi amacıyla kullanılmasına olanak sağlamaktadır.

Hazırlanan PSA bazlı ve histidin kaplı nanokürelerden ilaç salımı, farklı pH tampon ortamlarında (pH 4; 7.4 ve 10) kullanılarak optimize edilmiştir. Nanoparçacıkların kimyasal ve fiziksel yapıları, Fourier dönüştümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), dinamik ışık saçılım spektrometresi (DLS), ultraviyole ve görünür ışık absorpsiyon spektroskopisi (UV-VIS), parçacık boyut ölçücü (PA) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edilmiştir.

2.3 Çalışmanın Özgün Değeri

Terapi amacıyla kullanılan etkin maddelerin vücutta en yüksek etkiyi göstereceği bölgede salımının sağlanması farmasötik teknoloji alanında dozaj formlarının tasarımındaki en önemli noktalardan birisidir. Etkin maddenin sistemik absorpsiyonu ve biyolojik etkinliği, farmakolojik yanıtın en yüksek olduğu bölgeye hedeflenmiş dozaj şekilleri ile artırılmakta ve oluşabilecek yan etkileri azaltılmaktadır. İstenilen bölgeye, özellikle kanser hücrelerine hedeflenen ilaç taşıyıcı sistemler, tümöre özgü çeşitli lokal hastalıkların tedavisini ve etkin maddenin sistemik emilimlerini sağlarlar. Etkin maddelerin hücreye hedeflendirilmesi için ilaçların sıcaklığa veya pH değerlerine duyarlı polimerlerle kaplanması özellikle kanser tedavisinde etkin rol oynamaktadır. Bu güne kadar geliştirilen polihistidin bazlı pH duyarlı taşıyıcı sistemler, polihistidin'in piyasadaki fiyatından dolayı çok yüksek maliyetlerle hazırlanabilmektedir. Ayrıca, bu sistemlerde görülen pH duyarlı salım, poli(anhidrit) sisteminde görülen ve yüzey bozunmasına bağlı olan kontrollü salıma göre oldukça hızlıdır.

Bu çalışmadaki özgünlük, ilaç taşıyıcı nano sistemin ana kısmının düşük maliyetli ve asidik koşullarda uzun süre salım sağlayabilecek olan PSA polimerinden oluşturulması; bu nanokürelerin etrafının ince bir polihistidin tabakası ile kaplanarak pH duyarlı yapılması, ve böylece hem ekonomik hem de etkin bir kanser ilacı taşıyıcı nano sisteminin elde edilmesidir. Polihistidin temelli sistemlerin endositoz yoluyla hücre içine alınma özelliği olduğu bilinmektedir. Literatürde, kanser ilaçlarının polihistidin molekülüne kovalent bağlandığı ve hedefleme amacıyla kullanıldığını gösteren makaleler bulunmaktadır. Ancak, bu sistemler ilaçların kontrollü ve uzun süre salımını sağlayamamaktadırlar.

Yaptığımız araştırmalara göre, PSA bazlı nanoküre ilaç taşıyıcı sistemlerin polihistidin ile kaplanarak pH duyarlı hale getirilmesi konusunda daha önce yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. PSA nanokürelerin üzerindeki ince polihistidin tabakası, nanotaneciklerin kanser hücresi civarında etkin salım yapmasını sağlamak amacıyla kullanılmıştır. Asidik ortamda protone olan polihistidin, ilaç yüklü nanoküreleri de hücre içine taşıyacaktır. Böylece, ilaç içeren PSA nanoküreler hücre içine alınabilecek ve kontrollü salım hücre içinde

gerçekleştirebilecektir. İlaç içeren taşıyıcıların nano boyutta hazırlanması, bu sistemlerin hücre içine kolay girebilmesi yönü ile projeye uygulanabilirlik açısından özgünlük katmaktadır. Hidrofilik kanser ilaçları ile yüklenmiş olan pH duyarlı nanoküreler, fiziksel ve kimyasal analizleri yapıldıktan ve optimize edildikten sonra, içlerine yüklenen Doksorubisin ilacının salım kinetikleri farklı pH ortamlarında incelenmiştir.

Bu projenin kapsamı, verildiği hali ile pH duyarlı PSA nanoküre sentezi ile kısıtlıdır. Proje sunumunda belirtilen nanoküreler başarı ile hazırlanmıştır ve değişik pH ortamlarında sistemlere yüklenen Doksorubisin ilacının salımı incelenmiştir.

Şu anda, öğrencimiz Oslo Üniversitesinde (Norveç) bulunmaktadır, ve Oslo Üniversitesinde Kanser Araştırma Birimi ile birlikte yürütülmekte olan çalışmalarımızda, bu proje kapsamında elde edilen PSA nanokürelerin, in vitro ve in vivo uygulamaları devam etmektedir.

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Malzemeler

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar ve bu kimyasalların alındığı firmalar Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1 Kimyasallar ve alındıkları firmaların listesi

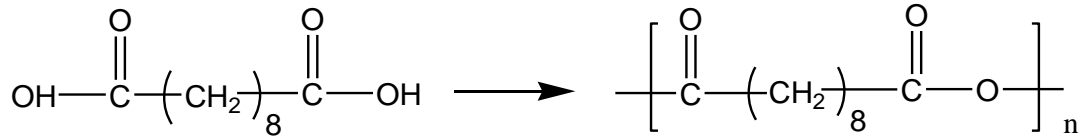
KİMYASAL	FİRMA
Sebasik asit (SA)	Fluka (ABD)
Asetik anhidrit	Merck (Almanya).
Etil eter	Sigma-Aldrich Chemie (Almanya)
Petrol eteri	Sigma-Aldrich Chemie (Almanya)
Poli(vinil alkol) (PVA)	Fluka (ABD)
Doksorubisin	Sandoz (Türkiye)
Polihistidin	Sigma-Aldrich Chemie (Almanya)
Hidroklorik asit (HCl)	R&D Systems (ABD)
Sodyum hidroksit (NaOH)	J.T. Baker (Hollanda)
Diklorometan	Sigma-Aldrich Chemie (Almanya)
Tween 80	Across (Belçika)
Etil asetat	Sigma-Aldrich Chemie (Almanya)
Poli(vinil pirolidon)	Across (Belçika)

3.2 Yöntem

3.2.1 Polimer Sentezi

Polisebasik anhidrit sentezi, sebasik asit ve asetik anhidrit kullanılarak azot gazı ortamında yapılmıştır. Karışım, döngülü buharlaştırıcı reaktör içinde 140°C sıcaklıkta 30 dakika ısıtılmıştır. Reaksiyon sırasında oluşan asetik asit, döngülü buharlaştırıcı yardımı ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan sebasik anhidrit oligomerleri, saflaştırma amacıyla diklorometan içinde çözülmüş ve daha sonra 1:1 oranında hazırlanan etil eter ve petrol eteri karışımına alınarak çökertilmiştir. Elde edilen saf prepolimer, vakum altında ve 180°C'de kondensasyon polimerizasyonuna tabi tutulmuştur. Sebasik asitin polimerleşme reaksiyonu Şekil 3.1 de gösterilmiştir.

Polimerleşme süresi, polimerin molekül ağırlığında etkin bir parametredir. Dolayısıyla, polimerleşme süresinin etkisini görebilmek amacıyla reaksiyonlar aynı şartlarda ve iki zaman aralığında yürütülmüştür. Sürenin 90 dakika olduğu durumda düşük molekül ağırlıklı polimer (Mw=2500) ve 180 dakika olduğu durumda yüksek molekül ağırlıklı polimer (Mw= 4600) elde edilmiştir. Literatürde verilen sonuçlara göre, yüksek moleküler ağırlıklı polianhidritlerin biyobozunmaları, düşük molekül ağırlıklı olanlara göre daha yavaş bir hızla gerçekleşmekte ve bu süre 1 ila 6 ay arasında değişmektedir (DOMB, 1987). Bu verilere dayanarak, projenin kısa süresi içinde hızlı sonuç alabilmek ve salım profillerini hızla inceleyebilmek için, bu çalışma kapsamında düşük molekül ağırlıklı PSA seçilmiş ve nanoküre yapımında kullanılmıştır.



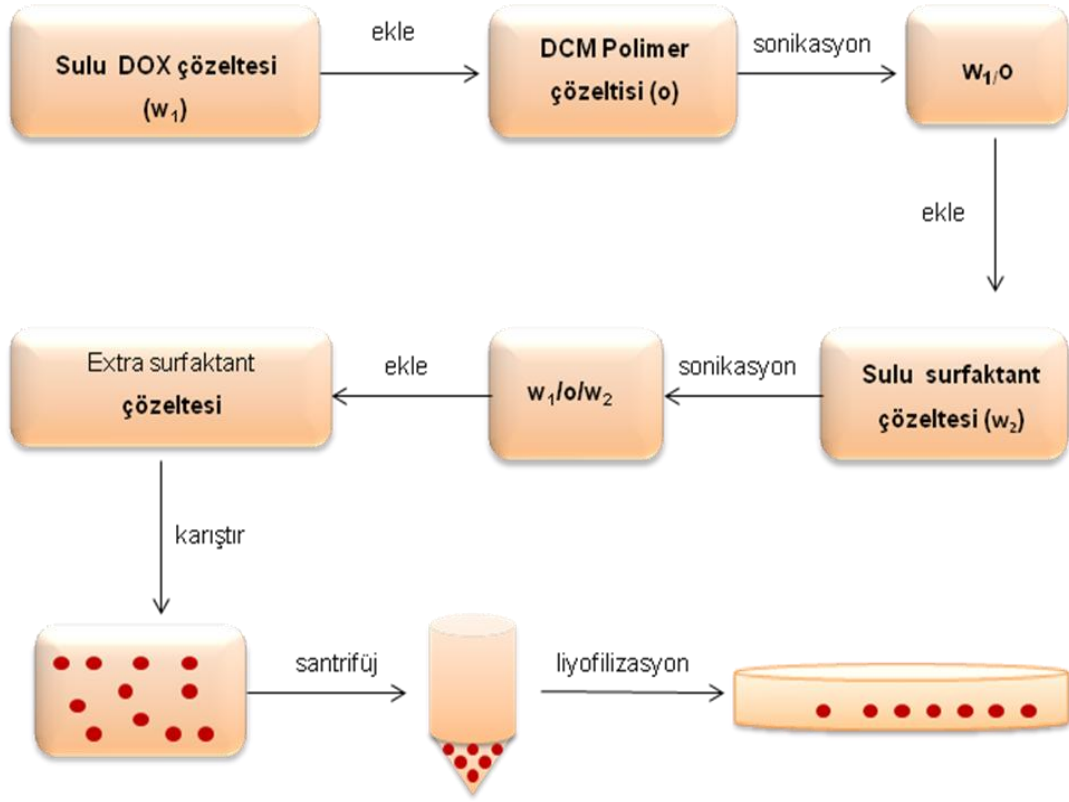
Şekil 3.1. Sebasik asitin polimerleşme reaksiyonu

3.2.2 İlaç içeren nanokürelerin hazırlanması

Kanser ilacı olarak seçilen Doksorubisin içeren PSA bazlı nanoküreler çift emülsiyon polimerleşme yöntemiyle hazırlanmıştır. Bu amaç için, Doksorubisin çözeltisi (2 mg Doksorubisin 1 mL distile su içinde), diklorometan içinde hazırlanan PSA çözeltisi (20 mg veya 50 mg ilaç 4.5 mL diklorometan içinde) ile karıştırılmış ve 100 W güçteki prob sonikasyonu ile 30 saniye boyunca emülsifiye edilmiştir. Organik fâz içinde su damlacıkları içeren ilk emülsiyon 'w₁/o' olarak ifade edilmiştir. Bu emülsiyon, içinde yüzey aktif madde (sürfaktan) bulunduran ikinci su fâzına eklenerek su/organik fâz/su ortamı elde edilmiştir. Bu sistem 'w₁/o/w₂' olarak gösterilmiştir. Organik çözücü, manyetik karıştırıcıyla 3 saat boyunca hızlı şekilde karıştırılarak buharlaştırılmış ve ortamdaki ayrıştırılmıştır. Çözelti 13000 rpm hızda 15 dakika santrifüj yapılarak katılmış nanoküreler toplanmış, ultra saf su ile en az 4 kez yıkanmış ve en son dondurarak-kurutma (liyofilizasyon) yöntemiyle ortamda bulunan su alınmıştır. Nanokürelerin en homojen boyutta elde edilmesi için farklı sürfaktanlar, çözücüler, ve farklı molekül ağırlıkta ve derişimde PSA polimerleri kullanılmıştır. Kullanılan kimyasallar ve özellikleri Tablo 3.2'de verilmiştir. PSA nanotaneciklerin hazırlanışı şematik olarak Şekil 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Nanokürelerin hazırlanmasında değişen parametreler

Parametreler	Değişiklikler
Sürfaktan tipi	Polivinil alkol (PVA) Polivinil pirolidon (PVP) Tween 80 (T80)
Polimer derişimi (mg/mL)	4 10
Polimer molekül ağırlığı	2500 4600
Çözücü tipi	Diklorometan Kloroform Benzil alkol Etil asetat



Şekil 3.2. Çift emülsiyon yöntemi ile ilaç içeren nanokürelerin hazırlanması

3.2.3 pH duyarlı nanokürelerin hazırlanması

Hazırlanan nanoküreleri pH duyarlı yapmak amacıyla, 20 mg PSA nanotaneçikleri tartılmış ve asitli ortamda (pH ~ 4) hazırlanmış 10 mL polihistidin çözeltisine eklenmiştir. Ortamda serbest kalan polihistidin çökene kadar ortama NaOH (0.01 M) çözeltisi eklenmiştir. Polihistidin ile kaplanmış olan nanoküreler santrifüj yapılarak toplanmış ve en az 2 kez ultra saf su ile yıkanmıştır. Son olarak, nanoküreler liyofilizasyon yöntemiyle kurutulmuş ve sudan arındırılmıştır.

3.3 Karakterizasyon

Tüm hazırlanan monomer, polimer ve nanotaneçiklerin değişik özellikleri aşağıda belirtilen farklı teknikler ile incelenmiştir.

3.3.1 PSA karakterizasyonu

3.3.1.1 PSA'nın kimyasal analizi

Proje kapsamında sentezlenen sebasik anhidrit monomeri ve polimerlerinin kimyasal yapıları Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) (PerkinElmer, ABD) ve dötoryumlanmış kloroform içinde çözülen hidrojen-nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (H-NMR) (Bruker, Almanya) yöntemleri ile incelenmiştir.

3.3.1.2 PSA'nın moleküler ağırlık analizi

Sentezlenen polimerlerin moleküler ağırlıkları polimerlerin tetrahidrofüran içinde çözülen ve 1 mL/dk akış hızı ile, 30 °C de jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) cihazından (PL-GPC 220, ABD) geçirilmesi ile elde edilmiştir. Deney sırasında polisitiren standart kalibrasyon molekülü olarak kullanılmıştır.

3.3.2 Nanokürelerin karakterizasyonu

3.3.2.1 Taramalı Elektron Mikroskopisi

Hazırlanan polisebasik anhidrit bazlı nanokürelerin boyut ve yapıları, taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizi ile belirlenmiştir. SEM analizine hazırlamak amacıyla, Doksorubisin yüklenmiş nanoküre çözeltilerinden 50 µL karbon bantlar üzerine konulmuş ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra altın ve paladyum ile kaplanan örneklerin SEM mikrografları alınmıştır.

3.3.2.2 Parçacık Boyutu Analizi

PSA bazlı nanokürelerin parçacık boyutları, lazer ışınli parçacık boyut analiz cihazı (Malvern Nano ZS90, İngiltere) kullanılarak belirlenmiştir. Bunun için nanoküreler sulu ortamda süspansiyon edilerek cihaza konulmuş ve boyut dağılımı ile ortalama boyut ölçüleri bulunmuştur.

3.3.2.3 Histidin kaplı nanokürelerin analizi

Hazırlanan nanoküreler, pH duyarlı sistem hazırlamak amacıyla polihistidin ile kaplanmıştır. Histidin kaplı nanoküreler FTIR spektroskopisi (PerkinElmer, ABD) ile incelenmiştir. Bu amaç için, PSA nanoküreleri, saf polihistidin ve polihistidin ile kaplanmış olan PSA nanokürelerin FTIR spektraları alınmış ve birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Bu analizlerde, kaplanmamış nanoküreler ve polihistidin kontrol grupları olarak kullanılmıştır.

3.3.3 Doksorubisin (DOX) çalışmaları

PSA nanokürelerin enkapsülasyon verimi ve salım profilleri Doksorubisin (DOX) kanser ilacı kullanılarak çalışılmıştır.

3.3.3.1 Doksorubisin enkapsülasyon verimi

PSA nanoküreler içine yüklenen Doksorubisin için enkapsülasyon verimini hesaplamak amacıyla, ilk başta konulan ilaç miktarı (2 mg Doksorubisin 1 mL distile su içinde) ve nanokapsül hazırlanması sonrası elde edilen çözeltideki Doksorubisin miktarı (organik faz vapore edilip nanoküreler ayrıldıktan sonra kalan sulu fazdaki Doksorubisin miktarı), ultraviyole spektrofotometresi ile (Molecular Devices, ABD) 485 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Enkapsülasyon verimi aşağıda verilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{İlaç Enkapsülasyon verimi (EE\%)} = \{ (I_b - I_s) / I_b \} \times 100$$

Bu denklemde, I_b başlangıç ilaç miktarını, I_s çözeltide kalan ilaç miktarını ve $(I_b - I_s)$ nanoküreler içinde enkapsüle olan ilaç miktarını göstermektedir.

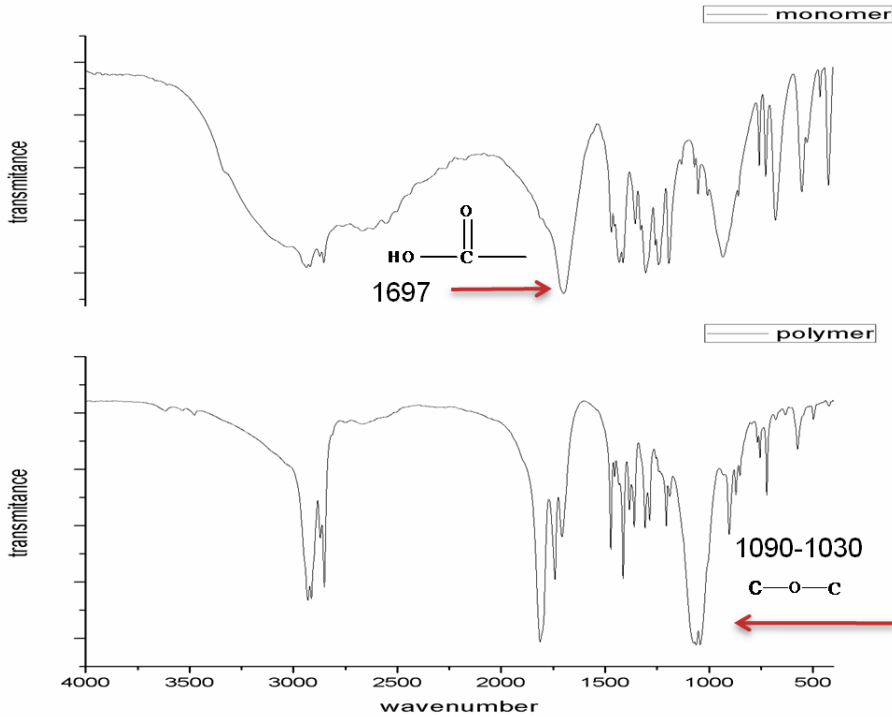
3.3.3.2 In situ Doksorubisin salımı

PSA nanokürelerden Doksorubisin salım profilleri fosfat tampon çözeltilerinde in situ olarak incelenmiştir. Bu amaçla, 5 mg pH duyarlı nanopartikül 0,5 mL distile suda suspansiyon haline getirilmiş ve diyaliz membranlar içine konulmuştur. pH duyarlı nanoküreleri içeren diyaliz membranlar, farklı pH değerlerinde olan 4.5 mL fosfat tampon çözeltileri (PBS) içine (0,1 M, pH 4, 7.4 ve 10) konularak 37°C de inkübe edilmiştir. Çeşitli zaman aralıklarında (1, 2, 3 ve 12 saatte bir) çözeltilerden 0.5 mL alınmış, yerine aynı miktarda taze PBS eklenmiştir. Salınan ilaç miktarı, ultraviyole spektrofotometresi ile (Molecular Devices, ABD) 485 nm dalga boyunda saptanmıştır. Absorpsiyon ve ilaç konsantrasyonu bağlantısını verecek şekilde hazırlanan kalibrasyon eğrisi kullanılarak (Şekil 4.6) ortamdaki Doksorubisin miktarı hesaplanmıştır. Salım deneyleri üçer kez tekrar edilmiş ve ortalama değerler alınmıştır.

4 BULGULAR VE TARTIŞMA

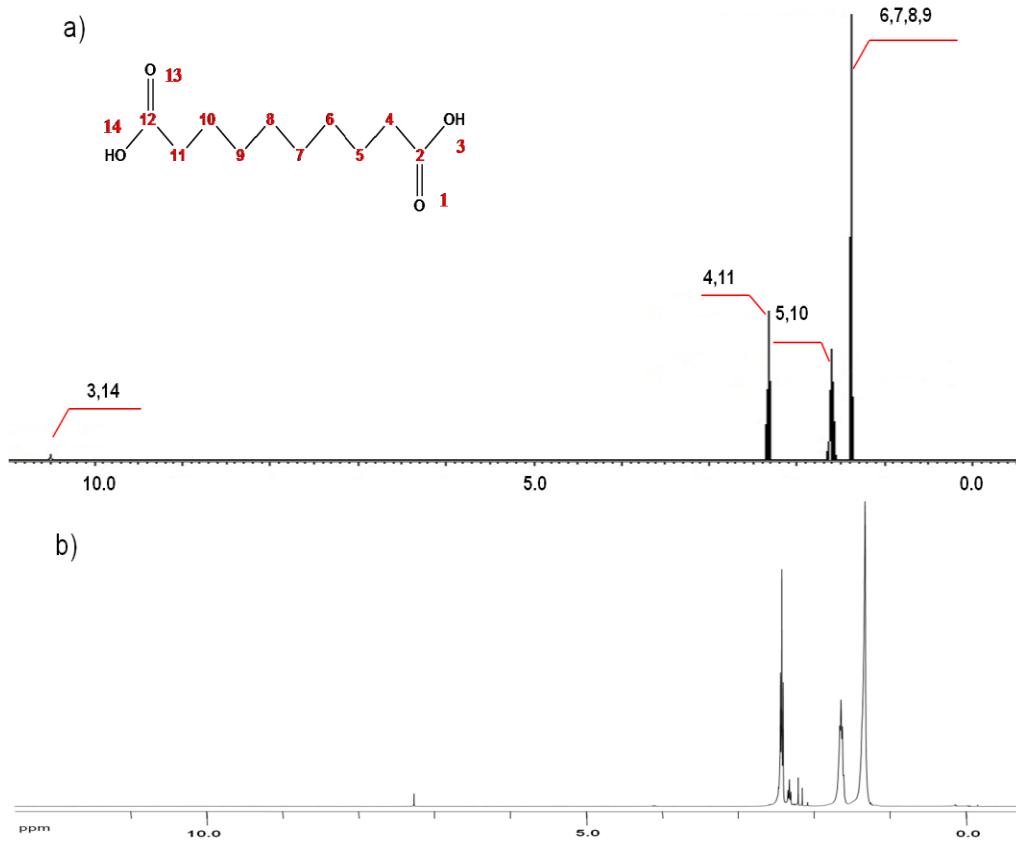
4.1 Polimer karakterizasyonu

Bu çalışmada kullanılan sebasik asit ve polisebasik anhidrit için elde edilen FTIR spektrası Şekil 4.1’de verilmiştir. Sebasik asit spektrumunda, karboksilik grubuna ait olan ve O-H gerilmesinden kaynaklanan keskin pikler, 1697, 1300 ve 930 cm^{-1} ’de gözlenmiştir. Polimerlerin spektrumunda ise, O-H gerilmesine ait pik gözlenmemekte, ancak C-O-C (anhidrit) gerilmesine ait olan pikler 1090-1030 cm^{-1} arasında belirgin olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, 1732 cm^{-1} ’de ortaya çıkan etkin pik ester grubunun oluşumunu açıkça belirtmiştir. Bu pikler polimerleşmenin gerçekleştiğinin kanıtıdır. 2924 cm^{-1} ve 2853 cm^{-1} ’de gözlenen pikler, $-\text{CH}_2$ grubunun gerilme titreşimine aittir.



Şekil 4.1. SA monomeri ve PSA polimerinin FTIR spektrası

Sentezlenen polimerin H-NMR spektrumu ve değerleri, 'İnsan Metabolom Veritabanı'ndan (Human Metabolome Database), referans olarak seçilen sebasik asitin H-NMR spektrumu ile karşılaştırılmıştır (www.hmdb.ca/search/search?query=sebacic+acid). Bu spektrumlar Şekil 4.2'de verilmiştir. Literatürden bilindiği üzere, monomerik sebasik asit için verilen numaralamada, 3 ve 14 numaralı olan –OH gruplarına ait bantlar 10.49 ppm olarak gözlenmiştir. Monomer ve polimerlerin H-NMR spektrumları karşılaştırıldığında, monomerde var olan –OH gruplarına ait bantların (10.49 ppm'deki bantlar), PSA polimerlerinde yok olduğu görülür ve bu durum –OH gruplarının polimerleşme reaksiyonuna girdiğini ve polimerin başarılı bir Şekilde sentezlendiğinin göstergesidir .



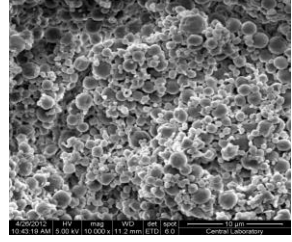
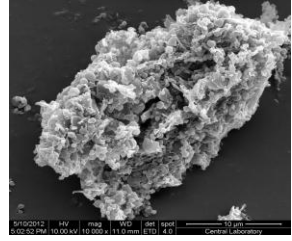
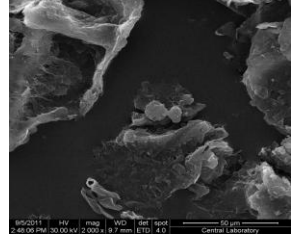
Şekil 4.2. H-NMR spektrumları, (a) Sebasik asit, (b) Polisebasik anhidrit

4.2 Nanokürelerin karakterizasyonu

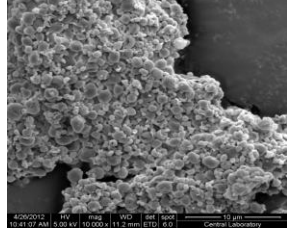
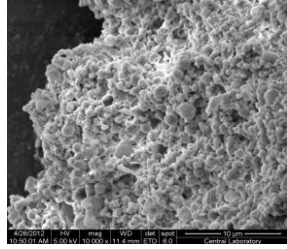
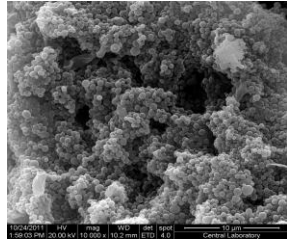
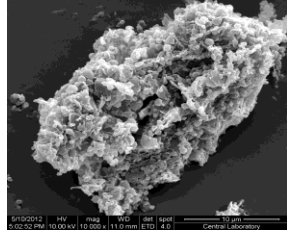
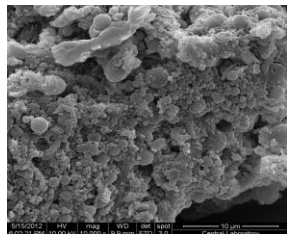
Polisebasik asit kullanılarak sentezlenen kürelerin nano boyutta, düzgün şekilde ve homojen dağılımda hazırlanabilmesi için çok sayıda deney yapılmıştır. Bu amaç için, değişik çözücüler, farklı sürfaktanlar, polimerin farklı moleküler ağırlıkları ve değişik derişimleri kullanılmıştır (Tablo 3.2).

Polimerizasyon ortamına 50 mg polimer konularak hazırlanan ve sadece çözücü tipi değiştirilerek (sürfaktan ve polimer ağırlığı sabit tutularak) elde edilen kürelerin hazırlanış şartları ve SEM mikrografları Tablo 4.1’de; ortama 20 mg polimer konularak hazırlanan ve çözücü tipi sabit tutularak (sürfaktan tipi ve polimer moleküler ağırlığı değiştirilerek) elde edilen kürelerin hazırlanış şartları ve SEM mikrografları Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Nanokürelerin sabit PSA derişiminde hazırlanış parametreleri ve SEM mikrografları

Sample	Hazırlanış parametreleri	SEM mikrografları
P1D	Polimer: 50 mg Çözelti: Diklorometan Sürfaktan 1: PVA (4% w/v) Sürfaktan 2: PVA (1% w/v) Polimer Mw: 2500	
P1E	Polimer: 50 mg Çözelti: Etil asetat Sürfaktan 1: PVA (4% w/v) Sürfaktan 2: PVA (1% w/v) Polimer Mw: 2500	
P1C	Polimer: 50 mg Çözelti: Kloroform Sürfaktan 1: PVA (4% w/v) Sürfaktan 2: PVA (1% w/v) Polimer Mw: 2500	

Tablo 4.2. Nanokürelerin sabit çözelti ortamında hazırlanış parametreleri ve SEM mikrografları

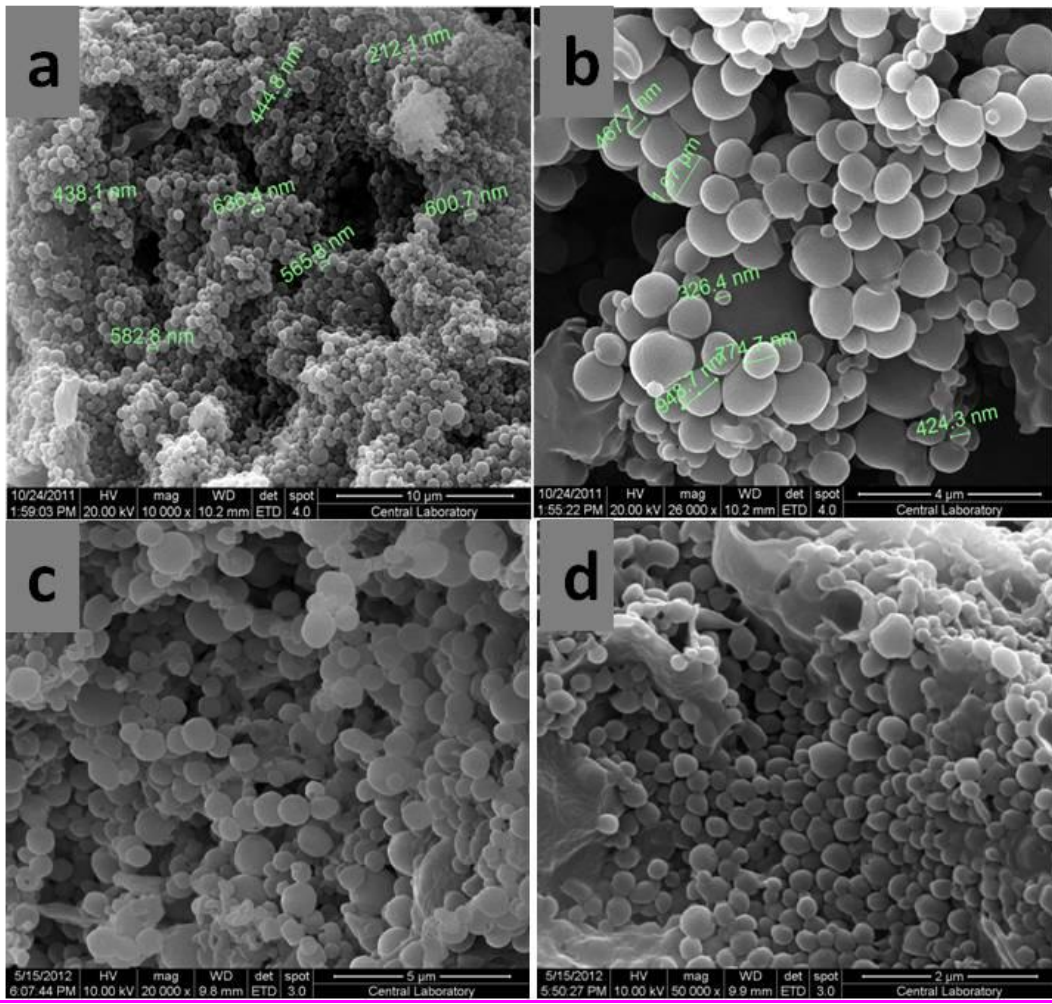
Sample	Hazırlanış parametreleri	SEM mikrografları
P2PVA1	<p>Polimer: 20 mg Çözelti: Diklorometan Sümfaktan 1: PVA (1% w/v) Sümfaktan 2: PVA (1% w/v) Polimer Mw: 2500</p>	
P2PVA4	<p>Polimer: 20 mg Çözelti: Diklorometan Sümfaktan 1: PVA (4% w/v) Sümfaktan 2: PVA (1% w/v) Polimer Mw: 2500</p>	
P2T4	<p>Polimer: 20 mg Çözelti: Diklorometan Sümfaktan 1: T80 (4% w/v) Sümfaktan 2: T80 (1% w/v) Polimer Mw: 2500</p>	
P2PVP4	<p>Polimer: 20 mg Çözelti: Diklorometan Sümfaktan 1: PVP (4% w/v) Sümfaktan 2: PVP (1% w/v) Polimer Mw: 2500</p>	
P2PVA4M	<p>Polimer: 20 mg Çözelti: Diklorometan Sümfaktan 1: PVA (4% w/v) Sümfaktan 2: PVA (1% w/v) Polimer Mw: 4600</p>	

Hazırlanan nanokürelerin arasında en düzgün ve homojen dağılım, çözelti olarak diklorometan, ve sürfaktan olarak T80 kullanılan (Tablo 4.2 de P2T4 kodlu örnek), veya PVA kullanılan ve sürfaktan miktarının % 4 olduğu ortamlarda (Tablo 4.2 de P2PVA4 kodlu örnek) elde edilmiştir.

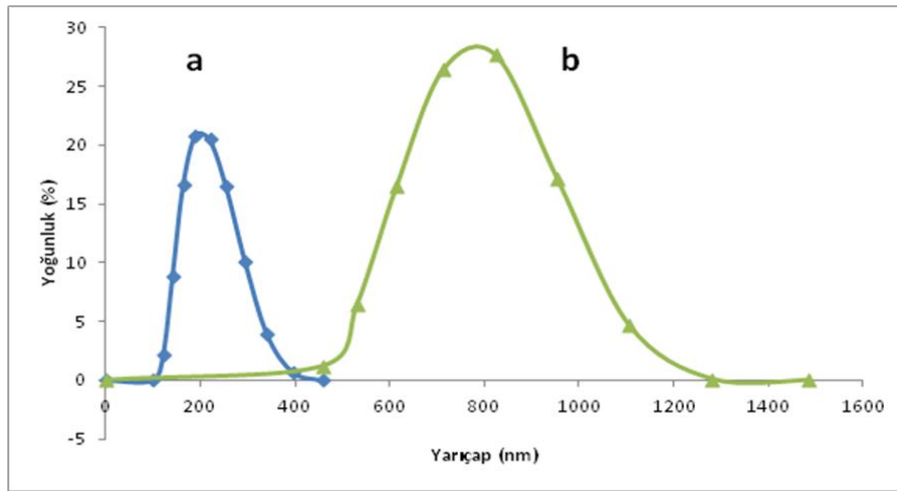
P2T4 ve P2PVA4 örneklerinin düzgün küre şekillerini ve homojen dağılımını daha net gösteren SEM fotoğrafları Şekil 4.3 de verilmiştir. Bu sonuçlar, PVA ve T80 sürfaktanlarının, sulu ortamda polimerin dağılımını çok daha iyi sağladığının bir göstergesi olup, sürfaktanların polimerik nanoküre yüzeylerini tamamen kaplaması ve nanokürelerin birleşmelerini engellemesi olarak açıklanabilir. Diğer taraftan, PVP kullanıldığında nano taneciklerin birbirine yapıştığı gözlenmiştir. Literatürde, PVP'nin genellikle metal bazlı olan nano taneciklerin hazırlanması için tercih edildiği bildirilmektedir (SHAO ve ark., 2006; WANG ve ark., 2005).

Bu çalışmada en iyi sonuçlar çözelti olarak diklorometan kullanıldığında elde edilmiştir. Bu sonuç, diklorometanın hızlı buharlaşması sonucu nanokürelerin oldukça hızlı bir şekilde katılaşması ve biraraya gelmeden düzgün küre oluşumunun sağlanması olarak açıklanabilir. Hızla katılaşan (solidified) polimerik küreciklerin küme oluşturması ve yapışması bu şekilde engellenmektedir. Bu çalışmada, molekül ağırlıkları 2500 ve 4600 olan iki değişik molekül ağırlığında PSA sentezlenmiştir. Her ikisinde de PVA sürfaktanı ve diklorometan çözeltisi kullanıldığında düzgün nanoküreler elde edilmiştir (Tablo 4.2; P2PVA4 ve P2PVA4M örnekleri). Ancak yüksek molekül ağırlıklı polimerin bozunma süresi daha uzun ve dolayısıyla salım daha yavaş (1-6 ay arası) olacağı için, molekül ağırlığı 2500 olan PSA ile hazırlanan nanoküreler tercih edilmiş ve salım çalışmalarında kullanılmıştır.

Elde edilen nanokürelerin şekillerinin çok düzgün küreler halinde olduğu SEM mikrograflarından gözlenmiştir (Şekil 4.3). Ayrıca, parçacık boyut analiz cihazı ile, ilaç içeren PSA bazlı olan nanokürelerin parçacık boyut dağılımı ve ortalama boyutları belirlenmiştir. Şekil 4.4'te gösterildiği gibi, P2T4 nanoküreleri için boyut dağılımının 458-1106 nm aralığında olduğu ve ortalama tanecik büyüklüğünün 709 nm olduğu gözlenmiştir. Diğer taraftan, P2PVA4 nanokürelerinin dağılımının 122-396 nm arasında olduğu ve ortalama boyutun ise 209 nm olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle çalışmanın devamında yapılmış olan deneylerde P2PVA4 nanoküreleri kullanılmıştır.



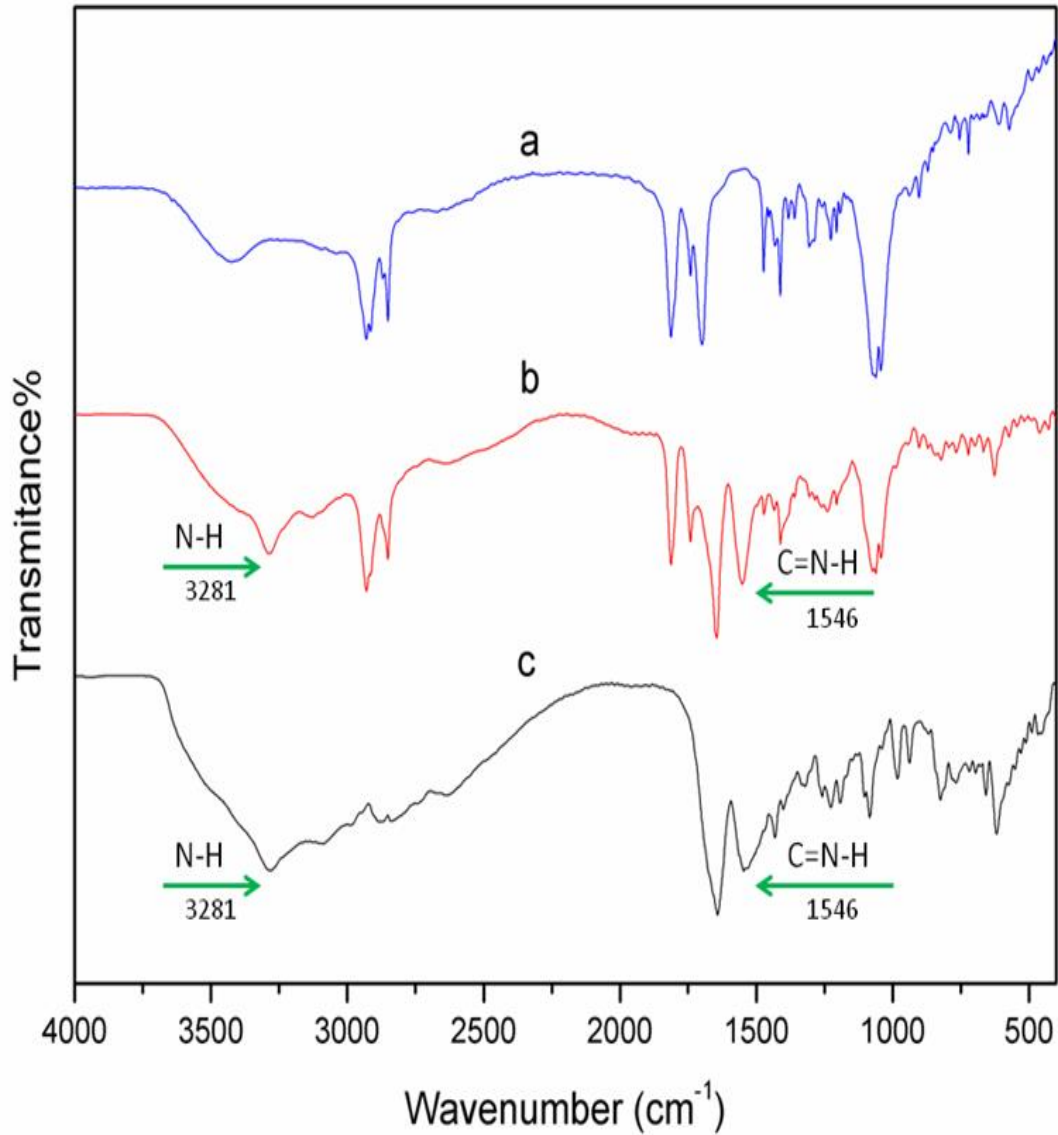
Şekil 4.3. Dokсорubisin içeren nanokürelerin SEM fotoğrafları. (a ve b) P2T4 ; (c ve d) P2PVA 4



Şekil 4.4. Dokсорubisin içeren PSA nanokürelerin tanecik boyut dağılımı. a) P2PVA; b) P2T4

4.3 Polihistidin kaplama karakterizasyonu

PSA nanokürelerin yüzeyleri polihistidin ile kaplandıktan sonra, yüzeydeki kimyasal değişim FTIR ile incelenmiştir. Doksorubisin içeren PSA nanoküreler ve saf polihistidin, kontrol grupları olarak FTIR ile analiz edilmiştir. Bu sonuçlar, Doksorubisin içeren ve polihistidin ile kaplanmış olan nanokürelerin spektrumu ile kıyaslanmıştır. PSA nanoküreler, saf polihistidin, ve histidin ile kaplanmış olan nanokürelere ait spektrumları Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5. FTIR spektrumları. a) Doksorubisin içeren PSA nanoküreler, b) Polihistidin ile kaplanmış Doksorubisin içeren PSA nanoküreler, c) Saf polihistidin

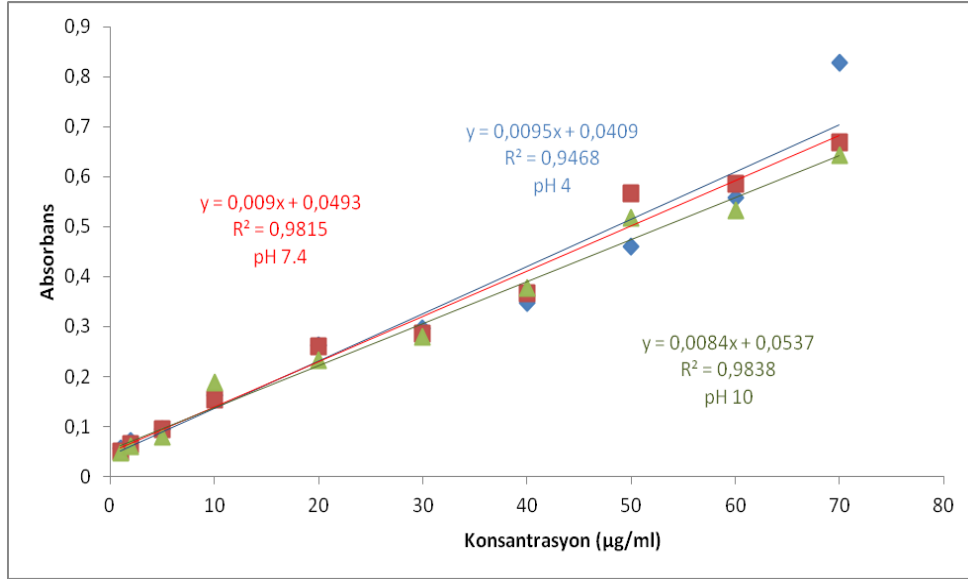
Polihistidin spektrumunda, imidazol ve amid gruplarına ait olan ve C=N-H ve N-H gerilmelerinden kaynaklanan pikler, sırasıyla 1546 ve 3281 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. Aynı pikler polihistidin ile kaplanmış olan nanokürelerin spektrumunda da görülmüştür. Diğer taraftan, kaplanmamış nanokürelerin spektrumunda bu pikler gözlenmemektedir. Bu sonuçlar da, polihistidin moleküllerinin PSA üzerinde varlığının ve polihistidinin başarı ile nanokürelere tutturulduğunun kanıtıdır.

4.4 Doksorubisin enkapsülasyon verimi

PSA nanokürelere enkapsüle edilen ilaç verimi % 48 olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu değer literatüre göre çok iyi bir değerdir. Literatürde doksorubisinin yükleme kapasitesini arttırmaya odaklanan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda ilaç yükleme kapasitesinin artışı, ilacın organik fazdan su fazına geçişini engellemek ile gerçekleştirilmektedir. PSA nanokürelerin ilaç yükleme değerini arttırmak için, iyonik polimerler (WONG ve ark, 2004) veya iyonik sürfaktanlar (CHAVANPATIL ve ark., 2007) kullanılarak sırasıyla % 42.5 ve % 49.2 verim elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda, PSA nanoküreleri, normal sürfaktan ve polimer kullanılarak hazırlanmış ve ilaç yükleme kapasiteleri % 48 olarak belirlenmiştir. Doksorubisin için elde edilen bu enkapsülasyon verimi literatürdeki sonuçlara göre çok iyi ve ümit verici bir değer olarak kabul edilmiştir.

4.5 İn situ Doksorubisin salımı

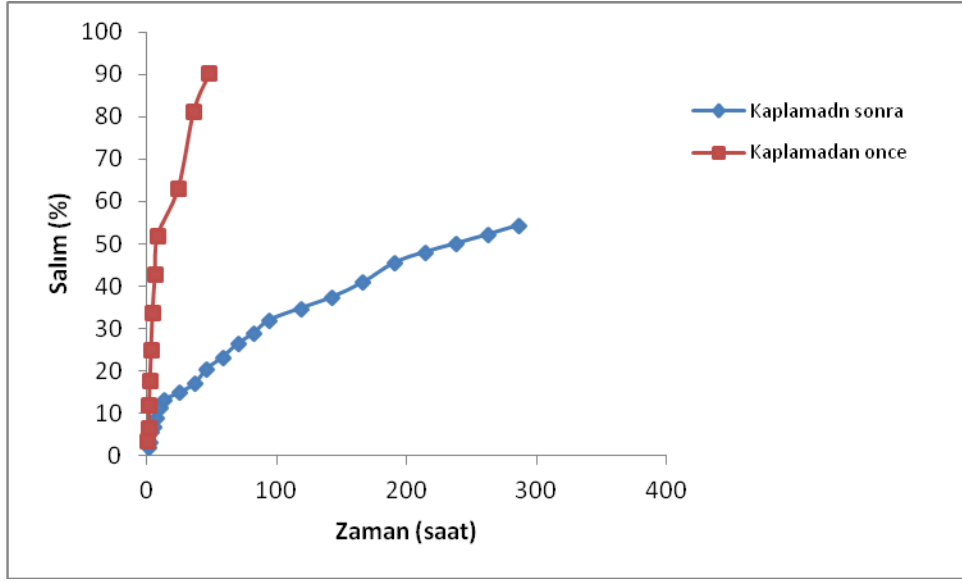
Ortamın pH değerinin salım üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla ilaç içeren nanokürelerin salımları üç farklı pH ortamında (pH 7; 7.4; ve 10) incelenmiştir. Diğer taraftan, pH'nın ilaç absorpsiyonu üzerindeki etkisini göz ardı etmemek amacıyla kalibrasyon eğrileri de belirtilen 3 pH ortamında da hazırlanmıştır (Şekil 4.6). pH değişiminin ilaç absorpsiyonuna etkisinin önemli sayılamayacak derecede az olduğu söylenebilir. Buna karşın salım deneyi hesapları, deneyin yapıldığı pH ortamı için hazırlanan kalibrasyon eğrisi kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 4.6. Dokсорubisin salımının üç farklı pH ortamında kalibrasyon eğrisi

PSA nanokürelerden Dokсорubisin salım profilleri, histidin kaplamadan önce ve sonra pH 7.4 tamponunda incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.7 de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, polihistidin ile kaplanmamış olan PSA nanoküreler, içerdikleri dokсорubisinin tamamını yaklaşık 50 saat içinde (~ 2 gün) bırakmaktadır. Bu durum PSA'nın hidrolitik bozunması sonucu ilacın hızla dışarı salınmasından dolayıdır.

Diğer taraftan, polihistidin ile kaplanmış olan nanoküreler ilacı kontrollü ve daha uzun sürede salmaktadır. Ortamın pH değeri 7.4 olduğunda, 300 saat (~ 12 gün) içinde toplam ilacın ancak % 50'si ortama salınmaktadır. Bu durumda da, polihistidine PSA nanokürelerin etrafında koruyucu bir zırh oluşturmakta ve PSA'nın bozunmasının yanısıra ilaç salımını engellemektedir.

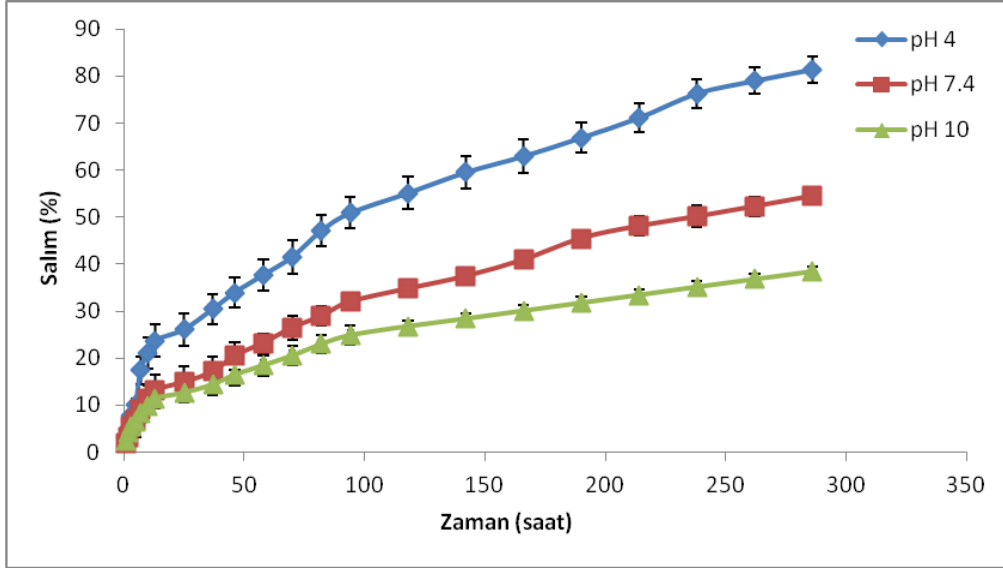


Şekil 4.7. Polihistidin kaplama öncesi ve sonrası PSA nanokürelerden pH 7.4 ortamında Doksorubisin salımı

Polihistidin ile kaplanmış olan nanokürelerin pH duyarlılıklarını gözlemlemek için nanokürelerin ilaç salımları 3 farklı pH ortamında (pH 4; 7.4 ve 10) incelenmiştir.

Hazırlanan pH duyarlı nanokürelerden farklı pH ortamlarında Doksorubisin salım profilleri Şekil 4.8 de gösterilmiştir. Literatürde değişik oranlarda kitosan, aljinat ve polihistidin içeren mikropartiküllere ait bilgi bulunmaktadır. Bu sistemlerde hemoglobinin örnek ilaç olarak kullanılmış ve elde edilen sonuçlara göre yüklenmiş olan hemoglobinin mikropartiküllerden salımı en fazla 80 saat içinde gerçekleşmiştir (CHEN ve ark., 2012).

Bizim çalışmamızda ise elde edilen salım grafiklerine bakıldığında, en yüksek salımın pH 4 ortamında gerçekleştiği (300 saat içinde % 81), ortam bazik olduğunda salımın azaldığı (pH değerinin 7.4 olduğu ortamda 300 saat içinde % 54, ve pH değerinin 10 olduğu bazik ortamda 300 saat içinde % 38 olduğu) görülmüştür (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. pH duyarlı nanokürelerden farklı pH ortamlarında Doksorubisin salımı

Bunun nedeni polihistidin'in düşük pH'larda protone olmasıdır. Bu durumda pH duyarlı nanoküreler asidik ortamda daha hızlı salım yaparak etkin doza kısa sürede ulaşmaktadır. Düşük pH ortamında nanokürelerin etrafındaki polihistidin kısa sürede ve tamamen çözünmektedir. Asidik ortamda çok yavaş çözünen polisebasik anhidrit ise yüzeyden, yavaş yavaş ve kontrollü bir hızla bozunmaya başlamaktadır. Bu özgün ve kompleks sistem sayesinde ilacın başta etkin doza ulaşması, sonrasında ise polisebasik anhidritin asidik ortamda bozunma hızına bağlı olarak sabit ve kontrollü bir hızla, etkin dozda ve uzun süreli salımı gerçekleştirilebilmektedir.

Nanokürelerin nötr ve bazik pH ortamlarındaki salım hızını daha fazla yavaşlatmak, ilacın vücut içinde diğer dokulara zarar vermesini önlemek açısından önemlidir. Bunun için, PSA nanoküreleri üzerine polihistidin kaplamasının daha kalın yapılması veya yüksek moleküler ağırlıklı PSA kullanılması gerekebilir. Çalışmalarımız bu yönde de devam etmektedir.

5 SONUÇ

Bu çalışmada çok özgün ve akıllı bir ilaç taşıyıcı sistemi geliştirilmiştir. Nanoküre olarak hazırlanan ilaç taşıyıcılar, biyouyumlu olduğu bilinen ve FDA tarafından onaylı olan polisebasik anhidrit kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan PSA nanoparçacıkların yüzeyden başlayan ve kontrollü ilerleyen bozunmasından dolayı içlerinde bulunan ilaçların oldukça sabit hızda ve kontrollü salımı beklenmektedir. Ayrıca PSA nanotaneceklerin yüzeyleri pH duyarlı olan polihistidin ile kaplanmış ve pH duyarlı olan akıllı nanoküreler yapılmıştır. Hazırlanan nanokürelerin, diğer dokulara göre daha asidik olduğu bilinen tümör bölgesinde ilaç salımı yapması beklenir. Bu nedenle, kanser dokularındaki ilaç konsantrasyonunun hızlı bir şekilde terapötik seviyesine ulaşması, ve diğer dokuların ilacın olumsuz etkilerinden korunması sağlanmış olacaktır.

Salım grafiklerinde pH 7.4 ortamında izlenen ilaç salımını engellemek için (ilacın kan hücrelerine ve sağlıklı dokulara verebileceği yan etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla) ilerideki çalışmalarımızda daha yüksek moleküler ağırlıklı PSA kullanılması ve/veya daha kalın polihistidin kaplama yapılması planlanmaktadır.

5.1 Öneriler ve yapılması gerekenler

Bu çalışma, hızlı destek projesi olarak ve 1 sene için desteklenmiştir. Çok yeni bir konu için, hem literatürü taramak, hem de proje takviminde belirtilen iş paketlerini tamamlayabilmek ve nano sistemleri hazırlayabilmek hiç kolay olmamıştır. Ayrıca, olaya sentez basamağından başlıyor olmak işimizi zorlaştırmıştır. Zira, literatürde belirtilen pek çok sentez prosedürü verimli çalışmamıştır. Her şeye rağmen, öğrencimizin yoğun ve titiz çalışması ile proje tamamlanmıştır. Laboratuvarımızda hazırlanan nano ilaç taşıyıcı sistemler, şu anda Oslo Üniversitesinde Prof. Nystrom yönetiminde optimize edilmekte ve ayrıca hücre kültürü ve in vivo çalışmaları Norveç'te bulunan ve kanser araştırma merkezi olan "Radium Hospitalet" hastanesinde gerçekleştirilmektedir.

Nano taşıyıcı olarak, çok yeni ve özgün olduğuna inandığımız pH duyarlı sistemleri biraz daha geliştirebilirsek ve pH duyarlılığını artırabilirsek, ilaç taşıyıcı olarak kanser terapide önemli bir yer tutacağına inanıyoruz. Bunun için yapılması gerekenler, pH duyarlı polihistidin kaplamayı artırmak veya modifiye etmek, veya PSA ile birlikte kopolimerler kullanarak

sistemin pH duyarlılığını etkinleştirmek gerekmektedir. In vitro hücre kültür deneylerinin mutlaka yapılması ve nano sistemin kanser hücrelerine geçiş yapabildiğinin gösterilmesi gerekir. Her tür deneyin pozitif sonuç vermesi sonrasında yapılacak işlem, in vivo şartlarda ve tümör yaratılmış deney hayvanları üzerinde bu sistemleri denemektir. Şu anda, Oslo Üniversitesinde de araştırmanın bu basamağı yürütülmektedir. Bilindiği gibi kanser tedavisi üzerinde tüm dünyada çok yoğun araştırmalar yürütülmektedir. Bu araştırmalar zahmetli ve maliyeti yüksek araştırmalardır. Ümidimiz, ülkemizde de özgün ve etkin sistemlerin geliştirilebilmesidir.

Referanslar:

BELLO RM., Midoux P., Histidylated Polylysine as DNA Vector: Elevation of the Imidazole Protonation and Reduced Cellular Uptake Without Change in the Polyfection Efficiency of Serum Stabilized Negative Polyplexes, *Bioconjug Chem*, 12, 92-9, (2001)

BENNS J., Choi JS., Mahato RI., Park JS., Kim SW. pH-sensitive Cationic Polymer Gene Delivery Vehicle. *J. Bioconjugate Chemistry*, 11, 637-45, (2000)

BREM H., Piantadosi S., Burger PC., Walker M., Selker R., et al, Placebo-controlled Trial of Safety and Efficacy of Intraoperative Controlled Delivery by Biodegradable Polymers of Chemotherapy for Recurrent Gliomas, *J. The Lancet*, 345, 1008–12, (1995)

BREM H., Langer R., Polymer-based Drug Delivery to the Brain, *Science & Medicine*, 3, 52-8, (1996)

CHAVANPATIL MD., Khdair A., Patil Y., Handa H., Mao GU., et al., Polymer-Surfactant Nanoparticles for Sustained Release of Water-Soluble Drugs, *J. Pharm. Sci.*, 96, 3379-89, (2007)

CHEN AZ., Chen MY., Wang SB., Huang XN., Liu YG., et al., Poly(L-histidine)-Chitosan/Alginate Complex Microcapsule as a Novel Drug Delivery Agent, *J. Appl. Polym. Sci.*, 124, 3728–36, (2012)

DANG WB., Daviau T., Brem H., Morphological characterization of Polyanhydride Biodegradable Implant Gliadel[®] During in Vitro and in Vivo Erosion Using Scanning Electron Microscopy, *Pharm. Res.*, 13, 683-91, (1996)

DOMB AJ., LANGER R., Polyanhydrides. I. Preparation of High Molecular Weight Polyanhydrides, *J. Polym. Sci.*, 25, 3373-86, (1987)

FURTADO S., Abramson D., Burrill R., Olivier G., Gourd C., et al., Oral Delivery of Insulin Loaded Poly(fumaric-co-sebacic) Anhydride Microspheres, *J. Pharmaceutics*: 347, 149–55, (2008)

HASIRCI N., Micro and Nano systems in Biomedicine and Drug delivery, in 'Nanomaterials and Nanosystems for Biomedical Applications', Editor: M. Reza Mozafari, Dordrecht, Netherlands, Springer, 2007, pp:1-26

KIM D., Lee ES., Oh KT., Gao ZG., Bae YH. Doxorubicin-Loaded Polymeric Micelle Overcomes Multidrug Resistance of Cancer by Double-Targeting Folate Receptor and Early Endosomal pH, *Small*, 4, 2043–50, (2008)

KIPPER MJ., Shen E., Determan A., Narasimhan B., Design of an Injectable System Based on Bioerodible Polyanhydride Microspheres for Sustained Drug delivery, *J. Biomaterials*, 23, 4405–12, (2002)

KRASKO MY., Shikanov A., Ezra A., Domb AJ., Poly(ester anhydride)s Prepared by the Insertion of Ricinoleic Acid into Poly(sebacic acid), *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.*, 41, 1059-69, (2003)

LAURENCIN C., Domb A., Morris C., Brown V., Chasin M., et al, Poly(anhydride) Administration in High Doses in Vivo: Studies of Biocompatibility and Toxicology, *J. Biomed. Mater. Res.*, 24, 1463-81, (1990)

LEE ES., Shin HJ., Na K., Bae YH., Poly(L-histidine)–PEG Block Copolymer Micelles and pH-induced Destabilization. *J. Control. Release*, 90, 363–74, (2003)

LEE ES., Na K., Bae YH. Polymeric Micelle for Tumor pH and Folate-mediated Targeting, *J. Control. Release*, 91, 103–13, (2003)

LEE ES., Na K., Bae YH. Doxorubicin Loaded pH-sensitive Polymeric Micelles for Reversal of Resistant MCF-7 Tumor, *J. Control. Release*, 103, 405–18, (2005)

LEONG KW., Brott BC., Langer R., Bioerodible Polyanhydrides as Drug-carrier Matrices. I: Characterization, Degradation, and Release Characteristics, *J. Biomed. Mater. Res.* 19, 941-55, (1985)

MATHIOWITZ E., Bernstein H., Giannos S., Dor P., Turek T., et al., Polyanhydride Microspheres. IV. Morphology and Characterization of Systems Made by Spray Drying, *J. Appl. Polym. Sci.*, 45, 125-34, (1992)

PFEIFER BA., Burdick JA., Little SR., Langer R., Poly(ester-anhydride):poly(α -amino ester) Micro- and Nanospheres: DNA Encapsulation and Cellular transfection, *J. of Pharmaceutics*, 304, 210–19, (2005)

ROSEN HB., Chang J., Wnek GE., Linhardt R J., Langer R., Bioerodible Polyanhydrides for Controlled Drug Delivery, *J. Biomaterials* 4, 131-33, (1983)

SHAO H., Huang Y., Lee HS., Suh YJ., Kim CO., Effect of PVP on the Morphology of Cobalt Nanoparticles Prepared by Thermal Decomposition of Cobalt Acetate, *Curr. Appl. Phys.* 6S1, 195–97, (2006)

SHEN E., Kipper MJ., Dziadul B., Lim MK., Narasimhan B., Mechanistic Relationships Between Polymer Microstructure and Drug Release Kinetics in Bioerodible Polyanhydrides, *J. Control. Release*, 82, 115–25, (2002)

TAMADA J., Langer RJ., The Development of Polyanhydrides for Drug Delivery Applications, *Biomater. Sci. Polym.*, 3, 315-53, (1992)

TOBIAS IS., Lee H., Engelmayr GC., Macaya D., Bettinger CJ., et al., Zero-order Controlled Release of Ciprofloxacin-HCl from a Reservoir-based, Bioresorbable and Elastomeric Device, *J. Control. Release*, 146, 356–62, (2010)

WANG H., Qia X., Chen J., Wang X., Ding S., Mechanisms of PVP in the Preparation of Silver Nanoparticles, *Mater. Chem. Phys.* 94, 449–53, (2005)

WONG H., Bendayan R., Rauth AM., Wu XY., Development of Solid Lipid Nanoparticles Containing Ionically Complexed Chemotherapeutic Drugs and Chemosensitizers. *J. Pharm. Sci.*, 93, 1993-2008, (2004)

ZHANG ZQ., Su XM., He HP., Qu FQ., Synthesis, Characterization, and Degradation of Poly(anhydride-co-amide)s and Their Blends with Polylactide *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.*, 42, 4311-17, (2004)

ZHAO A., Zhou S., Zhou Q., Chen T., Thermosensitive Micelles from PEG-Based Ether-anhydride Triblock Copolymers. *J. Pharmaceutics Research*, 27, 1627-43, (2010)

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 111M385
Proje Başlığı: pH DUYARLI POLİSEBASİK ANHİDRİT BAZLI NANOKÜRELERİN İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM OLARAK HAZIRLANMASI
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Yürütücü: Prof. Dr. Nesrin HASIRCI Araştırmacılar: Prof. Dr. Vasıf HASIRCI Shahla BAGHERI FAM
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Kimya Bölümü, İnönü Bulvarı 06800, Ankara
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi Rektörlüğü (BAP projesi kapsamında)
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 15/06/2011-15/06/2012
Öz (en çok 70 kelime) Günümüzde, özellikle kanser hastalığında teşhis ve tedavi amaçlı kullanılmak üzere nano boyutta çeşitli organik ve inorganik sistemler geliştirilmiştir. Polisebasik anhidritler, yüzeyden başlayan bozunma özelliği ve ekonomik olmaları nedeniyle ilaç taşıyıcı olarak tercih edilen polimerlerdir. Bu çalışmada, polisebasik anhidrit sentezlenmiş ve nanoküre yapımında kullanılmıştır. Kanser ilacı yüklü nanoküreler, akıllı bir taşıyıcı elde etmek amacıyla pH duyarlı polihistidin ile kaplanmıştır. Nanotaneciklerin fiziksel şekli ve farklı pH ortamlarında ilaç salım kinetiği incelenmiştir.
Anahtar Kelimeler: Polisebasik anhidrit, Polihistidin, pH duyarlılık, Nanoküre, İlaç taşıyıcı

Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet Gerekli Değil

Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.

Bu çalışma patente gidebilecek özgünlükte bir çalışmadır, ancak gerçek anlamda sonucu görebilmek çok uzun zaman istemektedir. Dolayısıyla patent başvurusu yapılmamıştır.

Projeden Yapılan Yayınlar:

Konferanslar:

- 1) Shahla Bagherifam, Nesrin Hasırcı, Vasif Hasırcı. Effect of Key Parameters on the Particle Size of Anhydride Based Nanocapsules. VIII. Nanoscience and Nanotechnology Congress, Ankara, Turkey, 2012

Yayınlar:

- i) Bu raporda verilen sonuçları içeren bir yayın basım için hazırlanmaktadır.
- ii) Şu an Oslo Üniversitesinde yapılan çalışmalarını içeren 2. yayın hazırlık aşamasındadır.

Ekte Bulunan “ARDEB Başarı Öyküsü Formu”, “Kazanımlar” Bölümünde Belirtilen Kriterlere Göre Proje Çıktılarınızın Başarı Öyküsü Niteliği Taşıdığını Düşünüyorsanız “ARDEB Başarı Öyküsü Formu”nu doldurunuz.

Çalışmamızın özgün ve önemli bir çalışma olduğunun bilinciydeyiz, ancak patent almadan veya ürüne dönmeden, bir sene içinde yapılmış, çok yeni tamamlanmış ve henüz in vivo uygulamalarının sonuçları gözlemlenmemiş bir çalışmaya ‘Başarı Öyküsü’ demek doğru olmayacaktır düşüncesindeyiz.