

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POLİMER BİLİMİ VE TEKNOLOJİSİ
ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DOKSORUBİSİN YÜKLÜ POLİESTER
NANOPARTİKÜLLERİNİN KRİYOPROTEKTAN VARLIĞINDA
LİYOFİLİZASYONLARI**

TUĞBA KOLDANKAYA

KOCAELİ 2021

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POLİMER BİLİMİ VE TEKNOLOJİSİ
ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DOKSORUBİSİN YÜKLÜ POLİESTER
NANOPARTİKÜLLERİNİN KRİYOPROTEKTAN VARLIĞINDA
LİYOFİLİZASYONLARI

TUĞBA KOLDANKAYA

Dr. Öğr. Üyesi Serap MERT
Danışman, Kocaeli Üniv.

.....

Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.
Doç. Dr. Mehmet KODAL

.....

Dr. Öğr. Üyesi İkrime ORKAN UÇAR
Jüri Üyesi, Düzce Üniv.

.....

Tezin Savunulduğu Tarih: 22.06.2021

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında kanser tedavisinde kullanılmak üzere sıkça üretilen PLGA-NP'lerine alternatif, ticarileşme potansiyeline sahip yeni PDIBG-NP'leri üretilmiştir. Doksorubisin anitikanser ilacı yüklü PLGA ve PDIBG-NP'lerine dondurma-çözme ve dondurma-kurutma prosesleri uygulanarak bu iki yöntem arasındaki ilişki incelenmiştir. Doksorubisin yüklü PDIBG-NP'lerinin kriyoprotektan varlığında detaylıca gerçekleştirilen dondurma-kurutma testleri ile uzun süreli saklama koşulları belirlenerek 1 ay boyunca depolanabilen katı toz içerikleri üretilmiştir.

Farklı bir alanda çalışma fırsatı sağlayan, bana karşı gösterdiği güler yüz, sabır ve anlayış için, değerli bilgi ve birikimlerini benimle paylaşıp gelişmemi sağlayan sevgili danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Serap Mert'e,

Kocaeli Üniversitesi, Kimya Bölümü, Polimer Malzeme ve Araştırma Laboratuvarı'nda çalışma imkanı veren, tecrübelerini benimle paylaşarak yol gösteren değerli hocam Doç. Dr. Olcay Mert'e,

Bilimsel anlamda edindiği tecrübeleri benimle paylaşarak gelişmemi sağlayan ve yüksek lisans süresi boyunca desteğini hep hissettiğim Mehmet Onur Arıcan'a,

Lisans ve yüksek lisans sürecinde hep yanımda olan canım arkadaşım Özden Erdebil'e,

Desteklerini ve sevgilerini her zaman hissettiğim, fedakarlıkları ve varlıkları için çok sevgili aileme,

Sonsuz teşekkür ederim...

Ayrıca, yüksek lisans tez projesi kapsamında bu çalışmayı destekleyen Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederiz. Proje Numarası: FYL-2021-2446.

Temmuz-2021

Tuğba KOLDANKAYA

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
TABLolar DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	4
1.1. Kanser ve Nanoteknoloji.....	4
1.2. Kanser Tedavisinde Kullanılan Nanotaşıyıcılar.....	5
1.2.1. Nanotaşıyıcıların tümör hedefleme mekanizması.....	6
1.3. Polimerik Nanopartiküller ve Önemli Avantajları	8
1.3.1. Polimerik nanopartikülleri hazırlama yöntemleri	9
1.3.2. Nanopartiküler sistemlerde sık kullanılan polimerler	11
1.3.3. Poli(laktik-ko-glikolik asit)	12
1.3.3.1. Poli(laktik-ko-glikolik asit) polimerinin biyomedikal uygulamaları	13
1.3.4. Sübstitüye glikolid bazlı polimerler	14
1.3.4.1. Sübstitüye glikolid polimerlerin biyomedikal uygulamaları	15
1.3.4.2. PDIBG bazlı polimerler ve biyomedikal uygulamaları.....	17
1.4. Liyofilizasyon Yöntemi	18
1.4.1. Kriyoprotektan kullanımı	18
1.4.2. Dondurma-çözme yöntemi	20
2. MALZEME VE YÖNTEM.....	22
2.1. Kullanılan Kimyasallar	22
2.2. Kullanılan Cihazlar	22
2.2.1. Azaltılmış toplam reflektans-fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometresi (ATR-FTIR).....	22
2.2.2. Nükleer manyetik rezonans spektrometresi (NMR)	23
2.2.3. Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC)	23
2.2.4. Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC)	23
2.2.5. Termogravimetrik analiz (TGA)	23
2.2.6. Ultrasonik homojenizatör	24
2.2.7. Soğutmalı santrifüj	24
2.2.8. Partikül boyut analizatör (ZetaSizer)	24
2.2.9. Liyofilizatör (Freeze dryer)	24
2.2.10. Soğutmalı sirkülatör	24
2.2.11. UV/Vis spektrofotometre	24
2.3. Yöntem.....	24
2.3.1. L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit sentezi.....	24

2.3.2. L-3,6-diizobütil-1,4-dioksan-2,5-dion (L-diizobütil glikolid, LDIBG) sentezi.....	25
2.3.3. Poli(diizobütil glikolid) (PDIBG) homopolimer sentezi.....	26
2.3.4. Dokсорubisin yüklü PLGA/PDIBG-NP'lerinin hazırlanması	27
2.3.5. NP içine yüklenen ilaç veriminin hesaplanması	28
2.3.6. DOX-PLGA/PDIBG-NP'lerine dondurma-çözme ve dondurma-kurutma proseslerinin uygulanması	29
2.3.6.1. NP'lere uygulanan dondurma sıcaklıklarının belirlenmesi	29
2.3.6.2. Dondurma-çözme prosesi	30
2.3.6.3. Liyofilizasyon prosesi	30
2.3.7. Liyofilize NP'lerin rekonstitüsünu.....	30
2.3.8. Kriyoprotektan içeren liyofilize NP'lerin uzun süreli saklama çalışması.....	31
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	32
3.1. L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit (2) Sentezi ve Karakterizasyonu	32
3.2. L-Diizobütil Glikolid (3) Sentezi ve Karakterizasyonu.....	34
3.3. Poli(Diizobütil Glikolid) (5) Sentezi ve Karakterizasyonu	37
3.4. Dokсорubisin yüklü NP formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	41
3.4.1. DOX-PLGA-NP'leri için kritik formülasyon	42
3.4.2. DOX-PDIBG-NP'leri için kritik formülasyon	43
3.4.3. Polimer konsantrasyonu ve NP'lerin karakteristik özellikleri	45
3.5. DOX- PLGA/PDIBG-NP'lerinin Dondurma-Çözme Testleri.....	49
3.5.1. DOX-PLGA-NP'lerinin dondurma-çözme testleri	49
3.5.2. DOX-PDIBG-NP'lerinin dondurma-çözme testleri.....	50
3.6. DOX- PLGA/PDIBG-NP'lerinin Dondurma-Kurutma Testleri	52
3.6.1. DOX- PLGA-NP'lerinin liyofilizasyonu	52
3.6.2. DOX- PDIBG-NP'lerinin liyofilizasyonu	54
3.6.2.1. Liyofilize DOX- PDIBG-NP'lerinin uzun süreli saklanması.....	56
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	59
KAYNAKLAR.....	62
EKLER.....	71
KİŞİSEL YAYINLAR VE ESERLER	82
ÖZGEÇMİŞ.....	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Kanser tanı ve tedavisinde kullanılan nanopartiküller	6
Şekil 1.2.	Nanopartiküllerin tümör hedefleme mekanizmaları; pasif ve aktif hedefleme.....	7
Şekil 1.3.	Polimerik nanopartiküllerin sınıflandırılması	8
Şekil 1.4.	PLGA'nın kimyasal yapısı ve vücutta biyolojik olarak parçalanması	13
Şekil 1.5.	Simetrik ve asimetrik süstitüye glikolidlerin yapısı	15
Şekil 1.6	NP formülasyonlarının Taramalı Elektron Kriyomikroskopi (kriyo-SEM) görüntüleri, kriyoprotektan içermeyen NP formülasyonlarının dondurulması (şekil üst), %3 sukroz içeren NP formülasyonlarının dondurulması (şekil alt).....	19
Şekil 2.1.	2 bileşiğinin sentezi	25
Şekil 2.2.	3 bileşiğinin sentezi	25
Şekil 2.3.	5 bileşiğinin sentezi	26
Şekil 2.4.	Tekli emülsiyon yöntemi ile NP üretiminin şematik gösterimi	28
Şekil 3.1.	2 bileşiği.....	32
Şekil 3.2.	2 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	33
Şekil 3.3.	2 bileşiğine ait ¹³ C-NMR spektrumu	33
Şekil 3.4.	2 bileşiğine ait ATR-FTIR spektrumu.....	34
Şekil 3.5.	3 bileşiği.....	34
Şekil 3.6.	3 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	35
Şekil 3.7.	3 bileşiğine ait ¹³ C-NMR spektrumu	36
Şekil 3.8.	3 bileşiğine ait ATR-FTIR spektrumu.....	37
Şekil 3.9.	5 bileşiği.....	37
Şekil 3.10.	5 bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu	39
Şekil 3.11.	5 bileşiğine ait ¹³ C-NMR spektrumu.....	39
Şekil 3.12.	5 bileşiğine ait ATR-FTIR spektrumu.....	40
Şekil 3.13.	5 bileşiğine ait GPC kromatogramı	40
Şekil 3.14.	5 bileşiğine ait DSC (A) ve TGA (B) termogramları	41
Şekil 3.15.	Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), farklı miktarda polimer ile hazırlanan DOX-PLGA-NP'lerin partikül boyutu ve boyut dağılımları.....	47
Şekil 3.16.	Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), farklı miktarda polimer ile hazırlanan DOX-PDIBG-NP'lerin partikül boyutu ve boyut dağılımları	48
Şekil 3.17.	Partikül boyutu ve boyut dağılımı (DLS), DOX-PLGA-NP'lerinin; -20 °C'de (A) ve -50 °C'de (B) dondurularak gerçekleştirilen dondurma-çözme testleri (F-T) öncesi ve sonrası.....	50

Şekil 3.18.	Partikül boyutu ve boyut dağılımı (DLS), DOX-PDIBG-NP'lerinin; -20 °C'de (A) ve -50 °C'de (B) dondurularak gerçekleştirilen dondurma-çözme testleri (F-T) öncesi ve sonrası	51
Şekil 3.19.	Partikül boyutu ve boyut dağılımı (DLS), Şeker içeren ve içermeyen DOX-PDIBG-NP'lerinin; -20 °C'de dondurma-çözme testleri öncesi (F-T) ve sonrası.....	52
Şekil A.1.	L-lösin (1) ATR-FTIR spektrumu.....	72
Şekil B.1.	2 ve 3 bileşiklerinin GPC kromatogramı	73
Şekil C.1.	480 nm'de DOX'un DMSO içindeki kalibrasyon eğrisi	74
Şekil C.2.	480 nm'de DOX'un DCM içindeki kalibrasyon eğrisi.....	74
Şekil D.1.	Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), DOX-PLGA-NP'leri için optimum formülasyon (NP6)	75
Şekil D.2.	Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), DOX-PDIBG-NP'leri için optimum formülasyon (NP10)	75
Şekil D.3.	Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), DOX-PLGA-NP'lerinin -20 °C'de dondurma çözme testleri (F-T) öncesi ve sonrası.....	75
Şekil D.4.	Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), DOX-PLGA-NP'lerinin -50 °C'de dondurma çözme testleri (F-T) öncesi ve sonrası.....	76
Şekil D.5.	Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), DOX-PDIBG-NP'lerinin -20 °C'de dondurma çözme testleri (F-T) öncesi ve sonrası.....	76
Şekil D.6.	Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), DOX-PDIBG-NP'lerinin -50 °C'de dondurma çözme testleri (F-T) öncesi ve sonrası.....	76
Şekil D.7.	Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), Şeker içeren ve içermeyen DOX-PDIBG-NP'lerinin;-20 °C'de dondurma-çözme testleri (F-T) öncesi ve sonrası (%1 kriyoprotektan içeren)	77
Şekil D.8.	Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), Şeker içeren ve içermeyen DOX-PDIBG-NP'lerinin;-20 °C'de dondurma-çözme testleri (F-T) öncesi ve sonrası (%5 kriyoprotektan içeren)	77
Şekil D.9.	Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), Şeker içeren ve içermeyen DOX-PLGA-NP'lerinin;-20 °C'de dondurma-kurutma testleri (F-D) öncesi ve sonrası (%1 kriyoprotektan içeren).....	77
Şekil D.10.	Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), Şeker içeren ve içermeyen DOX-PLGA-NP'lerinin;-20 °C'de dondurma-kurutma testleri (F-D) öncesi ve sonrası (%5 kriyoprotektan içeren).....	78
Şekil D.11.	Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), Şeker içeren ve içermeyen DOX-PLGA-NP'lerinin;-20 °C'de dondurma-kurutma testleri (F-D) öncesi ve sonrası (%10 kriyoprotektan içeren).....	78
Şekil D.12.	Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), Şeker içeren ve içermeyen DOX-PLGA-NP'lerinin;-50 °C'de dondurma-kurutma testleri (F-D) öncesi ve sonrası (%1 kriyoprotektan içeren).....	78
Şekil D.13.	Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), Şeker içeren ve içermeyen DOX-PLGA-NP'lerinin;-50 °C'de dondurma-kurutma testleri (F-D) öncesi ve sonrası (%5 kriyoprotektan içeren).....	79
Şekil D.14.	Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), Şeker içeren ve içermeyen DOX-PLGA-NP'lerinin;-50 °C'de dondurma-kurutma testleri (F-D) öncesi ve sonrası (%10 kriyoprotektan içeren).....	79
Şekil D.15.	Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), 50 mg/mL konsantrasyonlu DOX-PDIBG-NP'lerinin -20 °C'de dondurma- kurutma (F-D) öncesi ve sonrası (%5 ve %10 glukoz ve sukroz içeren).....	79

Şekil D.16. Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), 50 mg/mL konsantrasyonlu DOX-PDIBG-NP'lerinin -50 °C'de dondurma- kurutma (F-D) öncesi ve sonrası (%5 ve %10 glukoz ve sukroz içeren).....	80
Şekil D.17. Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), 75 mg/mL konsantrasyonlu DOX-PDIBG-NP'lerinin -50 °C'de dondurma- kurutma (F-D) öncesi ve sonrası (%5 ve %10 glukoz ve sukroz içeren).....	80
Şekil D.18. Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), %10 sukroz içeren farklı konsantrasyona sahip DOX-PDIBG-NP'lerin -50 °C'de dondurularak liyofilize edilmesinden sonra 1 ay -20 °C'de saklanması.....	81



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1.	Nanopartiküler sistemlerde yaygın olarak kullanılan polimerler.....	12
Tablo 3.1.	PDIBG homopolimerinin (5) molekül ağırlıkları	38
Tablo 3.2.	PDIBG homopolimerinin DSC ve TGA verileri.....	41
Tablo 3.3.	İlaç yüklü PLGA-NP formülasyonlarının boyut, PDI ve EE özellikleri	43
Tablo 3.4.	İlaç yüklü PDIBG-NP formülasyonlarının boyut, PDI ve EE özellikleri	44
Tablo 3.5.	Polimer miktarının DOX-PLGA-NP özellikleri üzerindeki etkisi.....	46
Tablo 3.6.	Polimer miktarının DOX-PDIBG-NP özellikleri üzerindeki etkisi	46
Tablo 3.7.	DOX-PLGA-NP'lerinin iki farklı sıcaklıkta dondurularak gerçekleştirilen liyofilizasyon testleri	53
Tablo 3.8.	DOX-PDIBG-NP'lerinin iki farklı dondurma sıcaklığı kullanılarak gerçekleştirilen liyofilizasyon testleri	55
Tablo 3.9.	DOX-PDIBG-NP'lerin iki farklı NP konsantrasyonunda -50 °C'de dondurularak gerçekleştirilen liyofilizasyon testleri	56
Tablo 3.10.	Farklı konsantrasyona sahip DOX-PDIBG-NP'lerinin şeker içeren ve içermeyen örneklerinin uzun süreli saklanması	57

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

M_n	: Sayıca ortalama moleküler ağırlığı ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
M_w	: Ağırlıkça ortalama moleküler ağırlığı ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
T_g	: Camsı geçiş sıcaklığı (katı içerikler için) ($^{\circ}\text{C}$)
T_g'	: Camsı geçiş sıcaklığı (çözelti halindeki içerikler için) ($^{\circ}\text{C}$)
$T_{\%5}$: Başlangıç bozunma sıcaklığı ($^{\circ}\text{C}$)
T_{maks}	: Maksimum kütle kaybının olduğu sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)
T_m	: Erime sıcaklığı ($^{\circ}\text{C}$)

Kısaltmalar

^{13}C -NMR	: Karbon Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
^1H -NMR	: Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
ATR-FTIR	: Azaltılmış Toplam Reflektans-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometresi
DLS	: Dynamic Light Scattering (Dinamik Işık Saçılması)
DOX-HCl	: Dokсорubisin hidroklorür
DOX-PDIBG-NP	: Dokсорubisin Yüklü PDIBG Nanopartikülleri
DOX-PLGA-NP	: Dokсорubisin Yüklü PLGA Nanopartikülleri
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
EE	: Encapsulation Efficiency (Enkapsülasyon Etkinliği)
EPR	: Enhanced Permeability and Retention (Arttırılmış Geçirgenlik ve Alıkonma Etkisi)
FDA	: Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç Dairesi)
GPC	: Jel geçirgenlik kromatografisi
LDIBG	: <i>L</i> -Diizobütil Glikolid
MePEG	: Poli(etilen glikol) Metil Eter
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi
NP	: Nanopartikül
PCA	: Polisiyanoakrilat
PCL	: Poli(ϵ -kaprolakton)
PDI	: Polydispersity Index (Partikül Boyut Dağılımı)
PDIBG	: Poli(diizobütil glikolid)
PGA	: Poli(glikolid)
PLA	: Poli(laktid)
PLGA	: Poli(laktid- <i>ko</i> -glikolid)
PNP	: Polimerik Nanopartikül
PSG	: Poli(sübstitüye glikolid)
PVA	: Polivinil alkol
TGA	: Termogravimetrik Analiz
TLC	: Thin Layer Chromatography (İnce Tabaka Kromatografisi)

DOKSORUBİSİN YÜKLÜ POLİESTER NANOPARTİKÜLLERİNİN KRIYOPROTEKTAN VARLIĞINDA LİYOFİLİZASYONLARI

ÖZET

Mevcut kanser tedavilerinde, başta antitümör ajanların sistemik dağılımı olmak üzere, karşılaşılan pekçok dezavantajın üstesinden gelmek için nano-taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Bunlar içerisinde polimerik nanopartiküller; küçük boyutlara sahip olma, tümör hedefli ilaç salımı gerçekleştirebilme, kolay üretilibilme, yüksek kararlılığa sahip olma, biyobozunurluk gibi pek çok avantaj sunması ile dikkat çekmektedir.

Genellikle sıvı süspansiyonlar şeklinde hazırlanan nanopartiküllerin (NP) klinik olarak uygulanabilmesi ve raflarda uzun süre saklanabilmesi için öncelikle ortamdaki suyun uzaklaştırılması gerekmektedir. Eğer formülasyondaki su uzaklaştırılmazsa, NP'lerin sıvı halde kalmaları sonucunda birtakım fiziksel ve kimyasal kararsızlıklar meydana gelebilmektedir.

Poli(süstitüye glikolid)'ler biyouyumluluk, biyobozunurluk ve yüksek ilaç yükleme kapasiteleri gibi üstün özellikler taşıması sayesinde, ticari olarak en sık tercih edilen PLA ve PLGA polimerlerine alternatif olabilme potansiyeline sahiptirler. Bu çalışmada hem doksorubisin-poli(diizobütil glikolid) (PDIBG) hem de kıyaslama amaçlı doksorubisin-PLGA nanopartiküllerinin formülasyonları sürfaktan konsantrasyonu, ilaç/polimer oranı gibi çeşitli parametreler değiştirilerek çalışılmış ve elde edilen NP'lerin boyut, ilaç yükleme verimliliği gibi analizleri yapılmıştır. Bu NP'lerin kararlılıkları şekerli ve şekerli olmayan ortamlarda dondurarak kurutma (liyofilizasyon) prosesi ile detaylı ve karşılaştırmalı bir şekilde incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Doksorubisin, Liyofilizasyon, Nanopartikül, Poli(laktid-ko-glikolid), Poli(süstitüye glikolid).

LYOPHILIZATION OF DOXORUBICIN LOADED POLYESTER NANOPARTICLES IN THE PRESENCE OF CRYOPROTECTANT

ABSTRACT

In current cancer treatments, especially the systemic distribution of antitumor agents, nano-carrier systems have been developed to overcome many of the disadvantages encountered. Among them, polymeric nanoparticles have drawn great attention with their many advantages such as having small sizes, ability to tumor-targeted drug release, easy to fabrication, having high stability, biodegradability, and so on.

First of all, the water in the environment must be removed from the nanoparticles (NP), which are generally prepared in the form of liquid suspensions, to be applied clinically and to be stored on shelves for a long time. If the water in the formulation is not removed, some physical and chemical instabilities may occur as a result of the NPs remaining in liquid form.

Thanks to the superior properties of poly (substituted glycolides) such as biocompatibility, biodegradability and high drug loading capacity, they have the potential to be an alternative to the most commercially preferred PLA and PLGA polymers. In this study, doxorubicin-poly(diisobutyl glycolide) (PDIBG) and doxorubicin-PLGA nanoparticles as a comparison were both formulated with changing various parameters such as surfactant concentration and drug/polymer ratio. The size analyses were performed and drug loading efficiency of the NPs were calculated. The stability of these NPs with/without sugar has been examined by the freeze-dry (lyophilization) process in detail.

Keywords: Doxorubicin, Lyophilization, Nanoparticle, Poly(lactide-co-glycolide), Poly(substituted glycolide).

GİRİŞ

Kanser tedavisinde; tümörlü hücre çoğalmasının, hastalığın ilerlemesinin ve metastazın baskılanması amacıyla en sık kullanılan sistemik tedavi yöntemi kemoterapidir. Ancak kanserli ve normal hücreler arasında büyük ölçüde ayırım yapamayan anti-kanser ajanlar tümörlü hücrelerin yanı sıra sağlıklı hücrelere de saldırırlar (Li ve diğ., 2017). Buna karşın, oldukça iyi bir ilaç salım profili sunan nano-taşıyıcılar, biyolojik sistemler ile moleküler seviyede etkileşime girebilme kabiliyetleri sayesinde çeşitli kanser türlerinin tanı ve tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir. İlacın biyoyararlanımını (ilacın alındıktan sonra etkileşmesi için gereken süre) ve ilaç dağılım süresini arttıran bu sistemler küçük boyutlu olmaları sayesinde tümörlü dokuya ulaşarak burada birikirler (Nelemans ve Gurevich 2020; Kumar ve diğ, 2018).

Nanoteknolojinin gelişmesiyle birlikte, kanser tedavisinde kullanılmak üzere, miseller, nanolifler, karbon nanotüpler, dendrimerler, kuantum noktaları ve nanopartiküller gibi çeşitli nanotaşıyıcı sistemler geliştirilmiştir (Qiao ve diğ., 2010). Bunlar içerisinde polimerik nanopartiküller (PNP), küçük boyutlu olmalarının sağladığı eşsiz özellikleri nedeniyle oldukça ilgi çekici malzemelerdir. PNP'ler, kontrollü salım, terapi ve görüntülemenin (teranostikler) eş zamanlı uygulanması, ilaç moleküllerinin korunması ve spesifik hedeflenmesi, ilacın miktarına bağlı gerçekleşebilecek olan toksik etkinin azaltılması gibi çeşitli avantajlara sahiptir (Crucho ve Barros, 2017).

Nanopartiküllerin sahip olduğu boyut, yüzey yükü ve şekil gibi özellikleri ilaç taşıma sistemleri için oldukça önemli faktörlerdir. Ancak çok küçük boyutlarda olmaları sebebi ile geniş yüzey alanına sahiptirler. Uzun süreli saklama sırasında partiküllerin agregasyonuna (partiküllerin topaklanmasına) yol açan bu durum NP'lerin boyutlarını ve fiziksel kararlılıklarını önemli ölçüde etkiler (Picco ve diğ., 2018; Wang ve diğ., 2018; Mohanraj ve Chen, 2006). Kolloidal nanosüspansiyonun fiziksel ve kimyasal özelliklerini korumak ve kararlılığını arttırmak adına ortamdaki fazla

suyun uzaklaştırılması gerekmektedir. Bunun için de farmasötik endüstrisinde yaygın olarak dondurarak-kurutma (freeze-dry, liyofilizasyon) yöntemi kullanılmaktadır. Liyofilizasyon yöntemiyle kolayca elde edilen toz ürün gerektiğinde su ile yeniden dağıtılarak (yeniden sulandırma, yeniden yapılandırma) kullanılır (Wang ve diğ., 2018; Abdelwahed ve diğ., 2006).

NP'lerin kararlılığını korumada etkili bir yöntem olsa da liyofilizasyon işlemi tek başına yeterli değildir, çünkü; NP'ler dondurma ve kurutma işlemleri sırasında buz kristallerinin oluşumu, pH değişimi ve çözünen madde konsantrasyonu gibi bir takım streslere maruz kalırlar. NP'lerin oluşacak bu streslerden etkilenmesini önlemek için liyofilizasyon sırasında çeşitli ekspiyanlar (yardımcı maddeler) kullanılmaktadır. Kriyoprotektan ve liyoprotektan olarak adlandırılan bu ekspiyanlar mannitol, sukroz, glukoz, trehaloz gibi pek çok şeker çeşidini içermektedir (Di Tommaso ve diğ., 2010; Abdelwahed ve diğ., 2006; Holzer ve diğ., 2009). Liyofilizasyon sırasında, hem bu kriyoprotektan çeşitlerinin hem de konsantrasyonun optimize edilmesi ise çok sayıda formülasyon üzerinde çalışmayı gerektirebilir. Dolayısıyla kullanılacak olan tüm şeker çeşitlerini ve konsantrasyonlarını değerlendirmek oldukça zaman alıcı ve maliyetli bir uygulama gerektirir. Bunun yerine daha pratik ve ekonomik bir yöntem olan dondurma-çözme (freeze-thaw) testleri ile bir ön eleme gerçekleştirilerek liyofilizasyon prosesi için en uygun şeker çeşidi ve konsantrasyonu belirlenebilmektedir (Date vd., 2010; Cui ve diğ., 2003; Saez vd., 2000).

Bu tez çalışmasında hem nanopartiküler sistemlerde sıkça kullanılan ve ticari bir polimer olan poli(laktid-*ko*-glikolid) (PLGA) kullanılarak hem de polilaktidin (PLA) analogu olan ve ticarileşme potansiyeli yüksek olan poli(diizopropil glikolid) (PDIBG) homopolimeri sentezlenerek doksorubisin yüklü PLGA-NP ve PDIBG-NP'leri hazırlanmıştır ve bu NP'lere dondurma-çözme ve dondurma-kurutma yöntemleri uygulanarak bu iki yöntem arasındaki korelasyon araştırılmıştır. Hazırlanan ve liyofilize edilen NP'lerde partikül boyutu, PDI değeri ve ilaç enkapsülasyon etkinliği karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Farklı parametreleri içeren dondurma-çözme ve dondurma-kurutma testleri ile ilaç yüklü NP'lerin uzun süreli saklanması sırasında kullanımına uygun NP konsantrasyonu, kriyoprotektan çeşidi ve konsantrasyonu belirlenmiştir. Elde edilen NP'lerin karakterizasyonu için çalışma boyunca NP'ler yeniden sulandırılarak dağılıbilirlik özellikleri incelenmiş

ve boyut analizleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçta PLGA-NP'lerine alternatif biyomalzemeler olarak uzun süre saklamaya uygun ve yeniden dağıtılabilen kuru formdaki doksorubisin yüklü PDIBG-NP'ler elde edilmiştir.



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Kanser ve Nanoteknoloji

Dünya çapında çok sayıda ölümlerle sonuçlanan kanser hastalığının tedavisi genel olarak kemoterapi radyasyon ve cerrahi yöntemler ile sınırlı kalmıştır. Bu tedavi yöntemlerinde; antitümör ajanların vücutta sistemik olarak dağılımı, tümöre ulaşan ilaç konsantrasyonlarının yetersizliği ve terapötik yanıtı izleme kabiliyetinin sınırlı olması gibi pek çok sorun ile karşılaşılmaktadır (Wang ve diğ., 2008; Zhou ve diğ.,2017). Hızla çoğalan kanser hücrelerinin sitotoksik bir ajan tarafından öldürülme olasılığının daha fazla olduğu görüşüne dayanan kemoterapi yöntemi oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemde etkili bir öldürme düzeyi gerçekleştirebilmek için gereken ilaç miktarı sağlıklı hücrelere de aktif olarak yayıldığından sistemik toksisiteye neden olur ve bu durum saç dökülmesi, karaciğer, böbrek ve kemik iliğinde hasar gibi ciddi yan etkileri de beraberinde getirir (Jaracz ve diğ., 2005; Ojima ve diğ., 2002). Dolayısıyla yalnızca kanserli hücreleri öldürmekle kalmayıp aynı zamanda sağlıklı hücrelere de saldıran kanser ilaçlarının geliştirilmesindeki en büyük engel, sistemik toksisiteyi en aza indirgeyip ilacın tümörlü (hedef) dokulara taşınabilir olmasıdır (Li ve diğ., 2017; Wang ve diğ., 2011).

Geleneksel yöntemlere karşı geliştirilen nanoteknoloji bazlı ilaç taşıyıcılar, moleküler düzeyde dokulara ulaşabildiğinden daha etkili bir kanser tanısı ve tedavisi sunmaktadır (Qiao ve diğ., 2010; Sutradhar ve Amin, 2014). Nano-bazlı ilaç taşıyıcı sistemler; hücreye veya dokuya özgü hedefleme ile diğer organlarda ilaç birikiminin önlenmesi, taşınan ilaçların farmakokinetik ve farmakolojik özelliklerinin korunması, ve terapötik etkinliğin gerçek zamanlı olarak görüntülenmesi gibi önemli avantajlar sağlar (Li ve diğ., 2017). Ayrıca etkin maddenin hedef bölgeye ulaştırılabilmesi sayesinde ilaçlama dozunu azaltmak ve dozajlama aralığını uzatmak da nanoteknoloji bazlı taşıyıcılar sayesinde mümkün hale gelmektedir (Tüylek, 2017). NP'lerin karakterizasyonunda uygulanan standart bir metodoloji bulunmasa da, parçacıkların fizikokimyasal özelliklerinin vücut içindeki etkileşimleri ile doğrudan ilgili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle biyolojik uygulamalarda kullanılmak üzere

hazırlanan NP'lerin preklinik geliştirme için kapsamlı karakterizasyon çalışmalarını gerçekleştirmek bir ön koşul olarak esas alınmaktadır (Crucho ve Barros, 2017). Çünkü NP'lerin uygun partikül boyutu, şekil ve yüzey yüküne sahip olarak üretilmemeleri durumunda ciddi toksisite sorunları meydana gelebilmektedir (Fonte ve diğ., 2012).

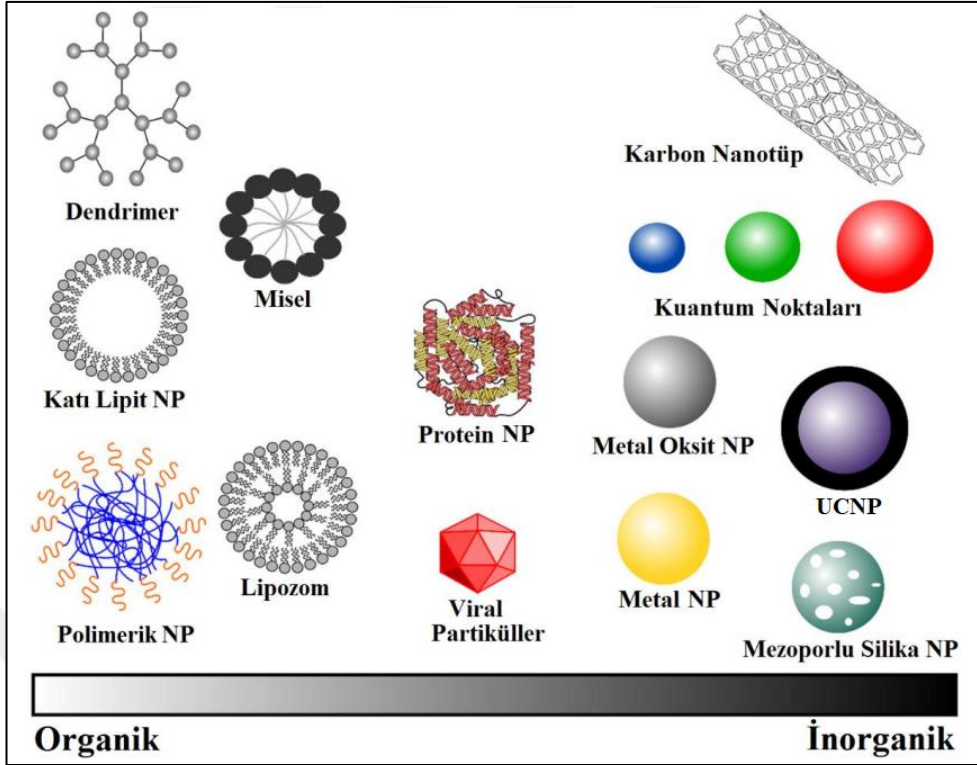
1.2. Kanser Tedavisinde Kullanılan Nanotaşıyıcılar

Kanser tanı ve tedavisi için yeni araçlar olarak ortaya çıkan nanomalzemeler, tipik olarak inorganik ve organik nanopartiküller olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Cryer ve Thorley, 2019; Zhou ve diğ.,2017). İnorganik nanopartiküllerin en dikkat çekici özelliği spesifik kolloidal yapılara dayalı olarak birçok uyaran-duyarlı fonksiyonun mümkün hale gelmesidir. Organik nanopartiküller ise intravenöz olarak uygulanan birçok farmasötik ve biyolojik ürüne kıyasla daha etkili bir ilaç dağıtımını sağlayabilecek önemli avantajlar sunmaktadır. İnorganik ve organik nanopartiküllerin bu özellikleri sayesinde nanopartikül teknolojisine olan ilgi ortaya çıkmıştır (Anselmo ve Mitragotri, 2016).

Tümör görüntüleme, radyoterapinin artırılması veya ilaç salım gibi çeşitli uygulamalar için kullanılan inorganik nanomalzemeler; karbon nanotüpler, silika nanopartiküller, altın nanopartiküller, manyetik nanopartiküller ve kuantum noktaları olarak sayılabilir (Zhou ve diğ.,2017; Wicki ve diğ., 2015)

Çeşitli doğal veya sentetik bileşiklerden elde edilen ve daha çok ilaç salım uygulamalarında kullanılmak üzere hedeflenmiş veya hedeflenmemiş olarak tasarlanabilen organik nanomalzemeler ise genel olarak; polimerik miseller, polimerik nanopartiküller, lipozomlar, dendrimerler ve polimer-ilac konjugatları olmak üzere beş tipe ayrılmaktadır (Şekil 1.1) (Wicki ve diğ., 2015; Cryer ve Thorley, 2019).

Biyolojik uyumluluk ve bozunabilirlik gibi üstün özellikler taşıması nedeniyle yaygın olarak kullanılan ve klinikte önemli başarılar gösteren organik NP'ler, serbest haldeki ilaç muadillerine kıyasla gelişmiş ilaç koruması, kontrollü salım, genişletilmiş ilaç dağıtımını ve tümöre özgü hedefleme sunmak üzere tasarlanabilmektedirler (Zhou ve diğ.,2017; Anselmo ve Mitragotri, 2016).



Şekil 1.1. Kanser tanı ve tedavisinde kullanılan nanopartiküller (Cryer ve Thorley, 2019)

1.2.1. Nanotaşıyıcıların tümör hedefleme mekanizması

Hızla çoğalma yeteneğine sahip olan kanser hücreleri, bunu gerçekleştirebilmek için yeni kan damarlarına ihtiyaç duyarlar. Yeni oluşan bu tümör kan damarları genellikle birtakım anormallikler ile karakterizedir. Bunlar; yüksek oranda endotel hücre çoğalması, perisit yetersizliği ve damar geçirgenliğine sebep olan anormal bazal membran yapısı olarak sayılabilir (Jaracz ve diğ., 2005; Danhier ve diğ., 2010).

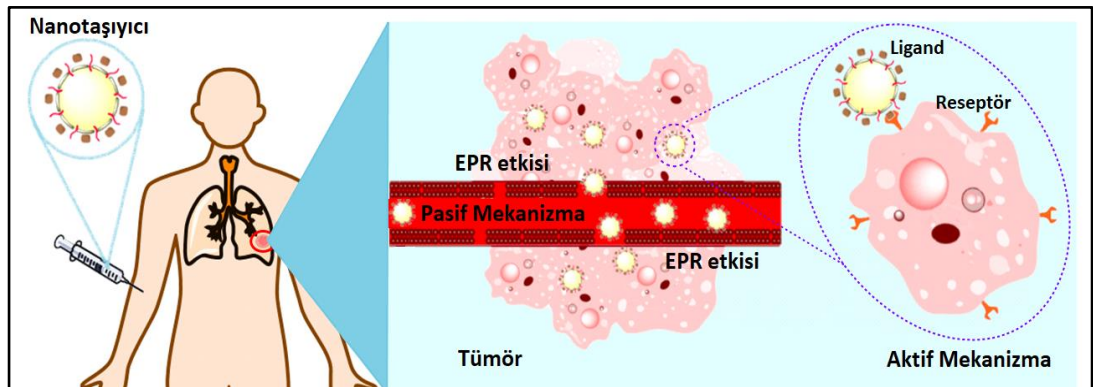
Sağlıklı bölgelere kıyasla iltihaplı veya tümörlü bölgelerde, endotel hücrelerin bir arada bulunma oranları daha azdır, endotel hücre boşluklarından (10-1000 nm) geçebilecek büyüklükte olan NP'ler küçük boyutları sayesinde kan damarı yakınındaki tümör dokusuna ulaşarak burada birikebilirler. İlaç yüklü bu nanotaşıyıcıların (50-800 nm) organizmanın sağlıklı bölgelerindeki damar duvarını geçmesi ise mümkün değildir çünkü bu hücreler arasındaki boşluk sadece 15-30 nm'dir. Bu pasif mekanizma Matsumura ve Maeda tarafından keşfedilen "Arttırılmış Geçirgenlik ve Alıkonma (EPR: Enhanced Permeability and Retention) etkisi" olarak adlandırılmıştır (Danhier ve diğ., 2010; Vieira ve Gamarra, 2016).

Normal vaskülatöre kıyasla daha geniş hacim ve çapa sahip olan tümör kan damarlarındaki bu farklılıktan yararlanılarak; polimer-ilaç konjugatları, proteinler, lipozomlar, miseller ve nanopartiküller gibi antikanser ajanların tümör hücrelerine pasif hedefleme şeklinde taşınması EPR etkisi sayesinde gerçekleşebilmektedir (Şekil 1.2) (Vieira ve Gamarra, 2016; Narang ve Varia, 2011).

Örneğin, ticari olarak kullanılan daunorubisin anti-kanser ilacı içeren Daunosome™ (NeXtar, Inc.) ve doksorubisin bazlı Doxil™ (Sequus Pharmaceuticals); EPR etkisi ile ilaçları tümörlere hedefleyen lipozomal formülasyonlardır. Sterik olarak stabilize edilmiş bu formülasyonlar tümör hücrelerinde pasif hedefleme ile birikmekte olup uzun dolaşım sürelerine sahiptirler. Bu sayede plazmadaki ilaç seviyesi azaltılarak bu ilaçların kullanımı sırasında sıklıkla meydana gelen kardiyak (kalp ile ilgili) yan etkileri en aza indirgenir (Vasir ve Labhasetwar, 2005).

Diğer bir tümör hedefleme mekanizması olan aktif hedeflemede ise kanser hücreleri tarafından aşırı ifade edilen reseptörlere özgü ligandların, nanopartiküllerin yüzeyine modifiye edilmesi ile bu ilaç taşıyıcı nanopartiküllerin tümör dokularına aktif olarak hedeflenmesi sağlanmaktadır (Şekil 1.2) (Vieira ve Gamarra, 2016; Dağlıoğlu, 2018).

Genel olarak ilaç salım sistemlerinde kullanılan NP'lerin boyutu, kılcal damarlardan hızla sızmayacak kadar büyük, retiküloendotelial sistemdeki makrofajlar tarafından yakalanamayacak kadar da küçük olmalıdır. Tümör dokusuna etkili bir ulaşım için patikül boyutlarının yaklaşık olarak 250 nm'den daha küçük olması beklenmektedir (Zhou ve diğ.,2017; Ober ve Gupta, 2011).



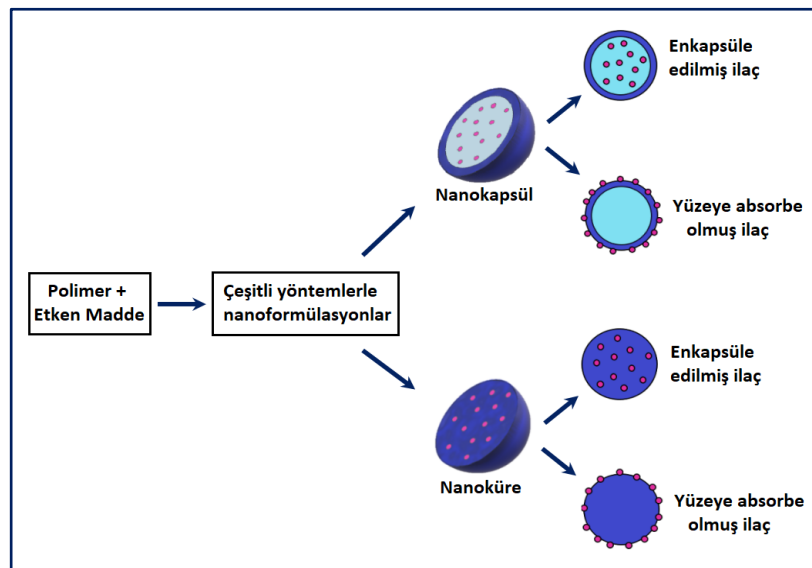
Şekil 1.2. Nanopartiküllerin tümör hedefleme mekanizmaları; pasif ve aktif hedefleme (Vieira ve Gamarra 2016)

1.3. Polimerik Nanopartiküller ve Önemli Avantajları

Polimer, metal ve seramik gibi çeşitli materyaller kullanılarak hazırlanan NP'ler üretim yöntemlerine ve kullanılan malzemelere bağlı olarak, farklı özelliklerde, çeşitli şekil ve boyutlara sahip olarak üretilebilmektedir (Wang ve diğ., 2008). Polimerik nanopartiküller (PNP), 10 ile 1000 nm arasında değişen boyutlara sahip, tek bir polimer veya polimer kombinasyonlarından üretilmiş mikron altı kolloidal sistemlerdir (Nagavarma ve diğ., 2012).

Doğal veya sentetik polimerler kullanılarak hazırlanan PNP'ler, antitümör ilaçlar ile birleştirilerek kötücül tümör hücrelerine hedeflendirilebilirler. Bu sayede sistemik toksisitenin en aza indirgenmesi ve terapötik etkinin artırılması sağlanır. Bunun yanı sıra, PNP'ler ilacın kontrollü salımı, kolay hazırlama ve saflaştırma yöntemleri, biyolojik uyumluluk gibi sunduğu pek çok avantaj ile de ön plana çıkmaktadır (Qiao ve diğ., 2010, Valencia ve diğ., 2011).

Biyolojik olarak bozunabilir olan (biyobozunur) PNP'ler, kontrollü / sürekli salım, küçük boyut (hücre altı), doku ve hücrelerle biyoyuymuluk gibi özellikleri ile ilaç salım sistemleri için oldukça umut vaat edicidirler ve bu yüzden sıkça tercih edilirler. Genel olarak hazırlama yöntemine ilişkin iki sınıfa –nanoküre ya da nanokapsül– ayrılan PNP'ler farklı özellikler taşırlar ve salım davranışları da birbirinden farklıdır (Şekil 1.3) (Kumari ve diğ., 2010; Qiao ve diğ., 2010).



Şekil 1.3. Polimerik nanopartiküllerin sınıflandırılması (Kumari ve diğ., 2010)

Veziküler sistemler olan nanokapsüller ilacın bir kavitede hapsedilmesi ve polimerik bir zar ile çevrenmesini temsil ederken, nanoküreler ilacın polimerik bir matriste tekdüze (sürekli) olarak dağılmasından oluşur. Her iki yöntemde de partiküller etkin maddenin yüzeye adsorbe edilmesi ya da polimerik zar/matris içinde tutulması şeklinde hazırlanabilir (Kumari ve diğ., 2010; Derman ve diğ., 2013).

PNP'lerin en önemli iki temel özelliği küçük boyutlara sahip olması ve biyobozunur materyaller kullanılarak hazırlanmasıdır. Kılcal damarlardan geçebilecek boyutları sayesinde hücrelere alınan PNP'ler hedef bölgeye ulaşırlar ve biyobozunur özellikleri sayesinde bu tümör dokusunda günler ve hatta haftalarca süren kontrollü bir ilaç salımı gerçekleştirirler (Derman ve diğ., 2013).

Bunun yanı sıra PNP'ler ilaç salım sistemlerinde kullanım için;

- Çeşitli yöntemler ile büyük miktarlarda kolay ve ucuz bir şekilde üretilebilmesi,
- Farmasötik ajanın istenen bölgeye daha yüksek konsantrasyonda ulaşabilmesi,
- İlaç salım ile ilgili doku mühendisliği gibi diğer uygulamalara da kolayca dahil edilebilmesi,
- Kolaylıkla sterilize edilebilmesi,
- Vücut içinde parçalanması ve yan ürünlerinin toksik olmaması,
- Diğer ilaç taşıyıcılara kıyasla biyolojik sıvılar içerisinde daha kararlı olması (polimerik matris içinde hapsolan aktif maddeyi parçalanmaktan koruması),
- Tümöre özgü salım ile diğer organ ve dokular üzerindeki sistemik toksisiteyi azaltması,
- Damar içi, kas içi veya deri altı gibi çeşitli yollarla kolaylıkla uygulanabilmesi,
- Katı dozaj formlarının uzun süreli saklanabilmesi, gibi çeşitli avantajlar sunar (Nagavarma ve diğ., 2012; Zhou ve diğ.,2017; , Derman ve diğ., 2013).

1.3.1. Polimerik nanopartikülleri hazırlama yöntemleri

PNP'lerin sentezi, uygulama amacına ve ilacın fizikokimyasal yapısına bağlı olarak çeşitli yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. PNP hazırlarken en uygun yöntemi seçmek, kullanılacak olan uygulama için taşınması istenen özellikleri sağlayabilmek açısından oldukça önemlidir (Crucho ve Barros, 2017).

NP'leri hazırlama yöntemi ise kullanılacak olan polimerin ve ilacın çözünürlük özelliğine bağlı olarak belirlenir (Derman ve diğ., 2013). NP'ler geleneksel olarak önceden sentezlenen polimerin dispersiyonu ya da monomerin polimerizasyonu olmak üzere iki ana metod kullanılarak hazırlanmıştır. Günümüzde ise yaygın olarak önceden sentezlenmiş ve karakteristik özellikleri bilinen polimer veya doğal makromoleküllerin kullanıldığı yöntemler tercih edilmektedir (Soppimath ve diğ., 2001; Derman ve diğ., 2013).

İlacın önceden sentez edilen polimere disperse edilmesi ile PLA, poliglaktid (PGA), PLGA ve poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) bazlı biyobozunur NP'lerin hazırlanması;

- (i) Çözücü buharlaştırma,
- (ii) Nanoçöktürme
- (iii) Kendiliğinden emülsifikasyon/çözücü difüzyonu,
- (iv) Salting out
- (v) Diyaliz
- (vi) Süperkritik akışkan teknolojisi gibi pek çok farklı yöntem ile gerçekleştirilebilmektedir (Soppimath ve diğ., 2001; Nagavarma ve diğ., 2012).

Kullanılan teknikler arasında emülsiyonlardan çözücünün buharlaştırılması (solvent evaporasyon) tekniği yüksek sıcaklıklar veya faz ayrılmasını indükleyen ajanlar gerektirmediği için en basit yöntemdir (Cavallaro ve diğ., 2015). PNP'lerin hazırlanmasında ilk geliştirilen yöntem olan bu yöntemde genel olarak, tekli emülsiyon tekniği ile yağ-su emülsiyonu (o/w) ya da çift emülsiyon tekniği ile ((su-yağ)-su) emülsiyonu (w/o/w) oluşturmak üzere iki farklı strateji kullanılmaktadır (Crucho ve Barros, 2017; Nagavarma ve diğ., 2012). Tekli emülsiyon yöntemi suda çözünmeyen ilaçlar için daha uygun iken, çift emülsiyon yöntemi daha çok suda çözünür ilaçların kapsüllemesi için uygun olarak kabul edilir (Alshamsan, 2014).

Çözücü buharlaştırma yönteminde öncelikle polimer kloroform, diklorometan veya etil asetat gibi uçucu bir çözücü içinde çözülür. Elde edilen organik çözelti sulu fazda emülsifiye edilir ve karışım tipik olarak bir yüzey aktif madde ile (sürfaktan) yüksek hızlı homojenizasyon veya ultrasonikasyon kullanılarak işlenir ve oluşan emülsiyon sürekli faz olan su fazına eklenerek disperse edilir. Böylece, organik çözücünün

buharlaşmasıyla polimer, sulu faz içerisinde bir nanopartikül süspansiyonuna dönüştürülür (Nagavarma ve diğ., 2012; Crucho ve Barros, 2017). Bu teknik kullanılarak hazırlanan ilaç yüklü NP'lerde; polimer, ilaç ve çözücü miktarı, sürfaktan konsantrasyonu, sonikasyon gücü ve süresi gibi farklı parametreler; partikül boyutu ve boyut dağılımı, NP verimi, NP içine yüklenen ilaç verimi ve enkapsülasyon etkinliği üzerinde oldukça etkilidir (Kunii ve diğ., 2007; Çağlar ve diğ., 2014; Shaikh ve diğ., 2017).

1.3.2. Nanopartiküler sistemlerde sık kullanılan polimerler

Food and Drug Administration; Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylı NP'lerin üretimi, biyolojik olarak parçalanabilen ve biyolojik olarak uyumlu doğal veya sentetik polimerlerin kullanımını içerir (Pérez-Herrero ve Fernández-Medarde, 2015). Polimer kimyasının sunduğu avantajlara rağmen, in vivo ilaç salım için tasarlanan PNP bileşeni olarak sayılabilecek polimer çeşidi sınırlıdır. Çünkü kullanılacak olan polimerin in vivo uygulamalarda bir takım gereklilikleri yerine getirmesini beklemek kaçınılmazdır. Arzu edilen özelliklerden ilki; uygulamanın tekrarlanması durumunda kontrolsüz birikim riskini önlemek adına polimerin biyobozunur olması veya tamamen vücuttan atılabilir olması; ikincisi; toksik ve immünojenik etki yaratmaması (bozunma ürünleri varsa, onlarda toksik ve immünojenik olmamalıdır); üçüncüsü ise ilaç salım amacına ilişkin tasarlanan PNP'lerin uygun özellikleri taşıyacak şekilde formüle edilmesidir. PNP'lerin hazırlanmasında; kitosan, jelatin, sodyum aljinat ve albumin gibi doğal polimerler, PLA, PGA, PLGA, PCL, polisiyanoakrilat (PCA) gibi daha pek çok sentetik polimer kullanılmaktadır (Tablo 1.1) (Vauthier ve Bouchemal, 2009; Nagavarma ve diğ., 2012).

Sentetik polimerler; kolayca üretilebilme, kullanımdan sonra kolay bozunma ve aktif bileşiklerin zaman içinde sürekli salımının sağlanması gibi özelliklere sahip olması nedeni ile nanopartiküler sistemlerde sıklıkla kullanılmaktadır (Pérez-Herrero ve Fernández-Medarde, 2015). Bunlar içerisinde en yaygın kullanılanlar ise PLA, PLGA ve poli(alkil siyanoakrilat)'tır (Chaco'n ve diğ.,1999; Kumar ve diğ., 2018).

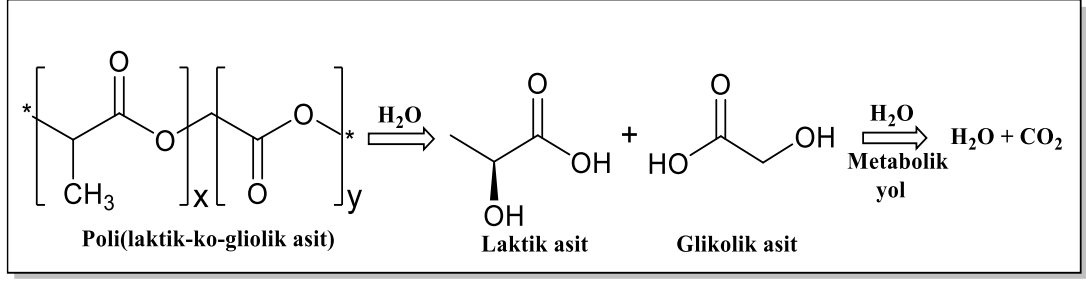
Tablo 1.1. Nanopartiküler sistemlerde yaygın olarak kullanılan polimerler (Christine Vautheir)

Polimer	Tam Adı	Kısaltma veya Ticari Adı*
Doğal Polimerler	Kitosan	
	Aljinat	
	Jelatin	
	Albümin	
Sentetik Polimerler	Polilaktik	PLA
	Poli(laktik-ko-glikolit)	PLGA
	Poli(epsilon-kaprolakton)	PCL
	Poli(izobütül siyanoakrilat)	PICBA
	Poli(izoheksil siyanoakrilat)	PIHCA
	Poli(n-bütül siyanoakrilat)	PBCA
	Poliakrilat ve Polimetakrilat	Eudragit*
Kopolimerler	Polilaktik-poli(etilen glikol)	PLA-PEG
	Poli(laktik-ko-glikolit)-poli(etilen glikol)	PLGA-PEG
	Poli(epsilon-kaprolakton)-poli(etilen glikol)	PCL-PEG
	Poli(heksadesil siyanoakrilat-ko-poli(etilen glikol) siyanoakrilat)	Poli(HDCA-PEGCA)

1.3.3. Poli(laktik-ko-glikolik asit)

FDA onaylı poliesterlerden biri olan PLGA; biyobozunurluk ve biyouyumluluk, iyi bir ilaç salım profili göstermesi ve aynı zamanda ilaç salım profillerini değiştirme imkanı sunması özellikleri ile ilaç salım uygulamaları için en ilgi çekici polimerik malzemeler arasında yerini almıştır (Konan ve diğ., 2002; Srivastava ve diğ., 2016; Fonte ve diğ., 2014; Choi ve diğ., 2012).

Biyolojik olarak parçalanabilir olan PLGA vücutta hidrolize uğrayarak metabolit monomerleri olan laktik asit ve glikolik asite dönüşür (Şekil 1.4), bunlar da sitrik asit döngüsüne girerek karbondioksit (CO₂) ve suya (H₂O) parçalanmaktadır. Dolayısıyla vücut bu iki monomeri etkili bir şekilde kullandığından, ilaç salım veya biyomalzeme uygulamaları için PLGA kullanımına ilişkin meydana gelen sistemik toksisite oldukça düşüktür (Kumari ve diğ., 2010; Choi ve diğ., 2012; Derman ve diğ., 2013). Sunmuş olduğu bu avantajlar sebebiyle antikanser ilaçların, antimetabolitlerin ve proteinlerin PLGA-NP'lerine dahil edilmesine dair literatürde çeşitli çalışmalara (Amjadi ve diğ., 2013; Yadav ve Sawant, 2010; Fonte ve diğ., 2014; Barichello ve diğ., 1999) rastlamak mümkündür.



Şekil 1.4. PLGA'nın kimyasal yapısı ve vücutta biyolojik olarak parçalanması

1.3.3.1. Poli(laktik-ko-glikolik asit) polimerinin biyomedikal uygulamaları

Biyolojik uygulamalar için en sık tercih edilen biyobozunur malzemelerden biri olan PLGA kullanılarak hazırlanan mikro ve nanopartiküler sistemler; oral uygulamalardan, deri altı enjeksiyon uygulamalarına, çeşitli ilaçların, proteinlerin dağıtım sistemlerinde kullanımına kadar geçmişten günümüze geniş bir uygulama alanına sahiptir (Chaco'n ve diğ.,1999; Barichello ve diğ., 1999; Saez ve diğ., 2000; Konan ve diğ., 2002; Bozdog ve diğ., 2005; Jeong ve diğ., 2005; Betancourt ve diğ., 2007; Mundargi ve diğ., 2008; Holzer ve diğ., 2009; Yadav ve Sawant; Lewis ve diğ., 2012; Zhang ve diğ., 2012; Choi ve diğ., 2012; Fonte ve diğ., 2014; Gupta ve diğ., 2014; Mobarak ve diğ., 2014; Guo ve diğ.,2015; Niu ve Panyam 2017; Hernandez-Giottonini ve diğ., 2020).

Bu tez çalışması kapsamında ise özellikle doksorubisin antikanser ilacını içeren PLGA-NP'leri araştırılmıştır (Shaikh ve diğ., 2017; Pieper ve Langer, 2017; Misra ve Sahoo, 2011; Win ve diğ.,2005; Park ve diğ., 2009; Amjadi ve diğ., 2013; Tansık ve diğ., 2014; Tewes ve diğ., 2007; Langroodi ve diğ., 2016; Maksimenko ve diğ., 2019; Pereverzeva ve diğ., 2019; Kalaria ve diğ., 2009; Chai ve diğ., 2017; Betancourt ve diğ., 2007; Yang ve diğ., 2013). Çeşitli katı tümörlere karşı iyi bir anti-tümör etkinlik gösteren doksorubisin (DOX), klinik uygulamada yaygın kullanılan bir antrasiklin ilaçtır (Langroodi ve diğ., 2016; Tewes ve diğ., 2007; Amjadi ve diğ., 2013; Shaikh ve diğ., 2017).

Hem hidrofobik hem hidrofilik formda bulunabilen doksorubisin ilacının enkapsülasyonu için PLGA sıkça tercih edilmiştir. Çünkü PLGA hem hidrofobik ilaçların (organik ortamda) hem de hidrofilik ilaçların (sulu ortamda) kapsüllenmesine olanak tanır (Win ve diğ., 2015). Daha önce (2.1. bölümünde) de bahsedildiği gibi hidrofobik ilaçların enkapsülasyonu için tekli emülsiyon yöntemi

kullanılırken, hidrofilik ilaçların enkapsülasyonu için daha çok çiftli emülsiyon yöntemi kullanılmaktadır (Alshamsan, 2014).

Doksorubisin yüklü PLGA-NP'lerinin sentezlenmesinde ilacın formuna (suda /organikte çözünübilirliğine) bağlı olarak hem tekli emülsiyon (Tewes ve diğ., 2007; Park ve diğ., 2009; Yang ve diğ., 2013; Tansık ve diğ., 2014; Çağlar ve diğ., 2014; Win ve diğ., 2015; Misra ve Sahoo, 2011) hem de çiftli emülsiyon (Chai ve diğ., 2017; Kalaria ve diğ., 2009; Pereverzeva ve diğ., 2019; Maksimenko ve diğ., 2019; Langroodi ve diğ., 2016; Tewes ve diğ., 2007; Çağlar ve diğ., 2014; Win ve diğ., 2015) çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmaktadır. Genel olarak çiftli emülsiyon tekniği daha çok tercih edilmiş olsa da iki yöntemin ilaç enkapsülasyon etkinliği karşılaştırıldığında tekli emülsiyon yönteminin doksorubisin yüklenebilirliği açısından daha başarılı olduğu görülmüştür (Tewes ve diğ., 2007; Çağlar ve diğ., 2014; Win ve diğ., 2015).

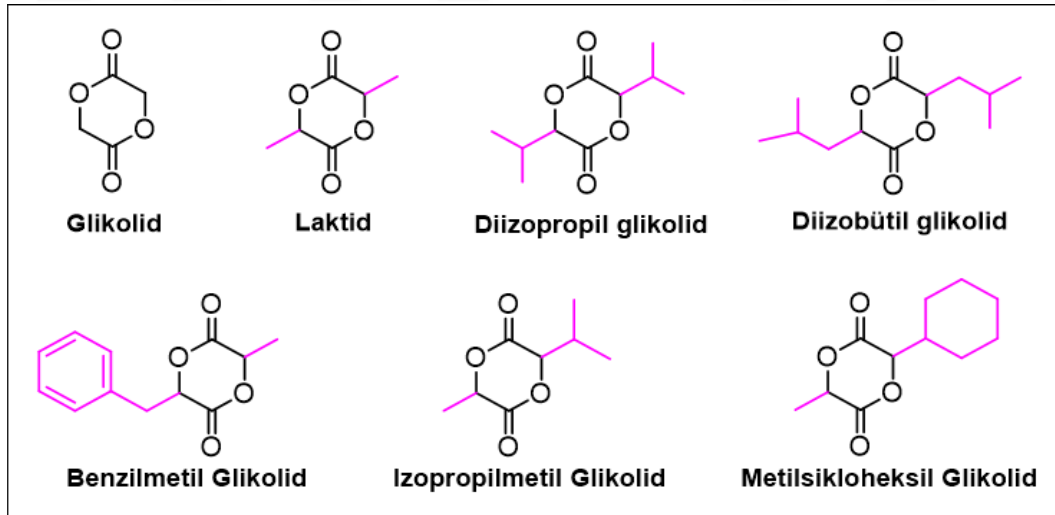
2017 yılında Shaikh ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmada tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile doksorubisin yüklü PLGA-NP'leri hazırlanmıştır. Bu çalışma ile NP'lerin hazırlanmasında polimer konsantrasyonu, PVA konsantrasyonu, sonikasyon süresi ve yağ/su oranı gibi çeşitli parametrelerin ilaç enkapsülasyonu, partikül boyutu ve boyut dağılımı (PDI), zeta potansiyeli gibi özellikleri üzerindeki etkisi detaylıca incelenmiştir. Optimize edilen NP formülasyonunda partikül kararlılığını test etmek için ise %5 konsantrasyonlu fruktoz, ksilitol, trehaloz ve mannitol varlığında liyofilizasyonları gerçekleştirilmiştir. Trehaloz ve mannitol içeren formülasyonların herhangi bir partikül agregasyonuna veya PDI' de önemli bir değişikliğe neden olmadığı bulunmuştur. (Shaikh ve diğ., 2017).

1.3.4. Sübstitüye glikolid bazlı polimerler

Biyolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılan poliesterlere alternatif yeni malzemeler üretmeyi amaçlayan araştırmacılar, farklı sübstitüye grupları içeren glikolidlerin polimerizasyonunu gerçekleştirerek bu yan grupların polimerin fizikokimyasal özelliklerine olan etkisini incelemiştir. Polilaktid'in yapısal analogu olan poli(sübstitüye glikolid) (PSG)'ler; sahip oldukları biyouyumluluk, biyobozunurluk ve yüksek ilaç yükleme kapasiteleri gibi üstün özellikleri sayesinde

araştırmacıların ilgi odağı olmuştur (Iwakura ve diğ., 1969; 1971; Yin ve Baker, 1999; Yin ve diğ., 2001; Simmons ve Baker, 2001; Lee ve diğ., 2004; Trimaille ve diğ., 2004; 2005; 2006; 2007; Di Tommaso ve diğ., 2010; Wang ve diğ., 2010; Mondon ve diğ., 2008; 2011a; 2011b; Bachhav ve diğ., 2011; Cohen-Arazi vd., 2010; 2013; Marubayashi ve diğ., 2013; Lapteva vd., 2014a; 2014b; 2019; Arıcan ve Mert, 2015; 2020; Arıcan ve diğ., 2018; Trubitsyn ve diğ., 2019).

Literatürde çok sayıda simetrik (diizopropil, diizobütil, diheksil, dibenzil gibi) ve asimetrik (metilsiklo heksil, izopropilmetil, benzilmetil gibi) sübstitüye glikolid monomerlerin (şekil 1.5) sentezi ve bunların polimerizasyonu monoalkol (benzil alkol gibi) varlığında çeşitli katalizörler ile ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$, DMAP gibi) halka açılma polimerizasyonu ile gerçekteşirilmifitir (Arıcan ve diğ., 2018). PLA'ya yan zincirlerin dahil edilmesi ile elde edilen PSG'lerin; hidrofobikliği, mekanik mukavemeti ve canlı hücre uyumluluğu gibi çeşitli özelliklerinin kontrol edilebileceği bilinmektedir. Dahası, uygun monomer seçimi ile uygun bozunma süresi ve toksik olmayan yan grupların oluşması beklenmektedir (Marubayashi ve diğ., 2013; Cohen-Arazi ve diğ., 2013).



şekil 1.5. Simetrik ve asimetrik sübstitüye glikolidlerin yapısı

1.3.4.1. Sübstitüye glikolid polimerlerin biyomedikal uygulamaları

PSG'lerin ilaç salım sistemlerinde kullanımına öncülük eden çalışmalardan biri 2005 yılında gerçekteşirilmifitir (Trimaille ve diğ., 2005). Bu çalışmada, halka açılma polimerizasyonu ile sentezlenen poli(monoheksil sübstitüye glikolid) (PmHLA)'in

camsı geçiş sıcaklığı (T_g), viskozitesi ve bozunma özellikleri incelenerek, PLA'ya alternatif, enjekte edilebilir yeni PSG bazlı formülasyonların hazırlanabileceği doğrulanmıştır. Ayrıca PmHLA polimerinin yapısındaki fonksiyonel yan grupların, optimize edilmiş ilaç sistemlerinde gereken gelişmiş moleküler yapıları eklemek ve oluşturmak için uygun olduğu bildirilmiştir (Trimaille ve diğ., 2005).

Yine aynı grup tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada poli(monoheksil sübstitüye glikolid) (PmHLA) ve poli(diheksil sübstitüye glikolid) (PdiHLA)'in MePEG ile diblok kopolimerleri sentezlenerek hidrofobik griseofulvin (GF) ilacı yüklü misel formülasyonları üretilmiştir (Trimaille ve diğ., 2006). Sonraki yıllarda da hidrofobiklik ve kristalinite özelliklerinin kontrol edilmesi gibi önemli avantajlar sunması sebebiyle sübstitüye glikolidlerin PEG ile kopolimerlerinin sentezi oldukça fazla tercih edilmiştir ve bunların biyomedikal uygulamalara ilişkin araştırılması büyük ölçüde ilaç taşıyıcı misel formülasyonlarının üretilmesi ile ilgili olmuştur (Di Tommaso ve diğ., 2010; Mondon ve diğ., 2011a; 2011b; Bachhav ve diğ., 2011; Lapteva vd., 2014a; 2014b; 2019; Trubitsyn ve diğ., 2019). Bunlar içerisinde PEG-poli(heksil sübstitüye glikolid (MePEG-hexPLA) misellerinin oda sıcaklığındaki sulu çözeltileri iyi bir kararlılığa sahiptir ve standart MePEG-PLA misellerine kıyasla daha hidrofobik olması nedeniyle (PLA'ya bağlı heksil yan gruplarından dolayı) özellikle hidrofobik ilaçların yükleme verimliliği yüksektir. Bu avantajlarının yanı sıra, uzun yan zincirler (heksil), metil grubuna (laktid) kıyasla polimerizasyonu yavaşlatır ve düşük molekül ağırlıklı kopolimer (<10 kDa) eldesi ile sonuçlanır (Mondon ve diğ., 2008; Çetin ve diğ., 2021).

İlaç taşıma sistemlerinde kullanılmak üzere hazırlanan misel formülasyonlarının yanı sıra PSG'lerin enjekte edilebilir hidrojellerinin üretilebilirliği de literatürde araştırma konusu olmuştur. Örneğin, 2015 yılında Arıcan ve Mert tarafından yürütülen çalışmada Sn(Oct)₂ katalizörü ve PEG başlatıcısı varlığında simetrik diizopropil glikolid (DIPG) monomerinin halka açılma polimerleşmesi ile sentezlenen MePEG-PDIPG diblok ve PDIPG-PEG-PDIPG triblok kopolimerlerinin ısıya-hassaslık (jel-sol; 42 °C'de akışkan (sol), 37 °C'de jel) özellikleri incelenmiş ve hazırlanan hidrojellere paklitaksel antikanser ilacı yüklenerek salım davranışları araştırılmıştır. Sonuçta lokal katı tümörlerin tedavisinde kullanılabilecek uygun biyomalzemeler üretilmiştir (Arıcan ve Mert, 2015).

1.3.4.2. PDIBG bazlı polimerler ve biyomedikal uygulamaları

Simetrik diizobütil monomerinin sentezi ilk defa 1971 yılında Iwakura ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada, lösin başlangıç maddesinin nitröz asit ile olan reaksiyonundan α -hidroksiizokaproik asit elde edilmiştir. Ardından, bu α -hidroksi asit, 200 °C'de ısıtılarak düşük moleküler ağırlıklı poliesterlere (oligomerlere) dönüştürülmüştür, son olarak az miktardaki ZnO varlığında oligomerlerin termal parçalanması ile diizobütil monomeri elde edilmiştir. Diizobütil monomerinin polimerizasyonu ise 175-180 °C'de Na₂CO₃, Zn, ZnO, PbO, MgO ve CaO gibi çeşitli metal katalizörleri kullanılarak halka açılma reaksiyonu ile başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte, laktid'in polimerizasyonunda pratik olarak kullanılan ve rasemizasyona neden olmadığı bilinen bu katalizörlerin diizobütil glikolidin polimerizasyonunda bir şekilde (yüksek sıcaklık ve uzun süre polimerleştirmeden kaynaklı olduğu düşünülen) rasemizasyona neden olduğu bildirilmiştir (Iwakura ve diğ., 1971). Ardından 1999 yılında Yin ve Baker çeşitli süstitüye glikolid monomerlerinin (diizobütil, dietil, dihekzil) sentezi için yine aynı yöntemi kullandığında bu kez diastereomer karışımları elde etmişlerdir. Bu monomerlerin homopolimerizasyonları ise Sn(Oct)₂, SnO, SnBr₂, SnBr₄, PbO ve Ph₄Sn gibi katalizörlerin ve tert-butilbenzil alkol gibi başlatıcıların varlığında eriyik ortamda gerçekleştirilmiştir. Sonuçta yüksek dönüşümlü ve öngörülebilir moleküler ağırlığına sahip polimerler elde edildiği ve bunun yanında polimerizasyon hızının ve polimerlerin T_g 'sinin monomerdeki yan zincir yapısı ile yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir (Yin ve Baker, 1999).

2020 yılında Arıcan ve Mert tarafından gerçekleştirilen çalışmada PSG'lerin nanotaşıyıcı sistemlerde kullanımına güncel bir örnektir. PDIBG'nin hidrofobikliğini azaltmak ve dolayısıyla biyobozunurluk ile ilgili dezavantajların üstesinden gelmek amacıyla MePEG-PDIBG diblok ve PDIBG-PEG-PDIBG triblok kopolimerleri sentezlenmiş ve bunların paklitaksel antikanser ilacı yüklü NP'leri hazırlanmıştır. Formülasyon değişkenlerinin NP özellikleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiş ve ilacın salım ve bozunma davranışları incelenmiştir (Arıcan ve Mert, 2015; 2020). PDIBG homopolimeri ile ilgili NP formülasyonlarının hazırlanması ve araştırılmasına ilişkin literatürde şimdiye kadar herhangi bir çalışmayla karşılaşılmamıştır.

1.4. Liyofilizasyon Yöntemi

NP'lerin klinik uygulamalarda kullanımında ana zorluklardan biri, ticarileşme aşamasına dek formülasyonların ilk fizikokimyasal durumlarının gerektiği gibi sürdürülmesiyle ilgilidir çünkü partiküller saklama sırasında birtakım fiziksel ve kimyasal kararsızlık gösterirler (Abdelwahed ve diğ., 2016).

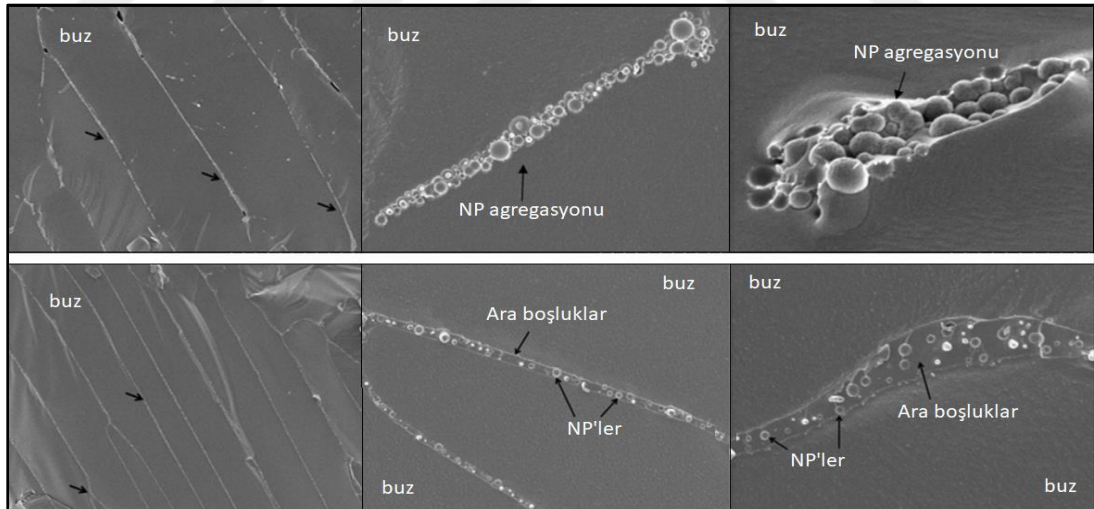
Nanopartiküler sistemlerin biyolojik uygulamalarına odaklanan araştırmalarda, NP yüzey enerjisinin kararlılığı için uygun ortamı sağlayan sıvı süspansiyonlar kullanılmaktadır (Picco ve diğ., 2018; Lee ve diğ., 2009). Ancak NP'lerin uzun süre sulu süspansiyon içerisinde saklanması durumunda partikül agregasyonu, polimerik malzemenin hidrolizi, ilacın NP'den salımı ve saklama sırasında kimyasal reaktivitesi gibi birtakım fiziksel ve kimyasal kararsızlıklar meydana gelmektedir. NP'lerin kullanımını büyük ölçüde sınırlayan bu durumları ortadan kaldırmak ve kararlılıklarını iyileştirmek ilaç taşıyıcıların geliştirilmesi için gereklidir ve hem fiziksel hem de kimyasal kararlılığı korumak için ortamdaki suyun uzaklaştırılması gerekmektedir. Bunun için farmasötik endüstrisinde yaygın olarak solüsyon ve süspansiyonların katı içeriklere dönüştürülüp saklanmasına olanak sağlayan liyofilizasyon (freeze-dry, dondurarak-kurutma) yöntemi kullanılmaktadır (Saez ve diğ., 2000; Bozdogan ve diğ., 2005; Picco ve diğ., 2018; Abdelwahed ve diğ., 2016).

Bir dehidrasyon prosesi olan bu yöntem, i) dondurma, ii) birincil kurutma, iii) ikincil kurutma olmak üzere üç aşamayı içermektedir ve temelde buzun süblimasyonu ile formülasyondaki suyun uzaklaştırılmasına daha sonra kalan (donmayan) suyun vakum altında desorpsiyonuna dayanır. Liyofilizasyon yöntemi ile kolayca elde edilen katı haldeki ürün gerektiğinde su ile yeniden dağıtılabılır. (Fonte ve diğ., 2016b, Varshosaz ve diğ., 2012; Wang ve diğ., 2018).

1.4.1. Kriyoprotektan kullanımı

Liyofilizasyon yöntemi NP füzyonunu ve agregasyonunu önleyici ve uzun süreli saklama sırasında boyutsal kararlılığı korumada oldukça etkili bir proses olsa da tek başına kullanımı yeterli değildir çünkü NP'ler bu proses boyunca, dondurma ve kurutma aşamalarında, çözünen madde konsantrasyonu, pH değişiklikleri, buz kristallerinin oluşumu gibi bir takım streslere maruz kalırlar (Almalik ve diğ., 2017; Wang, 2000, Lee ve diğ., 2009, Wang ve diğ., 2018).

NP üzerinde meydana gelen bu stresler uygulanan dondurma ve kurutma işlemleri sırasında agregasyona sebep olur. NP'lerin oluşacak bu streslerden etkilenmesini önlemek ve kararlılıklarını sağlamak için liyofilizasyon sırasında çeşitli ekspiyanlar (yardımcı maddeler) kullanılır (Abdelwahed vd., 2006; Wang ve diğ., 2018, Almalik ve diğ., 2017; Holzer ve diğ., 2009). Kriyoprotektan olarak kullanılan trehaloz, mannitol, glukoz, sakkaroz, sorbitol gibi çeşitli şekerlerin varlığı liyofilizasyon sırasında NP kararsızlığını en aza indirgeyerek agregasyon meydana gelmesini önler ve buz kristallerinin sebep olduğu mekanik strese karşı koruyucu bir etki yaratır (Fonte ve diğ., 2014). Örneğin, Niu ve Panyam tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada dondurma sırasında NP'lerin agregasyonu ve kriyoprotektif korumanın etkisi taramalı elektron kriyomikroskopi (kriyo-SEM) tekniği kullanılarak net bir şekilde gösterilmiştir; NP formülasyonları kriyoprotektan ilave edilmeden dondurulduğunda buz kristalleri sınırında kümelenerek (agregasyon) lineer bir birleşme gösterirken (Şekil üst), %3 sukroz içeren NP formülasyonları dondurulduğunda buz kristalleri ve NP'ler arasında oluşan boşluklar sayesinde partikül agregasyonunun önüne geçilmiştir (Şekil 1.6) (Niu ve Panyam, 2017).



Şekil 1.6. NP formülasyonlarının Taramalı Elektron Kriyomikroskopi (kriyo-SEM) görüntüleri, kriyoprotektan içermeyen NP formülasyonlarının dondurulması (şekil üst), %3 sukroz içeren NP formülasyonlarının dondurulması (şekil alt) (Niu ve Panyam, 2017)

Kullanılan ekspiyanlar, liyofilizasyon sırasında meydana gelen bu stresi azaltmanın yanında NP'lerin fiziko-kimyasal özelliklerinin korunmasını da (partikül boyut ve boyut dağılımı gibi) mümkün hale getirir. Bu ekspiyanların koruyucu mekanizması,

sudaki donmuş şekerin amorf matrisinden kaynaklanmaktadır. Amorf matris, NP yüzeyindeki polar gruplar ile kriyoprotektan ajanının -OH grupları arasında hidrojen bağı oluşturarak buz kristallerinin yıkıcı etkisini engeller (Hirsjärvi ve diğ., 2009; Abdelwahed ve diğ., 2006).

Farklı şeker çeşitlerinin, liyofilizasyon sırasında ve liyofilizasyondan sonra uzun süreli saklama boyunca NP kararlılığı üzerindeki etkisine odaklanan pekçok çalışma gerçekleştirilmiştir (Quintanar-Guerrero ve diğ., 1998; Konan ve diğ., 2002, Di Tommaso ve diğ., 2010; Holzer ve diğ., 2009; Wang ve diğ., 2018; Jeong ve diğ., 2005). Bunun yanında şeker içeren ilaç yüklü liyofilize NP'lerin farklı koşullarda uzun süre saklanması sırasında ilacın yapısal kararlılığının korunmasına odaklanan çalışmalar da mevcuttur (Soares ve diğ., 2013; Fonte ve diğ., 2014; 2016a). Gerçekleştirilen çalışmalar ile herhangi bir kriyoprotektan olmadan uygulanan liyofilizasyon proseslerinde partikül agregasyonu meydana geldiği doğrulanmıştır. Bu agregasyon, ilaç yüklü NP liyofilizatlarının kullanıma hazırlanması esnasında uygulanan su ile yeniden dağıtma işlemini (rekonstitüsyon) büyük ölçüde engelleyerek partikül boyutlarını istenmeyecek ölçüde büyütür (Wang, 2000; Fonte ve diğ., 2016b; Almalik ve diğ., 2017; Ohshima ve diğ., 2009; Varshosaz ve diğ., 2012). Dolayısıyla ekspiyan kullanımı başarılı bir dondurma-kurutma prosesi için vazgeçilmez olup uygun kriyoprotektan seçimi için farklı NP formülasyonlarının değerlendirilmesi gerekmektedir (Hirsjärvi ve diğ., 2009).

1.4.2. Dondurma-çözme yöntemi

Liyofilizasyon prosesi için kullanılacak olan kriyoprotektan çeşidi ve konsantrasyonunun optimizasyonu çok sayıda formülasyon üzerinde çalışmayı gerektirir. Bu da oldukça pahalı ve zaman alıcı bir süreçtir. Bu nedenle oldukça pratik ve hızlı bir yöntem olan dondurma-çözme (freeze-thaw) yöntemi, liyofilizasyon prosesi için en uygun kriyoprotektan çeşidi ve konsantrasyonunun belirlenmesinde ön bir eleme testi olarak kullanılmaktadır (Schwarz ve Mehnert, 1997; Date ve diğ., 2010; Holzer ve diğ., 2009; Doktorovova ve diğ., 2014; Abdelwahed ve diğ., 2006; Di Tommaso ve diğ., 2010).

Literatürde pek çok çalışma dondurma-çözme testleri için farklı dondurma sıcaklıklarının kullanımı, hızlı veya yavaş dondurma (Di Tommaso ve diğ., 2010;

Cui ve diğ., 2003; Saez ve diğ., 2000; Quintanar-Guerrero ve diğ., 1998), farklı NP ve kriyoprotektan konsantrasyonlarının kullanımı (Hirsjärvi ve diğ., 2009; Holzer ve diğ., 2009; Chasteigner ve diğ., 1996; Date ve diğ., 2010) gibi birçok parametreyi değiştirerek liyofilizasyon sırasında partikül kararlılığını koruyacak olan optimum koşullara ulaşmayı hedeflemiştir.

Genel olarak dondurma-çözme işlemleri sonrasında kriyoprotektan içermeyen formülasyonlarda partikül agregasyonunun meydana geldiği görülürken şeker ilave edilen NP formülasyonlarında farklı parametrelerin (kriyoprotektan çeşidi ve konsantrasyonu, NP konsantrasyonu ve dondurma sıcaklıkları gibi) uygulanması partikül kararlılığı üzerindeki koruyucu etkinliğinde farklı sonuçlara neden olduğu görülmüştür (Di Tommasove diğ., 2010; Cui ve diğ., 2003; Saez ve diğ., 2000; Quintanar-Guerrero ve diğ., 1998; Hirsjärvi ve diğ., 2009; Holzer ve diğ., 2009; de Chasteigner ve diğ., 1996; Date ve diğ., 2010).

2010 yılında Di Tommaso ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada, daha çok oftalmik (göz ile ilgili) uygulamalarda kullanılan siklosporin A (CsA) yüklü MPEG-hexPLA misellerine-çeşitli şekerlerin izotonik ve hipertonic çözeltileri varlığında ve iki farklı dondurma sıcaklığında- dondurma-çözme prosesi uygulanmıştır. Dondurma-çözme sonrası partikül kararlılığını koruyan sıcaklık ve şeker çeşitleri ile konsantrasyonları belirlenerek sonrasında da ilaç yüklü NP'lerin bu koşullarda dondurma-kurutma testleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçta; %10 sukroz içeren CsA yüklü MPEG-hexPLA misel formülasyonlarında başarılı bir liyofilizasyon ve rekonstitüsyon işlemi gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Di Tommasove diğ., 2010). Aynı yıl yürütülen bir diğer çalışmada tüberküloz hastalığının tedavisinde kullanılan rifampisin ilacı kullanılarak, Gantrez AN-119 polimeri bazlı ilaç yüklü PNP'ler üretilmiştir. Bu PNP'lerin liyofilizasyonunda kullanılacak optimum koşullar yine dondurma-çözme testleri ile belirlenmiştir. Trehaloz ve fruktozun PNP'ler üzerindeki etkinliği farklı şartları (NP konsantrasyonu, kriyoprotektan konsantrasyonu, dondurma sıcaklığı) içeren bir dizi dondurma-çözme testi ile değerlendirilmiştir. Sonrasında partikül kararlılığını en iyi korunduğu koşullar liyofilizasyon prosesinde uygulandığında yine benzer sonuçlar elde edilmiştir (Date ve diğ., 2010).

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Kimyasallar

L-lösin (*L*-2-amino-4-metilpentanoik asit) (TCI, %99), sodyum nitrit (NaNO₂) (BDH Chemicals) ve sülfürik asit (H₂SO₄) (Sigma-Aldrich, %95-97) *L*-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit sentezi için kullanıldı. Toluen (Sigma-Aldrich, %99,7) ve katalizör olarak *p*-toluensülfonik asit monohidrat (PTSA.H₂O) (Sigma-Aldrich, %98,5), *L*-3,6-diizobütil-1,4-dioksan-2,5-dion (*L*-diizobütil glikolid, LDIBG) monomerinin sentezi sırasında kullanıldı. Poli(diizobütil glikolid) (PDIBG) homopolimer sentezi için katalizör olarak kalay(II) 2-etilhekzanoat (kalay(II) oktoat, Sn(Oct)₂ (Sigma Aldrich, %95) ve başlatıcı olarak benzil alkol (Sigma Aldrich, %99,8) kullanıldı. PLGA (Corbion, 75/25), poli(vinil alkol) (PVA, Mowiol, *M_w* ~ 31 kDa), trietilamin (Et₃N) (Sigma-Aldrich, %99), D-glukoz (Galenik Ecza), mannitol (BDH Chemicals) ve sukroz (Merck) nanopartiküllerinin hazırlanması sırasında kullanıldı. Sodyum klorür (NaCl) (%99), sodyum sülfat (Na₂SO₄) (%99), dietil eter (Et₂O) (%99,5), hekzan (%95), diklorometan (%99,5), dimetil sülfoksit (%99,9) ve metanol (%99,8) Sigma-Aldrich'ten temin edildi ve *L*-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit, *L*-diizobütil glikolid ve poli(diizobütil glikolid) ürünlerinin sentezleri sırasında saflaştırma amacı ile direkt olarak kullanıldı. Tetrahidrofuran (THF) (Sigma-Aldrich, %99,9) GPC analizleri sırasında hareketli faz olarak ve numune hazırlamak amacı ile kullanıldı. Doksorubisin yüklü PLGA nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullandığımız PURASORB[®] PDLG 7510 (PLGA 75/25) polimerini temin ettiği için Corbion'a teşekkür ederiz.

2.2. Kullanılan Cihazlar

2.2.1. Azaltılmış toplam reflektans-fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometresi (ATR-FTIR)

ATR Bruker-Tensor 27 model spektrofotometre kullanılarak 4000-600 cm⁻¹ aralığında ve 4 cm⁻¹ çözünürlüğünde 30 tarama yapılarak sentez edilen ürünlerin ATR-FTIR spektrumları alındı.

2.2.2. Nükleer manyetik rezonans spektrometresi (NMR)

Bruker Avance III 400 MHz NMR spektrometresi (Giresun Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (GRÜMLAB) sentez edilen ürünlerin yapısal tayini ve homopolimerin sayıca ortalama molekül ağırlık ile dönüşümünün belirlenmesi amacı ile kullanıldı.

2.2.3. Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC)

Sentez edilen homopolimerin molekül ağırlık ve molekül ağırlık dağılımının belirlenmesi için kromatografik GPC (Malvern) tekniğinden yararlanıldı. GPC analizi; bünyesinde bir pompa, 3 adet kolon içeren (iki adet kolon 300x8 mm Viscotec LT4000L Mixed, Low Org ve bir ön kolon 10x4,6 mm Viscotec TGuard, Org Guard Col) kolon firmı ve bir refraktif indeks detektör (VE 3580 RI Detector) bulduran Viscotec GPCmax Autosampler sistemli cihaz ile 1 mL/dakika akış hızında THF (HPLC saflıkta) kullanılarak 35 °C'de yapıldı. Analiz sırasında enjeksiyon hacmi 100 µL ve numune konsantrasyonları 5 mg/mL olacak şekilde belirlendi. Kalibrasyon eğrisi hazırlanırken molekül ağırlıkları 1,200-400 kDa arasında değişen dokuz tane polistiren standardı kullanıldı. Analiz sonuçları, OmniSEC 5,12 paket programı kullanılarak hesaplandı.

2.2.4. Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC)

Poli(diizobütil glikolid) homopolimerinin termal karakteristikleri; -60-220 °C aralığında 10 °C/dakika ısıtma/soğutma hızında iki ısıtma basamaklı olarak sisteme 20 mL/dakika hacimsel akış hızında azot beslenerek Mettler Toledo DSC1 Star System cihazı ile belirlendi.

2.2.5. Termogravimetrik analiz (TGA)

Poli(diizobütil glikolid) homopolimerinin termal bozunma davranışı TGA 1 STAR System cihazı kullanılarak araştırıldı. Analiz, sisteme 30 mL/dakika hacimsel akış hızında azot beslenerek numunenin oda sıcaklığından 600 °C'ye kadar 10 °C/dakika hızla ısıtılması ile gerçekleştirildi.

2.2.6. Ultrasonik homojenizatör

Nanopartikül üretimleri tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma tekniği kullanılarak ultrasonik homojenizatör (Bandelin Sonopuls HD 2070.2) ile gerçekleştirildi.

2.2.7. Soğutmalı santrifüj

Nanopartiküller hazırlandıktan sonra sulu süspansiyonlarından toplanması işlemleri santrifüj cihazı (Gyrozen 1580R, Seul/Kore) kullanılarak 4 °C’de gerçekleştirildi.

2.2.8. Partikül boyut analizatör (ZetaSizer)

Hazırlanan nanopartiküllerin boyutları, boyut dağılımları ve yüzey yükleri 25 °C’de dinamik ışık saçılması yöntemi (DLS: dynamic light scattering) ile Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern) cihazı kullanılarak belirlendi.

2.2.9. Liyofilizatör (Freeze dryer)

Donmuş nanopartiküllerden oda sıcaklığında suyun uzaklaştırılması işlemi, -80 °C ve 0,008 mBar basınç altında liyofilizatör (Labconco FreeZone Plus Cascade Freeze Dry Systems 2,5 L) ile gerçekleştirildi.

2.2.10. Soğutmalı sirkülatör

Soğutmalı sirkülatör (Huber, TC100E) dondurma-çözme ve dondurma-kurutma testlerinde NP örneklerinin dondurulmasında kullanıldı.

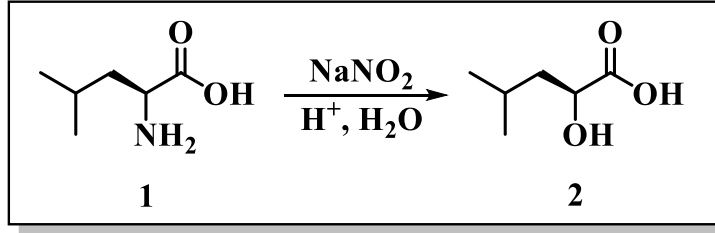
2.2.11. UV/Vis spektrofotometre

Nanopartiküllerin içerisine yüklenen doksorubisin miktarları Agilent Cary-60 UV/Vis spektrofotometre cihazı kullanılarak belirlendi.

2.3. Yöntem

2.3.1. L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit sentezi

L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit (2) sentezi basit ve pratik olan diazotizasyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi;

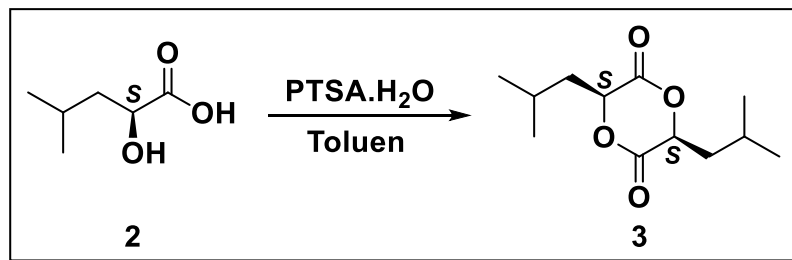


Şekil 2.1. 2 bileşiğinin sentezi

2,5 M sülfürik asit (H₂SO₄) (80 mL, 0,2 mol) içerisinde karışmakta olan *L*-lösin (*L*-2-amino-4-metilpentanoik asit) (13,25 g, 0,1 mol) çözeltisi içerisinde, saf su içerisinde hazırlanan sodyum nitrit (NaNO₂) (41,4 g, 0,6 mol) çözeltisi damlatma hunisi yardımı ile damla damla 0 °C’de yaklaşık iki saat süre ile eklendi. Eklemi işleminden sonra reaksiyon 3 saat daha 0 °C’de karıştırılmaya devam ettirildi ve arkasından oda sıcaklığına getirilerek 24 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Devamında, sulu çözelti sodyum klorür (NaCl) ile doyurularak dietil eter (3 x 80 mL) ile ekstrakte edildi. Ekstraksiyon sonucunda elde edilen organik fazlar birleştirildi ve susuz sodyum sülfat (Na₂SO₄) ile kurutulup filtre edildi. Organik çözücü vakum altında evaporatör yardımı ile uzaklaştırıldıktan sonra sarımsı vizkoz kalıntı elde edildi. Son olarak, viskoz kalıntı dietil eter-hekzan karışımı ile kristallendirilerek *L*-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit (2) beyaz kristalleri elde edildi (%80) (Şekil 2.1) (Arıcan ve Mert, 2020; Çetin ve diğ., 2021, Müller ve diğ., 2009).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0,92-1,08 (d, *J* = 6,6 Hz, 6H, CH₃, CH₃); 1,58-1,72 (dist. t, *J* = 7,2 Hz, 2H, CH₂); 1,82-1,98 (m, 1H, CH); 4,26-4,38 (dist. dd, *J* = 6,0, 7,4 Hz, 1H, CH); 6,40-8,20 (br, 2H, OH, COOH). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 21,53; 23,33; 24,58; 43,30; 69,02; 180,72. ATR-FTIR (ν_{max}/cm⁻¹): 3420 (OH); 2957, 2934, 2905, 2874 (CH); 1701 (C=O).

2.3.2. *L*-3,6-diizobütil-1,4-dioksan-2,5-dion (*L*-diizobütil glikolid, LDIBG) sentezi



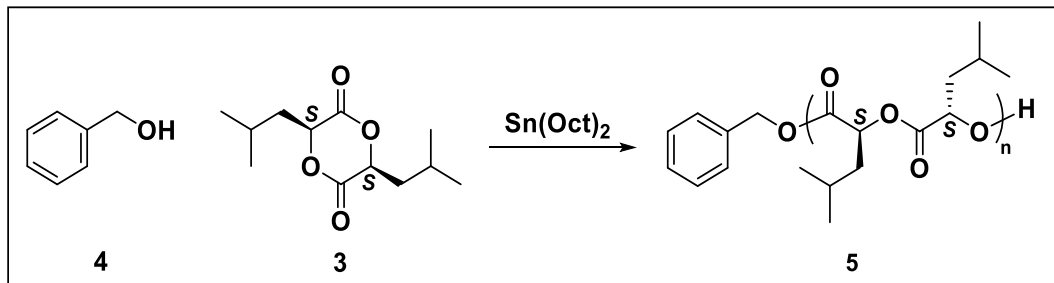
Şekil 2.2. 3 bileşiğinin sentezi

L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit (2, 10 g, 75,7 mmol), *p*-toluensülfonik asit monohidrat (PTSA.H₂O, 200 mg, 1,0 mmol) ve toluen (200 mL) 250 mL'lik balon içerisine eklendi. Karışım; reaksiyon sırasında oluşan suyun azeotropik olarak reaksiyon ortamından uzaklaştırılması amacı ile dean-stark aparatı kullanılarak 12 saat boyunca kaynatıldı. Reaksiyon takibi için ince tabaka kromatografisi (TLC, Silika Jel 60 F₂₅₄) tekniğinden yararlanıldı. Spotlar TLC plakasında etil asetat/hekzan (1:1) hareketli fazı kullanılarak yürütüldü ve noktaların belirlenmesi için, TLC plakası potasyum permanganat boyası (fonksiyonel grup (ester, amin, alkol gibi) belirteci) ile boyanarak 60 °C'de 2 dakika bekletildi (*R*_F: 0,84). *L*-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit başlangıç maddesine ait spotun TLC plakasında yok olması ile birlikte (12 saat) reaksiyon karışımı soğutularak toluen evaporatör yardımı ile düşük basınç altında (9.10⁻¹ mBar) uzaklaştırıldı.

Elde edilen oligomer-monomer karışımı, oligomerleri uzaklaştırmak için iki defa dietil eter ile yıkandı. Sonrasında dietil eter dekantasyonla ayrılıp çözücüyü tamamen uzaklaştırmak için elde edilen *L*-3,6-diizobütil-1,4-dioksan-2,5-dion (*L*-diizobütil glikolid, LDIBG, 3) beyaz kristalleri vakum altında kurutuldu (%40) (Şekil 2.2) (Arıcan ve Mert, 2015; 2020).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0,92-0,98 (d, *J* = 6,0 Hz, 6H, CH₃, CH₃); 0,98-1,08 (d, *J* = 6,0 Hz, 6H, CH₃, CH₃); 1,82-2,06 (m, 6H, CH, CH, CH₂, CH₂); 4,88-5,00 (dd, *J* = 4,1, 9,2 Hz, 2H, CH, CH). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 21,30; 23,00; 23,87; 38,84; 74,12; 167,41. ATR-FTIR (ν_{max}/cm⁻¹): 2957, 2928, 2868 (CH); 1755 (C=O).

2.3.3. Poli(diizobütil glikolid) (PDIBG) homopolimer sentezi



Şekil 2.3. 5 bileşiğinin sentezi

LDIBG monomerinin (3) çözücüsüz ortamda argon atmosferi altında halka açılma polimerizasyonu yöntemi ile homopolimer sentezi literatürdeki protokollerden yararlanılarak gerçekleştirildi (Arıcan ve Mert, 2015; 2020; Arıcan ve diğ., 2018; Çetin ve diğ., 2021).

Poli(diizobütil glikolid) (PDIBG) 5 sentezi yapılırken; kalay(II) 2-etilhekzanoat (10,7 mg, 25×10^{-3} mmol, 1,0 eşdeğer), *L*-diizobütil glikolid (285 mg, 1,25 mmol, 50 eşdeğer) ve benzil alkol (2,6 μ L, 25×10^{-3} mmol, 1,0 eşdeğer) sırasıyla polimerizasyon tüpünün içerisine eklendi. Reaksiyon, 175 °C'de argon gazı altında 6 saat süreyle gerçekleştirildi (Şekil 2.3). Reaksiyon ortamında bulunan kalıntıları (monomer, oligomerik türler ve katalizör) uzaklaştırmak amacı ile sentez edilen homopolimer eser miktarda diklorometan (1 mL) ile çözülüp soğuk metanolün (10 mL) aşırısı ile çöktürülerek gece boyunca -22 °C'de bekletildi. Son olarak, 10.000 rpm -20 °C'de 5 dakika boyunca santrifüj edilip, çözücü dekantasyonla ayrıldı ve elde edilen saf polimer vakum altında kurutuldu (%80).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 0,88-0,97 (d, $J = 5,9$ Hz, 6H, CH₃, CH₃), 0,97-1,04 (d, $J = 5,7$ Hz, 6H, CH₃, CH₃), 1,54-1,96 (m, 6H, CH, CH, CH₂, CH₂), 5,04-5,25 (dd, $J = 3,4, 8.8$ Hz, 2H, CH, CH), 7,32-7,43 (m, 5H, aromatik CH). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 21,40; 23,01; 24,51; 39,29; 71,35; 169,80. ATR-FTIR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 2958, 2873 (CH); 1753 (C=O).

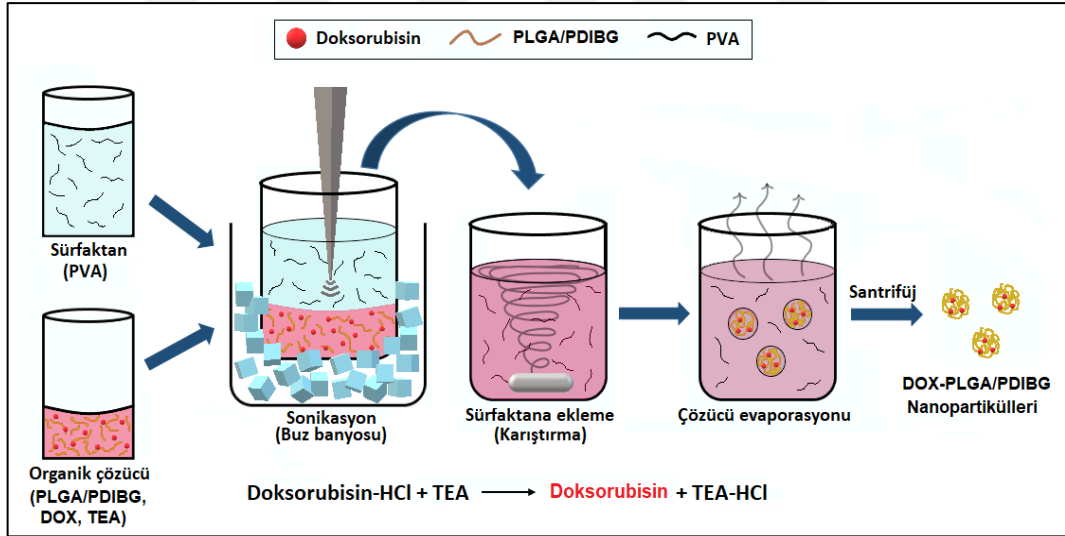
2.3.4. Doksorubisin yüklü PLGA/PDIBG-NP'lerinin hazırlanması

Doksorubisin yüklü PLGA ve PDIBG-NP'leri literatürde var olan protokoller uyarlanarak tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlandı (Yang vd., 2013; Çağlar ve diğ., 2014; Pieper ve Langer, 2017);

- Bu yöntem ile etkili bir şekilde NP içerisine yüklenebilmesi için öncelikle hidroklorür tuzu şeklinde bulunan doksorubisin (DOX-HCl, hidrofilik form) trietilamin ilavesi ile serbest ilaç formuna (HCl'nin uzaklaştırılması, hidrofobik form) dönüştürüldü. Bunun için ilaç çözeltisi hazırlanırken 1 mg DOX-HCl için 8 μ l trietilamin, organik çözücü olarak metanol kullanıldı.
- Uygulanan NP hazırlama yönteminde optimum partikül boyutu, PDI değeri ve ilaç yükleme verimliliğini sağlayan formülasyonu belirlemek için; polimer

miktarı, ilaç miktarı, sürfaktan konsantrasyonu (%PVA (w/v, ağırlık/hacim)), organik çözücü çeşidi, sonikasyon süresi ve gücü gibi farklı parametreler kullanıldı.

- NP formülasyonlarının kaba emülsiyonu (o/w: yağ/su); organik faz (ilaç çözeltisi+ polimer + çözücü) ve su fazının (sürfaktan (%PVA)) birleştirilerek buz banyosunda sonike edilmesiyle hazırlandı.
- Sonikasyon sonrası elde edilen emülsiyon karışmakta olan sürfaktan içerisine eklenip organik fazın uzaklaştırılması (çözücü buharlaşması) için yaklaşık 4 saat çeker ocakta karıştırıldı. Karıştırma süresinin sonunda soğutmalı santrifüj kullanılarak 15.000 rpm'de 4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi ve aynı santrifüj koşulunda su ile iki kez yıkama işlemi yapılarak ortamdaki sürfaktan uzaklaştırıldı (Şekil 2.1).
- Son olarak santrifüj işlemleri sonrası toplanan NP'lerin partikül boyutu ve boyut dağılımları partikül boyut analizatör ile dinamik ışık saçılması yöntemi (DLS: dynamic light scattering) kullanılarak tayin edildi.



Şekil 2.4. Tekli emülsiyon yöntemi ile NP üretiminin şematik gösterimi

2.3.5. NP içine yüklenen ilaç veriminin hesaplanması

Çeşitli parametreler kullanılarak hazırlanan her bir doksozürbisin yüklü-NP'de yüklü ilaç miktarı UV/Vis spektrofotometresi kullanılarak belirlendi (Jibowu, 2016; Tansık ve diğ., 2014; Tewes ve diğ., 2007; Termsarasab ve diğ., 2014; Lee ve diğ., 2019). Öncelikle dimetil sülfoksit (DMSO) veya diklorometan (DCM) organik çözücülerini kullanılarak 1 mg/ml konsantrasyonlu ilaç çözeltileri hazırlandı.

Sonraki aşamada 125; 62,5; 31,25; 15,63 ve 7,81 µg/mL olmak üzere beş farklı konsantrasyona seyreltilen ilaç çözeltilerinin 480 nm’de absorpsanları belirlenerek her iki çözücü için birer kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (DMSO ve DCM için oluşturulan kalibrasyon eğrileri EK-C’de sırasıyla Şekil C.1 ve Şekil C.2 olarak gösterildi).

Ardından santrifüj ve yıkama işlemleri sonrası toplanan NP’ler liyofilize edildikten sonra çözücüde çözünerek (PLGA-NP’leri için DMSO, PDIBG-NP’leri için DCM kullanıldı) UV-spektrofotometresinde 480 nm’deki absorpsan değerleri ölçüldü ve kalibrasyon eğrisinden elde edilen formülde yerine koyularak NP örnekleri içinde yüklü ilaç miktarı hesaplandı. Son olarak NP’lerin ilaç enkapsülasyon etkinliği (%EE) aşağıda gösterilen eşitlik (2.1) kullanılarak hesaplandı;

$$\%EE = \frac{\text{Yüklenen ilaç miktarı}}{\text{Toplam ilaç miktarı}} \times 100 \quad (2.1)$$

2.3.6. DOX-PLGA/PDIBG-NP’lerine dondurma-çözme ve dondurma-kurutma proseslerinin uygulanması

2.3.6.1. NP’lere uygulanan dondurma sıcaklıklarının belirlenmesi

NP’lere uygulanacak olan dondurma sıcaklıklarının belirlenmesi için literatürdeki bulgulardan yararlanıldı. Başarılı bir liyofilizasyon için ekspiyanların hem tek başına hem de PNP ile birleştirilmiş formülasyonların çözeltileri ve katı içeriklerinin (T_g' , T_g) termal analizleri gerçekleştirilmektedir. Ürünün dondurma ve kurutma aşamalarında çökme davranışı göstermemesi için bu sıcaklıklardan daha düşük sıcaklıklarda dondurulması ve saklanması gerekmektedir. Bu tez çalışmasında kullanılan şekerlerden; mannitolün -31,7 °C ve -25,9 °C; glukozun -43,6 °C ve -41,7 °C; sukrozun ise -30,5 °C ve -33,5 °C sıcaklıkları arasında camsı geçiş davranışı gösterdiği, PLGA-NP’nin ise -25,4 °C’de görülen camsı geçiş sıcaklığının kriyoprotektanlarla birleştirildiklerinde kriyoprotektanın camsı geçiş sıcaklığına yaklaştığı literatürde bildirilmiştir (Saez ve diğ., 2000; Holzer ve diğ., 2009; Di Tommaso ve diğ., 2010; Abdelwahed ve diğ., 2006). Bu nedenle çökme sıcaklığının NP’lerin kararlılığı üzerindeki etkisini de değerlendirmek adına kullanılan kriyoprotektanların camsı geçiş sıcaklıkları göz önünde bulundurularak NP

örneklerini dondurmak için hem bu sıcaklıkların altında olan -50 °C hem de daha yüksek bir sıcaklık olan -20 °C iki farklı sıcaklık olarak seçilmiştir.

2.3.6.2. Dondurma-çözme prosesi

Liyofilize edilen NP'lerin karakteristiği üzerinde en etkili parameterlerden biri dondurma işlemidir. Doksorubisin yüklü PLGA ve PDIBG NP'lerinin kriyoprotektan ilave edilen ve edilmeyen örneklerine iki farklı dondurma sıcaklığında (-50 °C ve -20 °C'de) dondurma-çözme prosesi uygulandı. Kriyoprotektan olarak kullanılan mannitol, glukoz ve sukrozun şeker çözeltileri ile NP'ler, Np süspansiyon/kriyoprotektan çözeltileri (1:1) oranı olacak şekilde karıştırıldı. Kontrol grubu olarak kriyoprotektan kullanılmayan NP'ler ise Np süspansiyon/su (1:1) oranı olacak şekilde distile su ile karıştırıldı. Kriyoprotektan ilave edilen ve edilmeyen örnekler -20°C'de 1 gece veya -50°C'de 3 saat dondurulması ve sonrasında oda sıcaklığında çözünmesi ile dondurma-çözme testleri gerçekleştirildi. Dondurma-çözme sonrası NP'lerin boyut analizleri gerçekleştirilerek dondurma sıcaklığının ve kriyoprotektan varlığının partikül kararlılığı üzerindeki etkileri değerlendirildi (Niu ve Panyam, 2017; Di Tommaso ve diğ., 2010; Cui ve diğ., 2003; Date ve diğ., 2010; Hirsjärvi ve diğ., 2009).

2.3.6.3. Liyofilizasyon prosesi

Kriyoprotektan konsantrasyonu, NP konsantrasyonu ve dondurma sıcaklığı gibi farklı koşulları içeren liyofilizasyon prosesi ile partikül kararlılığının korunduğu ve uzun süreli saklamaya uygun NP formülasyonu belirlenmiştir. Bunun için dondurma-çözme testlerinde olduğu gibi kriyoprotektan çözeltileri ile (1:1) oranında karıştırılan NP'lere -20 °C'de 1 gece ve -50 °C'de 3 saat olmak üzere iki farklı dondurma sıcaklığı uygulanarak liyofilizatör (freeze-dryer) cihazında -80 °C'de, 0.001 mbar vakum basıncı altında 1 gece boyunca kurutma işlemi uygulandı. Böylece benzer şartlar kullanılarak gerçekleştirilen bu iki yöntem arasındaki ilişki incelendi (Subedi ve diğ., 2009; Dave ve diğ., 2012; Shaikh ve diğ., 2017).

2.3.7. Liyofilize NP'lerin rekonstitüsü

Kriyoprotektan içeren ve içermeyen NP'lerin liyofilizasyonu sonrası elde edilen liyofilize kekler başlangıçtaki (liyofilizasyon öncesindeki) hacmi sağlayacak şekilde

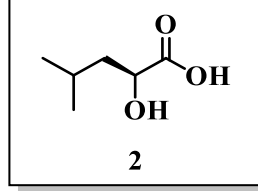
su eklenerek yeniden dağıtıldı. Rekonstitüsyon işlemi yapılan NP'lerin partikül boyutu ve boyut dağılımları partikül boyut analizatör ile belirlendi. Birbiri ile kıyaslanan şeker ilaveli NP'ler içerisinde uzun süreli saklama sırasında partikül kararlılığını koruma potansiyeline sahip şeker çeşidi ve konsantrasyonu belirlendi (Subedi ve diğ., 2009; Shaikh ve diğ., 2017; Hu ve diğ., 2018; Fonte ve diğ., 2014).

2.3.8. Kriyoprotektan içeren liyofilize NP'lerin uzun süreli saklama çalışması

Farklı şekerler ve konsantrasyonları ile uygulanan çeşitli liyofilizasyon testleri sonunda NP kararlılığını kısa süreli korumada en etkili olan şeker çeşidi ve konsantrasyonu ile uzun süreli saklama çalışması gerçekleştirilerek kriyoprotektan kullanımı ile liyofilize NP'lerin 1 aylık depolama süresince kararlılıklarının korunup korunmadığı test edildi (Fonte ve diğ., 2014; Soares ve diğ., 2013; Yadav ve Sawant, 2010; Holzer ve diğ., 2009).

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. *L*-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit (2) Sentezi ve Karakterizasyonu



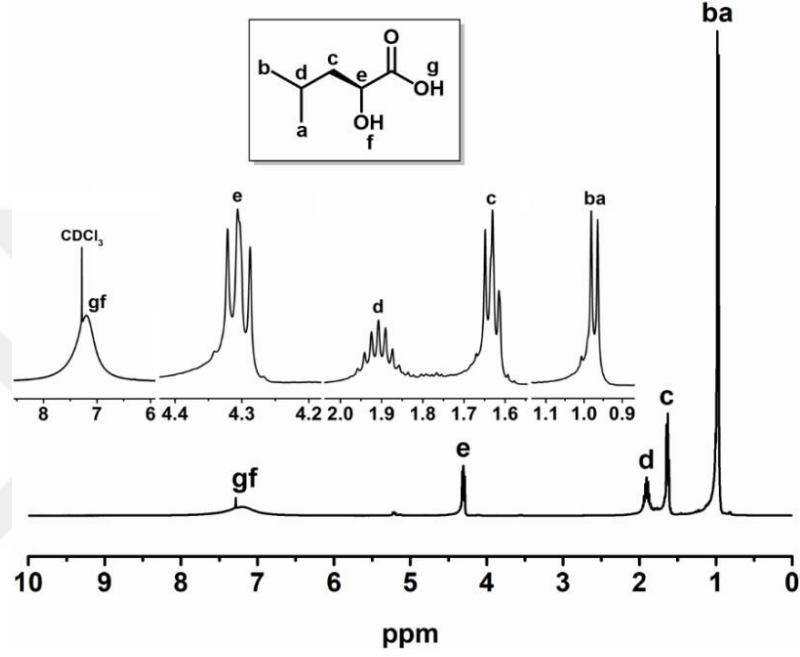
Şekil 3.1. 2 bileşiği

L-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit (2) sentezi, asidik sulu bir ortamda doğal bir α -amino asit olan *L*-lösin (*L*-2-amino-4-metilpentanoik asit) ile sodyum nitridin reaksiyonu sonucu basit, güvenilir ve ucuz bir yöntem olan diazotizasyon yöntemi ile gerçekleştirildi (Şekil 3.1) (Arıcan ve Mert, 2020; Çetin ve diğ., 2021; Cohen-Arazi ve diğ., 2008; 2010; 2013; Müller ve diğ., 2009). 2 bileşiğinin yapısının aydınlatılmasında spektroskopik (ATR-FTIR ve NMR) tekniklerden yararlanıldı. Analiz sonuçlarından elde edilen veriler aşağıda detaylıca tartışılmaktadır.

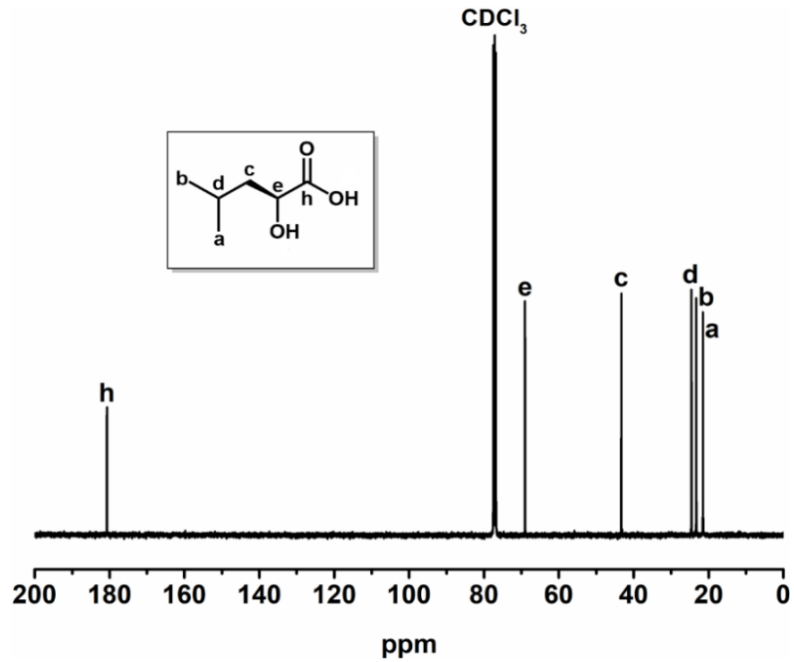
2 bileşiğine ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (Şekil 3.2) değerlendirildiğinde; 0,92-1,08 ppm'de a ve b kodlu metil protonlarına ait altı protonluk ikili bir pik, 1,58-1,72 ppm'de c kodlu metilen protonuna ait bozulmuş üçlü bir pik, 1,82-1,98 ppm'de d kodlu metin protonuna ait çoklu bir pik, 4,26-4,38 ppm'de e kodlu α -metin protonuna ait ikilinin ikilisi bir pik ve 6,40-8,20 ppm arasında f ve g kodlu hidroksil protonlarına ait iki protonluk yayvan bir pik görülmektedir.

2 bileşiğinin $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda; 21,53 ppm'de a kodlu metil, 23,33 ppm'de b kodlu metil, 24,58 ppm'de d kodlu metin, 43,30 ppm'de c kodlu metilen, 69,02 ppm'de e kodlu α -metin ve 180,72 ppm'de h kodlu karbonil karbonlarına ait pikler görülmektedir (Şekil 3.3). Ayrıca, NMR spektrumdan elde edilen verilerin literatürdeki değerler (Arıcan ve Mert, 2020; Çetin ve diğ., 2021) ile uyum içerisinde olduğu anlaşılmaktadır.

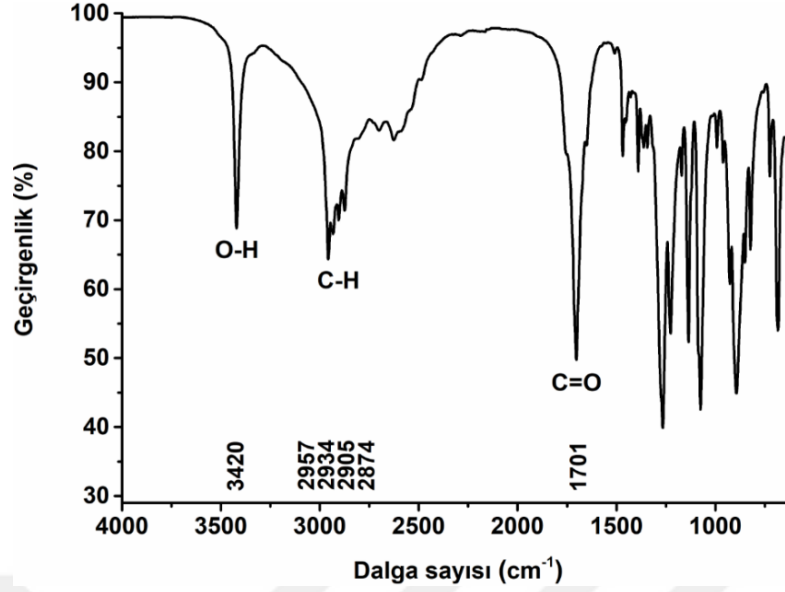
2 bileşiminin yapısının aydınlatılmasında kullanılan NMR verileri ATR-FTIR analizi ile de desteklendi. ATR-FTIR spektrumunda (Şekil 3.4); 3420 cm^{-1} 'de gözlenen pik, hidroksil (OH) grubuna aittir ve başlangıç maddesinde de (EK-A Şekil A.1) görünmemektedir. 2957, 2934, 2905 ve 2874 cm^{-1} 'de gözlenen pikler C-H gerilme frekanslarına karşılık gelmektedir. 1701 cm^{-1} 'de gözlenen keskin pik ise karboksilik asit grubunun karbonil (C=O) gerilme frekansına atfedilebilir.



Şekil 3.2. 2 bileşimine ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

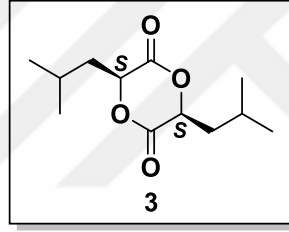


Şekil 3.3. 2 bileşimine ait $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu



Şekil 3.4. 2 bileşiğine ait ATR-FTIR spektrumu

3.2. *L*-Diizobütül Glikolid (3) Sentezi ve Karakterizasyonu



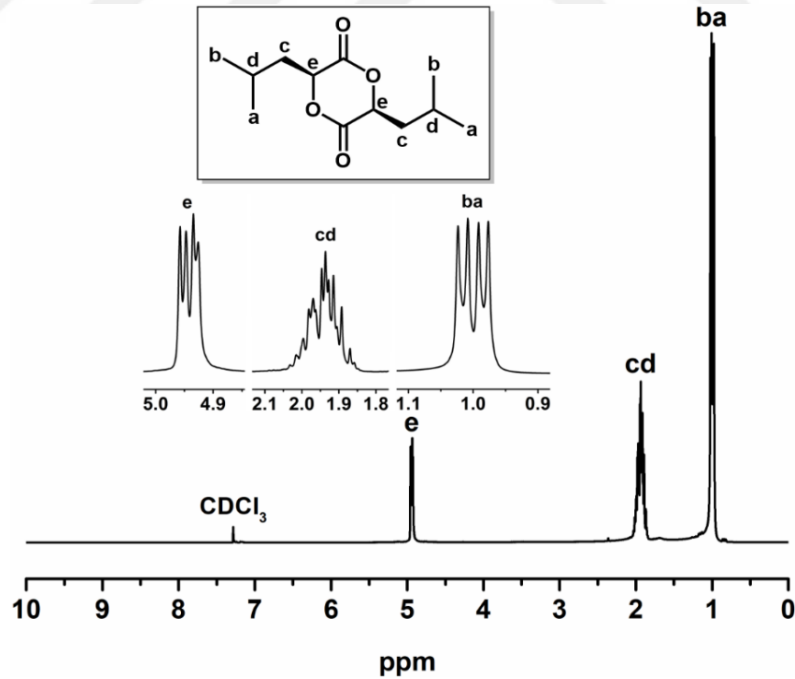
Şekil 3.5. 3 bileşiği

L-3,6-diizobütül-1,4-dioksan-2,5-dion (*L*-diizobütül glikolid, LDIBG) monomerinin sentezi; *L*-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit (2) başlangıç maddesi kullanılarak PTSA.H₂O katalizörü varlığında ve toluen içerisinde kiral merkez korunarak gerçekleştirildi (Şekil 3.5) (Arıcan ve Mert, 2020). Reaksiyon takibi için kromatografik tekniklerden (TLC, GPC) yararlanıldı.

Reflaks süresince belirli zaman aralıklarında (4. 8. ve 12. saat) reaksiyon ortamından numuneler alınarak ince tabaka kromatografisi (TLC) tekniği ile başlangıç maddesine ait spotun kaybolup kaybolmadığı teyit edildi (*L*-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit R_f : 0,1, *L*-3,6-diizobütül-1,4-dioksan-2,5-dion R_f : 0,84). Sonuçlar, jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) tekniği kullanılarak da teyit edildi. Reaksiyon sürecinde alınan numunelerden 12 saatlik reflaks süresinin monomer sentezi için yeterli olduğu anlaşıldı. Ayrıca, dietil eter ile yıkama sonucu oligomerik türlerden arındırılan LDIBG (3) monomerinin TLC plakasında tek bir spot olması ve GPC

analizi sonucunda tek bir pik görülmesi (oligomerik türler ve başlangıç maddesi olan *L*-2-hidroksi-4-metilpentanoik aside (2) ait piklerin görülmemesi) sentez edilen monomerin saf olarak elde edildiğini doğrulamaktadır (EK-B, Şekil B.1). Bu tekniklerin yanı sıra 3 bileşiğinin yapısal karakterizasyonu için $^1\text{H-NMR}$ (Şekil 3.6), $^{13}\text{C-NMR}$ (Şekil 3.7) ve ATR-FTIR (Şekil 3.8) teknikleri kullanıldı. Spektroskopik teknikler kullanılarak elde edilen bulgular aşağıda detaylıca verilmektedir.

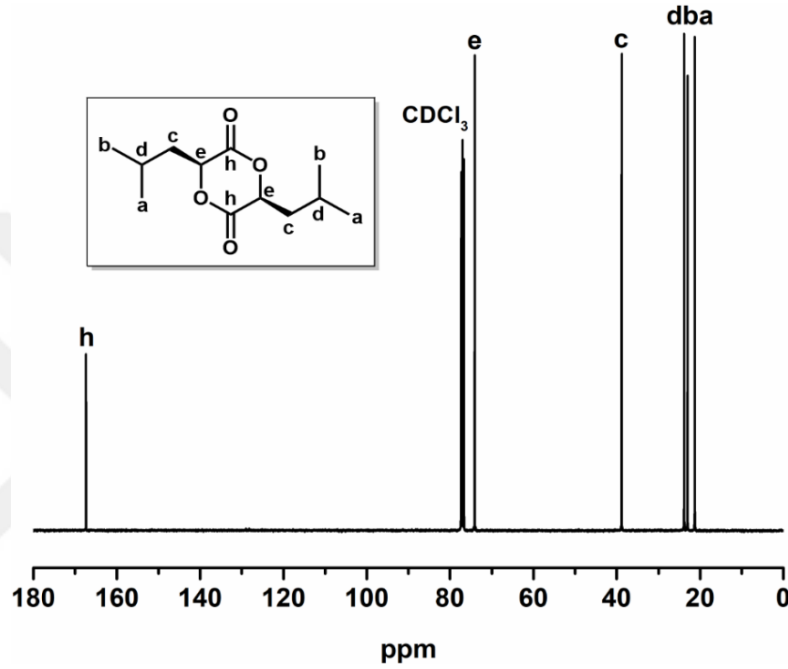
Şekil 3.6'da verilen 3 bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu yorumlanırken literatürdeki bilgiler dikkate alındı (Arıcan ve Mert, 2020). Glikolid halkası üzerindeki süstitüye izobütil grubunun metil protonlarına ait a ve b kodlu pikler sırası ile 0,92-0,98 ppm ve 0,98-1,08 ppm'de iki tane ikili pik, metin ve metilen protonlarına ait d ve c kodlu pikler ise 1,82-2,06 ppm arasında görülmektedir. 4,88-5,00 ppm'de ikilinin ikilisi olarak görülen pik ise e kodlu α -metin protonlarına aittir. Başlangıç maddesinde (*L*-2-hidroksi-4-metilpentanoik asit, 2) e kodlu α -metin protonuna ait 4,26-4,38 ppm'de gelen pikin halka kapanması ile birlikte LDIBG (3) bileşiğinde 4,88-5,00 ppm'e kayması glikolid halkası oluşumunu doğrulamaktadır.



Şekil 3.6. 3 bileşiğine ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

LDIBG (3) bileşiğinin $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda (Şekil 3.7); 21,30 ppm'deki a kodlu metil, 23,00 ppm'deki b kodlu metil, 23,87 ppm'deki d kodlu metin, 38,84 ppm'deki c kodlu metilen karbonlarına ait pikler glikolid halkası üzerindeki süstitüye izobütil

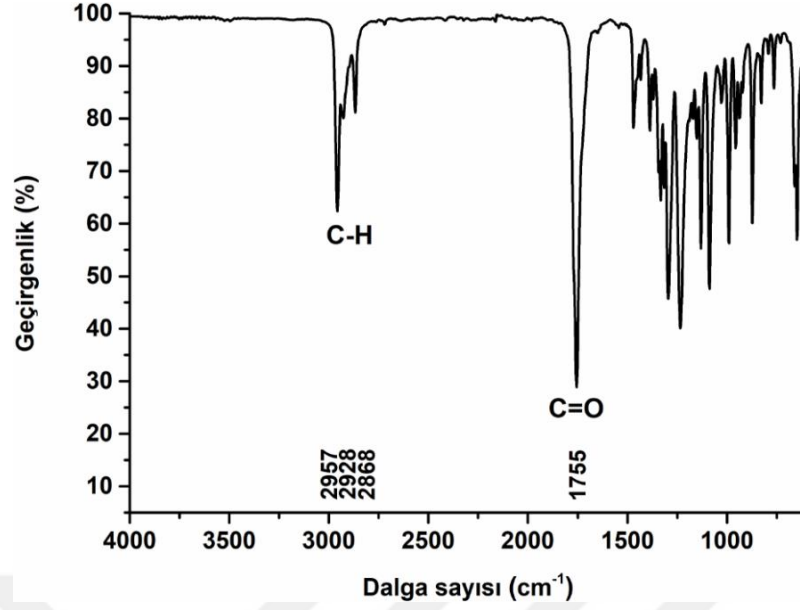
grubuna ait karbonları göstermektedir. 74,12 ppm'deki e kodlu ve 167,41 ppm'deki h kodlu kodlu pikler sırası ile glikolid halkasındaki α -metin ve karbonil karbonlarına aittir. Ayrıca, başlangıç maddesinde (2) 69,02 ppm ile 180,72 ppm'de gelen e kodlu α -metin ve h kodlu karbonil karbonlarına ait olan piklerin LDIBG (3) bileşğinde sırasıyla 74,12 ile 167,41 ppm'e kayması sentezin başarı ile gerçekleştiğini gösteren diğer bir kanıttır.



Şekil 3.7. 3 bileşğine ait ^{13}C -NMR spektrumu

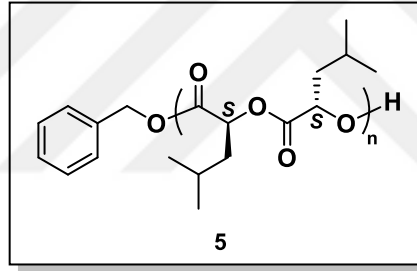
LDIBG (3) monomerinin yapısının aydınlatılması için NMR verilerini destekleyici bilgi olarak ATR-FTIR analizinden de yararlandı. 3 bileşğinin ATR-FTIR spektrumunda (Şekil 3.8); 2957, 2928 ve 2868 cm^{-1} 'de gözlenen pikler C-H ve 1755 cm^{-1} 'de gözlenen keskin pik ester grubunun karbonil (C=O) gerilme frekansına karşılık gelmektedir.

Başlangıç maddesinin (2) ATR-FTIR spektrumunda (Şekil 3.4) 3420 cm^{-1} 'de görülen hidroksil (OH) gerilmesine ait pikin kaybolması ve karboksilik asit grubunun karbonil gerilmesine ait 1701 cm^{-1} 'den görülen pikin ester oluşumu ile birlikte 1755 cm^{-1} 'e kayması LDIBG (3) sentezinin gerçekleştiğini doğrulamaktadır.



Şekil 3.8. 3 bileşiğine ait ATR-FTIR spektrumu

3.3. Poli(Diizobütül Glikolid) (5) Sentezi ve Karakterizasyonu



Şekil 3.9. 5 bileşiği

Poli(diizobütül glikolid) (PDIBG) homopolimerinin (5) sentezi; monomer olarak *L*-diizobütül glikolid (3), başlatıcı olarak benzil alkol ve katalizör olarak kalay(II) 2-etilhekzanoat kullanılması ile halka açılma polimerizasyonu yöntemi ile çözücüsüz ortamda ve argon gazı altında 175 °C'de gerçekleştirildi (Şekil 3.9). LDIBG (3) monomerinin erime noktası yüksek olduğu için (~ 170 °C) reaksiyon yüksek sıcaklıkta gerçekleştirildi (Arıcan ve Mert, 2020). 5 bileşiğinin karakterizasyonu için spektroskopik (NMR ve ATR-FTIR), kromatografik (GPC) ve termal tekniklerden (DSC ve TGA) yararlanıldı. Elde edilen bulgulara dair bilgiler aşağıda verilmektedir.

Poli(diizobütül glikolid) homopolimerine ait ¹H-NMR spektrumu (Şekil 3.10) incelendiğinde; 0,88-0,97 ppm ve 0,97-1,04 ppm'de görülen a ve b kodlu ikili pikler izobütül grubunun metil protonlarına aittir. 1,54-2,04 ppm aralığındaki pik; izobütül grubunun d kodlu metin ve c kodlu metilen protonlarına ait olan pikleri

göstermektedir. 5,04-5,25 ppm'de görülen e kodlu pik ise polimer ana zinciri üzerindeki α -metin protonlarına ait olup, monomer (3) ile karşılaştırıldığında (4,88-5,00 ppm'den 5,04-5,25 ppm'e) kayda değer bir kimyasal kaymaya uğramıştır ve bu da halka açılma ile birlikte polimerizasyonun başarılı ile gerçekleştiğini göstermektedir. Bununla birlikte, $^1\text{H-NMR}$ spektrumundaki PDIBG biriminin α -metin protonlarının ve benzil alkole ait 7,32-7,43 ppm'de görülen (i kodlu) aromatik protonların alanlarından faydalanılarak sentezlenen polimerin sayıca ortalama molekül ağırlığı da hesaplandı. Spektrumdan ayrıca, reaksiyona girmemiş monomerin ve polimerin α -metin protonlarının alanlarından yararlanılarak monomerin polimere %dönüşümü de belirlendi (Tablo 3.1).

GPC ve $^1\text{H-NMR}$ analizlerinden elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; sentezlenen homopolimerin molekül ağırlığının teorik molekül ağırlığı ile uyum içerisinde olduğu, yüksek dönüşüm (> %98) ve dar molekül ağırlığı dağılımına sahip monodispers ($M_w/M_n = 1,57$) homopolimer sentezinin gerçekleştirildiği anlaşılmaktadır (Tablo 3.1).

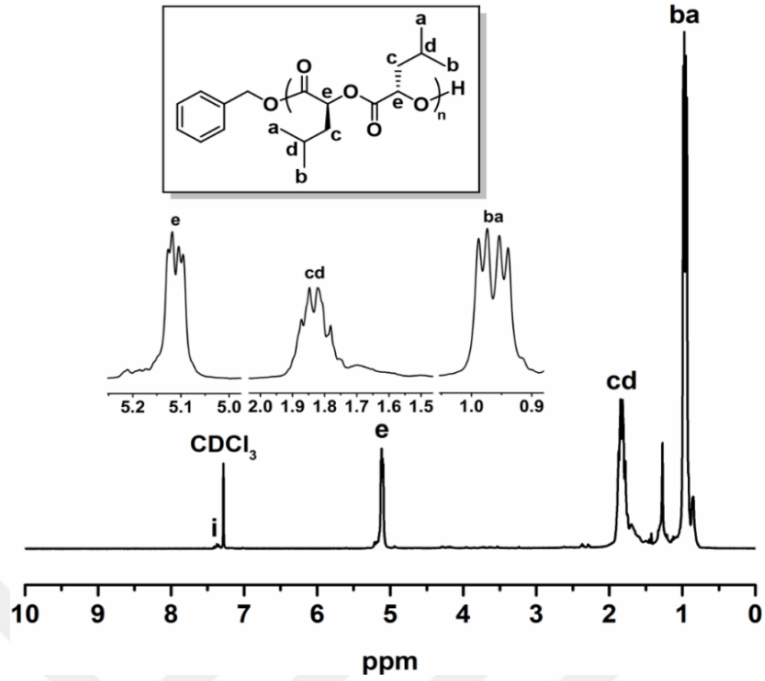
Şekil 3.11'de verilen PDIBG (5) homopolimerine ait $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu yorumlandığında; 21,40 ppm'de a kodlu metil, 23,01 ppm'de b kodlu metil, 24,51 ppm'de d kodlu metin, 39,29 ppm'de c kodlu metilen, 71,35 ppm'de e kodlu α -metin ve 169,80 ppm'de h kodlu karbonil karbonlarına ait rezonans değerleri görülmektedir. Spektrumda, yukarıda verilen piklerin haricinde başka sinyallerin bulunmaması; polimerizasyonun yüksek sıcaklıkta (175 °C) gerçekleştirilmesine rağmen ana zincirdeki kiral merkezde rasemizasyon olmadığını göstermektedir.

Ayrıca, monomere ait $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda (Şekil 3.7) e kodlu α -metin ile h kodlu karbonil karbonlarına ait piklerin 74,12 ppm ve 167,41 ppm'den polimerizasyondan sonra sırası ile 71,35 ppm ve 169,80 ppm'e kayması başarılı bir halka açılma polimerizasyonunu doğrulamaktadır.

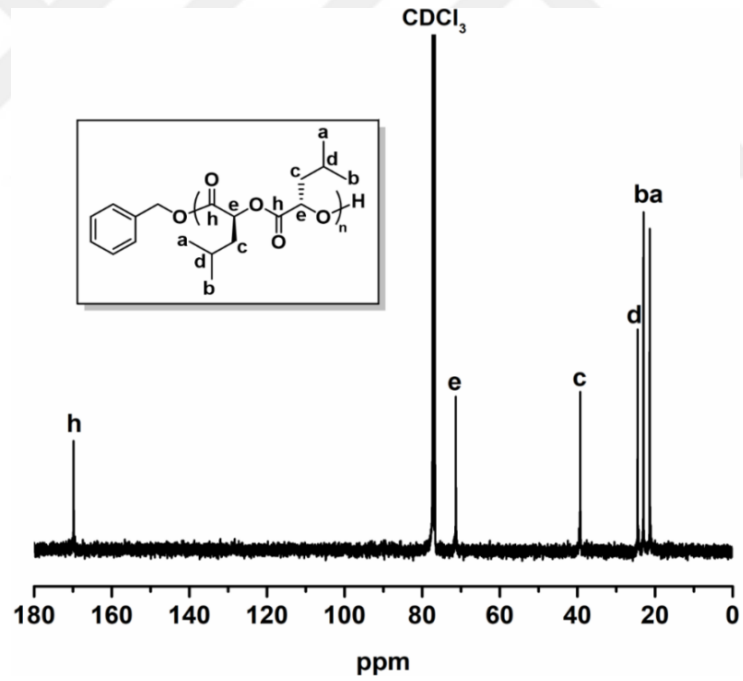
Tablo 3.1. PDIBG homopolimerinin (5) molekül ağırlıkları

No	M_w^a (g/mol)	M_n^a (g/mol)	M_n^b (g/mol)	M_n^c (g/mol)	M_w/M_n^a	%Dönüşüm ^a	%Dönüşüm ^b	DIBG'ni n TB'si ^b
5	17888	11393	12330	11210	1,57	100	98,2	54

TB: Tekrarlayan birim sayısı; ^a GPC ile bulundu. ^b $^1\text{H-NMR}$ ile bulundu. ^c Teorik molekül ağırlığı

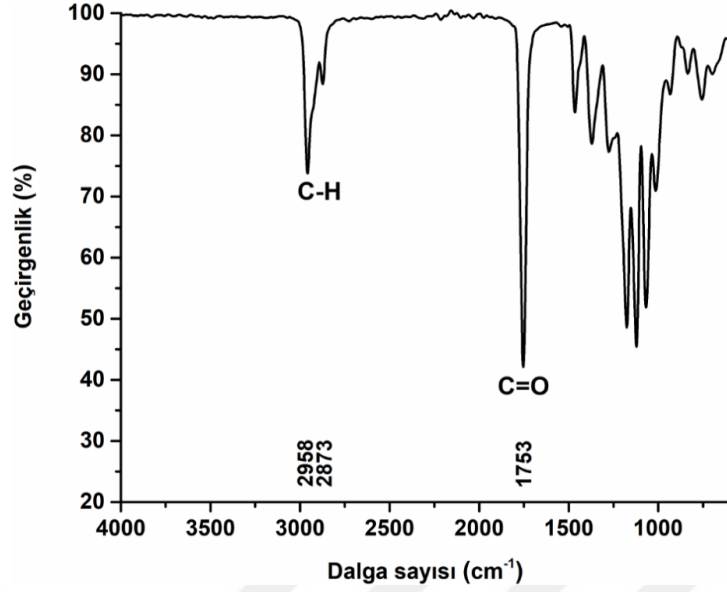


Şekil 3.10. 5 bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu



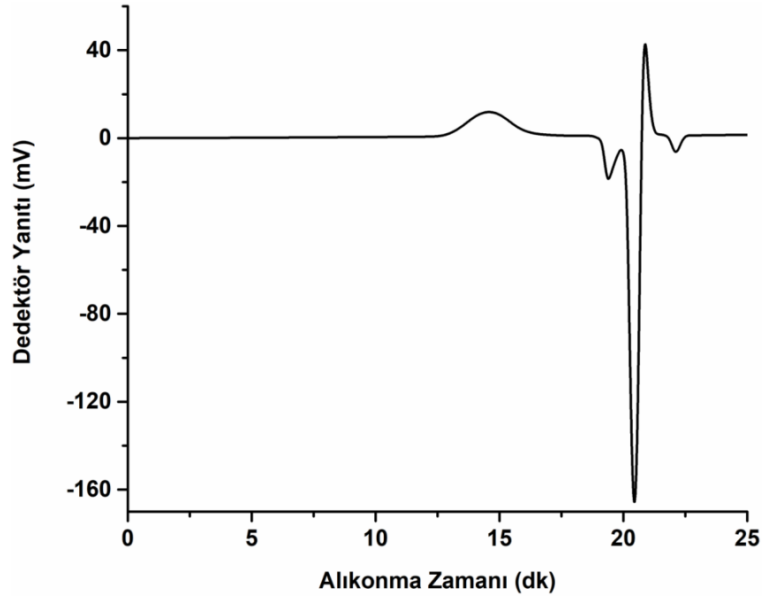
Şekil 3.11. 5 bileşiğine ait ¹³C-NMR spektrumu

Homopolimerin (5) ATR-FTIR spektrumundaki (Şekil 3.12); 2958 ve 2873 cm⁻¹'de gözlenen pikler C-H gerilme titreşimlerine ve 1753 cm⁻¹'deki keskin pik ester grubunun karbonil gerilme frekansına karşılık gelmektedir. Ayrıca, monomere ait karbonil gerilme titreşiminin 1755 cm⁻¹'den halka açılması ile birlikte 1753 cm⁻¹'e kayması polimerizasyonun gerçekleştiğine diğer bir kanıt olarak gösterilebilir.



Şekil 3.12. 5 bileşiğine ait ATR-FTIR spektrumu

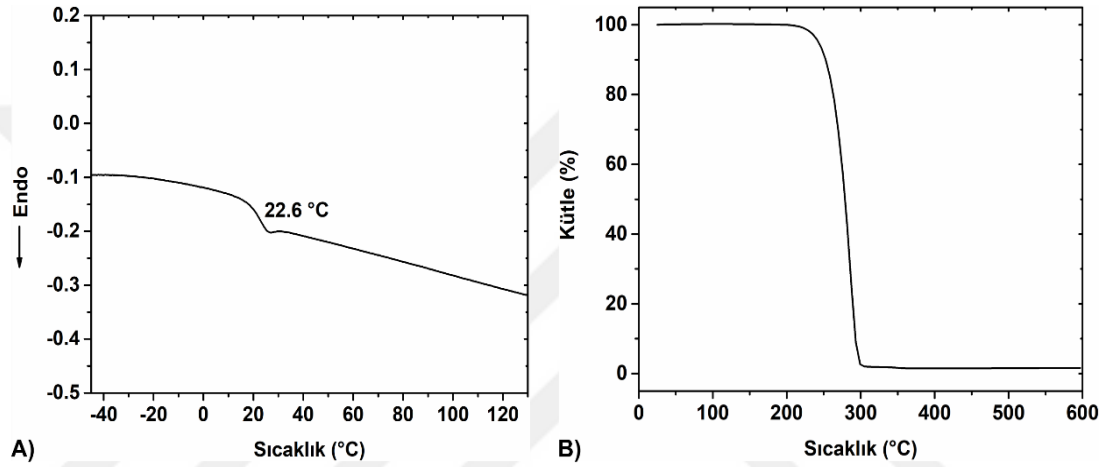
Poli(diizobütül glikolid) homopolimerine ait GPC kromatogramında tek bir pikin görülmesi; reaksiyon sistemi içerisinde tek bir aktif türün varlığını göstermekte olup farklı bir dağılımda homopolimer veya oligomerik türün oluşmadığına işaret etmektedir. Kromatogramda alıkonma zamanı 19,0 ve sonrası görülen pikler marker pik de denilen hareketli faz olan tetrahidrofuran içeriğinden gelmektedir (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. 5 bileşiğine ait GPC kromatogramı

Poli(diizobütül glikolid) homopolimerinin termal karakteristik özellikleri ve termal bozunma davranışı sırası ile DSC ve TGA analizleri ile araştırıldı.

Şekil 3.14A incelediğinde; yalnızca T_g (22,6 °C) geçişi sergileyen PDIBG homopolimerinin amorf bir yapıya sahip olduğu görülmektedir ve elde edilen camı geçiş sıcaklığı değeri literatürdeki bilgilerle uyum içerisindedir (Tablo 3.2) (Yin ve Baker, 1999; Yin ve diğ., 2001). PDIBG homopolimerinin termal kararlılığı değerlendirildiğinde ise başlangıç bozunma sıcaklığı ($T_{%5}$) ve maksimum kütle kaybının olduğu sıcaklıklar (T_{maks}) sırası ile 243 °C ve 285 °C olarak bulundu. Beklenildiği gibi tek bir kütle kaybı gözlemlendi. 600 °C'ye ısıtmadan sonra ise kül miktarı (Y_c) %1,6 olarak bulundu (Şekil 3.14B) (Tablo 3.2).



Şekil 3.14. 5 bileşiğine ait DSC (A) ve TGA (B) termogramları

Tablo 3.2. PDIBG homopolimerinin DSC ve TGA verileri

No	DSC			TGA		
	T_g (°C)	T_c (°C)	T_m (°C)	$T_{%5}$ (°C)	T_{maks} (°C)	Y_c (%)
5	22,6	-	-	243	285	1,6

$T_{%5}$: Başlangıç bozunma sıcaklığı. T_{maks} : Maksimum kütle kaybının olduğu sıcaklık. Y_c (%): Kül verimi

3.4. Doksorubisin yüklü NP formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yönteminde; polimer miktarı, sürfaktan konsantrasyonu ve miktarı, sonikasyon gücü ve süresi gibi çeşitli parametreler kullanılarak doksorubisin yüklü PLGA ve PDIBG-NP'leri (DOX-PLGA-NP ve DOX-PDIBG-NP) hazırlandı ve bu parametrelerin ilaç enkapsülasyon etkinliği, partikül boyutu ve boyut dağılımı açısından etkisi değerlendirilerek optimum formülasyon belirlendi.

3.4.1. DOX-PLGA-NP'leri için kritik formülasyon

Doksorubisin yüklü PLGA-NP'lerinin hazırlanması sırasında farklı koşullar uygulanmıştır ve bu koşulların partikül özellikleri üzerindeki etkisi değerlendirilerek en uygun özellikleri sağlayan kritik formülasyon belirlenmiştir. Doksorubisin yüklü PLGA-NP formülasyonlarının hazırlanması sırasında uygulanan koşullar Tablo.3.3.'de detaylıca gösterilmiştir ve partiküllerin boyut, PDI ve EE özellikleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir;

- Başlangıçtaki polimer miktarı 25 mg (NP1, NP2) ve 50 mg (NP3, NP4, NP5) olmak üzere iki farklı polimer konsantrasyonu kullanılarak hazırlanan NP'ler karşılaştırıldığında beklenildiği üzere daha fazla ilaç yükleme olasılığına sahip olan yüksek polimer konsantrasyonu (50 mg) daha başarılı bir enkapsülasyon etkinliği (> %20) göstermiştir.
- 25 mg PLGA kullanılarak hazırlanan NP1 ve NP2 karşılaştırıldığında ise metanol miktarının ilaç çözünürlüğünü arttırmasına bağlı olarak NP2' de enkapsülasyon etkinliğinin daha iyi olduğu görülmektedir.
- Yine çözünürlüğe bağlı olarak diklorometan yerine kloroform kullanılması durumunda diğer tüm şartlar aynı olmasına rağmen NP3'te ilaç yükleme verimi NP4'e kıyasla daha düşüktür.
- PLGA-NP'leri için sürfaktan konsantrasyonunun % 0.75'ten (NP5) %1'e (NP4) arttırılması durumunda ise nispeten daha yüksek partikül boyutlarına sahip NP'ler elde edilmiştir.
- Genel olarak 50 mg polimer kullanılarak hazırlanan NP'ler ilaç kapsülleme bakımından daha avantajlı olsa da partikül boyutları arzu edilenin (~ 250 nm) üzerindedir. Bu defa sonikasyon süresinin 4 dakikaya çıkarılması ile (NP6) 218 nm gibi oldukça küçük boyutlara sahip NP'ler elde edilmiştir (EK-D, Şekil D.1).

Sonuçta, % 22.1 enkapsülasyon etkinliğine ve ortalama 225,9 nm partikül boyutuna ve oldukça düşük PDI değerine (0,05) sahip NP6 formülasyonu DOX-PLGA-NP'leri için kritik formülasyon olarak belirlenmiştir.

Tablo 3.3. İlaç yüklü PLGA-NP formülasyonlarının boyut, PDI ve EE özellikleri

	PLGA (mg)	Çözücü Miktarı ve Çeşidi	Emülsiyon (PVA, %)	Ekleme (PVA, %)	Sonikasyon Gücü ve Süresi	Partikül boyutu nm ± SS	PDI ± SS	EE (%)
NP1	25	2 mL DCM, 200 µl MeOH	5 mL, 0,75%	5 mL, 0,75%	65 W, 1 dk	271,7 ± 1,90	0,11 ± 0,02	16,7
NP2	25	2 mL DCM, 250 µl MeOH	5 mL, 0,75%	5 mL, 0,75%	65 W, 1 dk	275,1 ± 5,59	0,13 ± 0,01	19
NP3	50	2 mL CHCl ₃ , 100 µl MeOH	5 mL, 1%	5 mL, 1%	65 W, 1 dk	333,7 ± 0,97	0,05 ± 0,02	20,3
NP4	50	2 mL DCM, 100 µl MeOH	5 mL, 1%	5 mL, 1%	65 W, 1 dk	343,6 ± 3,95	0,10 ± 0,02	25
NP5	50	2 mL DCM, 250 µl MeOH	5 mL, 1%	5 mL, 1%	65 W, 1 dk	321,0 ± 4,63	0,15 ± 0,01	21,9
NP6	50	2 mL DCM, 200 µl MeOH	5 mL, 0,75%	5 mL, 0,75%	65 W, 4 dk	225,9 ± 4,63	0,05 ± 0,02	22,1

DCM: diklorometan, CHCl₃: kloroform, MeOH: metanol, EE: enkapsülasyon etkinliği, SS: standart sapma

3.4.2. DOX-PDIBG-NP'leri için kritik formülasyon

Optimum özelliklere sahip ilaç yüklü PLGA nanoformülasyonu (NP6) için kullanılan parametreler göz önüne alınarak, PDIBG-NP'lerinin hazırlanması sırasında kullanılan çözücü miktarı ve çeşidi tüm formülasyonlar için sabit tutulup diğer parametrelerin etkisi değerlendirilmiştir. Doksorubisin yüklü PDIBG-NP'lerinin hazırlanması sırasında uygulanan koşullar ve NP formülasyonlarının boyut, PDI ve EE özellikleri Tablo 3.4'de gösterilmiştir.

- Sonikasyon süresi 1 dk olacak şekilde NP6 (Tablo 3.3)'da kullanılan formülasyon koşulları PDIBG-NP'leri için uygulandığında, daha kısa bir

sonikasyon süresi içermesine rağmen, NP7'nin ilaç kapsülleme verimi daha yüksek bulunmuştur.

- Ardından sürfaktanın etkisini değerlendirmek adına % 2 PVA konsantrasyonu ile NP8 hazırlanmıştır ancak partikül boyutu, PDI ve %EE değerleri NP7 ile oldukça benzer elde edilmiştir. NP9 formülasyonunda ise sonikasyon süresinin uzatılması ile ilaç yükleme verimi yüksek (%76.5) ve küçük partikül boyutu ve PDI değerine sahip NP'ler elde edilmiştir. Ancak bu NP'lerin santrifüj ve yıkama işlemleri sonrasında yapışma göstermesi ve homojen olmayan bir görünüme sahip olması nedeniyle bu formülasyon NP hazırlama prosesi için uygun bulunmamıştır.
- Son olarak sürfaktan olarak % 1.25 PVA konsantrasyonunun kullanımı ile NP10 formüle edilmiştir (EK-D, Şekil D.2). İlaç yüklü PDIBG-NP'leri için kritik formülasyon olarak kabul edilen bu formülasyon homojen bir görünüme, küçük partikül boyutuna (238.9 ± 4.32 nm), düşük PDI değerine (0.05 ± 0.04) ve yüksek enkapsülasyon etkinliğine (%75.6) sahip olarak elde edilmiştir.

Tablo 3.4. İlaç yüklü PDIBG-NP formülasyonlarının boyut, PDI ve EE özellikleri

	PDIBG (mg)	Çözücü Miktarı ve Çeşidi	Emülsiyon (PVA, %)	Ekleme (PVA, %)	Sonikasyon Gücü ve Süresi	Partikül boyutu nm \pm SS	PDI \pm SS	EE (%)
NP7	50	2 mL DCM, 200 μ l MeOH	5 mL, 0,75%	5 mL, 0,75%	65 W, 1 dk	232,4 \pm 2,70	0,03 \pm 0,02	37,7
NP8	50	2 mL DCM, 200 μ l MeOH	5 mL, 2 %	10 mL, 2 %	65 W, 1 dk	229,9 \pm 0,75	0,03 \pm 0,02	37,8
NP9	50	2 mL DCM, 200 μ l MeOH	5 mL, 0,75%	5 mL, 0,75%	65 W, 4 dk	229,9 \pm 1,07	0,02 \pm 0,02	76,5
NP10	50	2 mL DCM, 200 μ l MeOH	5 mL, 1,25%	5 mL, 1,25%	65 W, 4 dk	238,9 \pm 4,32	0,05 \pm 0,04	75,6

DCM: diklorometan, MeOH: metanol, EE: enkapsülasyon etkinliği, SS: standart sapma

Literatürdeki ile benzer şekilde, NP hazırlama yönteminde farklı metot ve koşulların kullanımının partikül boyutu ve ilaç yükleme verimliliği üzerinde etkili olduğu görülmüştür (Kunii ve diğ., 2007; Çağlar ve diğ., 2014). Özellikle emülsiyon oluşturma sırasında sonikasyon süresinin arttırılması PLGA-NP'lerinde daha küçük boyutlu partikül eldesine neden olmuştur (Tablo 3.3, NP6). Bu durum emülsiyon oluşturma aşamasının doğrudan partikül boyutuyla ilgili olması ile açıklanabilir. Sonikasyon süresinin arttırılması durumunda daha verimli parçacık oluşumunu sağlandığı (droplet breakdown) bilinmektedir. Literatürde de NP hazırlama sırasında sonikasyon süresinin arttırılması ile partikül boyutlarının küçüldüğü ve birbirine daha yakın boyutlu partiküllerin elde edilebildiği görülmüştür (Kumar ve diğ., 2011; Nguyen ve diğ., 2015; Mainardes ve Evangelista, 2005).

Tablo 3.4'ü incelediğimizde ise PDIBG-NP formülasyonunda NP7 ve NP9 formülasyonlarını kıyaslayacak olursak; sonikasyon süresinin uzatılması ile ilaç yükleme veriminin % 37,7'den %76.5'a yükselmesi ve küçük partikül boyutu ve PDI değerine sahip NP'ler elde edilmiş olmasına karşın partikül yapısının homojen olmayan/yapışkan özelliğe sahip olması sürfektan (PVA) konsantrasyonunun artılması gerektiğini işaret etmiştir. Bu nedenle NP9 formülasyonunda kullanılan PVA konsantrasyonu %0.75'ten NP10'da % 1.25'e çıkartılarak uygun partikül yapısına ve optimum özelliklere (238.9 ± 4.32 nm boyutlarında, 0.05 ± 0.04 PDI değerine ve %75.6 enkapsülasyon etkinliğine) sahip PDIBG-NP'ler hazırlanmıştır.

3.4.3. Polimer konsantrasyonu ve NP'lerin karakteristik özellikleri

Tekli emülsiyon yöntemi ile farklı polimer miktarları kullanarak hazırlanan PLGA (Tablo 3.5) ve PDIBG-NP'lerinin (Tablo 3.6) partikül boyutu, boyut dağılımları, elde edilen NP miktarları ve ilaç yükleme verimliliği karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. İlaç yüklü NP'lerde başlangıçta kullanılan polimer miktarının arttırılmasına bağlı olarak toplanan NP miktarı ve NP içine yüklenen ilaç miktarı daha verimli olarak elde edildi. Bunun yanı sıra polimer miktarının arttırılmasına bağlı olarak hem PLGA-NP'lerinin (Şekil 3.15) hem de PDIBG-NP'lerinin (Şekil 3.16) partikül boyutları ve boyut dağılımları doğru orantılı olarak arttı. Ayrıca yüksek polimer konsantrasyonlarında; PDIBG-NP'lerinde özellikle 100 mg polimer kullanıldığında, PLGA-NP'lerinde ise hem 70 mg hem 100 mg polimer kullanıldığında organik fazın

yoğunluğunun artması sonucu, yıkama işlemleri sonrası toplanan NP'lerde partikül topaklanması meydana geldi. Literatürde PLGA-NP'leri ile daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda da polimer konsantrasyonunun arttırılmasının partikül karakteristiğine olan etkisi benzer şekilde sonuçlanmıştır. Bunun sebebi ise muhtemelen organik fazın artan viskozitesi ile emülsiyon sonrası sulu fazda (sürefektan içerisinde) yeterince iyi bir şekilde dağılım göstermemesi ile ilgilidir ve bu durum daha yüksek boyutlu NP eldesine ve hatta agregasyona yol açmaktadır (Nguyen ve diğ., 2015; Mainardes ve Evangelista, 2005).

Sonuç olarak 50, 70 ve 100 mg polimer kullanılarak hazırlanan DOX-PLGA/PDIBG-NP'lerinin partikül boyutu, PDI, %EE ve elde edilen NP miktarları değerlendirildiğinde; dondurma-çözme ve dondurma-kurutma testlerinde kullanılmak üzere hazırlanan NP formülasyonlarında partikül agregasyonu içermeyen optimum polimer miktarı PLGA için 50 mg, PDIBG için 70 mg olarak belirlendi.

Tablo 3.5. Polimer miktarının DOX-PLGA-NP özellikleri üzerindeki etkisi

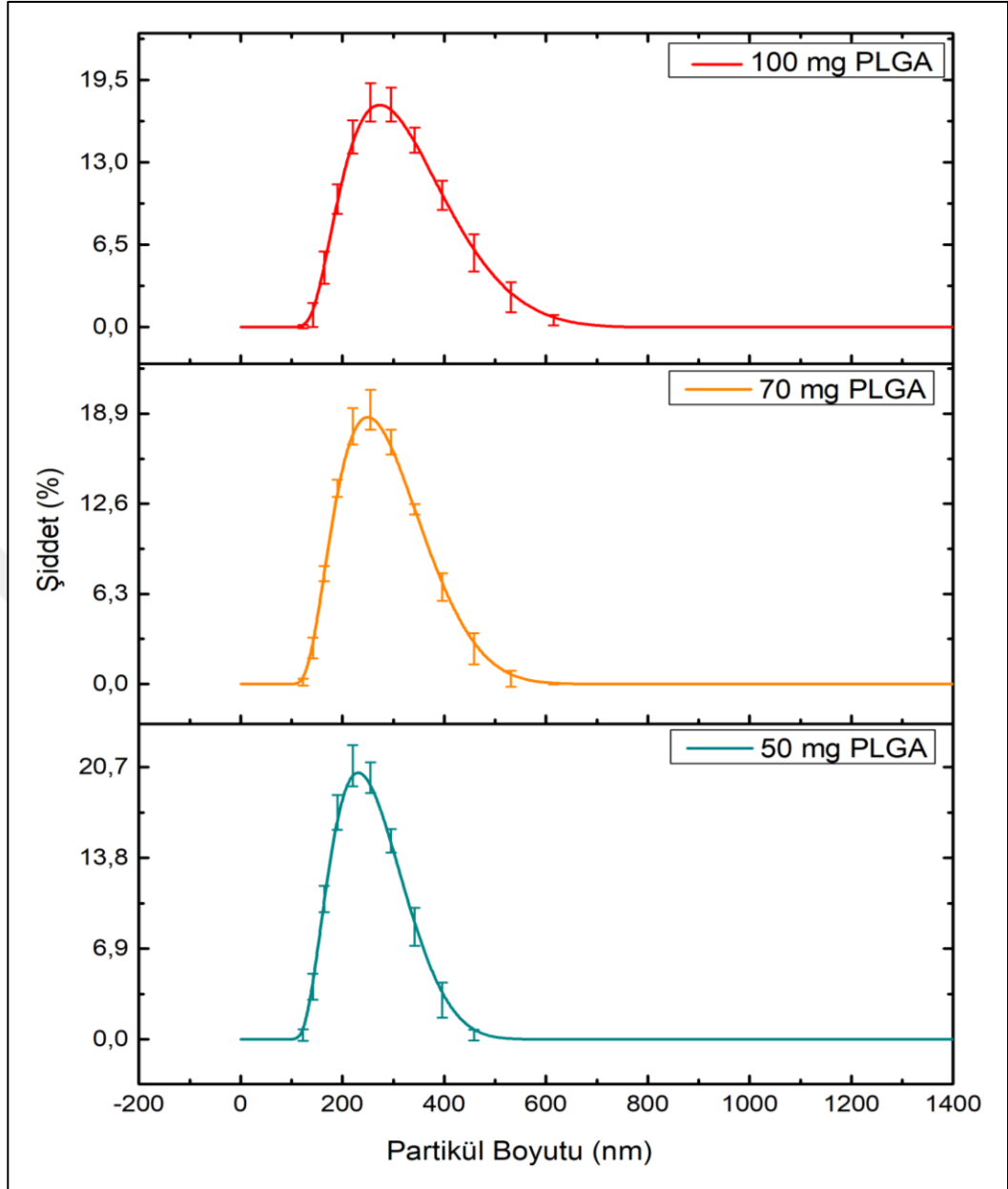
Polimer Miktarı	Başlangıçtaki Dox (μg)	Partikül boyutu nm \pm SS	PDI \pm SS	NP Miktarı	EE (%)
50 mg	437,4	225,9 \pm 4,63	0,05 \pm 0,02	42,4 mg	22,1
70 mg	437,6	242,9 \pm 5,58	0,08 \pm 0,02	61,3 mg	26,6
100 mg	510,8	272,2 \pm 10,01	0,12 \pm 0,03	87,05 mg	47,6

EE: enkapsülasyon etkinliği, SS: standart sapma

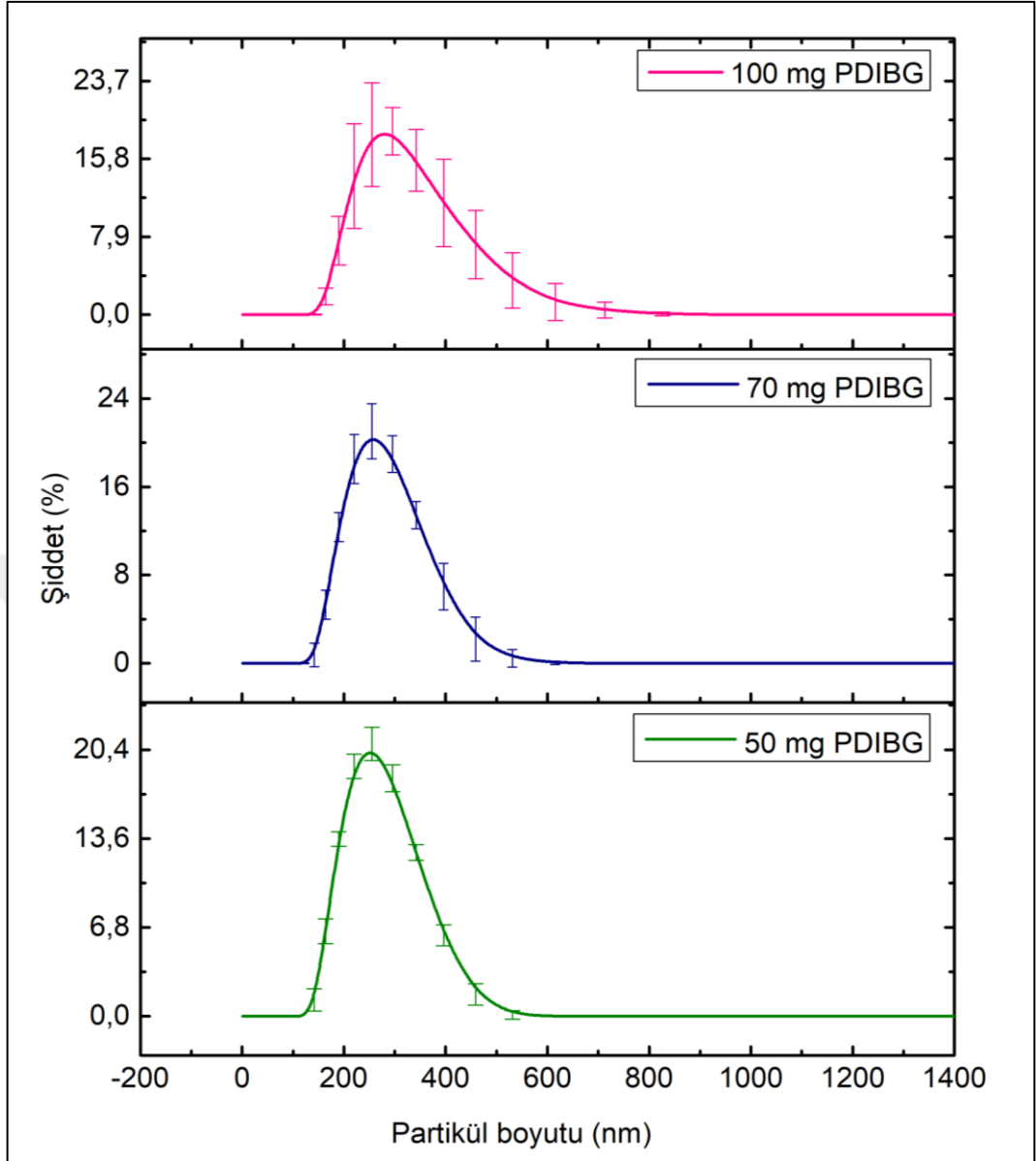
Tablo 3.6. Polimer miktarının DOX-PDIBG-NP özellikleri üzerindeki etkisi

Polimer Miktarı	Başlangıçtaki Dox (μg)	Partikül boyutu nm \pm SS	PDI \pm SS	NP Miktarı	EE (%)
50 mg	954,51	238,9 \pm 4,32	0,05 \pm 0,04	30,16 mg	75,6
70 mg	1097	252,9 \pm 6,50	0,06 \pm 0,02	48,7 mg	77,8
100 mg	1439	303,8 \pm 20,3	0,16 \pm 0,09	76,2 mg	72,5

EE: enkapsülasyon etkinliği, SS: standart sapma



Şekil 3.15. Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), farklı miktarda polimer ile hazırlanan DOX-PLGA-NP'lerin partikül boyutu ve boyut dağılımları



Şekil 3.16. Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), farklı miktarda polimer ile hazırlanan DOX-PDIBG-NP'lerin partikül boyutu ve boyut dağılımları

3.5. DOX- PLGA/PDIBG-NP'lerinin Dondurma-Çözme Testleri

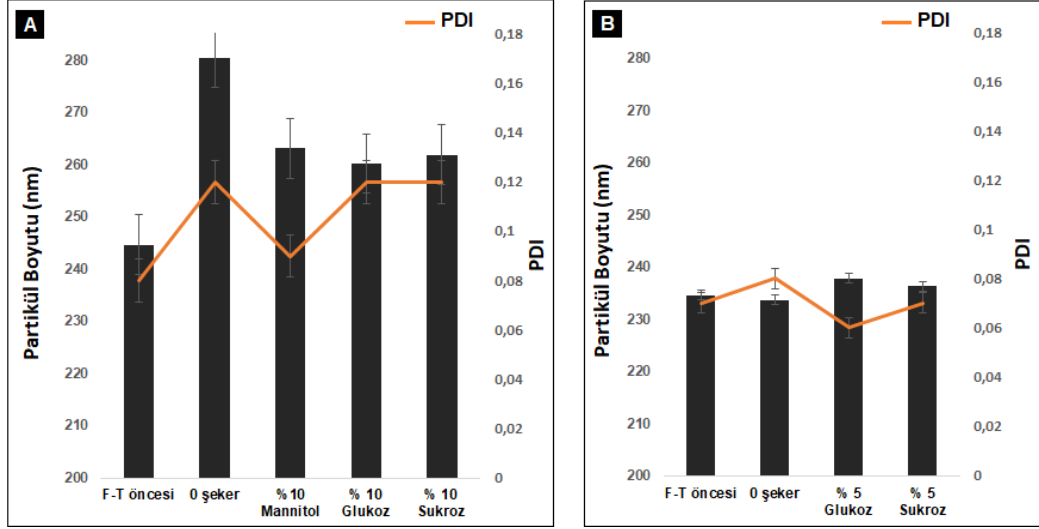
NP'lerin liyofilizasyonu için gereken en uygun şartları belirlemek üzere kriyoprotektan çeşidi/konsantrasyonu, NP konsantrasyonu ve dondurma sıcaklığı gibi farklı koşulları içeren dondurma-çözme testleri gerçekleştirilerek her iki polimer çeşidi için kıyaslamalı olarak incelendi.

3.5.1. DOX-PLGA-NP'lerinin dondurma-çözme testleri

Doksorubisin yüklü PLGA-NP'lerinin dondurma-çözme testleri için öncelikle hem şekerli hem şekersiz sulu süspansiyonları -20 °C'de 1 gece boyunca ve -50 °C'de 3 saat boyunca donduruldu ve ardından oda sıcaklığına getirilerek boyut analizleri gerçekleştirildi ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.17'de gösterildi.

Kriyoprotektanların ve PLGA'nın camsı geçiş sıcaklığı (T_g) üzerinde bir sıcaklık olan -20 °C'de 1 gece dondurulduğunda, başlangıçta yaklaşık 240 nm partikül boyutuna ve 0,08 PDI değerine sahip NP'lerin şeker içermeyen örneklerinde 280 nm partikül boyutu ve 0,12 PDI değeri olacak şekilde hafif bir artış görülürken %10 şeker konsantrasyonlu örnekler genel olarak dondurma-çözme öncesine yakın boyutlara ve PDI değerine sahip olarak elde edildi (Şekil 3.17 (A)). Literatürde de daha önce PLGA-NP'lerinin -20 °C'de gerçekleştirilen dondurma-çözme testlerinde partikül boyutu ve boyut dağılımının dondurma öncesine göre yükseldiği görülmüştür (Niu ve Panyam, 2017).

Hem şeker içeren hem de içermeyen PLGA-NP'ler, kriyoprotektanların ve PLGA'nın camsı geçiş sıcaklığından (T_g) daha düşük bir sıcaklık olan, -50 °C'de 3 saat dondurulduktan sonra partikül boyutları ve PDI değerlerinin dondurma-çözme öncesi ile hemen hemen aynı değerlerde olduğu görüldü (Şekil 3.17 (B)). Dolayısıyla ilaç yüklü PLGA-NP'lerinin iki farklı sıcaklıkta gerçekleştirilen dondurma-çözme testlerinde, -20 °C'ye (EK-D, Şekil D.3) kıyasla şeker ilavesiz NP örneklerinde dahi -50 °C dondurma sıcaklığında partikül kararlılığının daha iyi korunduğu görüldü (EK-D, Şekil D.4).



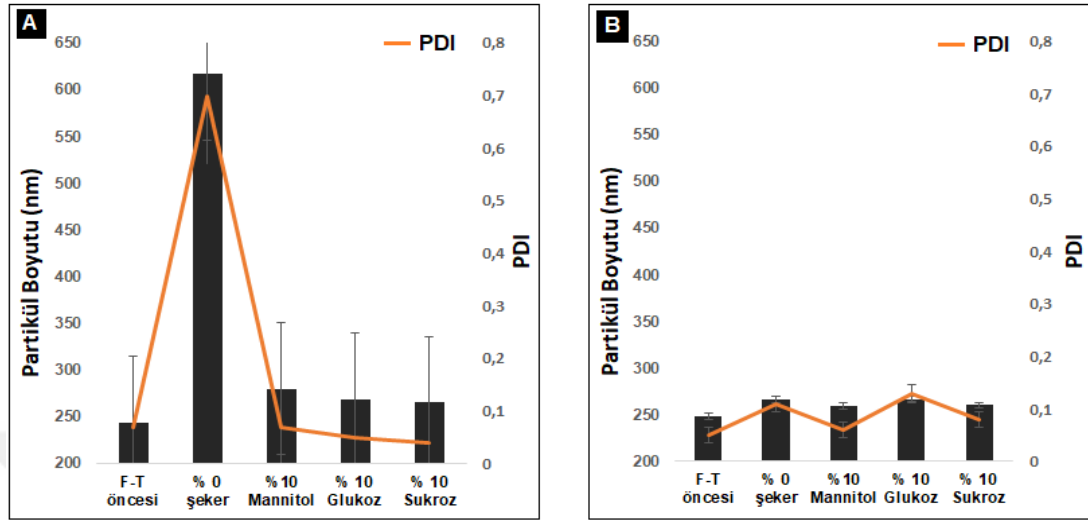
Şekil 3.17. Partikül boyutu ve boyut dağılımı (DLS), DOX-PLGA-NP'lerinin; -20 °C'de (A) ve -50 °C'de (B) dondurularak gerçekleştirilen dondurma-çözme testleri (F-T) öncesi ve sonrası

3.5.2. DOX-PDIBG-NP'lerinin dondurma-çözme testleri

Doksorubisin yüklü PDIBG-NP'lerinin dondurma-çözme testleri için PLGA-NP'lerinde olduğu gibi dondurma sıcaklığı olarak -20 °C ve -50 °C kullanıldı ve dondurma sıcaklığının PDIBG-NP'lerinin kararlılığı üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla en yüksek kriyoprotektan konsantrasyonu olan %10 toplam şeker konsantrasyonu ile dondurma-çözme testleri gerçekleştirildi. PDIBG-NP'lerinin -20 °C'de 1 gece dondurularak gerçekleştirilen dondurma-çözme testleri şeker ilavesiz örneklerin partikül boyutunun yaklaşık 620 nm'ye ve boyut dağılımının 0,7' ye yükselmesi ile sonuçlandı. Bunun yanı sıra %10 şeker (mannitol, glukoz, sukroz) içeren tüm örneklerde partikül boyutu ve PDI değerlerinin dondurma öncesine yakın elde edilmesi ile kriyoprotektan ilavesinin partikül kararlılığı üzerindeki etkinliği bu sıcaklıkta net bir şekilde görüldü (Şekil 3.18 (A), EK-D, Şekil D.5).

Şeker içeren ve içermeyen PDIBG-NP'lerin -50 °C'de 3 saat dondurulması sonrası oda sıcaklığına getirilerek boyut analizleri gerçekleştirildiğinde, partikül boyutları ve boyut dağılımları dondurma öncesine oldukça yakın elde edildi (Şekil 3.18 (B), EK-D, Şekil D.6). Benzer şekilde literatürde de PLGA-NP'lerinin, şekerlerin camsı geçiş sıcaklığı altında bir sıcaklıkta (kademeli olarak -40 °C'ye getirilip bu sıcaklıkta

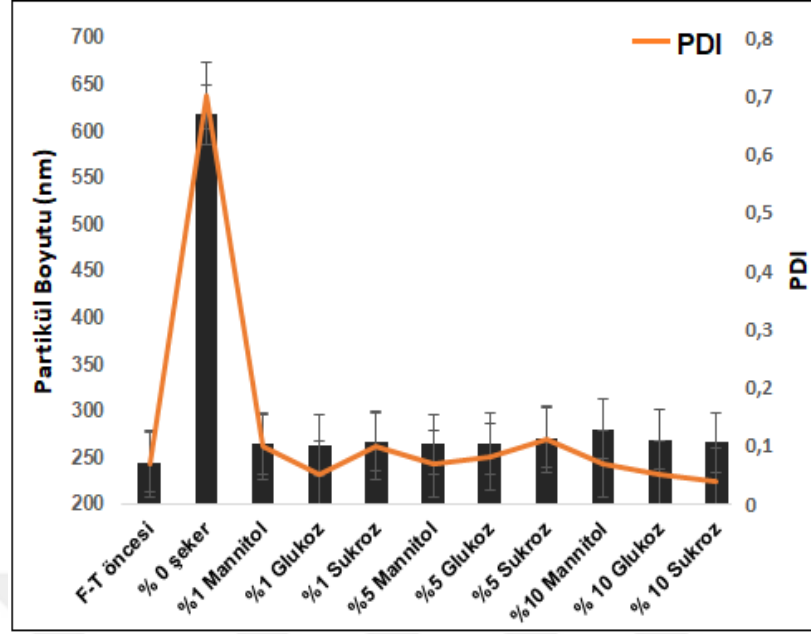
dondurularak) gerçekleştirilen dondurma-çözme testlerinde boyutlar dondurma öncesine yakın olarak elde edilmiştir (Holzer ve diğ., 2009).



Şekil 3.18. Partikül boyutu ve boyut dağılımı (DLS), DOX-PDIBG-NP'lerinin; -20 °C'de (A) ve -50 °C'de (B) dondurularak gerçekleştirilen dondurma-çözme testleri (F-T) öncesi ve sonrası

DOX-PDIBG-NP'lerin şekerli örneklerinin -20 °C'de dondurulması sonunda meydana gelen bu boyut artışından dolayı daha düşük konsantrasyonlu kriyoprotektanların da kararlılık üzerinde hala etkinliğinin olup olmadığının görülmesi adına %1 ve %5 toplam konsantrasyona sahip şekerli örnekleri içeren PDIBG-NP'lerin yine bu sıcaklıkta bir dizi dondurma-çözme testleri gerçekleştirildi (Şekil 3.19).

Kriyoprotektan çözeltilerinin NP çözeltileri ile 1:1 oranında karıştırılması sonucunda mannitol, glukoz ve sukrozun %1, %5 ve %10 konsantrasyonuna sahip DOX-PDIBG-NP süspansiyonlarının -20 °C dondurma sıcaklığı kullanılarak gerçekleştirilen dondurma-çözme testlerinde genel olarak tüm şekerli örneklerin partikül boyutları ve boyut dağılımları dondurma-çözme öncesine yakın olarak elde edildi. Sonuçta -20 °C'de dondurma-çözme testleri uygulanan DOX-PDIBG-NP'lerinin partikül kararlılığının %1 (EK-D, Şekil D.7) ve %5 (EK-D, Şekil D.8) şeker konsantrasyonu varlığında dahi korunduğu görüldü.



Şekil 3.19. Partikül boyutu ve boyut dağılımı (DLS), Şeker içeren ve içermeyen DOX-PDIBG-NP'lerinin; -20 °C'de dondurma-çözme testleri öncesi (F-T) ve sonrası

3.6. DOX- PLGA/PDIBG-NP'lerinin Dondurma-Kurutma Testleri

3.6.1. DOX- PLGA-NP'lerinin liyofilizasyonu

Dokсорubisin yüklü PLGA-NP'lerine uygulanan dondurma-çözme testlerinde; Dondurma sıcaklığı olarak -20 °C'nin kullanılmasında şeker içeren örneklerin partikül kararlılığının korunduğu görülürken şeker ilave edilmeyenlerde partikül boyutu ve boyut dağılımında hafif bir artış meydana geldiği görülmüştür (Şekil 3.17 (A)). Ayrıca, PLGA-NP'lerinin -50 °C'de dondurulması sonrasında ise şeker içeren ve içermeyen örneklerinin partikül boyutları ve boyut dağılımlarının birbirine yakın olarak elde edilmesiyle genel olarak partikül kararlılığının korunduğu görülmüştür (Şekil 3.17 (B)).

Dondurma-çözme ve dondurma-kurutma arasındaki ilişkiyi araştırmak adına DOX-PLGA-NP'lerine her iki dondurma sıcaklığında liyofilizasyon prosesi uygulandı. Bunun için dondurma-çözme testlerine benzer şekilde hem şekerli hem şekersiz sulu DOX-PLGA-NP süspansiyonlarına -20 °C'de 1 gece ve -50 °C'de 3 saat dondurma işlemi uygulandı. %1, %5 ve %10 toplam şeker konsantrasyonu içeren ve kontrol grubu olarak da su ilave edilen (%0 şeker) DOX-PLGA-NP'leri 1 gece boyunca liyofilize edildi.

Liyofilizasyon sonrası su ilavesi ile yeniden dağıtılan (rekonstitüsyon) NP'lerin boyut analizleri gerçekleştirildiğinde NP'lerin -20 °C'de 1 gece dondurularak gerçekleştirilen liyofilizasyonun (Tablo 3.7; 304,9 nm; 0,02 PDI değeri) -50 °C'de 3 saat dondurularak gerçekleştirilen liyofilizasyon işlemine kıyasla (Tablo 3.7; 249,7 nm; 0,11 PDI değeri) daha büyük partikül boyutları ve daha geniş bir partikül boyut dağılımına sebep olduğu görüldü. Ayrıca -20 °C'de dondurularak gerçekleştirilen liyofilizasyon prosesinde şeker içermeyen NP formülasyonlarında partikül topaklanmasının bir göstergesi olan mikro boyutlu partiküllerin varlığı tespit edilirken %1 şeker konsantrasyonunun varlığında dahi (EK-D, Şekil D.9, 12) partikül boyutu ve boyut dağılımının liyofilizasyon öncesine yakın olarak elde edilmesi ile partikül kararlılığının şeker ilaveli tüm formülasyonlarda korunduğu görüldü (EK-D, Şekil D.10, 11, 13, 14).

Tablo 3.7. DOX-PLGA-NP'lerinin iki farklı sıcaklıkta dondurularak gerçekleştirilen liyofilizasyon testleri

	-20° C		-50° C	
	Partikül boyutu (nm) ± SS	PDI ± SS	Partikül boyutu (nm) ± SS	PDI ± SS
Liyofilizasyon öncesi	234,9 ± 2,04	0,06 ± 0,02	232,4 ± 4,7	0,06 ± 0,01
%0 şeker	304,9 ± 33,0*	0,20 ± 0,05	249,7 ± 12,4	0,11 0,03
%1 Mannitol	243,8 ± 3,1	0,08 ± 0,02	237,4 ± 2,8	0,10 ± 0,03
%1 Glukoz	242,7 ± 2,8	0,10 ± 0,01	235,2 ± 2,5	0,08 ± 0,04
%1 Sukroz	244,5 ± 7,8	0,11 ± 0,05	235,3 ± 1,5	0,07 ± 0,02
%5 Mannitol	252,4 ± 2,5	0,11 ± 0,02	241,8 ± 1,4	0,08 ± 0,01
%5 Glukoz	240,8 ± 1,0	0,06 ± 0,02	238,3 ± 2,6	0,09 ± 0,03
%5 Sukroz	240,2 ± 2,3	0,08 ± 0,02	234,9 ± 2,03	0,08 ± 0,01
%10 Mannitol	246,3 ± 1,3	0,09 ± 0,02	247,02 ± 1,7	0,09 ± 0,03
%10 Glukoz	244,4 ± 4,2	0,06 ± 0,04	244,5 ± 4,9	0,09 ± 0,04
%10 Sukroz	243,5 ± 1,8	0,07 ± 0,02	243,9 ± 1,8	0,07 ± 0,04

*: mikro boyutlu partikül varlığı, SS: standart sapma

3.6.2. DOX- PDIBG-NP'lerinin liyofilizasyonu

Doksorubisin yüklü PDIBG-NP'lerin liyofilizasyonunda farklı parametreleri içeren çeşitli testler uygulanarak partikül kararlılığının korunduğu optimum koşullar detaylı olarak incelendi. Bu amaçla ilaç yüklü PDIBG-NP'lerine -20 °C ve -50 °C dondurma sıcaklıklarını, farklı şeker çeşitleri (mannitol, glukoz ve sukroz) ve bunların farklı konsantrasyonlarını (%1, %5 ve %10) ve farklı NP konsantrasyonlarını (50 mg/mL ve 75 mg/mL) kullanarak liyofilizasyon prosesi uygulandı.

Çeşitli parametrelerin test edildiği bir dizi dondurma-kurutma işlemi sonunda DOX-PDIBG-NP'lerinin uzun süreli saklanabilmesi için gereken şartlar belirlendi.

İlk olarak doksorubisin yüklü PDIBG-NP'lerin şeker içeren ve içermeyen örneklerinin liyofilizasyonu -20 °C ve -50 °C dondurma sıcaklıklarının kullanımı ile gerçekleştirildi. NP örneklerinde toplam NP konsantrasyonu 50 mg/ml ve toplam şeker konsantrasyonu %1, %5 ve %10 mannitol, glukoz ve sukroz içerecek şekilde ayarlanarak -20 °C'de 1 gece ve -50 °C'de 3 saat dondurulmasının, ardından liyofilizatörde 1 gece boyunca kurutma işlemi uygulandı. Liyofilizasyon sonrası su ilavesi ile rekonstitüsyonu gerçekleştirilen NP'lerin boyut analizleri gerçekleştirildi ve sonuçlar Tablo 3.8'de gösterildi.

- Her iki sıcaklıkta gerçekleştirilen liyofilizasyon testlerinde şeker içermeyen NP'lerin liyofilize edildikten sonra, PDI değerlerinin ve partikül boyutlarının mikro boyutlara yükseldiği (>6.000 nm) dolayısıyla da agregasyon meydana geldiği görüldü.
- Dondurma sıcaklığı olarak -20 °C kullanıldığında %0 şeker, %1 mannitol, %1 glukoz, %5 mannitol ve %10 mannitol içeren NP örnekleri, dondurma sıcaklığı olarak -50 °C kullanımında ise %0 şeker, %1 mannitol ve %5 mannitol içeren NP örnekleri su içerisinde iyi ve homojen dağılım göstermeyerek başarısız bir rekonstitüsyon gösterdi.
- Şeker içeren NP formülasyonlardan; %1 toplam konsantrasyona sahip tüm şekerlerin ve %5 ve %10 toplam mannitol çözeltisinin her iki dondurma sıcaklığında da partikül kararlılığını korumak için yeterli olmadığı görüldü.
- Genel olarak sukroz ve glukozun %5 ve %10 toplam konsantrasyonunu içeren NP'lerin her iki sıcaklıkta dondurulmasında da partikül kararlılığının korunduğu

görüldü. Bununla birlikte %5 glukoz ve sukroz içeren NP'lerin -20 °C'de dondurulması ile gerçekleştirilen liyofilizasyon prosesi dondurma öncesine kıyasla nispeten daha yüksek partikül boyutu ve boyut dağılımları ile sonuçlandı.

- Tüm bunların yanında şeker içeren NP'lerin liyofilizasyonunda; dondurma sıcaklığı olarak -20 °C kullanımının (EK-D, Şekil D.15) -50 °C'ye (EK-D, Şekil D.16) kıyasla daha yüksek partikül boyutuna ve PDI değerine sahip NP eldesi ile sonuçlandığı görülmüştür. Bunun sebebi muhtemelen şekerlerin camsı geçiş sıcaklığı üzerinde bir sıcaklık olan -20 °C'nin liyofilizasyon için uygun bir dondurma sıcaklığı olmamasından kaynaklanmaktadır.

Tablo 3.8. DOX-PDIBG-NP'lerinin iki farklı dondurma sıcaklığı kullanılarak gerçekleştirilen liyofilizasyon testleri

	-20° C		-50° C	
	Partikül boyutu (nm) ± SS	PDI ± SS	Partikül boyutu (nm) ± SS	PDI ± SS
Liyofilizasyon öncesi	254,2 ± 12,72	0,05 ± 0,02	247,1 ± 5,00	0,05 ± 0,02
%0 şeker	> 6.000 ± 3028,5	0,89 ± 0,15	> 8.000 ± 1882	0,39 ± 0,23
%1 Mannitol	> 10.000 ± 6199	0,39 ± 0,33	> 4.000 ± 2638,04	0,77 ± 0,27
%1 Glukoz	> 5.000 ± 2925,6	0,73 ± 0,29	747,5 ± 126,8	0,77 ± 0,09
%1 Sukroz	738,6 ± 305,7	0,74 ± 0,26	459,6 ± 101,5	0,54 ± 0,13
%5 Mannitol	> 6.000 ± 1369,3	0,52 ± 0,12	> 9.000 ± 4963,8	0,55 ± 0,27
%5 Glukoz	329,8 ± 40,7	0,18 ± 0,08	276,9 ± 6,32	0,14 ± 0,03
%5 Sukroz	334,7 ± 22,7	0,22 ± 0,02	261,7 ± 5,84	0,10 ± 0,03
%10 Mannitol	> 2.000 ± 1341,2	0,90 ± 0,20	513,7 ± 262,9	0,50 ± 0,18
%10 Glukoz	269,7 ± 6,25	0,12 ± 0,03	284,9 ± 16,1	0,12 ± 0,03
%10 Sukroz	265,7 ± 4,77	0,09 ± 0,03	272,4 ± 2,9	0,06 ± 0,01

SS: standart sapma

Glukozun ve sukrozun %5 ve %10 konsantrasyonlarının kullanılması ile gerçekleştirilen liyofilizasyon işleminin partikül kararlılığı üzerindeki olumlu etkileri sebebiyle bu şekerlerin daha yüksek NP konsantrasyonunda etkinlikleri değerlendirildi. Bunun için 75 mg/mL toplam konsantrasyona sahip DOX-PDIBG-NP'lerinin şeker içeren ve içermeyen örnekleri -50 °C'de 3 saat donduruldu ve 1 gece boyunca liyofilize edildi. Ardından 75 mg/mL konsantrasyona sahip liyofilize

NP'lerin partikül boyut analizleri gerçekleştirildiğinde kriyoprotektan ilavesinin koruyucu etkisi açıkça görüldü (EK-D, Şekil D.17).

Genel olarak her iki NP konsantrasyonunda uygulanan liyofilizasyon prosesinde şeker kullanımının şeker içermeyen NP'lere kıyasla partikül kararlılığını oldukça başarılı bir şekilde koruduğu görüldü. Bunun yanı sıra şeker içeren tüm örnekler içerisinde %10 konsantrasyonlu sukroz içeren NP'lerin liyofilizasyonunun daha küçük partikül boyutları ile sonuçlandığı tespit edildi (Tablo 3.9).

Tablo 3.9. DOX-PDIBG-NP'lerin iki farklı NP konsantrasyonunda -50 °C'de dondurularak gerçekleştirilen liyofilizasyon testleri

	50 mg/mL		75 mg/mL	
	Partikül boyutu (nm) ± SS	PDI ± SS	Partikül boyutu (nm) ± SS	PDI ± SS
Liyofilizasyon öncesi	247,1 ± 5,00	0,05 ± 0,02	240,6 ± 0,66	0,03
%0 şeker	> 8,000 ± 1882	0,39 ± 0,23	> 8.000 ± 212,5	0,29 ± 0,28
%5 Glukoz	276,9 ± 6,32	0,14 ± 0,03	263,8 ± 11,9	0,10 ± 0,05
%5 Sukroz	261,7 ± 5,84	0,10 ± 0,03	262,7 ± 7,64	0,11 ± 0,05
%10 Glukoz	284,9 ± 16,1	0,12 ± 0,03	263,8 ± 3,43	0,10 ± 0,04
%10 Sukroz	272,4 ± 2,9	0,06 ± 0,01	258,5 ± 6,14	0,08 ± 0,04

SS: standart sapma

3.6.2.1. Liyofilize DOX- PDIBG-NP'lerinin uzun süreli saklanması

Daha önce de bahsedildiği gibi liyofilizasyon sırasında kriyoprotektan kullanımı NP kararlılığını korumada oldukça etkili olsa da bu şekerlerin uzun saklama koşullarında da koruyucu özelliğini sürdürmesi beklenmektedir. İlaç yüklü NP'lerin ticarileşmesi için bir gereklilik olan depolanabilirlik özelliğini incelemek adına uzun süreli saklama testleri gerçekleştirildi.

Bu amaç doğrultusunda DOX-PDIBG-NP'lerinin liyofilizasyonu sırasında en etkili korumayı sağlayan %10 sukrozun uzun süreli etkinliği değerlendirildi;

- 20, 40 ve 60 mg/mL toplam NP konsantrasyonlu hem şeker içermeyen hem de %10 toplam sukroz çözeltisi içeren NP formülasyonları -50 °C'de 3 saat dondurulduktan sonra 1 gece boyunca liyofilize edildi.

- Ardından liyofilize edilen tüm NP örnekleri pratik bir saklama sıcaklığı olan -20 °C’de 1 ay boyunca tutuldu.
- Son olarak su ilave edilerek yeniden sulandırılan NP’lerin yeniden dağılılabirlik özellikleri incelendi ve boyut analizleri gerçekleştirildi.

Liyofilizasyon öncesi ortalama 235 nm partikül boyutuna ve 0,06 PDI değerine sahip DOX-PDIBG-NP’lerinin şeker içermeyen liyofilize örneklerinin 1 ay buzdolabında saklanması sonrası partikül boyutu ve boyut dağılımları agregasyon oluşumunun bir göstergesi olarak oldukça yüksek değerlerde elde edildi (Tablo 3.9).

%10 sukroz içeren NP’lerde ise genel olarak partikül boyutları ve boyut dağılımları şeker içermeyenlere kıyasla oldukça düşük elde edilirken; 60 mg/mL NP konsantrasyonuna sahip NP’de partikül boyutunun 294 nm’ye ve PDI değerinin yaklaşık 0,2’ye yükselmesi ile partikül kararlılığın yeterince iyi korunmadığı görüldü (Tablo 3.10). Bunun yanı sıra 60 mg/mL NP konsantrasyonunda formülasyonda mikro boyutlu ikinci piklerin de varlığı yine agregasyon oluşumunun bir göstergesidir (Şekil D.18).

Tablo 3.10. Farklı konsantrasyona sahip DOX-PDIBG-NP’lerinin şeker içeren ve içermeyen örneklerinin uzun süreli saklanması

NP konsantrasyonu (mg/mL)	%0 şeker		%10 sukroz	
	Partikül boyutu (nm) ± SS	PDI ± SS	Partikül boyutu (nm) ± SS	PDI ± SS
20	>5.000 ± 985,7	0,5 ± 0,12	268,5 ± 8,87	0,08 ± 0,03
40	>16.000 ± 5624	0,4 ± 0,17	252,9 ± 2,30	0,05 ± 0,03
60	>9.000 ± 5266	0,6 ± 0,16	294,1 ± 11,3	0,19 ± 0,03

SS: standart sapma

Liyofilize keklerin yeniden dağılılabirlik özellikleri değerlendirildiğinde ise;

- Beklendiği gibi agregasyona bağlı olarak şeker ilavesiz tüm NP’lerin yeniden sulandırılmasında oldukça başarısız bir rekonstitüsyon görüldü.
- 20 mg/mL konsantrasyona sahip NP formülasyonları başarılı bir dağılılabirlik özellik sergilerken NP konsantrasyonu 40 mg/mL’ye çıktığında çok hafif parçacıklı bir görünüm elde edildi.

- En yüksek NP konsantrasyonu olan 60 mg/mL’de ise su ilavesinden sonra kısmen başarılı bir dağılılabirlik özellik gösterdiği görüldü.

Dolayısıyla DOX-PDIBG-NP’lerinin uzun süreli saklanması sırasında partikül kararlılığının sağlanabildiği kritik NP konsantrasyonu 20 ve 40 mg/mL olarak belirlendi.



4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Geleneksel kemoretapi yöntemine karşı geliştirilen polimerik nanopartiküller küçük boyutlu olmaları sayesinde kanser tedavisi için oldukça avantajlı malzemelerdir. Biyobozunurluk ve biyoyumluluk özellikleri sayesinde poli(laktik) (PLA) ve poli(laktik-*ko*-glikolik asit) (PLGA) polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında en sık kullanılan poliestерlerdir. Bu polimerler kullanılarak hazırlanan biyomalzemelere alternatif olabilecek süstitüye glikolid bazlı polimerlerin geliştirilmesi ise son zamanlarda oldukça ilgi çekicidir.

Bu tez çalışmasında PLA, PLGA gibi poliestерlere alternatif yeni bir malzeme geliştirmek amacıyla poli(diizobütıl glikolid) (PDIBG) homopolimerleri sentezlendi. Bunun için Sn(Oct)₂ katalizörü varlığında ve benzilalkol başlatıcısı eşliğinde diizobütıl monomerinin halka açılma polimerizasyonu gerçekleştirildi.

Yeni sentezlenen PDIBG homopolimerlerinin ve ticari olarak satılan PLGA polimerinin ayrı olarak kullanımıyla doksorubisin antikanser ilacı yüklü NP formülasyonları hazırlandı ve bu NP'lerin partikül boyutu, boyut dağılımı ve ilaç yükleme kapasitesi karşılaştırmalı olarak incelendi. PDIBG-NP'leri için belirlenen optimum formülasyonda partikül boyutu yaklaşık 240 nm ve PDI değeri 0,05 olarak elde edilirken PLGA-NP'leri için yaklaşık 230 nm ve 0,05 PDI değerine sahip olarak elde edildi.

Polimer konsantrasyonunun partikül boyutu, boyut dağılımı ve ilaç yükleme verimi üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde en uygun özellikleri taşıyan ve homojen dağılım gösteren NP içeriği; PLGA için 50 mg, PDIBG için ise 70 mg polimer miktarı ile elde edildi. Bu iki polimerin ilaç yükleme kapasitesi karşılaştırıldığında ise PLGA-NP'lerin 100 mg gibi oldukça yüksek polimer miktarı kullanılarak hazırlanan formülasyonlarında dahi enkapsülasyon etkinliği %47,6 olarak elde edilirken PDIBG-NP'lerinin 70 mg polimer miktarı kullanılarak hazırlanan formülasyonlarında bu değer %77,8 olarak elde edildi.

Doksozürbisin yüklü PDIBG ve PLGA-NP'lerinin iki farklı sıcaklık kullanılarak gerçekleştirilen dondurma-çözme testlerinde ise -20 °C'de dondurmanın özellikle şeker içermeyen NP'lerde daha yüksek partikül boyutları ile sonuçlanması sebebiyle -50 °C'nin daha uygun bir dondurma sıcaklığı olduğu görüldü. Yine iki farklı sıcaklıkta dondurularak gerçekleştirilen liyofilizasyon testlerinde de hem PLGA-NP'lerinde hem de PDIBG-NP'lerinde -50 °C'de dondurulan NP'lerin daha küçük partikül boyutları ve boyut dağılımı ile sonuçlandığı görüldü. PDIBG-NP'leri (50 mg/mL) için dondurma-çözme ve daha detaylı olarak gerçekleştirilen liyofilizasyon testleri karşılaştırıldığında; PDIBG-NP'lerinin -20 °C'de gerçekleştirilen dondurma-çözme testlerinde %1, %5 ve %10 toplam konsantrasyonlu tüm şekerlerin partikül boyutlarını koruduğu görülürken -20 °C'de dondurularak gerçekleştirilen liyofilizasyon işleminde bu şekerlerden %1, %5 konsantrasyonlardaki glukoz, sukroz ile tüm konsantrasyonlarda mannitol kullanımının partikül kararlılığını korumada yetersiz olduğu tespit edildi. Aynı NP'lerin -50 °C'de dondurulmasının ardından gerçekleştirilen liyofilizasyon işleminde ise hem %5 hem de %10 toplam konsantrasyonlu glukoz ve sukrozun partikül kararlılığını koruduğu ancak glukozun PDI değerlerinde küçük bir artışa sebep olduğu tespit edildi.

PDIBG-NP'leri için farklı NP konsantrasyonları ile daha detaylı olarak gerçekleştirilen liyofilizasyon testleri sonucunda, kriyoprotektan çeşidi ve konsantrasyonunun dondurma-kurutma işlemleri sonunda partikül kararlılığı üzerindeki etkisi değerlendirildi. İlaç yüklü PDIBG-NP'lerinin liyofilizasyonu sırasında özellikle %10 toplam konsantrasyona sahip glukoz ve sukroz içeriğinin 75 mg/mL NP konsantrasyonuna kadar koruyucu etki gösterdiği bulundu. Bunun yanında %10 konsantrasyonlu sukroz içeriğinin %10 glukozla kıyasla daha küçük partikül boyutları ve boyut dağılımı sağladığı görülerek partikül kararlılığı üzerindeki en etkin korumayı sağlayan kriyoprotektan konsantrasyonu ve çeşidi %10 sukroz olarak belirlendi.

Kriyoprotektan konsantrasyonu ve çeşidinin %10 sukroz olarak belirlenmesi ile; bu kriyoprotektan konsantrasyonunun uzun süreli saklama sırasındaki koruyucu etkinliğinin incelenmesi için ise üç farklı konsantrasyona sahip DOX-PDIBG-NP'leri -50 °C'de dondurularak liyofilize edilmesinin ardından pratik bir saklama sıcaklığı olan -20 °C'de 1 ay boyunca depolandı.

1 ay sonunda yeniden sulandırılan NP'lerde uzun süreli saklamaya uygun kritik NP konsantrasyonu 20 ve 40 mg/mL olarak belirlendi.

Bu tez çalışması ile NP hazırlanması sırasında ticari olarak sıkça kullanılan PLGA'ya alternatif olarak uygun partikül boyutlarına ve daha yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip yeni doksorubisin yüklü PDIBG-NP'leri üretildi. Ticarileşme potansiyeline sahip DOX-PDIBG-NP'lerine kriyoprotektan varlığında detaylı bir liyofilizasyon prosesi uygulanarak 1 ay boyunca saklamaya uygun katı toz içerikleri elde edildi.



KAYNAKLAR

Abdelwahed W., Degobert G., Stainmesse S., Fessi H., Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations, *Adv Drug Deliv Rev.*, 2006, **58**(15), 1688-1713.

Almalik A., Alradwan I., Kalam M. A., Alshamsan A. Effect of cryoprotection on particle size stability and preservation of chitosan nanoparticles with and without hyaluronate or alginate coating, *Saudi Pharm. J.*, 2017, **25**(6), 861-867.

Amjadi I., Rabiee1 M., Hosseini M. S, Sefidkon F., Mozafari M., Nanoencapsulation of *Hypericum perforatum* and doxorubicin anticancer agents in PLGA nanoparticles through double emulsion technique, *Micro & Nano Letters*, 2013, **8**(5), 243–247.

Arıcan M. O., Erdoğan S., Mert O., Amine-Functionalized Polylactide–PEG Copolymers, *Macromolecules*, 2018, **51**(8), 2817-2830.

Arıcan M. O., Mert O., Symmetrical substituted glycolides: methodology and polymerization, *Polymer Chemistry*, 2020, **11**(27), 4477-4491.

Arıcan M. O., Mert O., Synthesis and properties of novel diisopropyl-functionalized polyglycolide–PEG copolymers, *RSC Advances*, 2015, **5**(87), 71519-71528.

Bachhav Y. G., Mondon K., Kalia Y. N., Gurny R., Möller M., Novel micelle formulations to increase cutaneous bioavailability of azole antifungals, *J. Control. Release*, 2011, **153**(2), 126-132.

Barichello J. M., Morishita M., Takayama K., Nagai T., Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 1999, **25**(4), 471-476.

Betancourt T., Brown B., Brannon-Peppas L., Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles by nanoprecipitation: preparation, characterization and in vitro evaluation. *Nanomedicine (Lond)*, 2007, **2**(2), 219-32.

Bozdag S., Dillen K., Vandervoort J., Ludwig A., The effect of freeze-drying with different cryoprotectants and gamma-irradiation sterilization on the characteristics of ciprofloxacin HCl-loaded poly(D,L-lactide-glycolide) nanoparticles, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2005, **57**(6), 699-707.

Chacón M., Molpeceres J., Berges L., Guzmán M., Aberturas M. R., Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly(D,L lactide-glycolide) carriers, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 1999, **8**(2), 99-107.

Chai F., Sun L., He X., Li J., Liu Y., Xiong F., Ge L., Webster T. J., Zheng C., Doxorubicin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles coated with chitosan/alginate by layer by layer technology for antitumor applications, *Int. J. Nanomed.*, 2017, **2**, 1791-1802.

Choi J. S., Seo K., Yoo J. W., Recent advances in PLGA particulate systems for drug delivery, *Int. J. Pharm. Investig.*, 2012, **42**, 155-163.

Cohen-Arazi N., Domb A. J., Katzhendler J., New Biocompatible Polyesters Derived from α -Amino Acids: Hydrolytic Degradation Behavior, *Polymers*, 2010, **2**(4), 418-439.

Cohen-Arazi N., Domb A. J., Katzhendler J., Poly(α -hydroxy alcanoic acid)s Derived From α -Amino Acids, *Macromolecular Bioscience*, 2013, **13**(12), 1689-1699.

Cohen-Arazi N., Katzhendler J., Kolitz M., Domb A. J., Preparation of New α -Hydroxy Acids Derived from Amino Acids and Their Corresponding Polyesters, *Macromolecules*, 2008, **41**(20), 7259-7263.

Crucho C. I.C., Barros M. T., Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods, *Mater. Sci. Eng.*, 2017, **80**, 771-784.

Cui Z., Hsu C. H., Mumper R. J., Physical characterization and macrophage cell uptake of mannan-coated nanoparticles, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2003, **29**(6), 689-700.

Çağlar G. P., Yalçın S., Gündüz G., Gündüz U., Poly (DL-Lactic-Co-Glycolic Acid) Microparticle-Doxorubicin Formulations for Anti-cancer Drug Delivery, *IUFS Journal of Biology*, 2014, **73**(1), 9-19.

Çetin D., Arıcan M. O., Kenar H., Mert S., Mert O., Poly(asymmetrical glycolide)s: The Mechanisms and Thermosensitive Properties, *Macromolecules*, 2021, **54**(1), 272-290.

Date P. V., Samad A., Devarajan P. V., Freeze Thaw: A Simple Approach for Prediction of Optimal Cryoprotectant for Freeze Drying, *AAPS PharmSciTech*, 2010, **11** (1), 304-313.

Dave R., Patel R., Patel J., Chauhan H., Effect of cryoprotectant on lyophilisation of doxorubicin –HCl loaded chitosan nanoparticles, *Int. J. of Pharm. & Life Sci.*, 2012, **3**(6), 1769-1772.

de Chasteigner S., Cavé G., Fessi H., Devissaguet J-P., Puisieux F., Freeze-Drying of Itraconazole-Loaded Nanosphere Suspensions: A Feasibility Study, *Drug Dev. Res.*, 1996, **38**(2), 116-124.

Di Tommaso C., Como C., Gurny R., Möller M., Investigations on the lyophilisation of MPEG-hexPLA micelle based pharmaceutical formulations, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2010, **40**(1), 38-47.

Doktorovova S., Shegokar R., Fernandes L., Martins-Lopes P., Silva A. M., Müller R. H., Souto E. B., Trehalose is not a universal solution for solid lipid nanoparticles freeze-drying, *Pharm. Dev. Technol.*, 2014, **19**(8), 922-929.

Fonte P., Andrade F., Azevedo C., Pinto J., Seabra V., van de Weert M., Reis S., Sarmento B., Effect of the Freezing Step in the Stability and Bioactivity of Protein-Loaded PLGA Nanoparticles Upon Lyophilization, *Pharm. Res.*, 2016a, **33**(11), 2777-2793.

Fonte P., Reis S., Sarmento B., Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery, *J. Control. Release*, 2016b, **225**, 75-86.

Fonte P., Soares S., Sousa F., Costa A., Seabra V., Reis S., Sarmento B., Stability study perspective of the effect of freeze-drying using cryoprotectants on the structure of insulin loaded into PLGA nanoparticles, *Biomacromolecules*, 2014, **15**(10), 3753-3765.

Guo W., Quan P., Fang L., Cun D., Yang M., Sustained release donepezil loaded PLGA microspheres for injection: Preparation, in vitro and in vivo study, *Asian J. Pharm. Sci.*, 2015, **10**(5), 405-414.

Gupta P. N., Jain S., Nehate C., Alam N., Khare V., Dubey R. D., Saneja A., Kour S., Singh S. K., Development and evaluation of paclitaxel loaded PLGA:poloxamer blend nanoparticles for cancer chemotherapy, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2014, **69**, 393-399.

Hernández-Giottonini K. Y., Rodríguez-Córdova R. J., Gutiérrez-Valenzuela C. A., Peñuñuri-Miranda O., Zavala-Rivera P., Guerrero-Germán P., Lucero-Acuña A., PLGA nanoparticle preparations by emulsification and nanoprecipitation techniques: effects of formulation parameters, *RSC Adv.*, 2020, **10**(8), 4218–4231.

Hirsjärvi S., Peltonen L., Hirvonen J., Effect of sugars, surfactant, and tangential flow filtration on the freeze-drying of poly(lactic acid) nanoparticles, *AAPS PharmSciTech.*, 2009, **10**(2), 488-494.

Holzer M., Vogel V., Mäntele W., Schwartz D., Haase W., Langer K., Physico-chemical characterisation of PLGA nanoparticles after freeze-drying and storage, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2009, **72**(2), 428-437.

Hu D., Li T., Xu Z., Liu D., Yang M., Zhu L., Self-stabilized silk sericin-based nanoparticles: In vivo biocompatibility and reduced doxorubicin-induced toxicity, *Acta. Biomater.*, 2018, **74**, 385-396.

Iwakura Y., Iwata K., Matsuo S., Tohara A., Synthesis of Optically Active Poly(L- α -hydroxyisovalerate) and Poly(L- α -hydroxyisocaproate), *Makromolekulare Chemie*, 1971, **146**(3544), 21-32.

Iwakura Y., Iwata, K., Matsuo, S., Tohara, A.. Preliminary Synthesis and Conformational Studies of Poly(L- α -hydroxyisovalerate), *Makromolekulare Chemie*, 1969, **122**(2982), 275-280.

Jaracz S., Chen J., Kuznetsova L. V., Ojima I., Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, **13**(17), 5043-5054.

Jeong Y. I., Shim Y. H., Kim C., Lim G. T., Choi K. C., Yoon C., Effect of cryoprotectants on the reconstitution of surfactant-free nanoparticles of poly(DL-lactide-co-glycolide), *J. Microencapsul.*, 2005, **22**(6), 593-601.

Jibowu T., The Formation of Doxorubicin Loaded Targeted Nanoparticles using Nanoprecipitation, Double Emulsion and Single Emulsion for Cancer Treatment, *J. Nanomed. Nanotechnol.*, 2016, **7**(3), 1000379.

Kalaria D. R., Sharma G., Beniwal V., Ravi Kumar M. N., Design of biodegradable nanoparticles for oral delivery of doxorubicin: in vivo pharmacokinetics and toxicity studies in rats, *Pharm. Res.*, 2009, **26**(3), 492-501.

Konan Y. N., Gurny R., Allémann E., Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, 2002, **233**(1-2), 239-252.

Kumar G., Malhotra S., Shafiq N., Pandhi P., Khuller G. K., Sharma S., In vitro physicochemical characterization and short term in vivo tolerability study of ethionamide loaded PLGA nanoparticles: potentially effective agent for multidrug resistant tuberculosis, *J. Microencapsul.*, 2011, **28**(8), 717-728.

Kumar L., Baldi A., Verma S., Utreja P., Exploring Therapeutic Potential of Nanocarrier Systems Against Breast Cancer, *Pharm. Nanotechnol.*, 2018, **6**(2), 94-110.

Kunii R., Onishi H., Machida Y., Preparation and antitumor characteristics of PLA/(PEG-PPG-PEG) nanoparticles loaded with camptothecin, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2007, **67**(1), 9-17.

Langroodi F., Hafezi Ghahestani Z., Alibolandi M., Ebrahimian M., Hashemi M., Evaluation of the effect of crocetin on antitumor activity of doxorubicin encapsulated in PLGA nanoparticles, *Nanomedicine Journal*, 2016, **3**(1), 23-34.

Lapteva M., Mignot M., Mondon K., Möller M., Gurny R., Kalia Y. N., Self-assembled mPEG-hexPLA polymeric nanocarriers for the targeted cutaneous delivery of imiquimod, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2019, **142**, 553-562.

Lapteva M., Mondon K., Möller M., Gurny R., Kalia Y. N., Polymeric Micelle Nanocarriers for the Cutaneous Delivery of Tacrolimus: A Targeted Approach for the Treatment of Psoriasis, *Mol. Pharm.*, 2014a, **11**(9), 2989-3001.

Lapteva M., Santer V., Mondon K., Patmanidis I., Chiriano G., Scapozza L., Gurny R., Möller M., Kalia Y. N., Targeted cutaneous delivery of ciclosporin A using micellar nanocarriers and the possible role of inter-cluster regions as molecular transport pathways, *J. Control. Release*, 2014b, **196**, 9-18.

Lee J., Cho E. C., Cho K., Incorporation and release behavior of hydrophobic drug in functionalized poly(D,L-lactide)-block-poly(ethylene oxide) micelles, *J. Controlled Release*, 2004, **94**(2-3), 323-335.

Lee M. K., Kim M. Y., Kim S., Lee J., Cryoprotectants for freeze drying of drug nano-suspensions: effect of freezing rate, *J Pharm Sci.*, 2009, **98**(12), 4808-17.

Lee K., Choi Y., Kim K., Koo H.-J., Choi J., Quantification of Unknown Nanoscale Biomolecules Using the Average-Weight-Difference Method, *Applied Sciences*, 2019, **9**(1), 130.

Lewis J. S., Zaveri T. D., Crooks C. P. Keselowsky B. G., Microparticle surface modifications targeting dendritic cells for non-activating applications, *Biomaterials*, 2012, **33**(29), 7221-7232.

Li Z., Tan S., Li S., Shen Q., Wang K., Cancer drug delivery in the nano era: An overview and perspectives (Review), *Oncol Rep*, 2017, **38**(2), 611-624.

Mainardes R. M., Evangelista R. C., PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution, *Int. J. Pharm.*, 2005, **290**(1-2), 137-44.

Maksimenko O., Malinovskaya Y., Shipulo E., Osipova N., Razzhivina V., Arantseva D., Yarovaya O., Mostovaya U., Khalansky A., Fedoseeva V., Alekseeva A., Vanchugova, L., Gorshkova M., Kovalenko E., Balabanyan V., Melnikov P., Baklaushev V., Chekhonin V., Kreuter J., Gelperina S., Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the chemotherapy of glioblastomas: Towards the pharmaceutical development, *Int. J. Pharm.*, 2019, **572**, 118733.

Marubayashi H., Asai S., Hikima T., Takata M., Iwata T., Biobased Copolymers Composed of L-Lactic Acid and Side-Chain-Substituted Lactic Acids: Synthesis, Properties, and Solid-State Structure, *Macromol. Chem. Phys.*, 2013, **214**(22), 2546-2561.

Misra R., Sahoo S. K., Coformulation of doxorubicin and curcumin in poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles suppresses the development of multidrug resistance in K562 cells, *Mol. Pharm.*, 2011, **8**(3), 852-866.

Mobarak D. H., Salah S., Elkheshen S. A., Formulation of ciprofloxacin hydrochloride loaded biodegradable nanoparticles: optimization of technique and process variables, *Pharm. Dev. Technol.*, 2014, **19**(7), 891-900.

Mohanraj V. J., Chen Y., Nanoparticles – A Review, *Trop. J. Pharm. Res.*, 2006, **5**(1), 561-573.

Mondon K., Gurny R., Möller M., Colloidal Drug Delivery Systems – Recent Advances With Polymeric Micelles, *Chimia*, 2008, **62**(10), 832-840.

Mondon K., Zeisser-Labouèbe M., Gurny R., Möller M., MPEG-hexPLA micelles as novel carriers for hypericin, a fluorescent marker for use in cancer diagnostics. *Photochem. Photobiol.*, 2011b, **87**(2), 399-407.

Mondon K., Zeisser-Labouèbe M., Gurny R., Möller M., Novel cyclosporin A formulations using MPEG-hexyl-substituted polylactide micelles: a suitability study, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2011a, **77**(1), 56-65.

Mundargi R. C., Babu V. R., Rangaswamy V., Patel P., Aminabhavi T. M., Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives, *J. Control. Release*, 2008, **125**(3), 193-209.

Müller J., Feifel S. C., Schmiederer T., Zocher R., Süßmuth R. D., In vitro Synthesis of New Cyclodepsipeptides of the PF1022-Type: Probing the α -D-Hydroxy Acid Tolerance of PH1022 Synthetase, *Chembiochem*, 2009, **10**(2), 323-328.

Nelemans L. C., Gurevich L., Drug Delivery with Polymeric Nanocarriers-Cellular Uptake Mechanisms, *Materials (Basel)*, 2020, **13**(2), 366.

Nguyen H. T., Tran T. H., Kim J. O., Yong C. S., Nguyen C. N., Enhancing the in vitro anti-cancer efficacy of artesunate by loading into poly-D,L-lactide-co-glycolide (PLGA) nanoparticles, *Arch. Pharm. Res.*, 2015, **38**(5), 716-724.

Niu L., Panyam J., Freeze concentration-induced PLGA and polystyrene nanoparticle aggregation: Imaging and rational design of lyoprotection, *J. Control. Release*, 2017, **248**, 125-132.

Ohshima H., Miyagishima A., Kurita T., Makino Y., Iwao Y., Sonobe T., Itai S., Freeze-dried nifedipine-lipid nanoparticles with long-term nano-dispersion stability after reconstitution, *Int. J. Pharm.*, 2009, **377**(1-2), 180-184.

Ojima I., Geng X., Wu X., Qu C., Borella. C. P., Xie H., Wilhelm S. D., Leece B. A., Bartle L. M., Goldmacher V. S., Chari R. V., Tumor-specific novel taxoid-monoclonal antibody conjugates, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**(26), 5620-3.

Park J., Fong P. M., Lu J., Russell K. S., Booth C. J., Saltzman W. M., Fahmy T. M., PEGylated PLGA nanoparticles for the improved delivery of doxorubicin, *Nanomedicine*, 2009, **5**(4), 410-418.

Pereverzeva E., Treschalin I., Treschalin M., Arantseva D., Ermolenko Y., Kumskova N., Maksimenko O., Balabanyan V., Kreuter J., Gelperina S., Toxicological study of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the treatment of glioblastoma, *Int. J. Pharm.*, 2019, **554**, 161-178.

Pérez-Herrero E., Fernández-Medarde A., Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2015, **93**, 52-79.

Picco, A. S., Ferreira, L. F., Liberato, M. S., Mondo, G. B., Cardoso, M. B., Freeze-drying of silica nanoparticles: redispersibility toward nanomedicine applications, *Nanomedicine*, 2018, **13**(2), 179-190.

Pieper S., Langer K., Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles - a systematic evaluation of preparation techniques and parameters, *Materials Today: Proceedings*, 2017, **4**(2), S188–S192.

Qiao W., Wang B., Wang Y., Yang L., Zhang Y., Shao P., Cancer Therapy Based on Nanomaterials and Nanocarrier Systems, *J. Nanomater.*, 2010, **2010**, 796303.

Quintanar-Guerrero D., Ganem-Quintanar A., Allémann E., Fessi H., Doelker E., Influence of the stabilizer coating layer on the purification and freeze-drying of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles prepared by an emulsion-diffusion technique, *J. Microencapsul.*, 1998, **15**(1), 107-119.

Saez A., Guzmán M., Molpeceres J., Aberturas M. R., Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2000, **50**(3), 379-387.

Schwarz C., Mehnert W., Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN), *Int. J. Pharm.*, 1997, **157**(2), 171-179.

Shaikh M. V., Kala M., Nivsarkar M., Formulation and optimization of doxorubicin loaded polymeric nanoparticles using Box-Behnken design: ex-vivo stability and in-vitro activity, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2017, **100**, 262-272.

Simmons T. L., Baker G. L., Poly(phenyllactide): Synthesis, Characterization, and Hydrolytic Degradation, *Biomacromolecules*, 2001, **2**(3), 658-663.

Soares S., Fonte P., Costa A., Andrade J., Seabra V., Ferreira D., Reis S., Sarmiento B., Effect of freeze-drying, cryoprotectants and storage conditions on the stability of secondary structure of insulin-loaded solid lipid nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, 2013, **456**(2), 370-381.

Srivastava A., Yadav T., Sharma S., Nayak A., Akanksha Kumari A., Mishra N., Polymers in Drug Delivery, *Journal of Biosciences and Medicines*, 2016, **4**(1), 69-84.

Subedi R. K., Kang K. W., Choi H. K., Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with doxorubicin, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2009, **37**(3-4), 508-513.

Sutradhar K. Md., Amin M. L., Nanotechnology in Cancer Drug Delivery and Selective Targeting, *Hindawi Publishing Corporation*, 2014, **2014**, 939378.

Tansik G., Yakar A., Gündüz U., Tailoring magnetic PLGA nanoparticles suitable for doxorubicin delivery, *J. Nanopart. Res.*, 2014, **16**(1), 2171.

Termsarasab U., Yoon I. S., Park J. H., Moon H. T., Cho H. J., Kim D. D., Polyethylene glycol-modified arachidyl chitosan-based nanoparticles for prolonged blood circulation of doxorubicin, *Int. J. Pharm.*, 2014, **464**(1-2), 127-134.

Tewes F., Munnier E., Antoon B., Ngaboni Okassa L., Cohen-Jonathan S., Marchais H., Douziech-Eyrolles L., Soucé M., Dubois P., Chourpa I., Comparative study of doxorubicin-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by single and double emulsion methods, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2007, **66**(3), 488-492.

Trimaille T., Gurny R., Möller M., Synthesis and Properties of Novel Poly(Hexyl-Substituted Lactides) for Pharmaceutical Applications, *Chimia*, 2005, **59**(6), 348-352.

Trimaille T., Gurny R., Möller M., Poly(hexyl-substituted lactides): novel injectable hydrophobic drug delivery systems, *J. Biomed. Mater Res. A*, 2007, **80**(1), 55-65.

Trimaille T., Mondon K., Gurny R., Möller M., Novel polymeric micelles for hydrophobic drug delivery based on biodegradable poly(hexyl-substituted lactides), *Int. J Pharm.*, 2006, **319**(1-2), 147-154.

Trimaille T., Möller M., Gurny R., Synthesis and Ring-Opening Polymerization of New Monoalkyl-Substituted Lactides, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.*, 2004, **42**(17), 4379-4391.

Trubitsyn G., Nguyen V. N., Di Tommaso C., Borchard G., Gurny R., Möller M., Impact of covalently Nile Red and covalently Rhodamine labeled fluorescent polymer micelles for the improved imaging of the respective drug delivery system, *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 2019, **142**, 480-487.

Varshosaz J., Eskandari S., Tabbakhian M., Freeze-drying of nanostructure lipid carriers by different carbohydrate polymers used as cryoprotectants, *Carbohydrate Polymers*, 2012, **88**(4), 1157-1163.

Vauthier C., Bouchemal K., Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles, *Pharm. Res.*, 2009, **26**(5), 1025-1058.

Wang C., Wang YC., Wang YJ., Fan M., Luo F., Qian ZQ., Characterization, pharmacokinetics and disposition of novel nanoscale preparations of paclitaxel, *Int. J. Pharm.*, 2011, **414**(1-2), 251-259.

Wang H., Song H.-r., Chen X.-s., Deng Y.-j., Release of Ibuprofen from PEG-PLLA Electrospun Fibers Containing Poly(ethylene glycol)-b-Poly(α -hydroxy octanoic acid) as an Additive, *CHINESE J. POLYM. SCI.*, 2010, **28**(3), 417-425.

Wang L., Ma Y., Gu Y., Liu Y., Zhao J., Yan B., Wang Y., Cryoprotectant choice and analyses of freeze-drying drug suspension of nanoparticles with functional stabilisers, *J. Microencapsul.*, 2018, **35**(3), 241-248.

Wang W., Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals, *Int J Pharm.*, 2000, **203**(1-2), 1-60.

Wang X., Yang L., Chen Z. G., Shin D. M., Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging, *CA Cancer J. Clin.*, 2008, **58**(2), 97-110.

Win K. Y., Teng C. P., Ye E., Low M., Han M. Y., Evaluation of polymeric nanoparticle formulations by effective imaging and quantitation of cellular uptake for controlled delivery of doxorubicin, *Small*, 2015, **11**(9-10), 1197-1204.

Yadav K. S., Sawant K. K., Modified nanoprecipitation method for preparation of cytarabine-loaded PLGA nanoparticles, *AAPS PharmSciTech.*, 2010, **11**(3), 1456-1465.

Yang Z., Zhang X., Luo X., Jiang Q., Liu J., Jiang Z., Enzymatic Synthesis of Poly(butylene-co-sebacate-co-glycolate) Copolyesters and Evaluation of the Copolymer Nanoparticles as Biodegradable Carriers for Doxorubicin Delivery, *Macromolecules*, 2013, **46**(5), 1743-1753.

Yin M., Baker G. L., Preparation and Characterization of Substituted Polylactides, *Macromolecules*, 1999, **32**(23), 7711-7718.

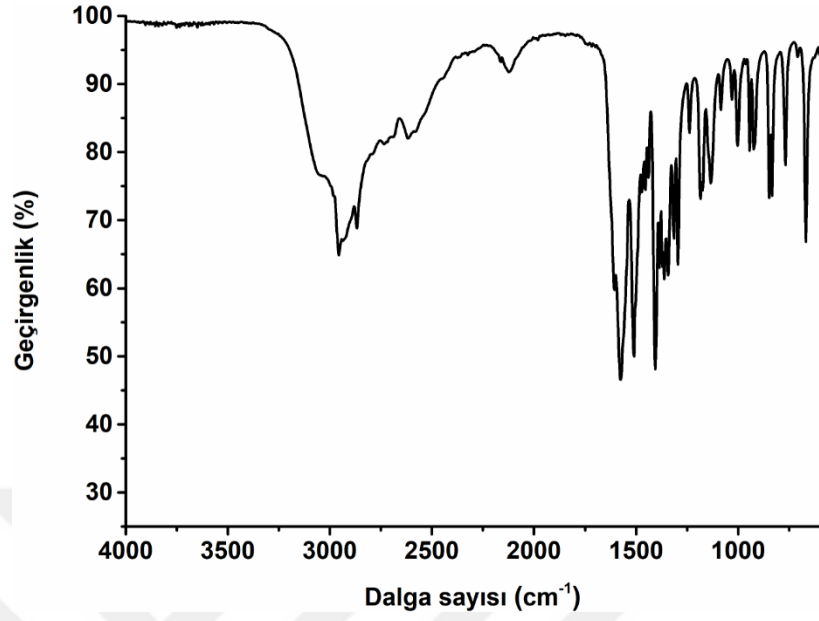
Yin M., Simmons T. L., Baker G. L., Chapter 12, Bozell J. J., *Chemicals and Materials from Renewable Resources (ACS Symposium Series)*, 1st ed., American Chemical Society, 147-159, 2001.

Zhang X., Sun M., Zheng A., Cao D., Bi Y., Sun J., Preparation and characterization of insulin-loaded bioadhesive PLGA nanoparticles for oral administration, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2012, **45**(5), 632-638.

Zhou Q., Zhang L., Wu H., Nanomaterials for cancer therapies, *Nanotechnol. Rev.*, 2017, **6**(5), 473-496.

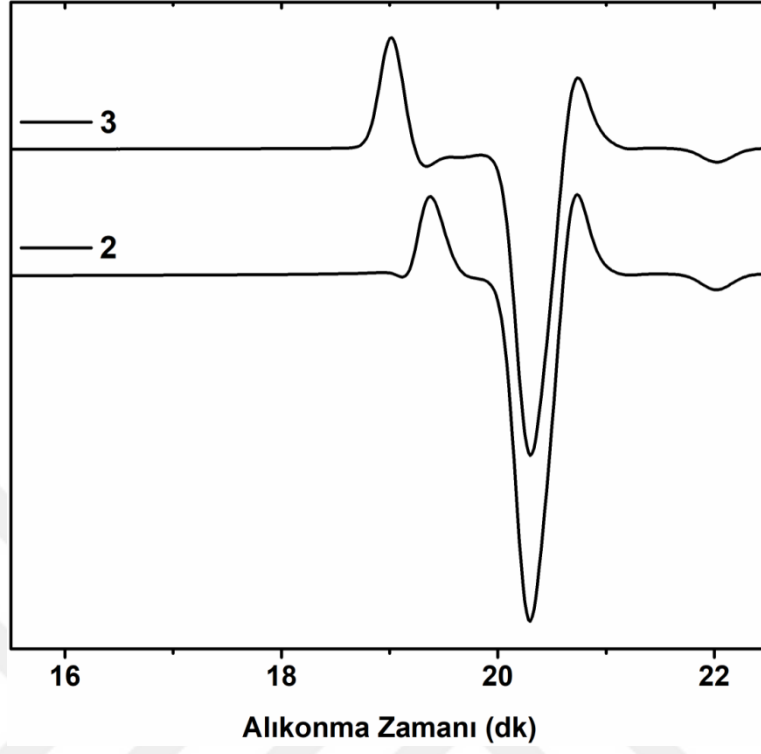


EK-A ATR-FTIR Spektrumları



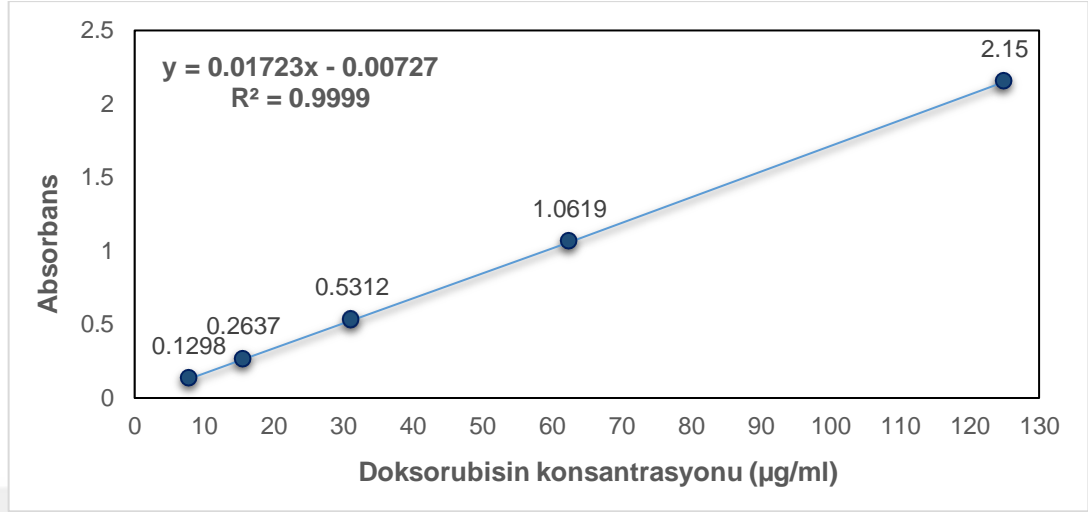
Şekil A.1. L-lösin (1) ATR-FTIR spektrumu

EK-B GPC Kromatogramları

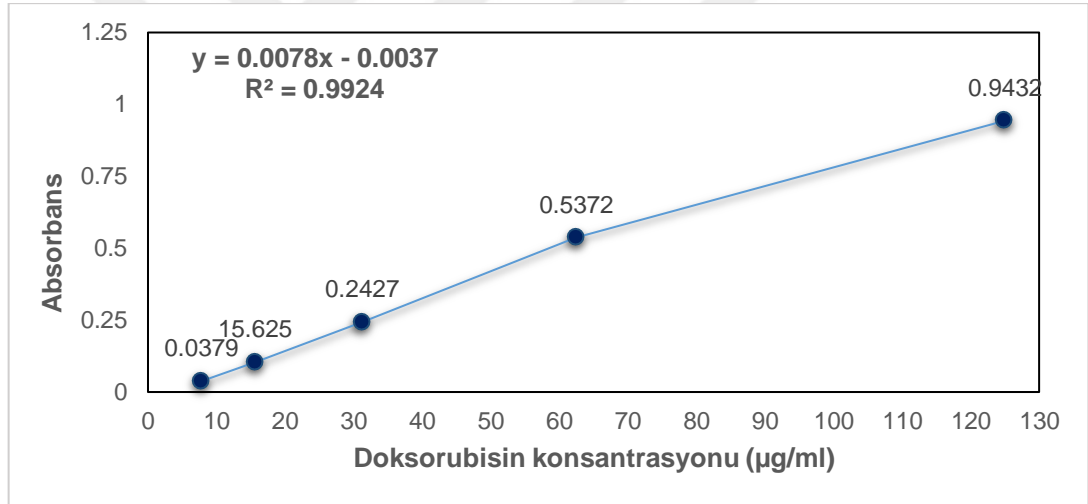


Şekil B.1. 2 ve 3 bileşiklerinin GPC kromatogramı

EK-C DOX'un Kalibrasyon Grafikleri

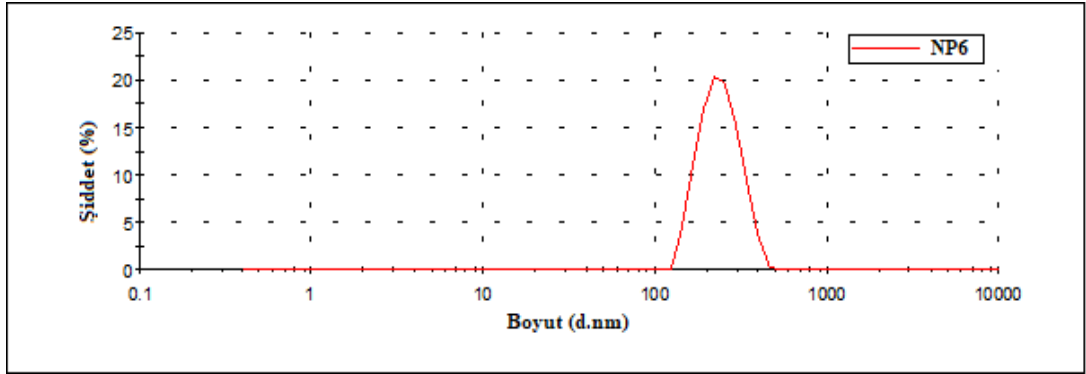


Şekil C.1. 480 nm'de DOX'un DMSO içindeki kalibrasyon eğrisi

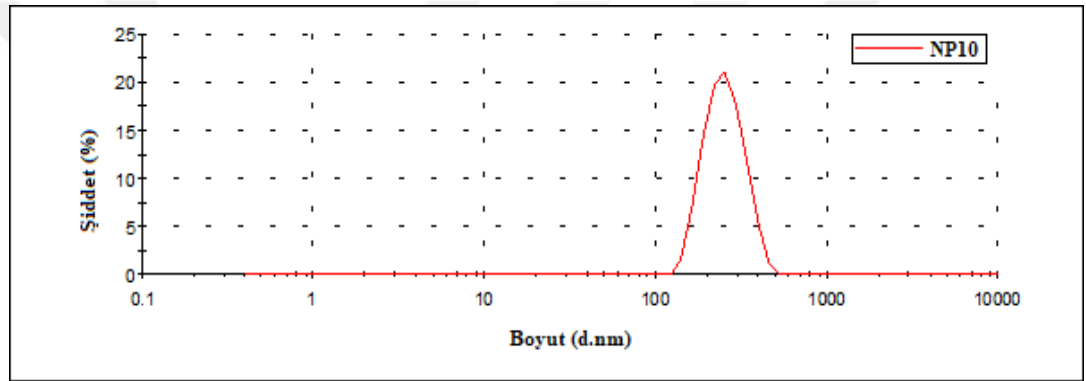


Şekil C.2. 480 nm'de DOX'un DCM içindeki kalibrasyon eğrisi

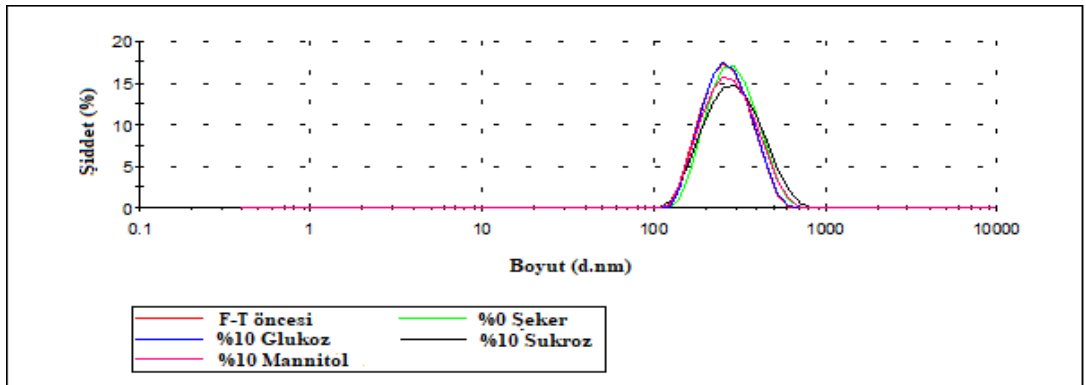
EK-D Partikül boyutu-Şiddet Grafikleri (DLS)



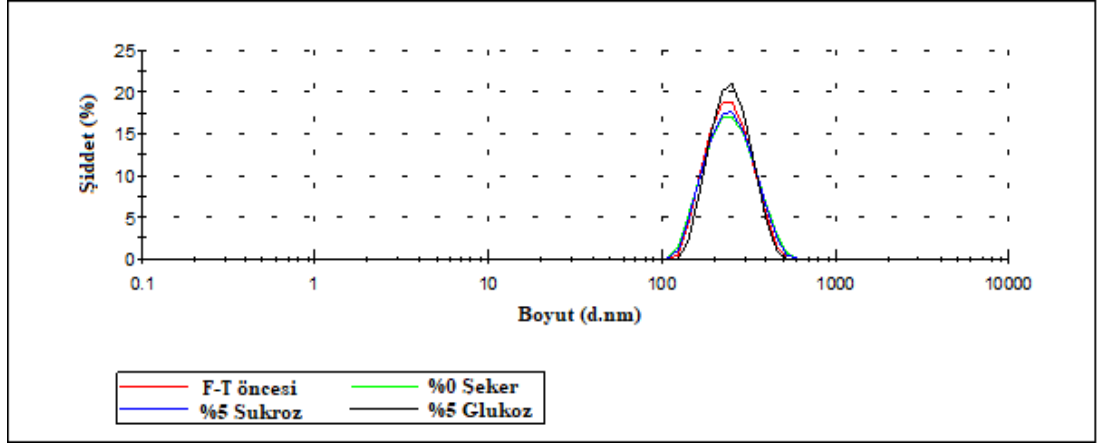
Şekil D.1. Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), DOX-PLGA-NP'leri için optimum formülasyon (NP6)



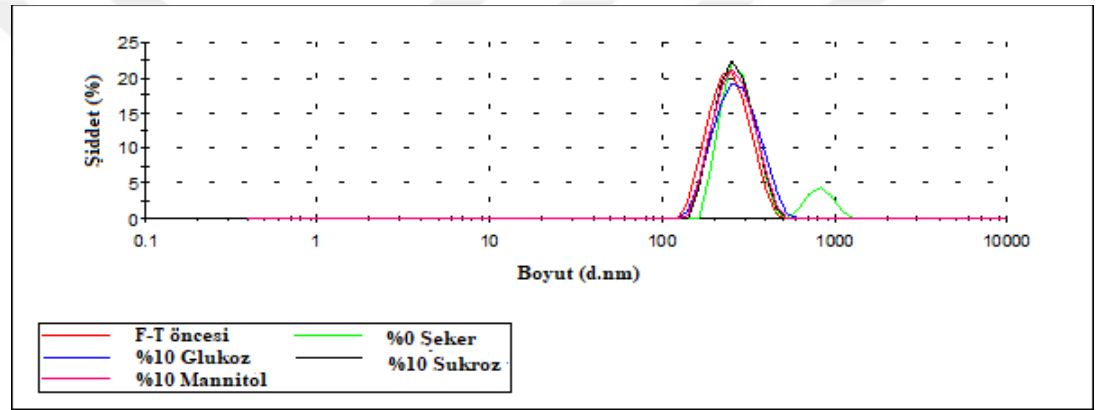
Şekil D.2. Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), DOX-PDIBG-NP'leri için optimum formülasyon (NP10)



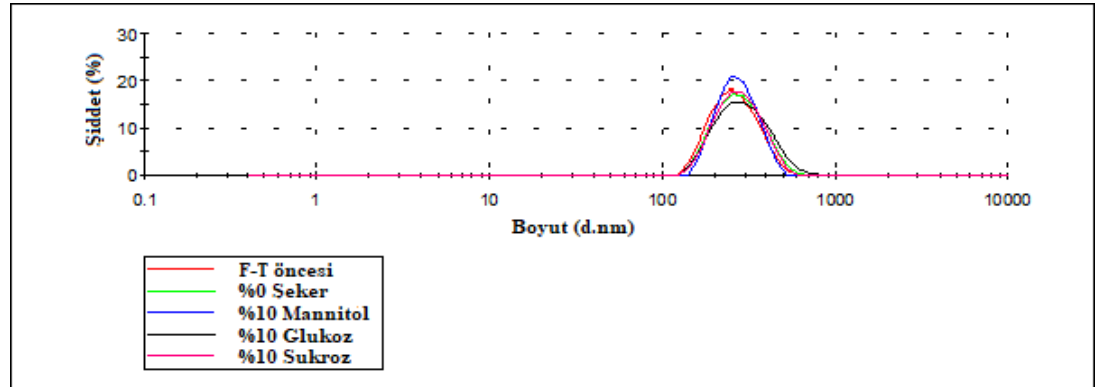
Şekil D.3. Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), DOX-PLGA-NP'lerinin -20 °C'de dondurma çözme testleri (F-T) öncesi ve sonrası



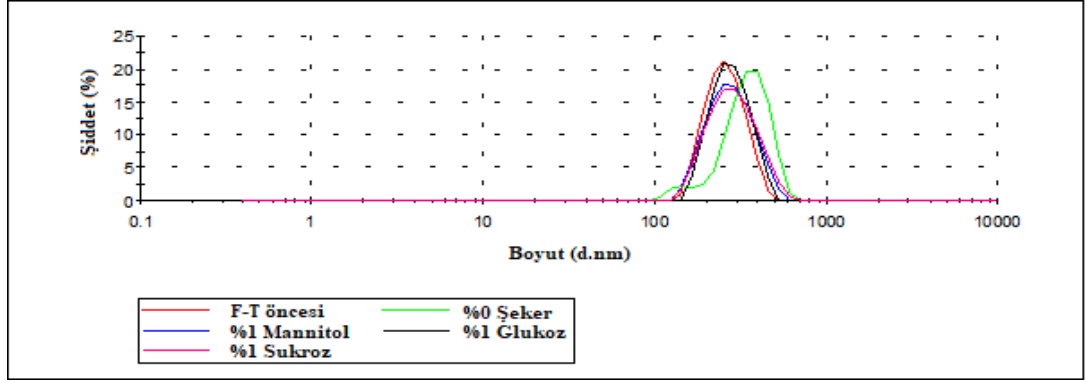
Şekil D.4. Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), DOX-PLGA-NP'lerinin -50 °C'de dondurma çözme testleri (F-T) öncesi ve sonrası



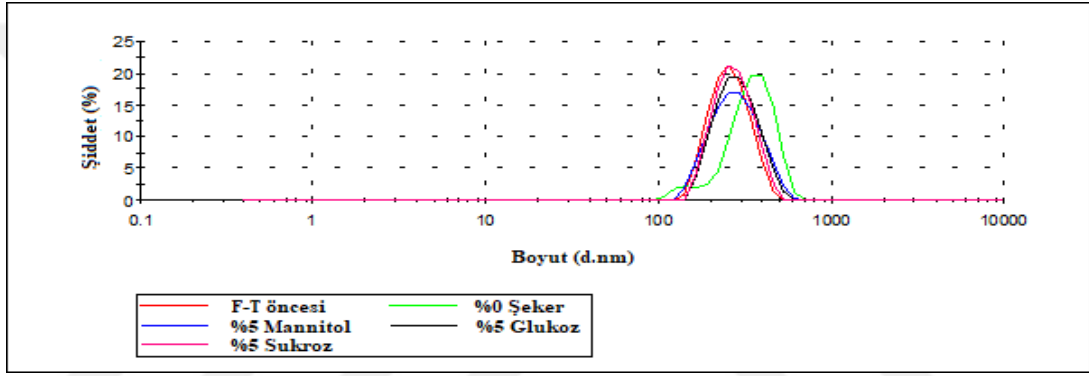
Şekil D.5. Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), DOX-PDIBG-NP'lerinin -20 °C'de dondurma çözme testleri (F-T) öncesi ve sonrası



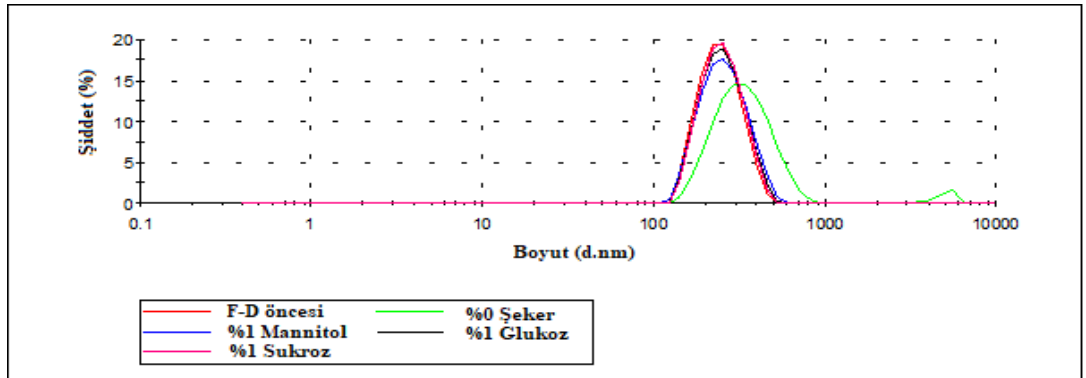
Şekil D.6. Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), DOX-PDIBG-NP'lerinin -50 °C'de dondurma çözme testleri (F-T) öncesi ve sonrası



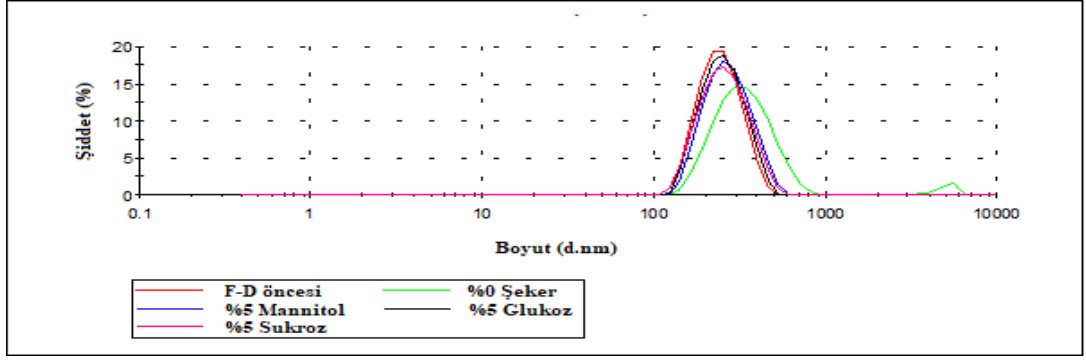
Şekil D.7. Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), Şeker içeren ve içermeyen DOX-PDIBG-NP'lerinin;-20 °C'de dondurma-çözme testleri (F-T) öncesi ve sonrası (%1 kriyoprotektan içeren)



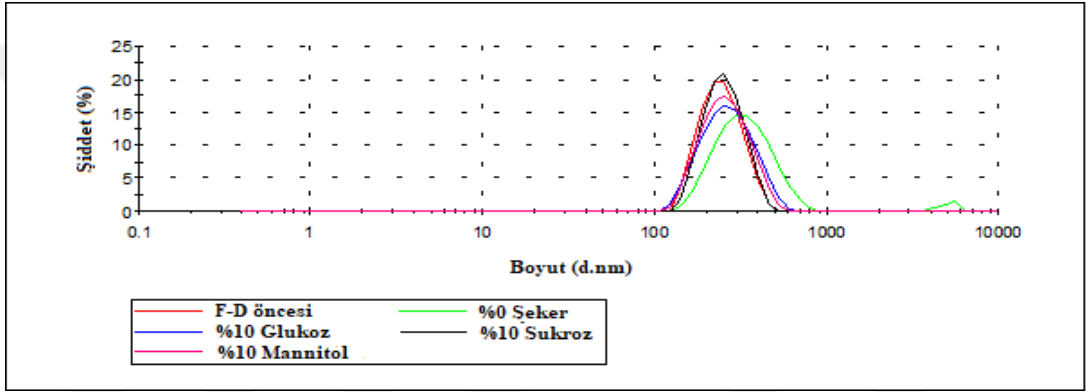
Şekil D.8. Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), Şeker içeren ve içermeyen DOX-PDIBG-NP'lerinin;-20 °C'de dondurma-çözme testleri (F-T) öncesi ve sonrası (%5 kriyoprotektan içeren)



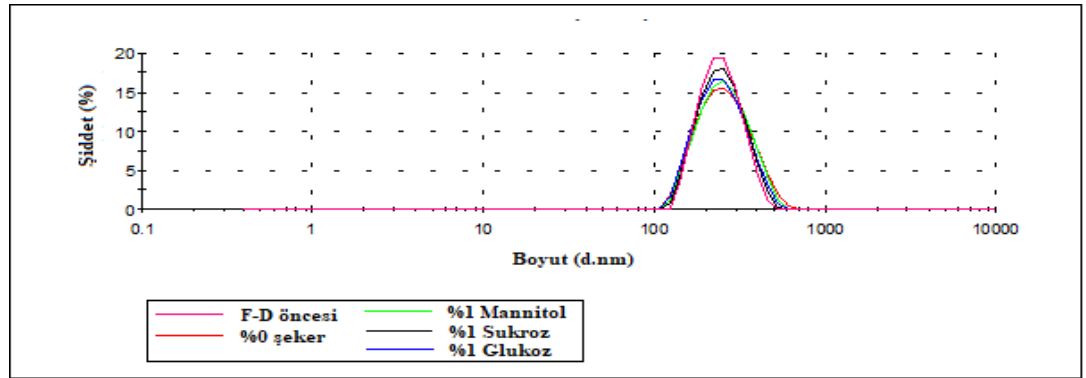
Şekil D.9. Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), Şeker içeren ve içermeyen DOX-PLGA-NP'lerinin;-20 °C'de dondurma-kurutma testleri (F-D) öncesi ve sonrası (%1 kriyoprotektan içeren)



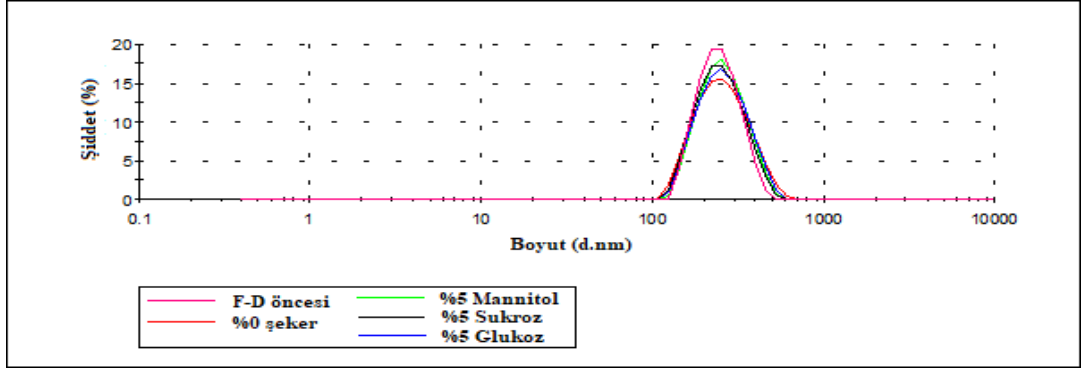
Şekil D.10. Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), Şeker içeren ve içermeyen DOX-PLGA-NP'lerinin;-20 °C'de dondurma-kurutma testleri (F-D) öncesi ve sonrası (%5 kriyoprotektan içeren)



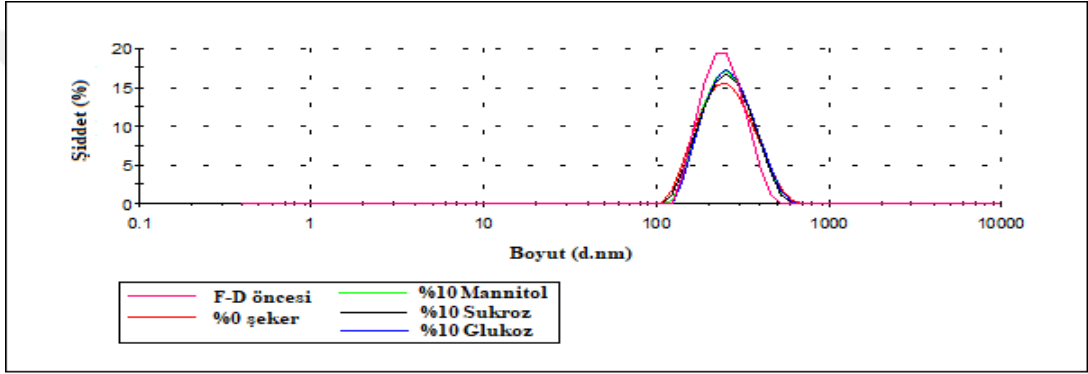
Şekil D.11. Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), Şeker içeren ve içermeyen DOX-PLGA-NP'lerinin;-20 °C'de dondurma-kurutma testleri (F-D) öncesi ve sonrası (%10 kriyoprotektan içeren)



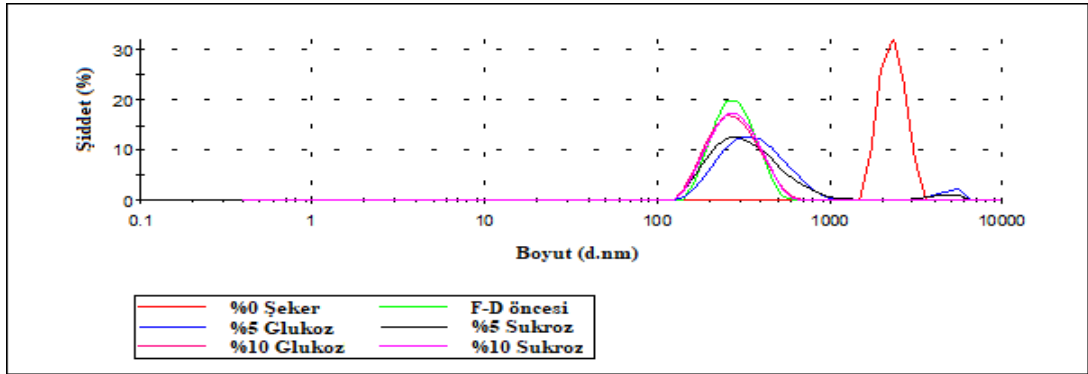
Şekil D.12. Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), Şeker içeren ve içermeyen DOX-PLGA-NP'lerinin;-50 °C'de dondurma-kurutma testleri (F-D) öncesi ve sonrası (%1 kriyoprotektan içeren)



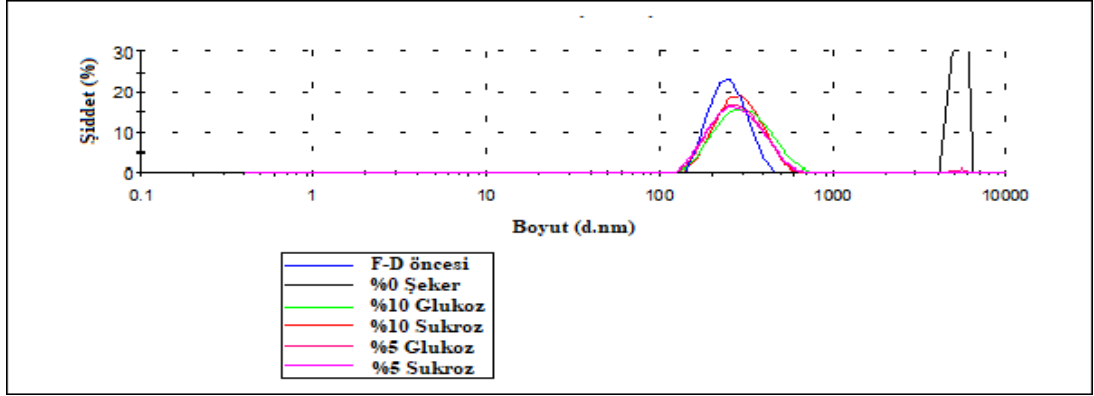
Şekil D.13. Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), Şeker içeren ve içermeyen DOX-PLGA-NP'lerinin;-50 °C'de dondurma-kurutma testleri (F-D) öncesi ve sonrası (%5 kriyoprotektan içeren)



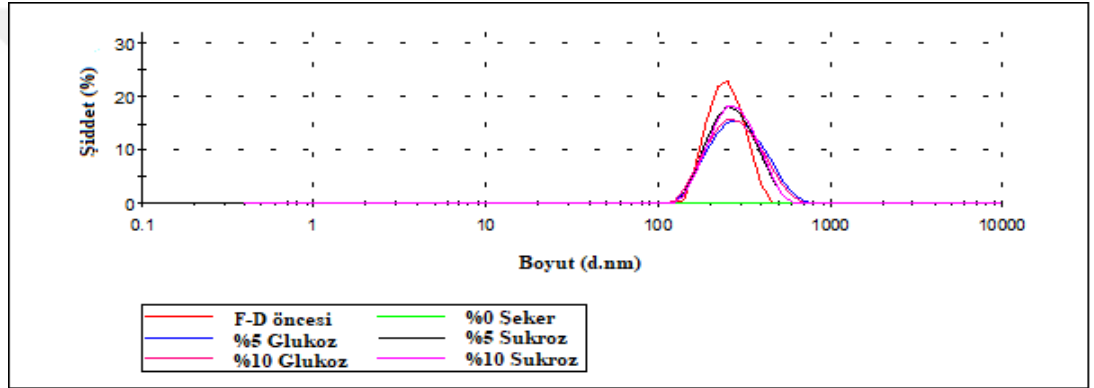
Şekil D.14. Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), Şeker içeren ve içermeyen DOX-PLGA-NP'lerinin;-50 °C'de dondurma-kurutma testleri (F-D) öncesi ve sonrası (%10 kriyoprotektan içeren)



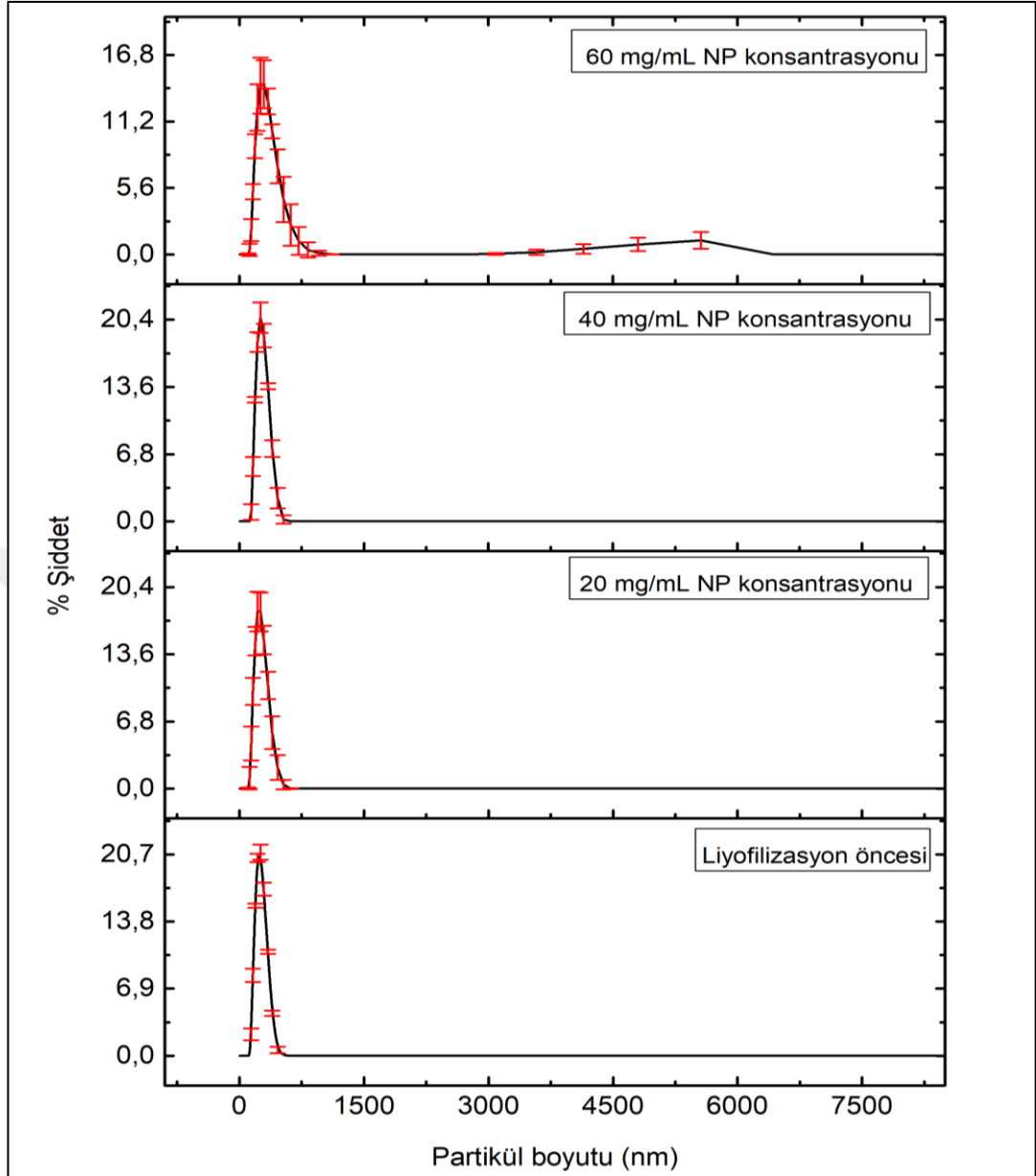
Şekil D.15. Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), 50 mg/mL konsantrasyonlu DOX-PDIBG-NP'lerinin -20 °C'de dondurma- kurutma (F-D) öncesi ve sonrası (%5 ve %10 glukoz ve sukroz içeren)



Şekil D.16. Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), 50 mg/mL konsantrasyonlu DOX-PDIBG-NP'lerinin -50 °C'de dondurma- kurutma (F-D) öncesi ve sonrası (%5 ve %10 glukoz ve sukroz içeren)



Şekil D.17. Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), 75 mg/mL konsantrasyonlu DOX-PDIBG-NP'lerinin -50 °C'de dondurma- kurutma (F-D) öncesi ve sonrası (%5 ve %10 glukoz ve sukroz içeren)



Şekil D.18. Partikül boyutu-şiddet grafiği (DLS), %10 sukroz içeren farklı konsantrasyona sahip DOX-PDIBG-NP'lerin -50 °C'de dondurularak liyofilize edilmesinden sonra 1 ay -20 °C'de saklanması

KİŞİSEL YAYINLAR VE ESERLER

Koldankaya T., Arıcan M. O, Mert O., Mert S., Investigation of Stability of PLGA/Doxorubicin Nanoparticles, *Imascon International Marmara Sience Congress*, Kocaeli, Turkey, 21-22 May 2021.

Koldankaya T., Arıcan M. O, Çoban H., Erdoğan S., Mert O., Mert S., Thermosensitive Poly(Menthide)-PEG Hydrogel Systems for Local Treatment, *Imascon International Marmara Sience Congress*, Kocaeli, Turkey, 21-22 May 2021.



ÖZGEÇMİŞ

İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2014 yılında girdiği Kastamonu Üniversitesi Mimarlık ve Mühendislik Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nden 2018 yılında Biyomühendis olarak mezun oldu. 2019 yılında, Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Polimer Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı.

