



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**Folik Asit ile Modifiye Polimerik Blendlerin Sentezi,
Karakterizasyonu, *In-vitro* ve *In-vivo* Aktivitesinin
Belirlenmesi**

Doktora Tezi

Ayça MEHMETOĞLU AL

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

İzmir

2024

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**Folik Asit ile Modifiye Polimerik Blendlerin Sentezi,
Karakterizasyonu, *In-vitro* ve *In-vivo* Aktivitesinin
Belirlenmesi**

Ayça MEHMETOĞLU AL

Danışman(lar) :
Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM
Doç. Dr. İskender İNCE

Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Derecesi ile Doktora Programı

İzmir
2024

Ayça MEHMETOĞLU AL tarafından doktora tezi olarak sunulan “**Folik Asit ile Modifiye Polimerik Blendlerin Sentezi, Karakterizasyonu, *In-vitro* ve *In-vivo* Aktivitesinin Belirlenmesi**” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilecek savunmaya değer bulunmuş ve 11.09.2024 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM

Raportör Üye : Prof. Dr. Fazilet Zümrüt BİBER MÜFTÜLER

Üye : Prof. Dr. Kamil ŞİRİN

Üye : Prof. Dr. Sibel GÖKSEL

Üye : Doç. Dr. Ü. Hakan YILDIZ

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “Folik Asit ile Modifiye Polimerik Blendlerin Sentezi, Karakterizasyonu, *In-vitro* ve *In-vivo* Aktivitesinin Belirlenmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilemeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunlara kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksini ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

11/09/2024

İmza

Ayça MEHMETOĞLU AL

ÖZET**Folik Asit ile Modifiye Polimerik Blendlerin Sentezi, Karakterizasyonu,
In-vitro ve *In-vivo* Aktivitesinin Belirlenmesi**

MEHMETOĞLU AL, Ayça

Doktora Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM

İkinci Tez Danışmanı: Doç. Dr. İskender İNCE

Eylül 2024, 206 SAYFA

Meme kanseri tedavisinde cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hedefe yönelik tedavi ve hormonal tedavi çeşitleri tek başına ya da kombine halinde kullanılmaktadır. Bu ilaçların kullanılmasının birden çok yan etkisinin yanı sıra sağlıklı hücrelere toksik etki sağladığı bilinmektedir. Yan etkilerinin ortadan kaldırılması, ilacın etkinlik süresinin uzatılması ve kontrollü salımı gibi olumlu yönlerin oluşabilmesi için hedefe yönelik ilaç taşıyıcı sistemler kanser tedavisinde büyük bir potansiyele sahiptir. İksabepilon, metastatik meme kanserinin tedavisi için yeni onaylanmış bir kemoterapötik ajandır ve mikrotübüllerin stabilizasyonu yoluyla etki mekanizmasını göstermektedir. Bu amaçla tez çalışmamızda, İksabepilon etkin maddesi yüklü folik asit ile modifiye edilmiş kitosan, aljinat ve kitosan/aljinat blend nanopartikülleri hazırlanmış ve bu bileşiklerin meme kanseri üzerindeki etkinlikleri *in-vitro/in-vivo* yöntemlerle belirlenmiştir. Ayrıca hazırlanan nanopartikül sistemleri teknesyum-99m (^{99m}Tc) radyonüklidi ile işaretlenip, bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hatı üzerinde etkinliği değerlendirilmiştir.

Elde edilen tüm deneysel sonuçlar incelendiğinde; hazırlanan nanopartiküllerin ve radyonüklid işaretli formülasyonlarının literatürdeki meme kanserine yönelik yapılan prelinik ve klinik çalışmalara yeni bir bakış açısı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler; İksabepilon (IXA), Folik Asit (FA), Kitosan (CS), Aljinat (CS), Blend Nanopartikül Sistem

ABSTRACT**Synthesis, Characterization, Determination of *In-vitro* and *In-vivo*
Activity of Modified Polymeric Blends with Folic Acid**

MEHMETOĞLU AL, Ayça

PhD in Biotechnology

Supervisor-1: Assoc. Prof. Dr. Yeliz YILDIRIM

Supervisor-2: Assoc. Prof. Dr. İskender İNCE

September 2024, 206 pages

In the treatment of breast cancer, surgery, radiotherapy, chemotherapy, targeted therapy and hormonal therapy are used alone or in combination. The use of these drugs is known to have multiple side effects as well as toxic effects on healthy cells. Targeted drug delivery systems have great potential in cancer treatment to eliminate side effects, prolong drug efficacy and controlled release. Ixabepilone is a newly approved chemotherapeutic agent for the treatment of metastatic breast cancer and demonstrates its mechanism of action through stabilization of microtubules. For this purpose, in our thesis study, chitosan, alginate and chitosan/alginate blend nanoparticles modified with folic acid loaded with Ixabepilone active substance were prepared and the activities of these compounds on breast cancer were determined by in-vitro/in-vivo methods. In addition, the prepared nanoparticle systems were labeled with technetium-99m (^{99m}Tc) radionuclide and the activity of the compounds on the MDA-MB-231 cell line was evaluated.

When all the experimental results obtained are examined; it is thought that the prepared nanoparticles and radionuclide-labeled formulations will provide a new perspective to preclinical and clinical studies on breast cancer in the literature.

Keywords; Ixabepilone (IXA), Folic Acid (FA), Chitosan (CS), Alginate (ALG), Blend Nanoparticle System

ÖNSÖZ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türü olmakla birlikte, dünya çapında kadınlarda kansere bağlı ölümlerin, önde gelen nedenidir. Uluslararası Kanser Ajansının 2023 verilerine göre 2,3 milyon yeni vaka kayda geçmiştir. Meme kanseri tedavisinde kemoterapiye direnç gelişmesi hastalığın tedavisinde büyük bir engel teşkil etmektedir. Bu bağlamda, tümör direnci mekanizmalarının üstesinden gelebilen yeni antineoplastik ajan sınıfında epotilonlar ve bunların analoglarından olan İksabepilon (IXA) kemoterapötik ilaç tez çalışmasında seçilmiştir. Tümör direnci mekanizmalarının üstesinden gelebilen yeni antimikrotübül ajan sınıfındadır. İlaç taşıyıcı sistemlerde biyoyararlanımı artırması ve biyobozunur özelliklerinden dolayı genellikle kitosan ve aljinat polimerleri tercih edilmektedir. Reseptör hedefli ilaç taşıyıcı sistemlerin başta kanser hastalığı olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Meme kanseri hücrelerinde folat reseptörü daha fazla ekprese edilmesi nedeniyle hazırladığımız ilaç taşıma sistemi polimerlerinin folik asit ile modifiye edilmesine, İksabepilon yüklü nanopartiküllerinin ve blend nanopartiküllerinin hazırlanmasına karar verilmiştir.

Bu tez çalışmasında, modifiye nanopartikül ve blend nanopartiküllerinin hazırlanması ve karakterizasyonu, radyoişaretleme çalışmaları, *in-vitro* hücre kültürü ve *in-vivo* çalışmaları kapsamaktadır. Doktora öğrenimim boyunca öğrendiğim bilgiler ve deneyimlerimle gerçekleştirdiğim tez çalışmam ile bu alanda yapılacak çalışmalara faydalı olması dileklerimle.

İzmir, 11.09.2024

Ayça MEHMETOĞLU AL

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İÇ KAPAK	II
KABUL VE ONAY SAYFASI.....	III
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	V
ÖZET	VII
ABSTRACT	IX
ÖNSÖZ.....	XI
İÇİNDEKİLER.....	XIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XVII
TABLolar DİZİNİ.....	XXI
SİMGELER VE KISALTMALAR	XXV
1 GİRİŞ.....	1
2 GENEL BİLGİLER	11
2.1 Kanser.....	11
2.1.1 Meme kanseri.....	11
2.1.2 Meme Kanser Tedavi Yöntemleri	13
2.2 Nanoteknoloji ve İlaç Taşıyıcı Sistemler	15
2.2.1 Kanser Tedavisinde Nanopartiküller	19
2.2.2 Nanopartiküllerin Hedeflendirilmesi	20
2.2.2.1 Aktif Hedeflendirme	20
2.2.2.2 Pasif Hedeflendirme	20
2.2.3 Nanopartikül Hazırlamada Kullanılan Polimerler	21
2.2.3.1 Kitosan.....	23
2.2.3.2 Aljinat	24
2.2.4 Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri	25
2.3 İksabepilon (IXA).....	27

2.3.1	Fizikokimyasal ve Farmakokinetik Özellikleri.....	28
2.3.2	Etki Mekanizması	29
2.3.3	Yan Etkileri	30
2.4	Folik Asit	30
2.5	Radyofarmasötikler	32
2.5.1	Teknesyum-99m.....	33
2.6	Hücre Kültürü Çalışmaları.....	34
2.6.1	MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücreleri.....	36
2.7	Deneyisel Hayvan Modelleri	36
2.8	Optik Görüntüleme Yöntemi	37
2.8.1	<i>In-vivo</i> Floresans Görüntüleme	38
3	GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1	Kullanılan Kimyasal Madde, Araç ve Gereçler.....	39
3.2	Yöntem.....	42
3.2.1	Etkin Madde (İksabepilon) Analitik Yöntem Validasyonu	42
3.2.2	Folik Asit Analitik Yöntem Validasyonu	48
3.2.3	Folik Asit-Kitosan (FA-CS) Molekülünün Sentezlenmesi	54
3.2.4	Folik Asit- Aljinat (FA-ALG) Molekülünün Sentezlenmesi	57
3.2.5	Folik Asit-Kitosan-Folik Asit-Aljinat Blend (FAC-FAALG NP) Nanopartikülünün Hazırlanması	60
3.2.6	<i>In-vitro</i> Karakterizasyon Çalışmaları.....	62
3.2.7	Stabilite Çalışmaları.....	67
3.2.8	<i>In-vitro</i> Sitotoksikite Çalışmaları	67
3.2.9	Radyoizotop Etiketleme Çalışmaları	70
3.2.10	Optik Görüntüleme Yöntemi ile <i>In-vivo</i> Çalışmalar.....	73
3.2.11	İstatistik Değerlendirme.....	76
4	BULGULAR VE TARTIŞMA	77
4.1	Etkin Madde Analitik Yöntem Validasyonuna Ait Bulgular.....	77
4.1.1	Seçicilik Parametresine Ait Bulgular	77
4.1.2	Doğrusallık Parametresine Ait Bulgular	79
4.1.3	Çalışma Aralığı Parametresine Ait Bulgular	82

4.1.4	Gözlenebilirlik (LOD) ve Ölçme Sınırı (LOQ)	83
4.1.5	Doğruluk Parametresine Ait Bulgular	83
4.1.6	Kesinlik parametresine ait bulgular	85
4.1.7	Dayanıklılık Parametresine Ait Bulgular.....	92
4.1.8	Çözelti Stabilitesi Parametresine Ait Bulgular	93
4.2	Folik Asit Analitik Yöntem Validasyonuna Ait Bulgular	95
4.2.1	Seçicilik Parametresine Ait Bulgular.....	95
4.2.2	Doğrusallık Parametresine Ait Bulgular.....	95
4.2.3	Çalışma Aralığı Parametresine Ait Bulgular	96
4.2.4	Gözlenebilirlik (LOD) ve Ölçme Sınırı (LOQ)	97
4.2.5	Doğruluk Parametresine Ait Bulgular	97
4.2.6	Kesinlik Parametresine Ait Bulgular	98
4.2.7	Dayanıklılık Parametresine Ait Bulgular.....	101
4.2.8	Çözelti Stabilitesi Parametresine Ait Bulgular	101
4.3	<i>In-vitro</i> Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	102
4.3.1	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi Bulguları	103
4.3.2	Proton Nükleer Manyetik Rezonans (¹ H-NMR) Analiz Bulguları ..	109
4.3.3	X-Işını Difraksiyon Spektroskopisi (XRD) Analiz Bulguları	110
4.3.4	Termogravimetrik Analiz (TGA) Bulguları	112
4.3.5	Partikül Boyutu, Polidispersite İndeksi ve Zeta Potansiyel Değerlerine ait Bulgular	116
4.3.6	Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizine ait Bulgular	118
4.3.7	Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) Analizine ait Bulgular	119
4.3.8	Sentezlenen Folik Asit ile Modifiye Edilen Polimere % Bağlanma Verimi, Hazırlanan Nanopartiküllerde Enkapsülasyon Etkinliği, Yükleme Kapasitesine ve Nanopartikül Verimine Ait Bulgular.....	120
4.3.9	<i>In-Vitro</i> Salım Çalışmalarına Ait Bulgular.....	121
4.4	Stabilite Çalışmalarına Ait Sonuçlar	126
4.5	<i>In-vitro</i> Sitotoksikite Çalışmalarına ait Bulgular	129
4.6	Radyoişaretleme Çalışmalarına ait Bulgular	133
4.6.1	TLRC Analizine ait Bulgular.....	133
4.6.2	Stabilite Çalışmalarına ait Bulgular.....	134
4.6.3	Lipofilite Çalışmasına ait Bulgular.....	135

4.6.4	İnkorporasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	136
4.7	<i>In-vivo</i> Çalışmalara Ait Bulgular	137
4.7.1	Kanserli Hayvan Modellerinin Oluşturulmasına Ait Bulgular	137
4.7.2	IRDye®-800 rs Boya Maddesi ile İşaretli CS-ALG Blend NP ve FACS-FAALG Blend NP'lerin Hazırlanması	138
4.7.3	Biyodağılım Çalışmasına Ait Bulgular	140
4.7.4	Etkinlik Çalışmasına Ait Bulgular	144
4.7.5	Patolojik Değerlendirmeye Ait Bulgular	148
5	SONUÇ VE ÖNERİLER	152
	KAYNAKLAR DİZİNİ	155
	EKLER	173
	TEZ İLE İLGİLİ YAPILAN BİLDİRİ VE PROJE	175
	TEŞEKKÜR	176
	ÖZGEÇMİŞ	178

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Kitosanın molekül yapısı (López-García et al., 2014).....	23
2.2 İksabepilon'un kimyasal yapısı (National Library of Medicine, 2024)	29
2.3 Folik asit'in kimyasal yapısı (National Library of Medicine, 2024)	31
2.4 Folik asit ve folat reseptörü (FR) hedefli formülasyonların internalizasyonu (Martín-Sabroso et al, 2021).....	31
4.1 IXA etkin maddesinin seçicilik parametresine ait HPLC kromatogramları	78
4.2 IXA etkin maddesinin etanol çözücüsündeki kalibrasyon grafiği.....	79
4.3 IXA etkin maddesinin pH 5,5 tampon çözücüsündeki kalibrasyon eğri grafiği	79
4.4 IXA etkin maddesinin pH 6,5 tampon çözücüsündeki kalibrasyon eğri grafiği	80
4.5 IXA etkin maddesinin pH 7,4 tampon çözücüsündeki kalibrasyon eğri grafiği	80
4.6 Folik Asit maddesinin seçicilik parametresine ait HPLC kromatogramları	95
4.7 Folik Asit'in çözücü ortamındaki kalibrasyon grafiği.....	96
4.8 FA-CS Konjugasyonu.....	103
4.9 Folik asit, Kitosan ve FACS molekülüne ait FTIR spektrumları	104
4.10 Sodyum Aljinat polimerinden Aljinik asit eldesi	105
4.11 Aljinat ve Aljinik Asit'e ait FTIR spektrumları	105
4.12 FA-ALG Konjugasyonu	106
4.13 Folik Asit, Aljinat ve FAALG molekülüne ait FTIR spektrumları	106
4.14 IXA, FACS NP ve IXA yüklü FACS NP ait FTIR spektrumları	107
4.15 IXA, FAALG NP ve IXA yüklü FACS NP'lerine ait FTIR spektrumları ..	107
4.16 IXA, Blend NP ve IXA yüklü Blend NP ait FTIR spektrumları	108
4.17 FACS molekülüne ait ¹ H NMR spektrumu	109
4.18 FAALG molekülüne ait ¹ H NMR spektrumu.....	110
4.19 FA'e ait XRD spektrumu.....	111
4.20 FACS molekülüne ait XRD spektrumu	111

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.21 FAALG molekülüne ait XRD spektrumu	112
4.22 FACS NP ve IXA yüklü FACS NP'üne ait TGA	112
4.23 FACS NP ve IXA yüklü FACS NP'üne ait DTG	113
4.24 FAALG NP ve IXA yüklü FAALG NP'üne ait TGA	114
4.25 FAALG NP ve IXA yüklü FAALG NP'üne ait DTG	114
4.26 FACS-FAALG blend NP ve IXA yüklü FACS-FAALG blend NP'üne ait TGA termogramları.....	115
4.27 FACS-FAALG blend NP ve IXA yüklü FACS-FAALG blend NP'üne ait DTG termogramları.....	115
4.28 IXA yüklü FACS NP'lerin ortalama boyut ve zeta potansiyel değeri sonucu	116
4.29 IXA yüklü FAALG NP'lerin ortalama boyut ve zeta potansiyel değeri sonucu	117
4.30 IXA yüklü FACS-FAALG blend NP'lerin ortalama boyut ve zeta potansiyel değeri sonucu	117
4.31 IXA/FACS NP (A), IXA/FAALG (B) ve IXA/FACS-FAALG blend (C) NP'lerine ait SEM görüntüleri	119
4.32 IXA/FACS NP (A), IXA/FAALG NP (B) ve IXA/FACS-FAALG blend NP'lerine (C) ait TEM görüntüleri.....	120
4.33 pH 5,5 Ortamında <i>in-vitro</i> salım grafiği	122
4.34. pH 6,5 ortamında <i>In-vitro</i> salım grafiği	123
4.35. pH 7,4 ortamında <i>in-vitro</i> salım grafiği	124
4.36 MCF-7 Hücre hattı üzerinde IXA etkin maddesinin 24. saat, 48.saat ve 72.saat hücre canlılığı verileri	129
4.37 MDA-MB-231 Hücre hattı üzerinde IXA etkin maddesinin 24. saat, 48.saat ve 72.saat hücre canlılığı verileri.....	129
4.38 MCF-7 Hücre hattı üzerinde FACS NP'üne ait 24. saat, 48.saat ve 72.saat hücre canlılığı verileri	130

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.39 MDA-MB-231 Hücre hattı üzerinde FACS NP'üne ait 24. saat, 48.saat ve 72.saat hücre canlılığı verileri.....	131
4.40 MCF-7 Hücre hattı üzerinde FAALG NP'üne ait 24. Saat, 48.saat ve 72.saat hücre canlılığı verileri.....	131
4.41 MDA-MB-231 Hücre hattı üzerinde FAALG NP'üne ait 24. saat, 48.saat ve 72.saat hücre canlılığı verileri.....	131
4.42 MFC-7 Hücre hatları üzerinde plasebo, IXA'nın 72.saat IC ₅₀ dozları yüklü FACS NP, FAALG NP ve FACS-FAALG NP blend NP'lerine ait MTT sonuçları	132
4.43 MDA-MMB-231 Hücre hatları üzerinde plasebo, IXA'nın 72.saat IC ₅₀ dozları yüklü FACS NP, FAALG NP ve FACS-FAALG NP blend NP'lerine ait MTT sonuçları.....	132
4.44 Radyoişaretli maddelere ait TLRC kromatogramları	134
4.45 Radyoişaretli bileşiklerin % bağlanma verimlerinin zamana bağlı olarak değişimi.....	135
4.46 Radyoişaretli maddelerin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde %bağlanma verileri.....	136
4.47 Kanseri oluşturulan deney hayvanlarına ait fotoğraf ve IVIS spektrum cihazı ile alınan görüntüler.....	137
4.48 MDA-MB-231 hücre hattı ile dişi nude farelerde oluşturulmuş kanserli hayvan modellerinin iminohistokimyasal incelemelerine ait görüntüler	138
4.49 IRDye®-800RDye 0,005 mg/mL ve 0,0015 mg/mL konsantrasyonlarındaki Standart boya çözeltileri ve sentez sonrası supernatant kısımlarına ait HPLC pikleri	139
4.50 İşaretli NP'lere ait görseller.....	139
4.51: 1.grup: IRDye®-800rs boya maddesi enjekte edilen gruba ait IVIS görüntüleri	141
4.52 2.grup: IRDye®-800rs-CS/ALG blend NP formülasyonu enjekte edilen grubuna (Aktif Hedefsiz NP) ait IVIS görüntüleri	142

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.53 3.Grup IRDye®e-800rs-FACS/FAALG blend NPformülasyonu enjekte edilen grubuna (Aktif Hedefli NP) ait IVIS görüntüleri.....	143
4.54 1. Grup <i>Ex-vivo</i> görüntüsü	144
4.55 2.Grup <i>Ex-vivo</i> görüntüsü	144
4.56 3.Grup <i>Ex-vivo</i> görüntüsü	144
4.57 Deney hayvanlarının ağırlıklarına ait grafik	145
4.58 SF uygulanan gruba ait 0. gün ve 21. güne ait IVIS görüntüleri (1.Grup) ..	146
4.59 Piyasa preparatı uygulanan gruba ait 0. gün ve 21. güne ait IVIS görüntüleri (2. Grup paklitaksel)	146
4.60 IXA/FACS-FAALG blend NP uygulanan gruba ait 0. gün ve 21. güne ait IVIS görüntüleri (3.Grup)	147
4.61 MDA-MB-231 hücre hattı ile kanser oluşturulma sonrasında 21 gün boyunca SF uygulanan 1.grubun, sakrifiye edilen dişi nude farelerinden alınan primer tümörler, karaciğer ve peritondaki metastaza ait patoloji görüntüleri	149
4.62 MDA-MB-231 hücre hattı ile kanser oluşturulma sonrasında 21 gün boyunca Paklitaksel ile tedavi edilen 2.grubun, sakrifiye edilen dişi nude farelerinden alınan karaciğere ve yumuşak dokuya ait patoloji görüntüleri	150
4.63 MDA-MB-231 hücre hattı ile kanser oluşturulma sonrasında 21 gün boyunca IXA/FACS-FAALG blend NP sistemi ile tedavi edilen 3.grubun, sakrifiye edilen dişi nude farelerinden alınan karaciğer, genital sistem ve kasa metastazına ait metastaza ait patoloji görüntüleri.....	151

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3-1 Kullanılan kimyasal malzemeler	39
3-2 Kullanılan araç ve gereçler	40
3-3 Analitik yöntem validasyon parametreleri	43
3-4 Folik Asit için HPLC cihaz parametreleri	49
3-5 FACS optimizasyon parametreleri	55
3-6 Liyofilizasyon parametreleri	55
3-7 FACS NP'lerine ait optimizasyon parametreleri.....	56
3-8 IXA Yüklü FACS NP formülasyonlarının optimizasyon parametreleri	57
3-9 Aljinik asit eldesine ait parametreler.....	58
3-10 FAALG NP formülasyonlarının optimizasyon parametreleri	59
3-11 IXA yüklü FAALG NP formülasyonlarının optimizasyon parametreleri.....	60
3-12 FACS-FAALG blend NP formülasyonlarının optimizasyon parametreleri..	61
3-13 IXA/FACS-FAALG blend nanopartikül formülasyonlarının optimizasyon parametreleri	62
3-14 IRDye®-800 rs için HPLC cihaz parametreleri	74
4-1 Etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,4 çözücü ortamlarında IXA standart çözeltisinin doğrusalılık parametresine ait veriler	81
4-2 Çalışma aralığı parametresine ait bulgular	82
4-3 IXA'nın etanol, pH 5,5, pH 6,5 ve pH 7,4 ortamlarındaki LOD ve LOQ değerlerine ait bulgular	83
4-4. IXA'nın etanol ortamındaki doğruluk parametresine ait bulgular	83
4-5. IXA'nın pH 5,5 ortamındaki doğruluk parametresine ait bulgular	84
4-6. IXA'nın pH 6,5 ortamındaki doğruluk parametresine ait bulgular	84
4-7. IXA'nın pH 7,4 ortamındaki doğruluk parametresine ait bulgular	85
4-8 IXA'nın etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,4 ortamlarında sistem kesinliği parametresine ait bulgular	86
4-9 IXA'nın etanol ortamında tekrarlanabilirlik parametresine ait bulgular.....	87
4-10 IXA'nın pH 5,5 ortamında tekrarlanabilirlik parametresine ait bulgular.....	87
4-11 IXA'nın pH 6,5 ortamında tekrarlanabilirlik parametresine ait bulgular.....	88

TABLOLAR DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4-12 IXA'nın pH 7,4 ortamında tekrarlanabilirlik parametresine ait bulgular	88
4-13 IXA'nın tekrarlanabilirlik parametresinde standart alan ve %uyum değerleri	88
4-14 IXA'nın etanol ortamında laboratuvar içi kesinlik parametresine ait bulgular-1	89
4-15 IXA'nın etanol ortamında laboratuvar içi kesinlik parametresine ait bulgular-2	89
4-16 IXA'nın pH 5,5 ortamında laboratuvar içi kesinlik parametresine ait bulgular-1	90
4-17 IXA'nın pH 5,5 ortamında laboratuvar içi kesinlik parametresine ait bulgular-2	90
4-18 IXA'nın pH 6,5 ortamında laboratuvar içi kesinlik parametresine ait bulgular-1	90
4-19 IXA'nın pH 6,5 ortamında laboratuvar içi kesinlik parametresine ait bulgular-2	91
4-20 IXA'nın pH 7,4 ortamında laboratuvar içi kesinlik parametresine ait bulgular-1	91
4-21 IXA'nın pH 7,4 ortamında laboratuvar içi kesinlik parametresine ait bulgular-2	91
4-22 IXA'nın etanol ortamında dayanıklılık parametresine ait bulguları	92
4-23 IXA'nın pH 5,5 ortamında dayanıklılık parametresine ait bulguları	92
4-24 IXA'nın pH 6,5 ortamında dayanıklılık parametresine ait bulguları	93
4-25 IXA'nın pH 7,4 ortamında dayanıklılık parametresine ait bulguları	93
4-26 IXA'nın etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,4 ortamlarında standart çözeltisi stabilitesine ait bulgular	94
4-27 IXA'nın etanol, pH 5,5, pH 6,5 ve pH 7,4 ortamlarında numune çözeltisi stabilitesine ait bulgular	94
4-28 Folik asit standart çözeltisinin doğrusallık parametresine ait veriler	96
4-29 Çalışma aralığı parametresine ait bulgular	97

TABLOLAR DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4-30 Folik Asit LOD ve LOQ değerlerine ait bulgular	97
4-31 Folik Asit doğruluk parametresine ait bulgular.....	98
4-32 Folik asit sistem kesinliğine ait bulgular	98
4-33 Folik asit tekrarlanabilirlik parametresine ait bulgular	99
4-34 Folik Asit'in tekrarlanabilirlik parametresinde standart alan ve %uyum değerler	99
4-35. Folik asit laboratuvar içi kesinlik parametresine ait bulgular-1	100
4-36 Folik asit laboratuvar içi kesinlik parametresine ait bulgular-2	100
4-37 Folik asit dayanıklılık parametresine ait bulgular	101
4-38 Folik asit standart çözelti stabilitesine ait bulgular	102
4-39 Folik asit numune çözelti stabilitesine ait bulgular	102
4-40 Nanopartiküllere ait boyut, zeta potansiyeli ve polidispersite değerleri	117
4-41 %Bağlanma verimine ait sonuçlar.....	121
4-42 Nanopartikül sistemlerinin enkapsülasyon verimi, yükleme kapasitesi ve nanopartikül sentez verimi sonuçları	121
4-43 pH 5,5 Tampon ortamında <i>in-vitro</i> salım sonuçları (n=3)	122
4-44 pH 6,5 Tampon ortamında <i>in-vitro</i> salım sonuçları (n=3)	123
4-45 pH 7,4 Tampon ortamında <i>in-vitro</i> salım sonuçları (n=3)	123
4-46 Tampon ortamlarında diyaliz membran içi miktar tayini sonuçları	124
4-47 pH 5,5, pH 6,5 ve pH 7,4 Ortamlarında salım kinetik modellere ait sonuçlar	124
4-48 IXA/FACS NP'e ait stabilite verileri	127
4-49. IXA/FAALG NP'e ait stabilite verileri	127
4-50 IXA/FACS-FAALG NP'e ait stabilite verileri.....	128
4-51 ^{99m} Tc-IXA etkin maddenin, ^{99m} Tc-IXA/FACS NP, ^{99m} Tc-IXA/FAALG NP ve ^{99m} Tc-IXA/FACS-FAALG blend NP'lerin pH değişimine göre % bağlanma verimleri.....	133
4-52 R _f ve %bağlanma verimleri(n=5)	134
4-53 Radyoişaretli maddelerin lipofilite değerleri (n=5).....	135

TABLÖLAR DİZİNİ(devam)ÇizelgeSayfa**4-54** IVIS cihazından okunan ROI değerleri 147

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

EDC	1-(3-Dimetilaminopropil)-3-etilkarbodiimid hidroklorür
DMSO	Dimetil sülfoksit
MTT	3-[4,5-dimetil tiyazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolyum bromür
FA	Folik Asit
CS	Kitosan
ALG	Aljinat
IXA	İksabepilon
CDI	1,1-Karbonildiimidazol
MEM	Minimum Essential Medium
NHS	N-hidroksi süksinimid
EP	European Pharmacopeia
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LOD	Gözlenebilirlik
LOQ	Ölçme Sınırı
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7 Cells
MDA-MB-231	MD Anderson-Metastatic Breast-231 Cells
NaOH	Sodyum Hidroksit
NaHCO ₃	Sodyum Bikarbonat
HCl	Hidroklorik Asit
FTIR	Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi
FACS NP	Folik asit ile Modifiye Kitosan Nanopartikülü
FAALG NP	Folik asit ile Modifiye Aljinat Nanopartikülü
FACS-FAALG Blend NP	Folik asit ile Modifiye Kitosan-Aljinat Blend Nanopartikülü
TBAOH	Tetrabütülamonyumhidroksit
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
¹ H-NMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans
XRD	X-Işını Difraksiyon Spektroskopisi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskop
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskop
FBS	Fetal Bovine Serum
PBS	Fosfat Tampon Tuzu

IC ₅₀	%50 maksimum inhibitör konsantrasyon
SnCl ₂	Kalay(II) klorür
^{99m} Tc	Teknesyum-99m
^{99m} Tc	Teknesyum-99m
^{99m} Tc-IXA/FACS NP	^{99m} Tc ile radyoişaretli İksabepilon Yüklü Folik asit ile Modifiye Kitosan Nanopartikülü
^{99m} Tc-IXA/FAALG NP	^{99m} Tc ile radyoişaretli İksabepilon Yüklü Folik asit ile Modifiye Aljinat Nanopartikülü
^{99m} Tc-IXA/FACS-FAALG Blend NP	^{99m} Tc ile radyoişaretli İksabepilon Yüklü Folik asit ile Modifiye Kitosan-Aljinat Nanopartikülü
SF	Serum Fizyolojik
TLRC	İnce Tabaka Radyo Kromatografisi
R _f	Relative Front
Cd(Te)	Kadmiyum Tellür
IVIS	<i>In-vivo</i> imaging system

1 GİRİŞ

Kanser, vücuttaki yer alan bazı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüyerek, vücudun diğer bölgelerine yayıldığı bir hastalık olarak adlandırılmaktadır (Shockney, 2023). Meme kanseri kadınlarda uzun senelerdir en sık görülen ikinci kanser olup, dünya çapında kadınlarda kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir (Kim and Je, 2014 ; Shockney,2023). Kemoterapi, birçok kanser türü için etkili tedavilerden biri olmasına rağmen, kombine kemoterapi sonrası bile gelişebilen ilaç direnci, tedavinin etkinliğini azaltabilmektedir. Bu sebeple, ilaç duyarlılığının artırılması, kanser hastalarının tedavi süreçlerindeki başarısını iyileştirmek adına kritik bir rol oynamaktadır (Wang et al. 2010). Meme kanseri tedavisinde kullanılan temel yöntemler arasında cerrahi çıkarım, kemoterapi ve radyoterapi yer almaktadır. Özellikle cerrahi uygulamaları, kanser vakalarında hastalığın nüks etmesini önlemek amacıyla konvansiyonel kemoterapi tedavileriyle desteklenebilmektedir (Sulman et al., 2017). Meme kanseri tedavisinde, geleneksel kemoterapi gibi stratejilerin yanı sıra cerrahi müdahaleler, radyoterapi, hormon duyarlılığı gösteren kanser türlerinde hedeflenmiş tedavi yöntemleri ve moleküler tedavi yaklaşımları bulunmaktadır (Shien & Iwata, 2020). Meme kanserine yönelik tedavilerde, erken teşhisin sağlanması ve yenilikçi tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi, bu hastalığın oluşturduğu sağlık yükünü önemli ölçüde azaltma potansiyeline sahiptir (Ferlay et al., 2021). Ancak, klasik kemoterapi uygulamalarında, antikanser ilaçlardan kaynaklanan ciddi yan etkiler, tedavi etkinliğini azaltan önemli bir sınırlayıcı faktördür (Carr, Ng, & Wigmore, 2008). Ayrıca bu yöntemlerin toksik etkileri, spesifik hedeflenmemeleri ve hücresel alımın düşük olması gibi pek çok yan etkisi ve dezavantajı, klinik kullanımda ciddi sınırlamalara yol açmıştır. Bu durum, araştırmacıları yenilikçi tedavi yaklaşımları geliştirmeye yönlendirmiştir (Ferlay et al., 2021).

Günümüzde, kemoterapi ilaçlarını doğrudan kanser hücresine taşıyan nanopartiküler sistemler kullanılmaktadır (Sinha et al., 2006). Nanopartiküllerin çeşitli kanser türlerinin tedavisinde en umut verici araçlar olarak görülmelerinin nedeni, kararlı olmaları, düşük toksisite, hücresel alımın artırılması, hedefe yönelik hücre spesifikliğı, sistemik ilaç dolaşımı ve etkili ilaç taşıma gibi avantajlı

özelliklere sahip olmalarıdır (Deng et al., 2022; Higino and França, 2022). Karbon nanofiberler, manyetik nanopartiküller, miseller, lipozomlar gibi çeşitli nanomateryaller, polimerik nanopartiküller ilaç taşıyıcı sistemleri olarak kullanılmaktadır (Allahverdiyev et al., 2018). İlaç taşıyıcı sistemler arasında polimerik nanopartiküller, hem hidrofilik hem de hidrofilik ilaçların yanısıra antijen ve protein gibi en çok tercih edilen biyobozunur nanopartiküllerdir (Jain et al. 2018).

Genellikle polisakkaritler (kitin/kitosan, hiyaluronik asit türevleri, aljinat, vb.) ve proteinler (albümin, kolajen, vb.) içeren doğal polimerler, çeşitli biyomedikal uygulamalarda (ilaç ve/veya görüntüleme ajanı dağıtım sistemi, doku rejenerasyon iskeleleri, farmasötik formülasyonlarda yardımcı maddeler olarak) yaygın olarak kullanılan toksik olmayan ve biyoyumlu biyomalzemelerdir (Horst et al. 2019; Simionescu et al. 2015).

Kitosan polimerinin ilaç taşıyıcı sistemlerinde kullanılmasının en önemli özellikleri biyoyararlanımı artırması, biyoyumlu olması ve bu nedenle toksisite oluşturmamasıdır. Bu özellikleri bakımından ilaç taşıyıcı sistemlerden gıdaya, kozmetikten biyoteknolojiye birçok alanda biyopolimer olarak tercih edilmektedir (Cárdenas-Triviño et al., 2021).

Luo ve arkadaşları (2019) tarafından stearik asit-karboksimetilkitosan (SA-CMC) konjugatı sentezlenerek 106 ± 19 nm boyutunda hidrodinamik parçacık boyutuna sahip kendiliğinden oluşabilen nanopartikülleri hazırlanmıştır. Kendiliğinden oluşabilen nanopartiküllere antikanser ilaç etkin maddesi olan Paklitaksel enkapsüle edilmiştir. İlaç etkin madde %86 enkapsülasyon verimi, 72 saat boyunca ise %70-90 ilaç salımı gerçekleşmiştir. Pasif hedefleme ve ardından hücresel endositoz yoluyla tümör bölgelerindeki birikimi önemli ölçüde artırdığını ortaya koyarak, tümör hedefli iletim ve kanser tedavisi için basit, ancak uygulanabilir bir nanosistem olduğunu kanıtlanmıştır (Luo et al., 2019).

Anjum ve arkadaşları (2024) 5-Florourasil'i tiyollenmiş kitosan bazlı nanopartiküllere enkapsüle edilebileceğini başarılı bir şekilde ortaya koymuşlardır.

Kemoterapötik kısmın etkinliğini arttırmak amacıyla, yüzeyi tiyol ligandıyla modifiye edilen nanopartiküller iyonik jelasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Ayrıca hazırladıkları nanopartikülleri, meme kanseri dahil birçok kanser çeşitlerinde katı malignitelerde sıklıkla ekprese edilen CD44 reseptörüne aktif hedefleyebilmek için nanopartikülleri hiyaluronik asit (HA) ile kaplamışlardır. Hazırlanan nanopartiküllerin *in-vitro* etkinliğini belirleyebilmek için MDA-MB-231 (üçlü negatif meme hücre hattı) ve MCF-10A hücre (normal epitel meme hücreleri) hatları üzerinde sitotoksiteleri çalışılmıştır. Elde edilen sitotoksitite sonuçları ile hazırlanan nanopartiküllerin meme kanseri için potansiyel antikanser tedavi sağlayabileceği kanıtlanmıştır (Anjum et al., 2024).

Hosseinzadeh ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları çalışmada, Gemcitabine yüklü kitosan-pluronic ® F-127 nanopartiküllerini iyonik jelasyon yöntemiyle hazırlamışlardır. Nanopartiküller dinamik ışık saçılması, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak karakterize edilmiştir. pH 7,4 tampon ortamında *in-vitro* ilaç salımı incelenmiş ve HT-29 kolon kanseri hücre hattı üzerinde sitotoksitite çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar ışığında kitosan bazlı nanopartiküllerin kolon kanseri tedavisinde etkili bir oral formülasyon olarak kabul edilebileceği kanıtlanmıştır (Hosseinzadeh et al., 2012).

pH duyarlı enjekte edilebilir biyouyumlu tiyol modifikasyonlu kitosan (CSSH) hidrojel, doku rezeksiyonunun ilk aşamasında tümör hücrelerinin etkin bir şekilde tedavi edilmesi ve ardından doku rekonstrüksiyonu için kullanılmak üzere Li ve arkadaşları tarafından (2021) tasarlanmıştır (R. Li et al., 2021) . Hidrojellerin mekanik dayanıklılığını artırmak, toksik ve yan etkileri azaltmak ve doksorubisin (DOX) salımını geciktirmek amacıyla halloysit nanotüpler (HNT'ler), tiyollenmiş HNT'ler (HNT'ler-SH) elde edilmiştir. DOX (DOX@HNTs-SH) yüklendikten sonra CSSH ile çapraz bağlanarak DOX@CSSH/HNTs-SH jeli oluşturulmuştur. *In-vitro* salım çalışma sonuçlarıyla, DOX'un normal fizyolojik pH'ta yavaş salım hızına sahip olmasına rağmen, tümörlerin asidik mikro çevrelerinde hızlı bir şekilde salım göstermesi, hazırlanan hidrojellerin pH'a duyarlı olduğunu göstermiştir. Elde

ettikleri sonuçları, *in-vitro* hücre kültürü çalışmalarıyla da destekleyerek (MCF-7 hücre hattı) DOX yüklü hidrojelin, özellikle tümör rezeksiyonundan sonra tekrarlanmayı önlemek ve hasarlı dokuları onarmak amacıyla, lokal olarak doğru ve etkili ilaç salımı sağlayan bir taşıyıcı olarak kullanılabileceği ortaya konulmuştur.

Kitosan dışında sıkça kullanılan bir diğer biyouyumlu polimer ise aljinattır. Aljinat, biyouyumluluğu, toksik olmaması, biyolojik olarak parçalanabilirliği ve çeşitli matrisler ve substratlarla fonksiyonel çok yönlülüğü gibi özellikleri sayesinde yara örtülerinin geliştirilmesinde, doku mühendisliğinde ve ilaç taşıma sistemleri gibi birçok farklı alanda kullanılmasına olanak tanır (X. Li et al., 2020)

Doğal bir polisakkarit olan sodyum aljinat kullanılarak apigenin'in sürekli salımlı Ca-aljinat boncukları Aldawsari ve arkadaşları tarafından kalsiyum klorürün çapraz bağlayıcısı kullanılarak iyonotropik jelleşme tekniğiyle hazırlanılmıştır. Hazırlanan nano boncukları FTIR, DSC, XRD ve SEM analizi ile karakterize edilmiş ve başarılı bir şekilde hazırlandığı ortaya konulmuştur. Ayrıca *in-vitro* MTT analizi, meme kanseri MCF-7 hücre hattı üzerinde potansiyel bir antikanser etki gösterdiğini belirtmişlerdir (Aldawsari et al., 2021).

Erdagi ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada (2019), hidrokolloid nanotaşıyıcılar oluşturmak için stabilizatör olarak kuaternize nanoselüloz (Q-NC) ve diosgenin-konjugat aljinat (DGN-ALG) parçacıkları kullanılarak çok katmanlı, kendiliğinden birleşen elektrostatik yağ-su Pickering emülsiyonlarının (PE'ler) kolay hazırlanması araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar ışığında, 30 günlük süre boyunca emülsiyon, damlacık kararlılığı göstermiştir. Morfolojik analiz, PE emülsiyonlarının hidrodinamik boyutlarının ortalama $150 \pm 3,51$ nm çapında küresel şekilli olduğunu ortaya koymuştur. Model ilaç olarak kapsüllenmiş Kinalizarinin *in-vitro* salım kinetiği, kanın pH ortamı taklit edilerek (pH 7,4) çalışılmış ve $\%89 \pm 1,21$ 'lik bir kümülatif ilaç salımı gösterdiği bulunmuştur. Ek olarak, PE'lerin hücresel içselleştirilmesi konfokal mikroskopik görüntüleme yöntemi ile incelenmiş ve yüksek hücre alım gösterilmiştir. Ayrıca, MTT testi ile değerlendirilen *in vitro* sitotoksikite çalışmaları sonucunda, insan akciğer (A549)

ve meme (MCF-7) kanser hücre hatlarında mükemmel antikanser aktivite sergilediği gösterilmiştir (Ilkar Erdagi et al.,2020).

2023 yılında Maher ve arkadaşlarının yapmış olduğu araştırmada, cisplatin içeren aljinat hidrojel kaplanmış gümüş nanopartiküllerinden (Alg-AgNPs-CisPt) oluşan bir kompozit materyali geliştirilmiştir. Bu nanokompleks, meme kanseri hücreleri üzerinde sinerjik sitotoksik etkiler indüklemadaki etkinliği araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, bu yenilikçi yaklaşımın, meme kanseri (MDA-MB-231 hücre hattı) tedavisinde potansiyel bir terapötik strateji olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Sitotoksisite deneyleri ve apoptoz analizleri, nanokompleksin meme kanseri hücrelerine karşı AgNP'leri veya bağımsız tedaviler olarak cisplatine kıyasla daha fazla etkinlik sergilediğini göstermişlerdir. Ayrıca, nanokompleksin hücre içi reaktif oksijen türleri seviyelerini arttırdığı ve etkinliğini daha da doğruladığı bulunmuştur (Maher et al., 2023).

Song ve arkadaşları (2018) tarafından kurkuminin (MDA-MB-231) biyoyararlanımını ve sitotoksisitesini artırmak için kurkumin yüklü manyetik aljinat/kitosan nanopartikülleri üretilmiştir. Aljinat ve kitosan, elektrostatik özellikleri nedeniyle Fe_3O_4 manyetik nanopartiküller üzerinde biriktirilmiştir. Nanopartikül boyutu, ilaç dağıtımı için optimum aralık 120-200 nm arasında değişmektedir. Konfokal floresan mikroskobu sonuçları, manyetik alan yardımıyla kurkuminin hedeflenen dağıtımının sağlandığını göstermiştir. Kurkumin yüklü nanopartikülleri MDA-MB-231 hücrelerine karşı, serbest kurkumine göre 3-6 kat daha fazla birikim göstererek ve bunun sonucunda daha yüksek sitotoksisite sergilemiştir. Sürekli salım profilleri, gelişmiş alım etkinliği ve kanser hücrelerine yönelik sitotoksisitenin yanı sıra aktif hedefleme, manyetik aljinat/kitosan nanopartiküllerini (MACP) kanser tedavisi için umut verici adaylar haline getirmektedir (Song et al., 2018).

Tümör hücrelerine/dokularına Ligustrazin (LZ) taşımını arttırmak için, folat esterinin kitosan üzerindeki amin grubu ile birleştirilmesiyle folat-kitosan nanopartikülleri (FA-CS-NPs) sentezlenerek, LZ için bir taşıma sistemi hazırlanması amaçlanmıştır (FA-CS-LZ-NPs). Folat reseptörü eksprese eden MCF-

7 hücreleri ile folat reseptörü eksprese etmeyen A549 hücreleri, hazırlanan nanopartikülün kanser hücreleri üzerinde hedefleme etkinliğini belirlemek için, FA-CS-LZ-NP'leri, CS-LZ-NP'leri ve LZ ile çalışılmıştır. Folat-kitosanın yapısı ve FA-CS-LZ-NP'lerin boyutu, enkapsülasyon etkinliği, yükleme kapasitesi ve salım oranları gibi özellikleri analiz edilmiştir. FA-CS-LZ-NP'lerin ortalama boyutu $182,7 \pm 0,56$ nm, kapsülleme etkinliği ve yükleme kapasitesi sırasıyla $\%59,6 \pm 0,23$ ve $\%15,3 \pm 0,16$ bulunurken, kümülatif salım oranı pH 7.4 tampon ortamına göre pH 5.0 tampon ortamında daha yüksek olup $\%95$ olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, FA-CS-LZ-NP'lerin hedefleme etkinliğin folat reseptörünün aracılık ettiğini göstermiştir. Bu sonuçlar ışığında, FA-CS-LZ-NP'ler, kanser tedavisi sırasında çoklu ilaç direncinin üstesinden gelebilecek potansiyel bir folat reseptörü pozitif tümör hücrelerini hedefleyebilen ilaç dağıtım sistemi olabileceği ortaya konmuştur (Cheng et al., 2017).

Literatürde kitosan nanopartikülleri ile yapılan bir diğer çalışmada, kitosan (CS) NP'ler iyonik çapraz bağlama yöntemi ile hazırlanmış ve elektrostatik etkileşim ile folik asit (FA), CS NP'ler ile konjuge edilmiştir. NP'lerin özellikleri incelenmiş ve model ilaç olarak doksorubisin hidroklorür (Dox) *in-vitro* ilaç salım kinetiğini araştırmak için enkapsüle edilmiştir. FA-CS NP'lerinin sitotoksitesi ve hücre alımı araştırılmıştır. Dox, FA-CS NP'lere kolayca yüklenmiş ve salım modeli kontrollü ilaç salımı göstermiştir. Folat reseptörü pozitif SMMC-7221 hücreleri ile inkübe edildiğinde rodamin B-işaretle FA-CSNP'lerin varlığında belirgin fagositoz etkisi gözlenmiştir. Modifiye edilmemiş CS NP'lerle karşılaştırıldığında, FA-CS NP'ler bilinen folat reseptör aracılı endositoz nedeniyle çok daha yüksek hücre alım kabiliyeti göstermiştir. FA-CS NP'ler, folat reseptörü aracılı hedefleme tanımı ile antitümör ilacın kullanım etkinliğini artırmak için potansiyel bir yol olarak tercih edilebileceği ortaya konmuştur (Song et al., 2018).

Lee ve Lee tarafından yapılan çalışmada ise, asidik ortamda bozulan ve hedef bölgeye 5-aminolevulinik asit (5ALA) salan pH duyarlı NP'ler geliştirilmiştir. NP'ler, aljinatın folik asit ile konjuge edilmesi ve ardından 5ALA'nın su içinde yağ (W/O) emülsiyon yöntemi ile kapsüllenmesi ile hazırlanmıştır. Aljinat konjuge folik asit nanopartikülleri (AF NP'ler) homojen boyutta olup, sulu süspansiyonda

agregasyon olmaksızın uzun süre stabil kalmış ve toksik olmadığı belirlenmiştir. AF NP'ler, tümörlere etkili bir şekilde sızabilecek kadar küçük (<50 nm) olup, reseptör aracılı endositoz yoluyla kanser hücreleri tarafından spesifik olarak internalize edilmiştir. NP'lerin hücre içi absorpsiyonunun ardından, aljinat lizozomlarda deprotonize olmuş ve 5ALA'yı salmıştır; bu da mitokondriyal sentezi yoluyla protoporfirin IX (PpIX)'e dönüştürüldüğü belirtilmektedir. Çalışma sonuçları, AF NP'lerin kanser hücrelerine ulaşmadan önce enzimler veya diğer dış faktörler tarafından bozulmadığını ve floresan öncüllerinin floresan oluşturmak için kanser hücrelerine spesifik ve doğru bir şekilde iletilildiğini göstermişlerdir (Lee and Lee, 2020).

Tek bileşenli polimerik nanopartikül sistemlerde yapısal parçalanma, ilacın erken salımı veya spesifik olmayan ilaç salım kinetiği gibi dezavantajlar yaşanabilmektedir. Bu tür dezavantajların blend sistemlerde avantaja dönüştürülebilmesi, son zamanlarda daha yoğun bir şekilde araştırılmasında neden olmuştur (Ferreira Soares et al., 2020; Nyamweya, 2021).

Farklı alanlarda kullanılan blend nanopartiküllerinin ilaç taşıma sistemi olarak avantajlarına odaklanıldığında, ilacın çözünürlüğünü ve stabilitesini artırarak toksisitesini azaltma potansiyeli ön plana çıkmaktadır (Nyamweya, 2021).

Her ne kadar hedefe yönelik tedaviler onkolojide giderek daha önemli hale gelse de, sitotoksik ajanların kanser tedavi paradigmasında değerli bir unsur olmaya devam etmesi muhtemeldir. Ancak kemoterapiye karşı gelişen direnç, kanserin başarılı tedavisinin önünde büyük bir engeldir (Fornier, 2007). Bu nedenle tümör direnci mekanizmalarının üstesinden gelebilen yeni antineoplastik ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Iksabepilon (IXA), metastatik meme kanserinin tedavisi için FDA tarafından yeni onaylanmış bir kemoterapötik ajandır. Dosetaksel ve paklitaksel'e benzer şekilde mikrotübülleri hedeflemesine rağmen, iksabepilone taksanlara dirençli hastalarda aktiviteye sahiptir. İksabepilon, kanser hücrelerinde apoptosisi tetikleyen epotilon B'nin yarı sentetik bir analogudur. Mikrotübüllerin stabilizasyonu yoluyla etki mekanizmasını göstermektedir (Puhalla and Brufsky, 2008). Bu amaçla, tedavi edilmiş dirençli ve erken meme kanseri dahil olmak üzere

çok çeşitli tümör tiplerinde umut verici sonuçlarının olmasından dolayı önemlidir. (F. Y.F. Lee et al., 2001).

IXA yüklü ve folik asit (FA) ile fonksiyonelleştirilmiş poli(etilen glikol)-poli(propilen süksinat) (PEG-PPSu) kopolimeri nanopartikülleri Siafaka ve arkadaşları tarafından 2015 yılında hazırlanmıştır. Bu nanopartiküllerin, folat reseptörünü aşırı eksprese eden meme kanseri tümörlerinin hedeflenmiş tedavisi için kullanılabileceği düşünülmüştür. Nanopartiküller, çift emülsifikasyon ve çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Ortalama 195 nm boyutunda olup, enkapsülasyon etkinliği ise, %38,80 olarak bulunmuştur. Floresan nanopartiküller, Rodamin B'nin PEG-PPSu'ya konjuge edilmesiyle hazırlanmış ve FA-PEG-PPSu nanopartiküllerinin folat reseptörünü eksprese eden insan meme kanseri hücrelerine girme kapasitesini göstermek için konfokal mikroskopi ile görüntülenmiştir. *In-vitro* sitotoksikite çalışmalarına dayanarak, boş FA-PEG-PPSu nanopartiküllerinin hücreler için toksik olmadığı tespit edilmiştir. IXA yüklü nanopartiküller, vücut sıvısını simüle edilen tampon ortamında sürekli ilaç salınım profili sergilediği belirtilmiştir. Ayrıca elde ettikleri sonuçları değerlendirdiklerinde ise, hazırladıkları IXA yüklü nanopartiküllerin meme kanseri kemoterapisinde hedeflenebilir nanotaşıyıcıları olarak kullanılmaya uygunluğunu ortaya koymuşlardır.

Dahası, nanopartiküller FA reseptörünü ifade eden insan meme kanseri hücrelerine girebildi. (Siafaka et al., 2015).

Radyofarmasötikler, farmakolojik bir yanıt oluşturmaksızın hastalarda tanı ve tedavi amacıyla kullanılan radyoaktif ilaçlar olarak tanımlanmaktadır. Nükleer tıp uygulamasının ana bileşenleri olup, nükleer tıpta %95 tanı ve %5 tedavi amacıyla kullanılırlar. Meme kanseri görüntülenmesi için radyoişaretli metotreksat (MTX) yüklü kitosan nanopartikül sistemleri hazırlanmıştır. Teknesyum-99m (^{99m}Tc) ile radyolaişaretlenmiş, işaretli bileşiğin radyokimyasal saflığı kontrol edilip, stabilitesi 6 saate kadar bir gama sayacı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kitosan nanopartiküllerini, ^{99m}Tc ile yüksek işaretleme verimi ($> \%90$) ve stabilite ile radyoişaretleme yapıldığı gösterilmiştir. *In-vitro* hücre kültürü çalışmalarını

inkorporasyon çalışmalarını, meme kanseri (MCF-7) ve insan keratinosit (HaCaT) hücre hatlarında değerlendirilmiş ve sonuçlar radyoişaretleli kitosan nanopartiküllerinin meme kanseri teşhisi için umut verici bir ajan olabileceğini gösterilmiştir (Ekinci vd., 2015).

^{99m}Tc -kitosan nanopartikülleri sentezlemiş ve karaciğer görüntüleme için potansiyeli değerlendirilmiştir. Normal farelerde işaretleme etkinliği, stabilite, biyodağılım ve görüntüleme çalışması yapılarak, radyoişaretleli nanopartiküllerin fare karaciğerinde etkili bir şekilde biriktiğini göstermişler ve ^{99m}Tc -kitosan nanopartiküllerinin karaciğer görüntülemesi için umut verici bir radyofarmasötik olarak kabul edilebileceğini belirtmişlerdir (Rajabi et al., 2016).

İzoniazid (INH), tüberküloz tedavisinde yaygın olarak kullanılan birinci basamak anti-tüberküloz ilaç etkin maddesidir. ^{99m}Tc -aljinat-INH mikroküre formülasyonları hazırlanarak, iyileştirilmiş bir formülasyon geliştirmek ve kalite kontrol yöntemleri ile radyoaktif işaretlemenin stabilitesi değerlendirmişlerdir. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda, işaretleme veriminin %96 olduğu ve biyodağılım çalışmalar ile radyoaktif atom ile işaretlenmiş formülasyonun karaciğer, bağırsak, akciğerler ve böbreklerde büyük birikim göstererek, tüberküloz tedavisinde etkinliği ortaya konulmuştur (Samad, 2008).

Bu bağlamda tez çalışmamız; meme kanseri tedavisinde kullanılan ve diğer kemoterapötik ilaçlara göre umut verici olan İksabepilon model ilaç etkin maddesi yüklü, folik asit ile aktif hedefli hale getirilmiş biyopolimer nanopartikülleri, blend nanopartiküllerin hazırlanması ve ^{99m}Tc ile işaretlenmesini içermektedir. Hazırlanan formülasyonların karakterizasyonları, enkapsülasyon ve işaretleme verimleri belirlenmiştir. *In-vitro* hücre kültürü denemelerinde FACS, FAALG ve FAALG/FACS blend nanopartiküllerin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde sitotoksikite çalışmaları, ^{99m}Tc ile işaretlenen nanopartiküllerde ise, inkorporasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Son olarak, optik görüntüleme yöntemi ile *in-vivo* hayvan çalışmalarında MDA-MB-231 hücre hattı kullanılarak meme kanserli dişi BALB/C fare modelleri oluşturulmuş, hazırlanan blend nanopartiküllerinin biyodağılım ve tedavi potansiyelleri, *in-vivo* görüntüleme (IVIS)

spektrum cihazıyla izlenmiştir. *Ex-vivo* çalışmaların sonucunda, elde edilen tümörlü dokuların patolojik incelemeleri yapılmıştır. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde hazırlanan IXA yüklü blend nanopartikül sistemin meme kanseri tedavisinde umut vaad edebilme potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

Kanser, vücudun çeşitli bölgelerini etkileyebilen bir grup malign hastalığı tanımlamak için kullanılan kapsamlı bir terimdir. Bu hastalık, hücrelerin hızlı ve kontrolsüz şekilde çoğalmasıyla karakterize edilir; bu hücreler bir kitle veya tümör oluşturmak üzere bir araya gelebilir ya da vücuda yayılıp diğer bölgelerde anormal büyümeler başlatabilir (Ovais et al., 2016). Kanser, dünya genelinde milyonlarca insanın yaşamını yitirmesine neden olan ciddi hastalıklardan biridir (Reddy and Grace, 2016).

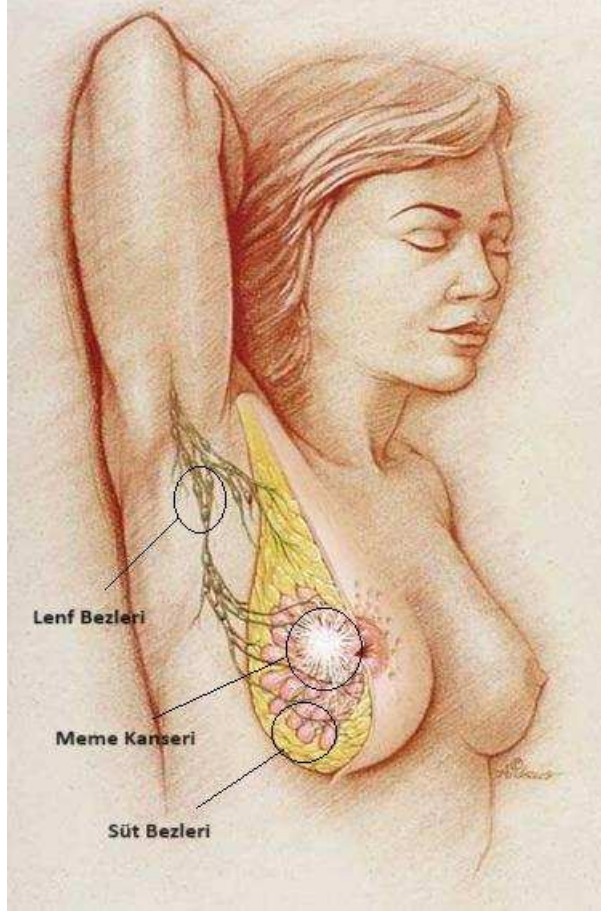
Amerikan Kanser Derneği, her yıl için yıl içerisinde ortaya çıkacak yeni kanser vakalarını ve ölüm sayılarını tahmin etmekte ve kanser insidansı, mortalite oranı ve sağkalım ile ilgili en güncel verileri toplamaktadır. 2024 yılında tahmini olarak 2.001.140 yeni kanser vakası teşhis edileceği ve 611.720 kişinin kanserden dolayı öleceği tahmin edilmiştir (Siegel et al, 2024).

2.1.1 Meme kanseri

Meme kanseri, son yıllarda tanı ve tedavi alanındaki gelişmelere rağmen, kadınlarda en sık görülen kanser türü olup, kanser kaynaklı ölümler arasında ise akciğer kanserinin ardından ikinci sırada yer almaktadır (Back et al., 2005). Orta yaşlı kadınlar arasında ölüm nedenlerinden biridir. Meme kanserlerinin yaklaşık %7'si 40 yaş altı kadınlarda, %4'ten azı ise 35 yaş altı kadınlarda görülmektedir (Brinton et al., 2008). Tüm kanser tanılarının yaklaşık %23'ü ve kadınlardaki ölümlerin %14'ü meme kanseri ile ilişkilidir. Meme kanseri insidansı Asya'da 35 kadında 1 ve Amerika Birleşik Devletleri'nde 8 kadında 1 olarak gözlemlenmektedir (Graidist et al., 2015).

Meme kanseri, memede malign hücrelerin gelişmesi sonucunda ortaya çıkar. Bu kötü huylu hücreler, memenin süt bezlerinin veya kanallarının (duktal epitel) iç yüzeyinden kaynaklanır ve bu durum kanser olarak tanımlanır. Kanser hücreleri, kontrolsüz bölünme ve anormal büyümeye yol açan özellikleriyle, yerel olarak

normal dokuyu istila edebilir veya metastaz adı verilen süreçle vücuda yayılma yeteneğine sahiptir (Thackery, 2002).



Şekil 2.1 Meme kanseri gösterimi (Thackery, 2022).

Meme kanseri genellikle mamografi taramaları sırasında, semptomlar ortaya çıkmadan önce (asemptomatik) veya bir kadın memesinde bir kitle veya değişiklik fark ettikten sonra (semtomatik) tespit edilir. Semptomların ortaya çıkmasından sonra tespit edilmesi, meme kanseri taramasına başlamamış genç kadınlar, artık tarama için önerilmeyen ileri yaştaki kadınlar ve önleyici taramalara erişimi olmayan kişiler arasında daha yaygındır. Taramada tespit edilen kitlelerin çoğu iyi huylu (benign) çıkmaktadır. Kanser şüphesi olduğunda, mikroskobik analiz yoluyla kesin tanı koymak için biyopsi yapılması gerekmektedir. İnce iğne biyopsisi veya daha büyük çekirdek iğne biyopsisi en yaygın yöntemlerdir, ancak bazen cerrahi biyopsi de uygulanabilir. Biyopsi türünün seçimi, kitlenin boyutu ve konumu, hasta

faktörleri ve tercihleri ile mevcut kaynaklar gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (American Cancer Society, 2022).

2.1.2 Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri

Meme kanseri tedavisi, multidisipliner bir yaklaşım gerektirir. Her vaka için tedavi kararı verilirken;

- Tümörün boyutu ve evresi,
- Kanser hücrelerinin türü,
- Aksilla lenf düğümlerine veya vücudun diğer organlarına yayılım durumu,
- Tümörün hormon reseptörlerinin durumu,
- Kanser hücrelerindeki genetik materyalin türü,
- Kanser hücrelerinin proliferasyon hızı,
- Hastanın yaşı ve genel sağlık durumu

gibi faktörler dikkate alınmaktadır (American Cancer Society, 2022; Luini et al., 1994).

Meme kanseri tedavisinde, cerrahi müdahale, radyoterapi, kemoterapi, hormon tedavisi, biyolojik tedavi, kemik iliği nakli ve kök hücre nakli gibi çeşitli yöntemler, tek olarak veya kombinasyon halinde uygulanmaktadır. Tüm bu değişik tedavi seçeneklerinde amaç, hastayı kanserden kurtarmak, lokal kontrolü sağlamak, evrelemeyi doğru yapmak ve buna bağlı olarak doğru adjuvan tedavi uygulamak, iyi kozmetik sonuç elde etmek ve hastanın rehabilitasyonunu sağlamaktır (Ülger, 2008; Luini et al., 1994).

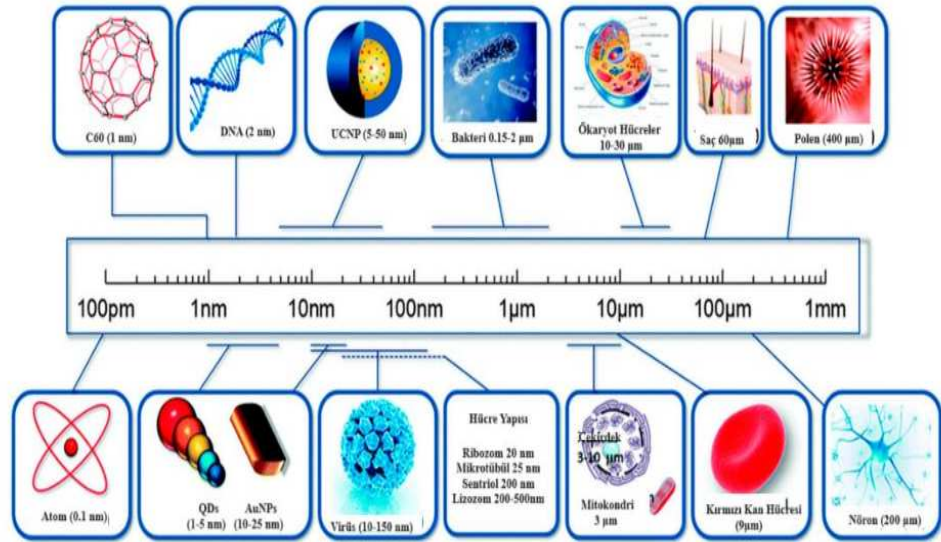
Cerrahi Tedaviler: Mastektomi; pektoral kasların korunup, meme başı da dahil olmak üzere tüm meme dokusunun çıkarılmasıdır. Radikal Mastektomi; pektoral kasların, aksiller lenf düğümlerinin, meme başının ve tüm meme dokusunun çıkarılmasıdır. Modifiye Radikal Mastektomi; Aksiller lenf düğümleri ve tüm meme dokusunun alınmasını içerir. Meme Koruyucu Cerrahi'de (MKC) gerçekleştirilen operasyonlar kadrantektomi, tümörektomi ve geniş tümör eksizyonu veya lumpektomi olarak adlandırılır. Lumpektomi, tümörün ve çevresindeki sağlıklı dokunun çıkarılması işlemidir. Kadrantektomi, lumpektomi ile benzer bir cerrahi işlemdir, ancak bu operasyonda memenin tüm bir kadranı çıkarılır (American Cancer Society, 2022; Cabioğlu, 2012).

Radyoterapi: Meme Koruyucu Cerrahi (MKC) sonrası uygulanan radyoterapi, tedavinin ayrılmaz bir bileşenidir. Radyoterapi, yüksek enerjili iyonlaştırıcı ışınlar veya atom parçacıkları kullanılarak gerçekleştirilen bir tedavi biçimidir. Amacı, cerrahi yöntemlerde olduğu gibi, öncelikle lokal ve bölgesel kontrolü sağlamak ve buna bağlı olarak yaşam süresini uzatmaktır.

Sistemik Tedavi Yöntemleri: Kemoterapi; “ilaçla tedavi” anlamına gelmekle birlikte, kanser hücrelerini etkileyen kanser ilaçlarının kullanılmasıdır. Kemoterapinin amacı; tanı anında kanda dolaşan mikrometastazları yok ederek, hastalığın nüks etme ve ölüm riskini azaltmak veya önlemek ve yaşam süresini uzatmak amaçlanmaktadır (Yu and Hung 2010). İmmünoterapi; cerrahi sonrasında kanserin yeniden ortaya çıkma riskini azaltmak amacıyla kullanılabilir. Ayrıca, ileri evre meme kanserleri için de uygulanan bir tedavi yöntemidir. Bağışıklık sisteminin aktive ederek yada baskılayarak hastalığın tedavi edilmesidir (American Cancer Society, 2022; Cabioğlu, 2012). Meme kanserlerinin yaklaşık %15-20'si, büyümeyi teşvik eden HER-2 proteinini aşırı miktarda üretir (Carey et al., 2006). Bu tümörler daha hızlı bir büyüme göstermekte ve HER-2 üretmeyen tümörlere kıyasla yeniden ortaya çıkma olasılığı daha yüksek olmaktadır. Örneğin; Trastuzumab (Herceptin), HER-2 proteinini doğrudan hedefleyen bir monoklonal antikordur. Ayrıca kemoterapi almamış hastaya Dosetaksel ve Transtuzumab birlikte verilmesinin ardından Pertuzumab kullanımı da meme kanserindeki büyümeyi azalttığı gözlemlenmiştir (NCADV, 2017).

2.2 Nanoteknoloji ve İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nano, Yunanca'da “cüce” ya da çok küçük şeyi ifade eden bir terimdir ve bir metrenin milyarda birini (10^{-9} m) ifade eder. Nanobilim ve nanoteknoloji arasında net bir ayrım yapmamız gerekmektedir. Nanobilim, 1 ila 100 nanometre arasındaki ölçekte yapıların ve moleküllerin incelenmesini kapsar. Bu yapıları ve molekülleri pratik uygulamalarda kullanan teknoloji ise nanoteknoloji olarak adlandırılır (Mansoori and Soelaiman, 2005). Karşılaştırma yapıldığında, tek bir insan saçının kalınlığının yaklaşık 60.000 nm olduğu ve DNA çift sarmalının yarıçapının ise yalnızca 1 nm olduğu anlaşılmalıdır (Şekil 2).



Şekil 2.2 Nanomalzeme boyutlarının karşılaştırılması (Gnach et al., 2015).

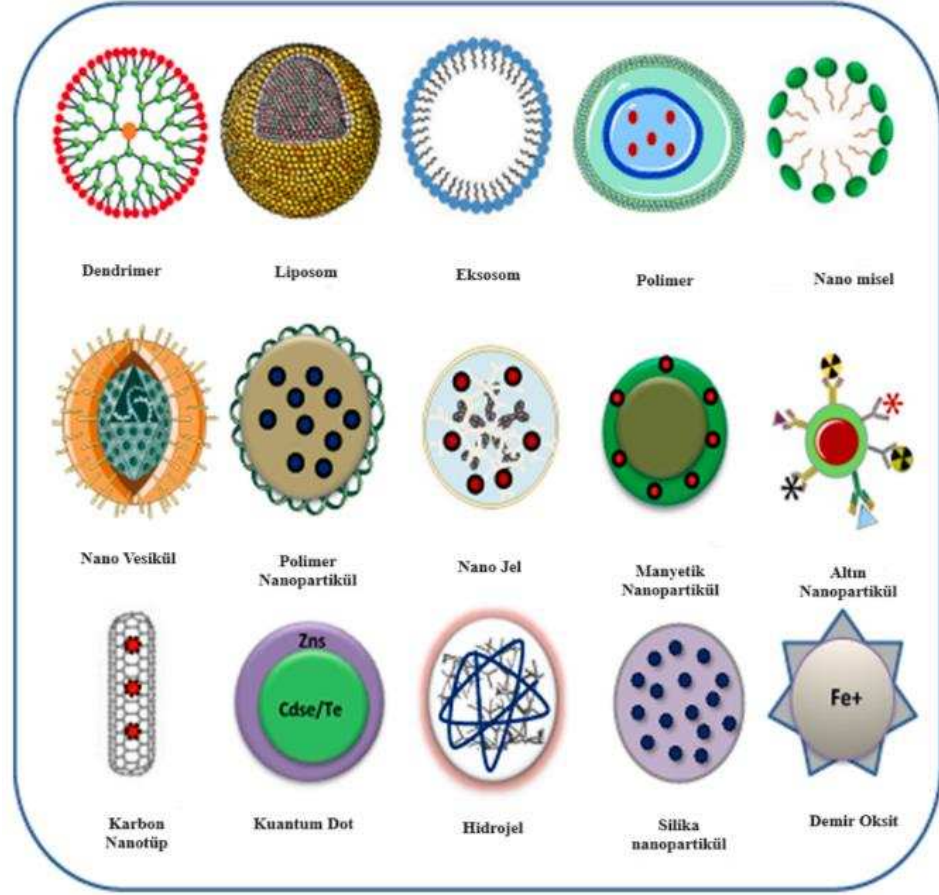
Nanobilim, uygulamalı sağlık, moleküler kimya, moleküler bilim, farmakoloji, optik ve mühendislik gibi geleneksel disiplinlerle iş birliği yaparak maddelerin yeni özelliklerini keşfetmek için bütünleşik bir platform sunar. Son yıllarda, bilim ve teknolojinin entegrasyonu, daha etkili bir sağlık sistemi, nano-tıbbi cihazlar ve terapötik yaklaşımlar sağlayarak tıp ve sağlık bilimlerindeki zorluklara çözüm üretmek amacıyla sıklıkla iyi bir şekilde tasarlanmıştır (Gnach et al., 2015).

Nanoteknolojinin günümüzde insan ve hayvanlar üzerindeki etkisi, sağlık bilimlerinin araştırılması ve dönüştürülmesi için yeni ufuklar açabilir ve terapötik bir araç olarak değerlendirilmesi gereken önemli bir konudur. Nanoteknoloji, atomlar, moleküller ve süpermoleküller gibi biyolojik yapıların mühendisliği amacıyla geliştirilmiş, çok disiplinli bir alandır. Bu teknoloji, yeni cihazlar ve benzersiz özelliklere sahip malzeme yapılarını karakterize ederek mevcut zorluklara karşı umut vaat etmektedir. Bunun yanı sıra, ölümcül biyolojik sorunları incelemek ve anlamak için hastalıkların teşhisi ve tedavisinde de kullanılmaktadır (Sichert et al., 2015). Nanoteknoloji, hücre sinyalizasyonu, metabolizma, enerji üretimi ve besin taşınması gibi hemen hemen tüm biyolojik faaliyetlerde merkezi bir rol oynar. Bu nedenle, nanoteknolojinin terapötik amaçlarla biyoloji ve tıpla etkileşimde bulunarak bireysel madde düzeyinde yenilikçi teknolojiler sunabilecek temel bir aday olduğu kabul edilebilir (Alliance & Heath, 2003; Sahu et al., 2021). Böylelikle, dokuya özgü ilaç hedefleme yaklaşımları, hastalık prognozunu aşmak için strateji seçeneği sunabilir (Veselov et al., 2022).

Nanoteknolojinin amacı, görüntüleme, hastalıkların teşhisi, doku mühendisliği ve daha etkili, uygun maliyetli ve güvenli ilaç dağıtım sistemlerinin tasarımı gibi alanlarda uygulanabilir olmasıdır. İlaç taşıyıcı sistemler, ilaçları hedef bölgelere hassas bir şekilde ileterek, hedef dışı etkileri ve toksisiteleri azaltarak tedavi sonuçlarını hızlandırabilir (Al., 2018). Ayrıca etkin maddenin salım zamanı, yeri ve hızının kontrol edilebileceği formülasyonlardır. Bu sistemler, antikor, peptit, aşı, ilaç ve enzim gibi farmasötik bileşiklerin taşınımını ve etkinliğini artırarak, uygulanmalarını mümkün kılmaktadır (Anselmo and Mitragotri, 2014).

İlaç taşıyıcı sistemler, terapötik maddelerin hidrofobik veya hidrofilik olmasına bakılmaksızın taşınmasında rol oynamaktadırlar (Mi et al., 2012). İlaç taşıyıcılar, taşıma işlemi için çeşitli mekanizmalara sahiptir. Bu mekanizmalar, etkin maddenin nanotaşıyıcı içine elektrostatik, hidrofobik veya hidrojen bağları ile kapatılarak salıverilmesi ve kovalent veya elektrostatik etkileşimlerle nanotaşıyıcı yüzeyine konjugasyonunu içerir (Tüylek, 2019). Polimerler, miseller, dendrimerler, lipozomlar, emülsiyonlar, nanokapsüller ve nanopartiküller gibi nanomalzemelerin

sentezinin optimize edilmesi, günümüzde verimli bir araştırma alanı haline gelmiştir.



Şekil 2.2 Nano ilaç moleküllerinin türleri (Sahu et al., 2021)

İlaç taşıyıcı sistemlerin ve araçların kontrol edilebilirliği, ilacın hedeflenen bölgeye ulaşmasını ve burada etkili olma potansiyelini artırır. Hedef bölge dışında ilaç etkisinin azaltılması, sistemik emilim ve yan etkilerin minimuma indirilmesiyle terapötik indeksin yükseltilmesi mümkündür. Ayrıca, nanotaşıyıcılar, ilacı degradasyona karşı koruma ve hücre içine alımını kolaylaştırma işlevi görmektedir (Guterres et al., 2007).

İlaçların biyodağılımı, terapötik etkinlik ve yan etkiler üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. İlaç taşıyıcı sistemler, ilaçların biyodağılımını iyileştirmenin ve hücre içi alımına yardımcı olmanın yanı sıra bozunmaya karşı koruma sağlar (Belay et al., 2018). Konvansiyonel ilaç taşıma yöntemleri, çoğunlukla hedef dışı etkiler

nedeniyle sağlıklı dokularda ciddi yan etkilere ve toksisiteye yol açabilen çeşitli dezavantajlar sunmaktadır. Nanoteknolojiye dayalı yeni ilaç taşıma sistemleri, yeni ve geliştirilmiş özellikler göstererek istenen terapötik etkinliğe ulaşmak için umut verici çözümler olarak geliştirilmiştir (Bhatia, 2016). Su içinde çözünürlüğü düşük olan hidrofobik ajanların terapötik kullanımlarında, yetersiz emilim ve biyoyararlanım sorunları ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, bu durum ilaç agregasyonu ile ilişkili çeşitli komplikasyonlarla da bağlantılıdır (Kedar et al., 2010).

İlaç taşıyıcı sistemler arasında yer alan ve daha fazla tercih edilen polimerik nanopartiküllerdir. Kontrollü ilaç salımı çalışmalarında etkinliği artırmak ve toksisiteyi önlemek amacıyla kullanılan, yüksek terapötik potansiyele sahip yapı taşlarıdır (Calzoni et al., 2019; Chan et al., 2010). Polimerik nanopartiküllerin avantajları, küçük partikül boyutları nedeniyle hücre içine kolayca girebilmeleridir. Ayrıca, etkin maddenin hedef bölgeye taşınması ve orada kontrollü salımına aracılık etmeleri de önemli avantajlarından. Yapısal özellikleri sayesinde, bu partiküller vücutta yüksek stabiliteye sahip olup biyoparçalanabilirler ve parçalandıklarında toksik olmayan maddeler oluştururlar (Derman et al., 2013).

Nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmasının avantajları şu şekilde sıralanabilir (George & Cyriac, 2017; Soppimath et al., 2001):

- Nanopartiküller, ilacın belirli bir bölgede kontrollü ve uzun süreli salımını sağlayabilir, organlara dağılımını ve sonrasında vücuttan atılımını değiştirebilir. Bu durum, terapötik etkinliği artırırken yan etkileri minimize edebilir.
- Partiküllerin yüzeyine hedefleme ligandlarının eklenmesi veya manyetik hedefleme yöntemlerinin kullanılması ile spesifik yönlendirme sağlanabilir.
- Parenteral uygulamadan sonra, nanopartiküllerin aktif veya pasif hedeflenmesi, partikül boyutu veya yüzey özelliklerinin değiştirilmesi yoluyla kolayca ayarlanabilir.

- İlaç yükleme kapasitesi yüksektir ve ilaçlar herhangi bir kimyasal reaksiyona girmeden sisteme dahil edilebildiği için ilaç aktivitesi korunur.

Farmakolojik olarak aktif maddelerin belirli etki bölgelerinde, kontrollü ve optimum dozda salımını sağlar.

2.2.1 Kanser Tedavisinde Nanopartiküller

Kanser tedavisinde, bir ilaç veya genin tümör bölgesine etkin bir şekilde ulaştırılabilmesi, çeşitli faktörlere bağlıdır. Bu faktörler arasında dolaşım süresi, mononükleer fagositik sistemle etkileşim, dolaşımdan tümör bölgesine geçiş, hedefleme stratejisi, taşıyıcı sistemden salım ve kanser hücreleri tarafından alım yer almaktadır. Kanser tedavisinde ilaç olarak, genellikle alkilleyici ajanlar (örneğin, busulfan), antimetabolitler (örneğin, gemcitabin), antimikrotübül ajanlar (örneğin, paklitaksel, vinkristin), topoizomeraaz inhibitörleri (örneğin, topotekan) ve sitotoksik inhibitörler (örneğin, doksorubisin) gibi küçük moleküllerin kullanımını içerir. Bu sitotoksik moleküller, hızla çoğalan kanser hücrelerini öldürür, ancak aynı zamanda kemik iliği, gastrointestinal kanal ve saç foliküllerindeki diğer bölünen hücreleri de yok eder. Bu durum, bağışıklık sisteminin zayıflaması, gastrointestinal kanalın iltihaplanması ve ülserasyonu ile saç dökülmesi gibi yaygın yan etkilere neden olur. İlaç taşıyıcı sistem olarak nanopartiküller kullanıldığında, sistemik dağılımın istenmeyen yan etkilerini azaltmak, tümör bölgesinde birikimi artırmak ve tedavi etkinliğini iyileştirmek için yeni yöntemler sunar (Dawidczyk et al., 2014).

Kanser tedavisinde, ilaç moleküllerinin maksimum düzeyde kanser hücrelerine odaklanması ve sağlıklı hücreler üzerindeki yan etkilerinin minimize edilmesi, tedavi başarısı için önemlidir. Bu yaklaşım aynı zamanda hastanın yaşam süresi ve kalitesinin artırılması açısından da büyük önem taşır. Tümörler, kapiler vasküler yapılandırmaları sağlıklı dokulardan farklı olarak endoteller arasındaki boşluklarla karakterize edilir. Bu anormal damar yapısı nedeniyle, tümör bölgelerinde kapiler geçirgenlik artmıştır ve bu durum artmış permeasyon ve

retansiyon (EPR) etkisi olarak adlandırılmaktadır. Normal kapilerden daha geçirgen olan tümör dokusu yakınlarına gelen nanopartiküller, bu bölgede ekstravasküler kompartmana geçerek seçici bir şekilde birikebilirler. Nanopartiküller, bu özellikleri sayesinde normal dokularda daha az birikim gösterirler ve kanda daha uzun süre dolaşabilirler. Bu durum, diğer dokuların sitotoksik ajanlarla karşılaşma riskini azaltır (Bazak et al., 2014; Kumari et al., 2016)

2.2.2 Nanopartiküllerin Hedeflendirilmesi

İlaç hedeflemesi, farmakolojik etkinin gerektiği belirli fizyolojik alanlarda, organlarda, dokularda veya hücrelerde seçici ilaç salımı olarak tanımlanır (Yokoyama, 2005). Bir ilaç intravenöz olarak enjekte edildiğinde tüm vücutta eşit olarak dağılır ve terapötik bölgeler dışındaki bölgelere dağıldığında, toksik yan etkilere neden olabilir. Terapötik bölgelere iletimi artırarak ve istenmeyen bölgelere iletimi azaltarak, sırasıyla terapötik ve istenmeyen bölgelerde artırılmış ve azaltılmış ilaç etkisiyle iyileştirilmiş bir terapötik indeks elde edilebilir (Dawidczyk et al., 2014). İlaç hedeflemesi aktif ve pasif hedefleme olmak üzere iki genel yöntemle ayrılır (Yokoyama, 2005).

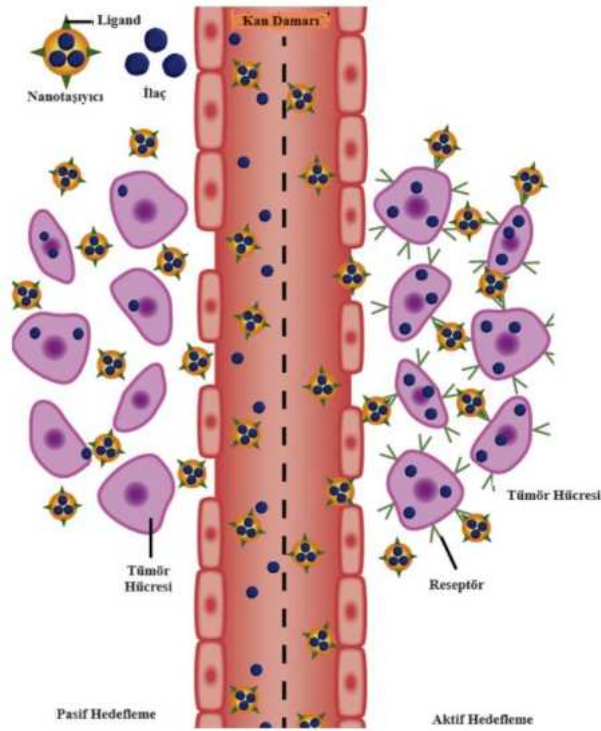
2.2.2.1 Aktif Hedeflendirme

Aktif hedefleme, ilaçların farmakolojik etkinliğinin gerekli olduğu hedef alanlara iletimini artırmak için belirli etkileşimlerin kullanılması anlamına gelir. Bu etkileşimler, antijen-antikor ve ligand-reseptör bağlanmalarını içerir. Ayrıca, manyetik alanlar ve sıcaklık gibi dışarıdan uygulanan fiziksel sinyaller de aktif hedefleme için kullanılabilir (Daniel and Astruc, 2004). Bu metodolojide sınıflandırılan taşıyıcılar arasında antikorlar, transferin, ferrit içeren lipozomlar ve termoreponsif taşıyıcılar yer almaktadır.

2.2.2.2 Pasif Hedeflendirme

Pasif hedefleme, taşıyıcı sistemlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin, bu özellikleri hedef ve hedef olmayan dokuların, organların ve hücrelerin fizyolojik ve

histolojik özelliklerine uyacak şekilde ayarlayarak, iletilen ilacın hedef/hedef olmayan oranını artırdığı bir yöntem olarak tanımlanır. Bu kategoriye giren taşıyıcılar arasında sentetik polimerler, albümin gibi bazı doğal polimerler, lipozomlar, mikro (veya nano) partiküller ve polimerik miseller bulunmaktadır. Pasif hedeflemenin etkileyici özellikleri; hidrofilitik/hidrofobiklik ve pozitif/negatif yük gibi kimyasal faktörler ve boyut/ kütle gibi fiziksel faktörlerdir. Pasif hedefleme, hem hedef olmayan organlar, dokular ve hücrelerle olan spesifik olmayan etkileşimlerin ve iletimin en aza indirilmesi hem de hedefe iletimin maksimize edilmesi yoluyla gerçekleştirilebilir (S. D. Li and Huang, 2008).



Şekil 2.2 Pasif ve aktif hedeflemenin şematik gösterimi (Ajnai vd.,2014)

2.2.3 Nanopartikül Hazırlamada Kullanılan Polimerler

Polimerler, birçok molekülün kimyasal bağlarla düzenli bir şekilde bağlanmasıyla oluşan yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Polimerler, molekül ağırlıkları dağılımı sergileyen makromoleküllerin bir karışımıdır (Ulery et al.,

2011). Polimerleri inceleyebilmek için çeşitli şekilde sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırma türlerine aşağıda örnekler verilmektedir.

Kimyasal Yapıları: Organik ve İnorganik

Kaynak Kökeni: Doğal, Sentetik ve Yarı Sentetik

Yapı: Düz Zincirli, Dallanmış Zincir ve Çapraz Bağlı

Fiziksel Özellikleri: Elastomer, Plastikler ve Elyaf

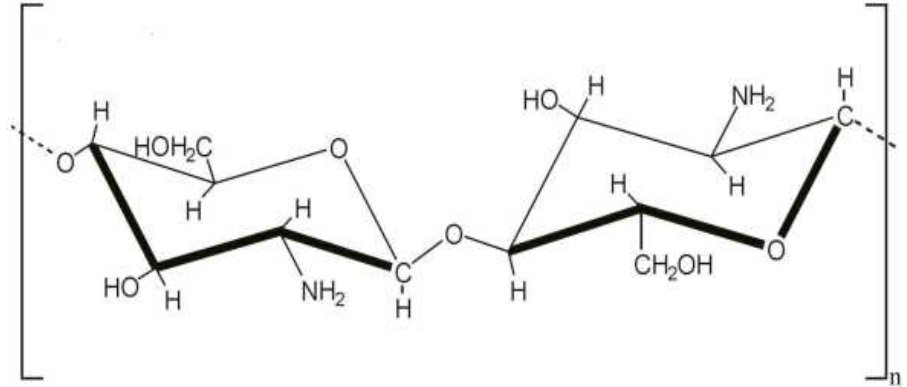
Doğal polimerler, bitki ve hayvan kaynaklarından elde edilen polimerlerdir. Proteinler, selüloz, kitosan ve aljinat gibi malzemeler doğal polimerlere örnektir. Sentetik polimerler ise, insan yapımı olup, plastik en yaygın bilinen ve kullanılan türdür. Yarı sentetik polimerlerin üretiminde doğal polimerler kullanılır, ancak bu polimerler daha fazla kimyasal değişime uğrarlar. Selüloz nitrat ve selüloz asetat'ı örnek verilebilir. Moleküler kuvvete göre gruplandırmaya bakıldığında ise, zayıf etkileşime sahip polimer olarak kauçuk gibi elastomerler, güçlü etkileşime sahip olanlara fiber, orta çekim kuvvetine sahip olanlara termoplastikler verilebilir. (Fakirov, 2019).

Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan polimerleri biyoparçalanabilen doğal ve sentetik polimerler, biyoparçalanabilir olmayan polimerler olarak kategorize edilebilir (Marin et al., 2013). Biyoparçalanabilir polimerlerin en büyük avantajı, degradasyon ürünlerinin genellikle vücuttan kolayca atılabilen toksik olmayan maddeler olmasıdır. Ayrıca, ticari ölçekte üretim sırasındaki manipülasyonlarının zor olması, ayrıca saflaştırma ve tekdüze üretimin sağlanmasında çeşitli zorlukların bulunması mümkündür. Biyoparçalanabilir sentetik polimerler, yük dağılımı, molekül boyutu ve hidrofobisite değişiklikleri gibi özelliklere göre istenilen şekilde sentezlenebilme yetenekleriyle ön plana çıkar. Büyük miktarlarda ve yüksek saflıkta üretilebilmeleri, farklı partiler arasında tutarlı ve tekrarlanabilir özelliklere sahip olmaları ve hazırlama ile depolama koşullarında stabiliteyi korumaları gibi avantajları nedeniyle nanopartiküllerin hazırlanmasında yaygın olarak tercih edilen polimerik materyallerdir.

Biyoparçalanabilen olmayan polimerler ise, uygulandıktan sonra vücutta uzun süre parçalanamayan polimerler olup, toksisite problemlerine neden olmaktadır.

2.2.3.1 Kitosan

Kitosan, kitinin kısmi alkali deasetilasyonu ile elde edilen, rastgele dağılmış β -(1-4)-bağlı d-glukozaminler ve N-asetil-d-glukozaminlerden oluşan, farklı molekül ağırlıklarına (50-200kDa), deasetilasyon derecelerine (%40-98) ve viskozitelere sahip bir polisakkarit kopolimeridir. Kitosan, bazı asitlerin sulu çözeltilerinde ve bazı seçici N-alkilidinasyonlarda çözünür (Lakshmana and Suriyaprakash, 2017). Kitosanda bulunan amino gruplarının pKa değerleri yaklaşık olarak 6,5'tir. Bu sebeple, kitosan pozitif yüklü olup, asidik ve nötr çözeltilerde pH ve deasetillenme derecesine bağlı olarak çözünürlük gösterir (Sarasam et al., 2006).



Şekil 2.1 Kitosanın molekül yapısı (López-García et al., 2014)

Doğada bol miktarda bulunan kitosan ve türevleri, düşük toksisiteleri, biyolojik olarak parçalanabilirlikleri ve uyumlulukları ile antimikrobiyal ve antifungal özellikleri sayesinde ilaç, gıda, kozmetik ve tekstil gibi birçok endüstriyel alanda büyük ilgi gören polimerler arasında yer almaktadır (Ben Amar Cheba, 2011; Singh et al. , 2021).

Kitosanın hem -NH_2 hem de -OH grupları modifikasyon için aktif bölgelerdir (Mohammed et al., 2021). Fakat bu gruplarla kararsız serbest radikallerle reaksiyona girerek bunları stabilize eder ve metal iyonlarını bağlama yeteneği

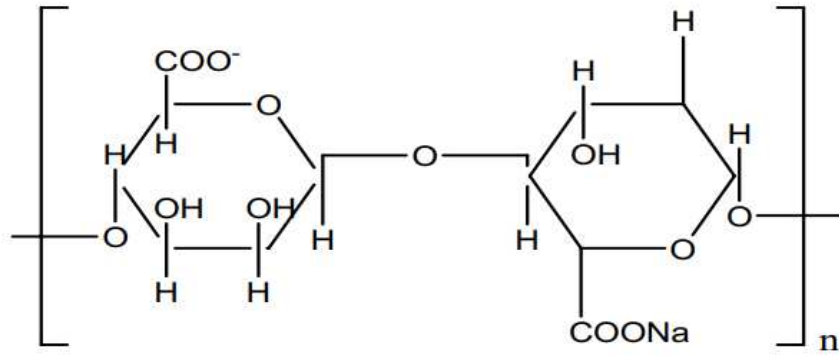
nedeniyle antioksidan aktivite göstermektedir (Yildirim et al., 2016). Kitosanın çözünürlüğü pH 6'nın üzerinde düşük olduğundan, antimikrobiyal özelliği yalnızca asidik çözeltilerde aktivite bulunmuştur (No et al., 2002).

Kitosan nanopartikülleri, onları üstün çevre dostu bir malzeme yapan ve insanlara zarar vermeyen biyoaktiviteye sahip mükemmel fizikokimyasal, antimikrobiyal ve biyolojik özelliklere sahip doğal malzemelerdir (Malmiri et al., 2012). Bu benzersiz özellikler nedeniyle, kitosan nanopartikülleri doku mühendisliği, kanser tanısı, ilaç taşıyıcı sistemleri, enzim immobilizasyonu, antioksidan aktivitesi, su arıtması, antimikrobiyal ajan, tarım gibi çok çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır (Divya and Jisha, 2018).

2.2.3.2 Aljinat

Aljinat, fiziksel ve kimyasal özellikleri incelendiğinde, toksik olmadığı, biyolojik olarak parçalanabilir, düşük maliyetli, kolayca temin edilebilir, mukoadesif, biyouyumlu ve immünojenik olmayan bir maddedir (Tønnesen and Karlsen, 2002). Aljinat, kahverengi algler ve bakteriler tarafından üretilen anyonik bir polimer olup, 1,4-glikozidik bağlarla doğrusal olarak bağlanmış α -L-guluronik asit (G) ve β -D-mannuronik asit (M) kalıntılarından oluşmaktadır. Aljinat, polianyonik yapıya sahip doğal bir polimerdir. Divalent katyonlar (Ca^{+2}) ve polikasyonlar (kitosan, polilisin, polietilenimin) varlığında, sulu çözeltilerde şişme özelliği gösteren polielektrolit jeller oluşturmaktadır (A. Zielinski & Aebischer, 1994).

Aljinat bazlı hidrojeller, biyomedikal uygulamalarda yaygın bir kullanım alanına sahiptir; yara ve yanık örtü materyali, yumuşak ve sert doku dolgu maddeleri, kontrollü ilaç salım sistemleri, üç boyutlu sentetik ekstrasellüler matriksler (ECM) ve doku onarımında destek matrisi olarak kullanılmaktadır (Hoffman, 2012; Mumper et al., 1994; Yang et al., 2001).



Şekil 2.2 Aljinatın molekül yapısı (Homayouni et al., 2007)

Bu polimerin pek çok alanda kullanımını sağlayan özellikleri arasında biyouyumlu olması, düşük toksisite göstermesi, ekonomik olması ve Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} gibi çift değerlikli katyonların varlığında kolayca jel oluşturabilmesi bulunmaktadır. Aljinatın kullanım alanları iki temel özelliğine dayanmaktadır. Birincisi, su içerisinde çözüldüğünde çözeltinin viskozitesini artırabilme kapasitesidir. İkincisi ise jel oluşturma kabiliyetidir.

2.2.4 Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri

Nanopartikül hazırlama yöntemleri seçilen polimerin yapısına ve model ilaç olarak kullanılan etkin maddenin çözünürlük özelliğine göre belirlenmektedir. Hazırlama yöntemlerine ait bazı bilgiler aşağıda verilmektedir:

- ✓ **Çözücü Buharlaştırma Yöntemi:** İlacın enkapsülasyonu için farklı yöntemler mevcuttur. Bu yöntemler ilacın hidrofobik veya hidrofilik özelliğiyle ilişkilidir. Yöntemlerde, su içinde yağ (o/w; w/o/w; o/o/w) veya yağ içinde yağ (o/o) oluşur. Polimer çözündürülmesi için kloroform, diklorometan, etil asetat ve etil format gibi çözücüler kullanılmaktadır. Kapsüllenecek olan ilaç etkin madde süspansiyon, emülsiyon veya çözelti oluşturmak için organik çözücü içinde dağıtılır yada çözülür. Sonraki aşamada ise, organik faz uygun miktarda yüzey etkin madde (stabilizatör) içeren organik çözücüyle

emülsifiye edilir. Emülsiyon stabilize edildikten sonra organik çözücü buharlaştırılır. Küçük partiküllerin boyutlarını elde edebilmek için homojenizasyon ve ultrasonikasyon kullanılabilir (Deshmukh et al., 2016).

- ✓ **Nanoçöktürme Yöntemi:** Bu yöntem çözücü yer değiştirme olarak da bilinmektedir (Fessi et al., 1989). Polimer ve etkin maddenin suyla karışabilen yarı-polar etanol, aseton gibi organik çözücünün içerisinde çözündürüldükten sonra su içerisine bu çözücünün yer değişimi ile polimerin arayüzeyde çökmesi prensibine dayanmaktadır. Nanoçöktürme yönteminde, etkin madde nanopartikül hazırlamadan polimer ile bağlanması, polimerik ortamın içerisine hapsedilmesi yada adsorpsiyonu gibi farklı çalışma yöntemleri geliştirilmiştir (Muthu, 2009).
- ✓ **Tuzla Çöktürme (Salting Out) Yöntemi:** Suyla karışabilen çözücünün tuzlama etkisi ile sulu fazdan ayrılması prensibine dayanır. Polimerler ve ilaç etkin madde, organik faz olarak genellikle suyla karışabilen bir çözücü içinde çözülür. Sulu faz, yüzey aktif maddeyi ve magnezyum klorür, kalsiyum klorür gibi tuz giderici elektrolit maddeyi içerir. Organik faz (yağ fazı) manyetik karıştırma altında sulu faza emülsifiye edilir. Oluşan yağ/su emülsiyonunun difüzyonu sonucunda nanopartiküller elde edilir (Pinto Reis et al., 2006; Wang et al., 2016).
- ✓ **Diyaliz Yöntemi:** Polimer, organik bir çözücüde çözülür ve polimerin molekül ağırlığına göre bir diyaliz tüpü seçilerek, çözelti diyaliz tüpü içine aktarılır. Çözücünün diyaliz yoluyla yer değiştirmesi sonucunda polimer çözünürlüğünü kaybederek kademeli agregasyonu gerçekleşir, böylece nanopartikül süspansiyonu elde edilir (Adeyemi et al., 2023).

- ✓ **İyonik Jelasyon Yöntemi:** İyonotropik jelleşme, belirli koşullar altında iki iyonik tür arasında elektrostatik etkileşimler yoluyla nanopartiküllerin ve mikropartiküllerin üretilmesini sağlayan bir tekniktir. Reaksiyona bir ilaç veya biyo-aktif molekül eklendiğinde, polimerik zincirler arasında sıkışarak nanopartikül/mikropartikül yapısının içine hapsedilebilir. Bu tür bir yöntem, ilacın kontrollü salım yapmasına izin verir ve moleküllerin birlikte kapsüllenmesi, partiküllerin bölgeye özgü işlevselleştirilmesi ve ilacın biyoaktivitesinin artan süreleri gibi başka avantajlar da sunar (Pedroso-Santana and Fleitas-Salazar, 2020).

2.3 İksabepilon (IXA)

İksabepilon, meme kanseri ve küçük hücre dışı akciğer kanseri (NSCLC) dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir ajandır (Leise et al., 2014). Mikrotübülleri hedef alan ilaçlar, antikanser tedavileri arasında en sık reçete edilenlerdendir. Bu tedavilerde kullanılan taksan bazlı ilaçların formülasyon, uygulama ve P-glikoprotein (P-gp) tarafından sağlanan direnç karşı duyarlılık gibi sorunlarına yönelik çözümler geliştirmek amacıyla, yeni antimikrotübül bileşiklerinin klinik değerlendirmesi devam etmektedir. Bu yeni bileşikler arasında, Sorangium cellulosum adı verilen mikrobakterinin fermantasyon suyundan izole edilen ve topraktan türetilmiş yeni bir anti-neoplastik ajan sınıfı olan epotilonlar yer almaktadır (Altmann et al., 2000; Rothermel et al., 2003; Trivedi et al., 2008). Yarı sentetik bir laktam analogu olan İksabepilon (BMS-247550; Bristol-Myers Squibb, Wallingford CT, ABD), epothilone B'nin metabolik olarak daha stabil bir türevi olarak ilk analogu geliştirilmiştir. Paklitaksele dirençli tümör modelleri de dahil olmak üzere çeşitli in-vivo ksenograft kanser modellerinde antitümör aktivitesi göstermiştir (Shimizu et al., 2008).

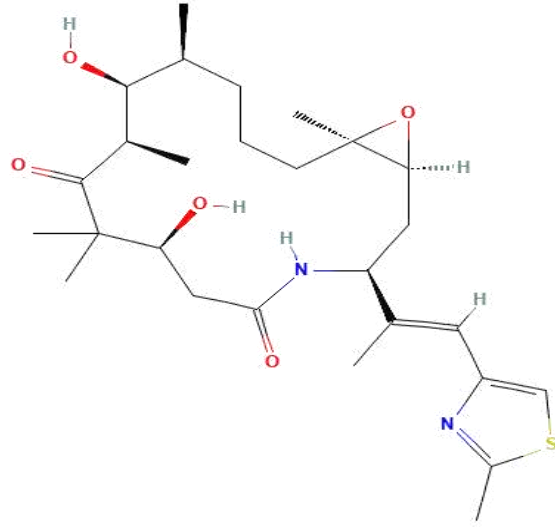
IXA ve taksanlar arasındaki temel farklardan biri, İksabepilonun tümör direnç mekanizmalarına karşı düşük duyarlılığıdır (Shimizu et al., 2008; Tymon-Rosario et al., 2021). Çoklu ilaç direnci (MDR-1) ve çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein (MRP) genlerinin aşırı ekspresyonu, taksanlar ve antrasiklinler de dahil olmak

üzere birçok kemoterapiye karşı hem içsel hem de edinilmiş direncin başlıca nedenidir ve kanser tedavisinde önemli bir zorluk oluşturmaktadır. IXA, çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein, P-glikoprotein ve kemoterapi ilaç direncinde rol oynayan diğer hücre taşıyıcıları için zayıf bir substrat olduğundan, bu yeni anti-neoplastik ajanın konsantrasyonları hedef yerlerinde tutularak, ikabepilonun aktivitesi ile sonuçlanır (Shimizu et al., 2008).

Antrasiklin ve taksanlar, meme kanseri tedavisinde standart olarak kullanılan seçeneklerdir. IXA, metastatik meme kanseri olan ve antrasiklin ile taksan tedavilerine direnç gösteren hastalarda kullanılan, FDA tarafından onaylanmış alternatif bir tedavi seçeneği sağlamaktadır (J. Li, Ren, & Sun, 2017). IXA, farklı meme kanseri türleri üzerindeki çalışmalar sonucunda etkinliği kanıtlanmış bir tedavi seçeneği olup, özellikle östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2-negatif (ER/PR/HER2-negatif, üçlü negatif) veya HER2-pozitif olan hastalar üzerinde yüksek aktivite gösterdiği ortaya konmuştur (Gradishar, 2009).

2.3.1 Fizikokimyasal ve Farmakokinetik Özellikleri

İksabepilonun, kimyasal adı (1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihydroxy-8,8,10,12,16-pentamethyl-3-[(E)-1-(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)prop-1-en-2-yl]-17-oxa-4-azabicyclo[14.1.0]heptadecane-5,9-dione, kimyasal formülü ise $C_{27}H_{42}N_2O_5S$ şeklindedir. Moleküler ağırlığı 506,7 g/mol'dür. IXA suda çözünmezken, inorganik çözümlerde (Dimetilsülfoksit (DMSO), Etanol (EtOH)) çözünür.



Şekil 2.2 İksabepilon'un kimyasal yapısı (National Library of Medicine, 2024)

İksabepilon 40 mg/m² konsantrasyonunda intravenöz yolla 21 günde bir uygulanmaktadır. Uygulanan dozun yaklaşık %86'sı 7 gün içinde dışkı yoluyla atılmaktadır. Protein bağlama kapasitesi %67 ile %77 arasında olup, eliminasyon yarı ömrü 52 saattir.

2.3.2 Etki Mekanizması

IXA, mikrotübül stabilizatörleri olarak bilinen ilaç sınıfına aittir ve Ixempra markası altında pazarlanmaktadır. Bristol-Myers Squibb tarafından geliştirilen IXA, 2007 yılında metastatik veya lokal olarak ilerlemiş meme kanserinin tedavisi için FDA onayı almıştır. IXA, hücre bölünmesinde rol oynayan hücre iskeletinin yapısal bileşenleri olan mikrotübülleri hedef alır (Francis Y.F. Lee et al., 2008). Mikrotübüller, hücre bölünmesinin G2/M fazında mitotik iğ ipliklerinin oluşumundan sorumludur. Mikrotübül yapısının bozulması, mitotik iğ ipliklerinin oluşumunu aksatarak, hücre bölünmesinin durdurulmasına neden olmaktadır (Lopus et al., 2015). IXA etkisini mikrotübüllere bağlanarak ve onları stabilize ederek gösterir, böylece dinamik istikrarsızlıklarını engeller ve hücre bölünmesinin geleneksel seyrini bozar. Sonuç olarak, bu durum hücre döngüsünün durması ve kanser hücrelerinde apoptozun indüklenmesi ile sonuçlanır. Klinik öncesi

alışmalar, IXA'un mikrotüböl dinamiklerini inhibe etme ve meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanser hücre hatlarında hücre ölümünü indükleme yeteneğini göstermiştir (Francis Y.F. Lee et al., 2008; Thomas et al., 2007). IXA, özellikle diğler tedavilerin etkisiz kaldığı durumlarda, meme kanseri ve NSCLC hastaları için ek bir tedavi seçeneğı sağlamıştır. IXA, farklı bağlanma afinitesi nedeniyle taksana dirençli kanserlere karşı gelişmiş etkinlik sunmaktadır (Sun et al., 2024).

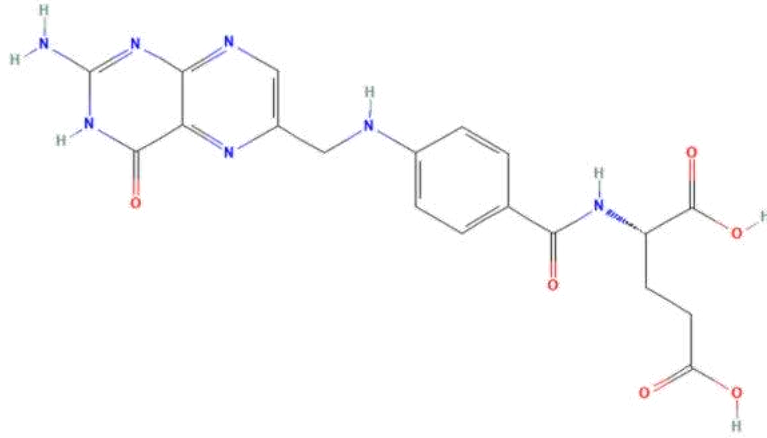
2.3.3 Yan Etkileri

İksabepilonun yaygın yan etkileri arasında miyelosupresyon (nötropeni ve trombositopeni), periferik nöropati, gastrointestinal semptomlar ve diyare yer almaktadır. Tedavi sırasında dikkatli izleme gerektiren ciddi alerjik reaksiyonlar ve nöropati meydana gelebilir (Denduluri & Swain, 2008; Sun et al., 2024).

2.4 Folik Asit

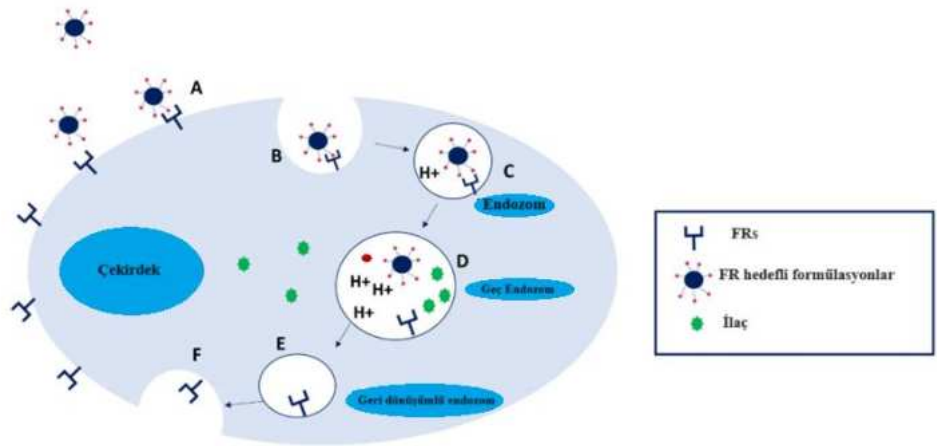
Son yıllarda, hedef hücreler üzerinde seçici olarak etki eden tedavilerin kullanımı önemli ölçüde artmıştır (Arachchige et al., 2015; Siddique and Chow, 2020). İlaçların, terapötik hedeflerde seçiciliğini elde etmek için çeşitli stratejiler kullanılabilir. En çok üzerinde durulan yaklaşımlardan biri, terapötik ajanların hedefleme kısmına veya patolojik hücre, doku ya da organ tarafından spesifik olarak tanınan bir nanotaşıyıcının yüzeyi ile konjuge edilmesidir (Siddique & Chow, 2020; Srinivasarao & Low, 2017). Bu şekilde, antikorlar, peptitler, aptamerler, karbonhidratlar veya vitaminler dahil olmak üzere çok sayıda ligand kullanılmaktadır (Birrer et al., 2019; Merrell and McMurphy, 2022).

Folik asit (pteroyl-L-glutamik asit), özellikle kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir hedefleme ligandır. Folatın (pteroyl-L-glutamat) sentetik formudur, ayrıca B9 vitamini olarak da bilinir. Folik asit ve folat terimlerinin sıklıkla birbirinin yerine kullanıldığı, ancak folik asidin doğada bulunmadığı bilinmelidir. Folik asit, nükleotid sentezine, amino asit metabolizmasına ve fosfolipid biyosentezine katıldığı için DNA replikasyonu ile onarımı ve RNA sentezi için vazgeçilmez olan önemli bir moleküldür (Desai et al., 2016; Frigerio et al., 2019).



Şekil 2.3 Folik asit'in kimyasal yapısı (National Library of Medicine, 2024)

Folik asitin hücre içi alım süreci şekil 2.4'de verilmektedir. (A.) Öncelikle folik asit veya başka bir ligand folat reseptörüne (FRs) bağlanır. (B.) Ardından plazma membranının içine doğru kıvrılması başlar ve (C.) folat reseptörü-ligand konjugatı endosom adlı bir vezikülde çevrelenir. Asidik pH, folat reseptörlerinde konformasyonel değişiklikleri tetikler, ligandın (D.) ve ilacın hücrelere salınmasını ve folat reseptörünün hücre yüzeyine geri dönüşümünü sağlar (E., F.).



Şekil 2.4 Folik asit ve folat reseptörü (FR) hedefli formülasyonların internalizasyonu (Martín-Sabroso et al, 2021)

Kanser tedavilerinde FR'leri hedeflemek için kullanılan iki strateji, FR'lere yüksek afinitesi olan folik asit veya diğer kimyasal varlıkların kullanılması veya

anti-FR monoklonal antikorların kullanılması şeklinde sıralanabilir. Her iki durumda da, kemoterapötik ajan doğrudan FR ligandlarına konjuge edilir veya yüzeyi hedefleme birimi ile modifiye edilmiş bir nanotaşıyıcı içine enkapsüle edilir. Bu, antineoplastiklerin tümör seviyesinde seçici olarak taşınmasını sağlamak, antikanser aktiviteyi artırmak ve kemoterapiye bağlı toksisiteyi azaltma amacı taşımaktadır. Hedefli bir kemoterapötik etki elde etmek için çok sayıda nanoformülasyon geliştirilmiş ve etkinliği değerlendirilmiştir (Frigerio et al., 2019).

2.5 Radyofarmasötikler

Yeni hastalıkların ortaya çıkmasıyla birlikte, yeni biyobelirteçlerin tanımlanması, görüntüleme teknikleri, radyoizotop takibi gibi tanıda birçok ilerleme kaydedildi. Bazı geleneksel teknikler tanı için altın standart olarak kabul edilmeye devam etmektedir; ancak, radyofarmasötiklerdeki gelişmeler, teknikleri daha faydalı, daha az zahmetli, kısa zaman alan, hedefe spesifik hale getirmiştir.

Radyofarmasötikler, tanı ve tedavide kullanılan, radyoaktif maddelerden oluşan farmasötik formülasyonlardır. Radyofarmasötik geliştirme çalışmalarında, ilk önemli basamak, farmasötik bileşenin belirli bir organda tutulacak veya o organın fizyolojik fonksiyonuna katılabilecek olmasıdır. İkinci basamak ise, uygun bir radyonüklid ile kimyasal olarak bağlanabilmesidir. Radyonüklid ile bağlanması işlemi “radyoişaretleme” olarak adlandırılmaktadır. İdeal özellikleri kolay bulunabilirlik, düşük maliyet, optimum biyolojik yarı ömür, kısa radyoaktif yarı ömür, 100 ila 200 keV arasında enerji aralığında gama foton emisyonu, çok düşük partikül emisyonu, elektron yakalama veya izomerik geçişle bozunma ve yüksek hedef-hedef dışı oranıdır. Bu faktörlerin yanısıra radyofarmasötiğin farklı organlarda lokalize olma mekanizması, kısaca organda ya emilmeli ya da bilinen bir yola ile organa dahil olmasıdır (Arano, 2002; Dzik-Jurasz, 2003).

Radyofarmasötiklerin kullanımıyla birden fazla temel uygulama çalışmaları yürütülmektedir. Bilinmeyen nedeni gastrointestinal kanama, karaciğer hemanjiyomu, gastroözofageal reflü çalışması, akciğer perfüzyon ve ventilasyon

çalışması (V/Q taraması), primer ve metastatik tutulumlu nöroendokrin tümörler, kemik metastazı, paratiroid, lenfosintigrafi, sentinel lenf düğümleri ve nörolojik bozukluklar gibi böbrek, kalp, gastrik hastalıkların morfolojik ve fonksiyonel tanısında, pozitron emisyon tomografisi (PET) ve tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi (SPECT) görüntüleme ile bilgisayarlı tomografi'nin (BT) birleştirilmesi gibi görüntüleme cihazları kullanılmaktadır. Ayrıca teranostik yaklaşım olarak ise, hipertiroidizm, tirotoksikoz, tiroid kanseri, feokromositoma ve bazı endokrin bozukluklarda (prostat kanseri ve nöroendokrin tümörler gibi) radyonüklid tedavisi kullanılmaktadır (Oyen et al., 2007). Farklı tümörlerde hastanın tedaviye yanıtının öngörüsü kullanılarak etkisiz tedavilerin yan etkilerini/toksisitesini azaltır ve alternatif, daha spesifik, etkili tedavilerin ortaya çıkmasına yardımcı olmaktadır (Bockisch et al., 2009).

Günümüzde moleküler görüntülemelerde Teknesyum-99m (^{99m}Tc), Talyum-201 (^{201}Tl), Floro-18 (^{18}F), Galyum-67 (^{67}Ga), Galyum-68 (^{68}Ga), İyot-123 (^{123}I), İyot-131 (^{131}I), Azot-13 (^{13}N), Rubidyum-82 (^{82}Rb), İndiyum-111 (^{111}In), Oksijen-15 (^{15}O) ve Karbon-11 (^{11}C) radyonüklidleri gibi radyofarmasötikler kullanılmaktadır. Fakat hedef yönelimi, uyumluluğu, yarılanma süresi ve diğer fizikokimyasal özellikleri nedeniyle ^{99m}Tc görüntüleme ajanlarının en önemli üyesi olarak kabul edilir.

2.5.1 Teknesyum-99m

Teknesyum (^{99}Tc), periyodik tablonun VIIB grubunda bulunan, atom numarası “43” ve kütle numarası “99” olan yapay bir geçiş metalidir. Kovalent bağlanması nedeniyle çok yönlü bir kimyaya sahiptir, çünkü perteknetat -1'den +7'ye kadar değişen 8 farklı oksidasyon durumunda bulunur (Alberto, 2023). En karmaşık ve kararsız oksidasyon durumu Tc +5'tir. ^{99m}Tc , Molibden (Mo-99) ve ^{99}Tc 'un ara formu olup, metastabil form olarak adlandırılır ve ^{99}Tc ile benzer kimyasal ve fiziksel özelliklere sahiptir.

Teknesyum-99m (^{99m}Tc), perteknetat formunda +7 oksidasyon durumu ile bulunur ve çeşitli kimyasal bileşikler veya biyomoleküllerle koordineli kovalent

bağlar oluşturur. Bu özellikleri sayesinde, farklı farmakodinamik özellikler sergileyerek birden fazla klinik çalışmada kullanılabilmektedir. Nükleer tıbbın önemli bir bileşeni olan ^{99m}Tc işaretli radyofarmasötikler, çeşitli organların görüntülenmesi, enfeksiyonların veya tümörlerin farklı biyomoleküller aracılığıyla lokalizasyonu için gama görüntüleme radyonüklidi olarak işlev görür. Gama nükleer görüntülemenin ideal bir radyoizleyicisi olan ^{99m}Tc , inert bir radyonüklid olarak kullanılır, ayrıca tanısal ajan olarak biyomolekülleri işaretlenebilmektedir. ^{99m}Tc , 140 keV gama foton emisyonuna ve 6,04 saatlik radyoaktif yarı ömre sahiptir ve bu nedenle radyokimyasal ve radyonüklid analizleri için idealdir (Banerjee et al., 2001).

2.6 Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü, yeni moleküllerin ve işlevlerinin keşfinden, potansiyel ilaçların yüksek verimli testlerine kadar incelemeleri içeren çalışmalardır. Hücre kültürü, hücrelerin laboratuvar ortamında kontrollü koşullar altında yetiştirilmesi sürecidir. Bu teknik, araştırmalarda, biyoteknolojide ve ilaç geliştirmede yaygın olarak kullanılır. Hücre kültürü ile hücrelerin büyüme, farklılaşma ve genetik özellikleri üzerinde çalışılabilir. Ayrıca, çeşitli hastalıkların mekanizmalarını anlamak ve tedavi yöntemleri geliştirmek için de önemli bir araçtır (Freshney, 2010; Van der Valk et al.,2010).

Hücre kültürü çalışmalarının yer aldığı temel çalışmalar ve uygulama aşağıda verildiği şekilde sıralanabilir (Freshney, 2010; Harrison et al.,2011; Liu et al., 2018; Rouwkema et al.2008).

-Temel Araştırmalar:

- **Hücre Büyümesi ve Farklılaşma:** Farklı büyüme faktörleri ve ortam koşullarının hücrelerin büyümesine etkisi incelenir.
- **Genetik Araştırmalar:** Gen ekspresyonu ve genetik modifikasyon çalışmaları yapılır.

-Hastalık Modelleri:

- **Kanser Araştırmaları:** Kanser hücre hatları kullanılarak tümör biyolojisi ve tedavi yöntemleri üzerine çalışmalar yapılır.
- **Enfeksiyon Modelleri:** Virüs ve bakterilerin hücelere etkisi incelenir.

- İlaç Geliştirme:

- **Toksisite Testleri:** Yeni ilaçların hücre üzerindeki toksik etkileri değerlendirilebilir.
- **Etkililik Testleri:** İlaçların hedef hücreler üzerindeki etkileri araştırılır.

-Doku Mühendisliği:

- **Hücre Şablonları:** Hücrelerin belirli bir doku yapısını oluşturmak için kullanılması.
- **Rejeneratif Tıp:** Hasar görmüş dokuların yenilenmesi için hücre kültürü teknikleri uygulanır.

-Aşı Geliştirme:

- Aşıların etkinliğini test etmek ve virüslerin hücre kültüründe çoğaltılması.

Hücre kültürü çalışmalarının avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Hücrelerin büyüme koşulları (sıcaklık, pH, besin maddeleri) kontrol edilebilir olması tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesini, in-vitro ortamda gerçekte içi için, hayvan deneylerine göre daha az etik sorun içermesi, hücre hatları oluşturulabilir olması araştırmacılara sürekli olarak kullanılabilecek bir kaynak sağlaması gibi hücre kültürü çalışmalarının avantajları arasında sıralanabilir. Hücre kültürü çalışmalarının dezavantajları ise; hücreler doğal ortamlarından uzakta, farklı bir ortamda yetiştirildiklerinde davranışlarının değişebilmesi, özel besin ortamları ve ekipman gereksinimleri ile maliyetin artması, bakteri, maya veya diğer kontaminasyonlar hücre kültürü çalışmalarını olumsuz etkileyebilmesi, bazı hücre türlerinin laboratuvar ortamında uzun süre yaşayamaması ve çoğalamaması şeklinde sıralanabilir (Freshney, 2010; Van der Valk et al., 2010; Lee et al., 2015; SPWLA et al.2019).

2.6.1 MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücreleri

MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hatları, meme kanseri araştırmalarında yaygın olarak kullanılan iki farklı hücre hattıdır. MCF-7 hücreleri, meme kanseri dokusundan izole edilmişken, MDA-MB-231 hücreleri ise, metastatik meme kanseri dokusundan elde edilmiştir. MCF-7 hücreleri yavaş büyüyen, MDA-MB-231 hücreleri ise, daha agresif ve hızlı büyüyen bir hücre hattı olarak bilinmektedir. MDA-MB-231 hücreleri folat reseptörünü MCF-7 hücrelerinden daha fazla eksprese ettiği belirtilmektedir. Her iki hücre hattı da kanser tedavisi, biyomarker keşfi ve ilaç etkileşimleri üzerine birçok çalışmada kullanılmaktadır (LSK et al., 2011; SMB et al., 2018; ACS et al., 2016).

2.7 Deneysel Hayvan Modelleri

Hayvanlar, özellikle kemirgenler, insanlarla biyolojik benzerlikleri nedeniyle, araştırmacılar tarafından çevresel ksenobiyotiklerden kaynaklanan tehlikeleri tanımlamak ve değerlendirmek için en yaygın kullanılan modellerdir. Ayrıca çeşitli biyolojik olayların altında yatan mekanizmanın anlaşılmasına, hastalık patogenezi ile ilişkili moleküler, hücresel ve histolojik değişikliklerin açıklanmasına ve insanlara uygulanmadan önce ilk ilaç taramasına yardımcı olurlar. Deneysel hayvan modelleri, insan kanserlerinin özelliklerinin açıklanmasında, antikanser ilaçlarının klinik öncesi test edilmesinde ve çeşitli ürünlerin kemopreventif potansiyelinin değerlendirilmesinde hayati öneme sahiptir. Kimyasal, fiziksel, viral, genetik manipülasyon ve greft nakli kullanılarak bir dizi insan kanseri hayvan modeli geliştirilmiştir. Bu modeller, çeşitli antikanser ilaçlarının ve kanser kemopreventif çalışmalarının terapötik potansiyelini değerlendirmek için klinik öncesi çalışmalarda yaygın olarak kullanılır. Kanser gelişiminin çok aşamalı ve karmaşık doğasındaki ilk atılım bir hayvan modelinde ortaya konmuştur (DIGIOVANNI, 1992). Ayrıca, hücresel, moleküler ve histolojik değişikliklerin açıklanması da insan kanserlerinin hayvan modelleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hasta örneklerinden elde edilen hücre hatları veya dokular değişik deney hayvanlarına uygulanarak çalışmaların doğasına uygun olarak in-vivo model geliştirilmiştir (Yee et al. 2015; Zhang et al., 2011; Navarro et al., 2018).

Çeşitli insan malignitelerinin ilerlemesini ve gelişimini incelemek için viral veya kimyasal olarak indüklenen hayvan modelleri hazırlanmıştır (Yee et al. 2015).

Hayvan modeli kullanılarak çeşitli çalışmalar yürütülmüştür ve bu çalışmaların sonuçları, dönüşüm ve tümör gelişiminde yer alan mekanizmaların keşfini kolaylaştırmıştır. Hayvan modelleri kullanılarak yapılan klinik öncesi çalışmalar, terapötik ajanların toksisitesinin yanı sıra kanser tedavisinin yönetimi için terapötik etkinliklerinin belirlenmesine de yardımcı olmuştur (Uddin et al.,2011). İnsan malignitelerini incelemek için hayvan modelleri geliştirmede büyük ilerlemeler kaydedilmiştir.

Fare, genetik ve fizyolojik olarak insanlara benzediği için insan malignitelerinin patogenezinin araştırılması için mükemmel bir modeldir (Yee et al. 2015; Ishida 2017). Ayrıca, bu hayvanların daha kısa bir gebelik süresi ve yaşam süresi vardır. Farelerde genetik modifikasyonlar için çeşitli ileri teknolojiler geliştirilmiştir. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre dizilerinin her ikisi de folat reseptörünü eksprese etmesine rağmen, MDA-MB-231 hücreleri folat reseptörünü MCF-7 hücrelerinden daha fazla eksprese eder.

2.8 Optik Görüntüleme Yöntemi

Optik görüntüleme, fotonların ışığını hafifleten ve hücresel ve moleküler bileşenleri (organlar, dokular ve hücreler) izlemede önemli ve güçlü bir rol oynayan invaziv olmayan bir görüntüleme yöntemidir (Guy Cox, 2012). Bir hastalığın ilerlemesini veya tedavi sonuçlarını değerlendirmek için iyonlaştırıcı olmayan radyasyon kullanılması nedeniyle hızlı, makul, güvenilir, invaziv olmayan, güçlü ve güvenli bir tekniktir. Optik görüntüleme, farklı yumuşak doku emilimi ve saçılma ışığı nedeniyle, işaretleyici görevi gören metabolik değişikliklerle dokudaki anormalliği ölçebilir. Biyoluminesans, Floresans ve Çerenkov luminesans görüntüleme, küçük hayvan görüntüleme için benzersiz özellikler sağlar. Bioluminesans görüntüleme (BLI), hayvanlara transfeksiyon veya transdüksiyon yoluyla biyolojik hedeflerin anormalliği ve hücre davranışı ve tümör hücrelerinin anormalliklerinin ilerlemesi gibi biyolojik bozuklukları değerlendirmek için hayvan dokularından yüksek çözünürlüklü görüntüler üretmek için lüsiferaz enzimini kullanır. Transfeksiyon, bir genin kimyasal veya fiziksel

araçlarla hücreye iletilmesini içerirken, transdüksiyon bu gen odaklı lüminesans probunu viral ajan aracılığıyla enjekte eder. Çerenkov lüminesans görüntüleme (CLI), yeterli enerjiye sahip yüklü parçacıkları (radyoaktif bozunma ile üretilen bir β parçacığı) Çerenkov ışığı oluşmasına neden olmaktadır. Bu ışın yeni makul bir optik görüntüleme yöntemi olarak deney hayvanlarının görüntülenmesi çalışmalarında kullanılmaktadır. Diğer yöntemlerle tespit edilemeyen beklenmeyen bozuklukları tespit etmek için avantajlar sağlamaktadır (Wei & Gu, 2021).

2.8.1 *In-vivo* Floresans Görüntüleme

19. yüzyılın ortalarında bir bilimsel çalışmada George Gabriel Stokes, floresansı, floresan boyaları ve floresan mikroskopunun icadını gerçekleştirmiştir (Valeur & Berberan-Santos, 2011). Floresan, uyarılmış seviyeden temel seviyeye dönen bir uyarım foton demetinin (yüksek enerjili, daha kısa dalga boylu) absorplamasını yapan ışık emisyonudur. Hayvan modellerinde biyolojik hedefleri, mekanizmaları ve işlevsel süreçleri tespit etmek için kullanılmaktadır. Floresan görüntüleme, yüksek uyarılma durumuna geçebilmek için bir moleküler prob ve bir ön uyarılma ışık kaynağı gerektirir. Problar, uyarılma durumlarından sonra daha düşük enerjili ve daha uzun dalga boyuna sahip fotonlar (probun ışığı) yayabilecek elektronlarla çevrilidir. Probdan yayılan bu ışığın tespiti, yüksek hassasiyete sahip (CCD) kamera tarafından gerçekleştirilir ve tespit edilmesi gereken hayvan vücudunun herhangi bir kısmı hakkında ayrıntılı bilgi verir. Floresan görüntülemeye, endojen moleküller (kollajen veya hemoglobin gibi), floresan proteinler (yeşil floresan protein [GFP] ve ilgili moleküller) veya floresan moleküller optik kontrast olarak kullanılabilir. Tüm bu optik kontrastlar, küçük hayvanlarda hücresel ve moleküler görüntüler elde etmek için kullanılır (Hassan et al., 2007; Lakowicz, 2006).

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Kimyasal Madde, Araç ve Gereçler

Tablo 3-1 Kullanılan kimyasal malzemeler

Madde Adı	Firma
Aseton	Carlo Erba
Asetonitril	Carlo Erba
Aljinat	Sigma-Aldrich
Disodyum Hidrojen Fosfat	Merck
1-(3-Dimetilaminopropil)-3-etilkarbodiimid hidroklorür (EDC)	Sigma-Aldrich
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dimetil sülfoksit (DMSO), Hücre Kültürü	Santa Cruz
3-[4,5-dimetil tiyazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT)	ChemCruz
IRDye®-800 rs	LI-COR
Etanol	Carlo Erba
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biowest
Folik Asit	Aromel Kimya Medikal AŞ.
Glasiyel Asetik Asit	Merck
Hidroklorik Asit	Fluka
İksabepilon	MedChemExpress
1,1-Kabonildiimidazol (CDI)	Sigma-Aldrich
Kalsiyum Klorür	AFG
Kitosan (Low molecular weight)	Sigma-Aldrich
MEM-Eagle Non-esansiyal amino asit	Capricorn
Minimum Essential Medium (MEM)	Capricorn
N-hidroksi süksinimid (NHS)	Sigma-Aldrich
Penisilin streptomisin	Capricorn

Potasyum dihidrojen fosfat	Merck
IVISense Vascular Fluorescent Receptor 680 prob	Perkin Elmer
Sodyum dihidrojen fosfat	Merck
Sodyum Hidroksit	Merck
Sodyum karbonat	AFG
Sodyum pürivat	Biowest
Tetrabütülamonyumhidroksit	Sigma-Aldrich
Tetra-n-butilamonyum florür (TBAF)	Merck
Tripolifosfat	Thermo Fisher Scientific
Trypan Blue Çözeltisi	Sigma Aldrich
Tripsin-EDTA	Capricorn

Tablo 3-2 Kullanılan araç ve gereçler

Araç ve Gereç	Marka, Model
Diyaliz membran 14kDa	Sigma Aldrich, 14kDa
Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR)	Shimadzu, IR Tracer -100
Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM)	Jeol, Japonya
Hassas Terazî	Mettler Toledo, ML204/01
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	Shimadzu, LC 20 AT
HPLC Kolon	Ace, C18 5µm 4.6 x 250 mm
HPLC Kolon	Hichrom, C18 5µm 4.6 x 250 mm
Hücre Kültürü Flaskaları- 75cm ² ve 25 cm ²	Nest
<i>In-Vivo</i> Imaging Spektrum (IVIS)	Perkin Elmer
İnverted Mikroskop	ZEISS
Laminer hava akımlı kabin	Nuve, Class II BSC
Liyofilizatör	Telstar, LyoQuest
Manyetik Karıştırıcı	Heindolph, Almanya

Mikroplate Okuyucu	POLARstar Omega
Neubauer Lamı	Superior
Nükleer Manyetik Rezonans (1H-NMR)	Agilent, MERCURYplusAS 400
Pastör pipet	Superior
pH metre	Mettler Toledo, Seven Multi
Stabilite Kabini (25± 2 °C % 60 ± 5)	Nüve, TK-600
Stabilite Kabini (40± 2 °C % 75 ± 5)	Nüve, TK-600
Serolojik pipet-10mL, 5mL, 2mL	Nest
Taramalı Elektron Mikroskop (SEM)	Zeiss, Gemini 500
Termogravimetrik Analiz	Perkin Elmer-Pyris Diamond
Ultrasonik banyo	Hydroultrasonic, US-10
Well plate (96'lı)	Nest
X-Işını Difraksiyon Spektroskopisi (XRD)	Malvern, ULTRA Ref Unit
Zetasizer	Malvern, ULTRA Ref Unit

3.2 Yöntem

3.2.1 Etkin Madde (İksabepilon) Analitik Yöntem Validasyonu

Etkin madde miktarının belirlenmesi, analitik yöntem validasyonunun gereklilikleri ile kabul kriterlerinin saptanması ve metodun etkinliğinin ispatlanmasıdır. Bu nedenle tez çalışmamızda Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi’de (USP) (Contents, 2020) verilen yöntem parametreleri ile literatür verileri göz önünde bulundurularak yeni bir metot geliştirildi. Metoda ait yöntem parametreleri Tablo-1’de verilmektedir. İksabepilon (IXA) etkin maddesinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography (HPLC)) yöntem validasyonu etanol ortamında ve salım çalışmalarında kullanılacak olan pH 5,5, 6,5 ve 7,4 tampon ortamlarında da gerçekleştirildi.

3.2.1.1 Tampon Çözeltilerinin Hazırlanışı

Fosfat tamponu (pH 5,5) hazırlanışı: 13,61 g potasyum dihidrojen fosfat tartılıp 1000 mL’lik balon jojeye aktarıldı ve üzerine distile su eklenerek çözündürme işlemi gerçekleştirildi (A çözeltisi). 35,81 g disodyum hidrojen fosfat tartılıp 1000 ml distile su içerisinde çözündürüldü (B çözeltisi). %96,4 A çözeltisi ve %3,6 B çözeltisi karıştırılıp, pH’ı kontrol edildi (European Pharmacopeia, 7.0).

Fosfat tamponu (pH 6,5) hazırlanışı: 2,75 g sodyum dihidrojen fosfat ve 4,5 g sodyum klorür tartılarak 500 mL’lik balon jojeye aktarıldı ve üzerine distile su eklenerek çözelti hazırlandı, pH kontrolü yapıldı (pH 8,5 fosfat tamponu ile pH ayarı yapıldı (European Pharmacopeia, 7.0)).

Fosfat tamponu (pH 7,5) hazırlanışı: Hazır fosfat tampon tabletlerinden (Sigma Aldrich) bir tane alınarak 100 mL balon jojeyede distile su ile çözündürme işlemi gerçekleştirildi. pH kontrolü yapıldı (European Pharmacopeia, 2005).

10 mM Potasyum dihidrojen fosfat tamponu hazırlanması: 1,36 g potasyum dihidrojen fosfat 1000 mL’lik balonjojeye aktarılıp belli bir miktar saf su eklendi ve ultrasonik banyo yardımıyla çözündürüldü. Sodyum hidroksit ile pH 5,0’e ayarlanıp, hacmine tamamlandı. Ultrasonik banyoda 10 dk. degaze işlemi yapıldı.

Tablo 3-3 Analitik yöntem validasyon parametreleri

Cihaz	HPLC
Dedektör	PDA
Kolon	HiChrom C18 5µm 4.6 x 250 mm
Dalga Boyu	240 nm
Akış Hızı	1,0 mL/dk.
Enjeksiyon Hacmi	10,0 µL
Analiz Süresi	15 dk.
Kolon Sıcaklığı	25°C
Tray sıcaklığı	4°C
Mobil Faz	Potasyum dihidrojen fosfat tamponu (pH:5) / Asetonitril (%60/%40)
Çalışma Türü	İzokretik
Çözücüler	Etanol (Stok) Seyreltmeler: pH 5,5, 6,5 ve 7,5

3.2.1.2 Standart ve Numune Çözeltilerinin Hazırlanışı

Standart Çözeltilerinin Hazırlanışı: 5 mg IXA standardı hassas bir şekilde tartıldı ve 50,0 mL’lik balon jojeye aktarıldı. Etanol çözücü eklenerek çözündürüldü ve hacmine tamamlandı (C İksabepilon = 0,100 mg/mL) (**Ana stok çözelti**).

Ana stok standart çözeltisinden 1,0 mL alınarak, etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,4 çözeltileri ile 10 mL’lik balon jodede ayrı ayrı hacmine tamamlandı ve HPLC cihazına enjekte edildi (C İksabepilon = 0,010 mg/mL).

Numune Çözeltilisinin Hazırlanması: 5 mg IXA numunesi hassas bir şekilde tartıldı ve 50,0 mL’lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine etanol eklenerek hazırlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak etanol, pH değeri 5,5, 6,5 ve 7,4 çözeltileri ile 10 mL’lik balon jodede ayrı ayrı hacmine tamamlanıp, HPLC cihazına enjekte edildi (C İksabepilon = 0,010 mg/mL). Eşitlik 1’e göre hesaplandı.

$$\% \text{ İksabepilon} = \frac{AT}{AS} \times \left(\frac{W_S}{50 \text{ mL}} \times P_1 \right) \times \left(\frac{50 \text{ mL}}{W_T} \times P_2 \right) \times 100 \quad (1)$$

AT : Numune çözeltisinden elde edilen HPLC kromatogramındaki IXA pik alanı

AS : Standart çözeltisinden elde edilen HPLC kromatogramındaki IXA pik alanı

W_T : IXA numune tartımı (mg)

W_S : IXA referans standardının tartımı (mg)

P₁: IXA çalışma standardının saflığı

P₂ : IXA numune saflığı

3.2.1.3 Seçicilik

Bir analitik yöntemin seçiciliği, analiz edilen bileşik veya bileşikleri, numune içerisindeki olası diğer maddelerin varlığında tespit edebilme kapasitesidir. Olası bir girişim için test edilmelidir. Bu amaçla İksabepilon standart çözeltisi ve çözücü enjeksiyonu yapılarak HPLC kromatogramları incelendi.

3.2.1.4 Doğrusallık

Bir analitik yöntemin seçiciliği, analiz edilen bileşik veya bileşikleri, numune içerisindeki olası diğer maddelerin varlığında tespit edebilme kapasitesidir. Bu amaçla aşağıdaki konsantrasyonları belirtilen örneklerden 3'er enjeksiyon yapıldı.

%25 Konsantrasyonda IXA çözelti: Hazırlanan IXA standart çözeltisinden 0,25 mL alınarak, etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,4 çözeltileri ile 10 mL'lik balon jojede ayrı ayrı hacmine tamamlanıp, HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{İksabepilon} = 0,0025$ mg/mL).

%50 Konsantrasyonda IXA Çözelti: Hazırlanan IXA standart çözeltisinden 0,50 mL alınarak, etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,4 çözeltileri ile 10 mL'lik balon jojede ayrı ayrı hacmine tamamlanıp, HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{İksabepilon} = 0,0050$ mg/mL).

%80 Konsantrasyonda IXA Çözelti: Hazırlanan IXA standart çözeltisinden 0,80 mL alınarak, etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,4 çözeltileri ile 10 mL'lik balon jojede ayrı

ayrı hacmine tamamlanıp, HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{\text{İksabepilon}} = 0,0080$ mg/mL).

%100 Konsantrasyonda IXA Çözelti: Hazırlanan IXA standart çözeltisinden 1,00 mL alınarak, etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,4 çözeltileri ile 10 mL'lik balon jodede ayrı ayrı hacmine tamamlanıp, HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{\text{İksabepilon}} = 0,0100$ mg/mL).

%120 Konsantrasyonda IXA Çözelti: Hazırlanan IXA standart çözeltisinden 1,20 mL alınarak, etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,4 çözeltileri ile 10 mL'lik balon jodede ayrı ayrı hacmine tamamlanıp, HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{\text{İksabepilon}} = 0,0120$ mg/mL).

%160 Konsantrasyonda IXA Çözelti: Hazırlanan IXA standart çözeltisinden 1,40 mL alınarak, etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,4 çözeltileri ile 10 mL'lik balon jodede ayrı ayrı hacmine tamamlanıp, HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{\text{İksabepilon}} = 0,0160$ mg/mL).

IXA etkin madde konsantrasyonları ile HPLC cihazından okunan pik alanlarına karşı grafiği çizilerek, regresyon doğrusu ($y=mx+n$) hesaplandı; korelasyon katsayıları, y-kesişim noktaları ve eğimler değerlendirildi.

3.2.1.5 Çalışma Aralığı

Çalışılan analitik yöntemin doğru, kesin ve lineer sonuçlar verdiği alt ve üst konsantrasyon aralığıdır. Çalışma aralığı parametresi için IXA standartının etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,5 çözücüleri ile hazırlanan %25 ve %160 konsantrasyonlarındaki çözeltileri altı tekrarlı olarak HPLC cihazına enjekte edildi.

3.2.1.6 Gözlenebilirlik (LOD) ve Ölçme Sınırı (LOQ)

Örnekte tayin edilecek bileşenin tespit edilebilen en küçük konsantrasyonu gözlenebilirlik (LOD), bileşenin uygun doğruluk ve kesinlik ile tayin edilebilen en küçük konsantrasyonu ise, ölçme sınırı (LOQ) olarak tanımlanmaktadır. Bu amaçla %100 konsantrasyonda IXA çözeltisi, etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,5 çözeltileri ile hazırlanarak enjekte edildi. HPLC cihazına sinyal/gürültü hesabı yaptırıldı. S/N ortalaması alındı ve LOD - LOQ değerleri tüm çözücü ortamları için bulundu (S:

simyal, N: Gürültü). Eşitlik 2 ve Eşitlik 3 kullanılarak LOD ve LOQ değerleri hesaplandı.

$$\text{LOD} = S/N \times 3,3 \quad (2)$$

$$\text{LOQ} = S/N \times 10,0 \quad (3)$$

3.2.1.7 Doğruluk

Doğruluk, HPLC metodu ile test edilen analiz sonuçlarının gerçek sonuçlara olan yakınlığıdır. %80, %100 ve %120 konsantrasyonlarında IXA çözeltileri hazırlanarak, HPLC cihazına enjekte edildi.

%80 Konsantrasyonda Numune Çözeltisi: 8 mg IXA tartıldı ve 100 mL'lik balonjojeye aktarıldı. Üzerine çözücü etanol eklenerek çözündürüldü ve hacmine tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,4 çözeltileri ile 10 mL'lik balon jodede ayrı ayrı hacmine tamamlanıp, HPLC cihazına enjekte edildi. ($C_{\text{İksabepilon}} = 0,0080 \text{ mg/mL}$).

%100 Konsantrasyonda Numune Çözeltisi: 10 mg IXA tartıldı ve 100 'ik balonjojeye aktarıldı. Üzerine çözücü etanol eklenerek çözündürüldü ve hacmine tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,4 çözeltileri ile 10 mL'lik balon jodede ayrı ayrı hacmine tamamlanıp, HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{\text{İksabepilon}} = 0,0100 \text{ mg/mL}$).

%120 Konsantrasyonda Numune Çözeltisi: 12 mg IXA tartıldı ve 100 mL'lik balonjojeye aktarıldı. Üzerine çözücü etanol eklenerek çözündürdü ve hacmine tamamlandı. Bu çözeltiden 1.0 mL alınarak etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,4 çözeltileri ile 10 mL'lik balon jodede ayrı ayrı hacmine tamamlanıp, HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{\text{İksabepilon}} = 0,0120 \text{ mg/mL}$).

3.2.1.8 Kesinlik

Analitik metodun kesinliğinin kanıtlanabilmesi için, belirlenen koşullarda hazırlanan numuneler üzerinde çalışma yapılır. Elde edilen sonuçlar birbiriyle uyumlu olması beklenmektedir. Seri ölçümlerin; korelasyon katsayısı, relatif standart sapması, standart sapması veya güven aralığı ile ifade edilir. Bu metotta;

- Sistem Kesinliği
- Tekrarlanabilirlik
- Laboratuvar İçi Kesinlik parametreleri çalışıldı.

➤ **Tekrarlanabilirlik:**

Tekrarlanabilirlik, metodun 6 farklı numunenin çalışma şartlarında elde edilen sonuçların birbirlerine yakınlık derecesinin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Bu amaçla, numuneler etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,5 ortamlarında hazırlandı. Her numuneden 2'şer enjeksiyon verildi. Numune çözeltilerindeki IXA miktarı % olarak hesaplandı.

➤ **Laboratuvar İçi Kesinlik**

Analitik prosedür üzerine değişen şartların etkisinin ölçülmesi için laboratuvarda oluşabilecek varyasyonların aynı numune üzerindeki etkisinin incelenmesi laboratuvar iç kesinlik olarak ifade edilebilir. Numuneler etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,4 ortamlarında hazırlanarak her bir numuneden aynı analitik koşullar altında farklı günlerde farklı cihazlarda enjeksiyon yapıldı. Elde edilen sonuçların birbirine yakınlık derecesinin ölçülmesi prensibine dayandırılarak değerlendirildi.

3.2.1.9 Dayanıklılık

Bir analitik metodun dayanıklılığı, analitik yöntem parametrelerinde yapılan küçük değişikliklerden etkilenmeden kalabilme yeteneğidir ve bu özellik, metodun normal kullanımı sırasında güvenilirliğini gösterir. Analitik yöntem parametrelerinde yapılan değişikliklere bağlı olarak elde edilen sonuçların, normal çalışma şartlarında bulunan değerlerine olan yakınlığın ölçülmesi prensibine dayanır. Çalışmamızda, etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,5 çözücülerini ile ayrı ayrı numune çözeltileri hazırlandı. Değişen her bir şart için parametreler kontrol edilerek normal çalışma şartlarına karşı değerlendirildi.

Uygulanan parametreler;

- a. Metot Akış hızı 0,9 mL/dk
- b. Metot Akış hızı 1,1 mL/dk
- c. Kolona Ait Sıcaklığı 20°C
- d. Kolona Ait Sıcaklığı 30°C
- e. Tampon pH'ı 4,7
- f. Tampon pH'ı 5,3
- g. Farklı Lot numaralı kolon

3.2.1.10 Cözelti Stabilitesi

Bir analitik metodun çözelti stabilitesi çalışmasındaki amaç, hazırlanan numune ve standartların bozunmaya uğramadan kullanabileceği zamanı tespit etmektir. Etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,5 çözücülerini ile ayrı ayrı standart ve numune çözeltileri taze bir şekilde hazırlandı ve HPLC cihazına enjekte edildi. Standart ve numunenin analizi aynı gün hazırlanmış standart çözeltiye karşı çalışıldı. Belli zaman aralıklarında (0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 18, 24, 36, 40, 48. saat) hazırlanan standart ve numune çözeltilerinden enjeksiyon yapılarak 48 saat kontrol edildi. %Fark değerleri standart ve numune çözeltileri için ayrı ayrı Eşitlik 4 ve Eşitlik 5'e göre hesaplandı.

$$\% \text{ Fark} = \frac{|Std_i - Std_s|}{Std_i} \times 100 \quad (4)$$

$$\% \text{ Fark} = \frac{|Nm_i - Nm_s|}{Nm_i} \times 100 \quad (5)$$

Std_i: Standart çözeltinin başlangıçtaki etkin madde % miktarı

Std_s: Standart çözeltinin 48.saatteki etkin madde % miktarı

Nm_i: Numune çözeltisinin başlangıçtaki etkin madde % miktarı

Nm_s: Numune çözeltisinin 48.saatteki dakikadaki etkin madde % miktarı

3.2.2 Folik Asit Analitik Yöntem Validasyonu

Folik asit miktar tayini, analitik yöntem validasyonunun gereklilikleri ile kabul kriterlerinin saptanması ve metodun etkinliğinin ispatlanmasıdır. Bu nedenle Folik asit ile modifiye edilecek olan polimerlere bağlanma %'sini hesaplayabilmek için bu metot geliştirildi. Metoda ait yöntem parametreleri Tablo-2'de

verilmektedir. Folik asit maddesinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography (HPLC)) yöntem validasyonu mobil faz ortamında gerçekleştirildi.

3.2.2.1 Tampon Çözeltisinin ve Mobil Faz Hazırlanışı

Tampon Hazırlanışı: 5,67 g Disodyum Hidrojen Fosfat tartılarak 1000 mL'lik balon jojeye aktarılıp ~900 mL saf su eklendi ve ultrasonik banyo kullanılarak çözündürüldü. Hacmine tamamlandı.

Mobil Faz Hazırlanması: Hazırlanan disodyum hidrojen fosfat tamponundan %90 alınarak ve üzerine %10 Asetonitril eklenerek hazırlanır. Hazırlanan çözelti glasiyel asetik asit ile pH'ı 5,0'e ayarlanarak hacmine tamamlandı. Ultrasonik banyoda 10 dk. degaze edildi.

Tablo 3-4 Folik Asit için HPLC cihaz parametreleri

Cihaz	HPLC
Dedektör	PDA
Kolon	ACE C18 5µm 4.6 x 250 mm
Dalga Boyu	240 nm
Akış Hızı	1,0 mL/dk.
Enjeksiyon Hacmi	10,0 µL
Analiz Süresi	15 dk.
Kolon Sıcaklığı	25oC
Tray sıcaklığı	25oC
Mobil Faz	Disodyum Hidrojen Fosfat Tamponu/ Asetonitril (%90/%10) pH 5,5
Çalışma Türü	İzokretik
Çözücüler	DMSO (Stok), %1 Asetik asit çözeltisi, Mobil faz

Standart Çözeltilerinin Hazırlanışı: 10 mg Folik asit standardı hassas bir şekilde tartıldı ve 50 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Bir miktar DMSO

(Dimetilsülfoksit) çözücüsü eklenerek çözündürüldü ve hacmine tamamlandı (C_{Folik asit} = 0,200 mg/mL) (**Ana stok Çözelti**).

Hazırlanan stok standart çözeltisinden 1,0 mL alınarak, 5 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine çözücü olarak hazırlanan %1 asetik asit çözeltisi eklenerek çözündürüldü, hacmine tamamlandı (**Ara stok Çözelti**). Bu çözeltiden 2,5 mL alınarak 10 mL'lik balon jodede mobil faz ile hacmine tamamlandı ve HPLC cihazına enjekte edildi (C_{Folik asit} = 0,010 mg/mL).

Folik Asit Numune Çözeltisinin Hazırlanması: 10 mg Folik asit hassas bir şekilde tartılarak, 50 mL'lik balon jodede DMSO çözücüsünde çözündürüldü, hacmine tamamlandı (C_{Folik Asit} = 0,200 mg/mL) (**Ana stok Çözelti**). Hazırlanan stok çözeltisinden 1,0 mL alınarak, 5 mL'lik balon jojeye aktarılıp, %1 asetik asit çözeltisi eklenerek çözündürüldü (**Ara stok çözelti**). Bu çözeltiden 2,5 mL alınarak 10 mL'lik balon jojeye aktarılarak, mobil faz ile hacmine tamamlandı ve HPLC cihazına enjekte edildi (C_{Folik Asit} = 0,010 mg/mL). Eşitlik 6'ya göre hesaplandı.

$$\% \text{ Folik asit} = \frac{AT}{AS} \times \left(\frac{W_s}{50 \text{ mL}} \times P_1 \right) \times \left(\frac{1,0 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \right) \times \left(\frac{2,5 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) \times \left(\frac{50 \text{ mL}}{W_T} \times P_2 \right) \times \left(\frac{5,0 \text{ mL}}{1,0 \text{ mL}} \right) \times \left(\frac{10,0 \text{ mL}}{2,5 \text{ mL}} \right) \times 100 \quad (6)$$

AT: FA numune çözeltisinden elde edilen HPLC kromatogramındaki FA pik alanı

AS: Standart çözeltisinden elde edilen HPLC kromatogramındaki FA pik alanı

W_T: Folik asit numune tartımı (mg)

W_s: Folik asit standardının tartımı (mg)

P₁: Folik asit standardının saflığı

P₂: Folik asit numune saflığı

3.2.2.2 Seçicilik

Analiz edilen folik asit maddesinin, numune içerisindeki olması muhtemel maddelerin olası bir girişimin olup olmadığını kontrol etmek için, çözücü ve Folik

asit standart çözelti enjeksiyonu yapılarak HPLC kromatogramları incelendi. Değerlendirme kriterleri Yöntem 3.2.1.3’de verildiği şekildedir.

3.2.2.3 Doğrusallık

Doğrusallık parametresi için, %10, %50, %100, %140 ve %160 konsantrasyonlarda aralığında örnekler hazırlanarak HPLC cihazına enjekte edildi.

%10 Konsantrasyonda FA Çözeltisi: Hazırlanan ara stok standart çözeltisinden 0,10 mL alınarak, 20 mL’lik balon jojeye aktarıldı ve çözücü ile hacmine tamamlandı. HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Folik Asit}} = 0,0010 \text{ mg/mL}$).

%50 Konsantrasyonda FA Çözeltisi: Hazırlanan ara stok standart çözeltisinden 0,50 mL alınarak, 20 mL’lik balon jojeye aktarıldı ve çözücü ile hacmine tamamlandı. HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Folik Asit}} = 0,0050 \text{ mg/mL}$).

%100 Konsantrasyonda FA Çözeltisi: Hazırlanan stok standart çözeltisinden 1,0 mL alınarak, 20 mL’lik balon jojeye aktarıldı ve çözücü ile hacmine tamamlandı. HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Folik Asit}} = 0,010 \text{ mg/mL}$).

%140 Konsantrasyonda FA Çözeltisi: Hazırlanan stok standart çözeltisinden 1,4 mL alınarak, 10 mL’lik balon jojeye aktarıldı ve çözücü ile hacmine tamamlandı. HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Folik Asit}} = 0,0140 \text{ mg/mL}$).

%160 Konsantrasyonda FA Çözeltisi: Hazırlanan stok standart çözeltisinden 1,6 mL alınarak, 20 mL’lik balon jojeye aktarıldı ve çözücü ile hacmine tamamlandı. HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Folik Asit}} = 0,0160 \text{ mg/mL}$).

Folik asit konsantrasyonları ile HPLC cihazında okunan pik alanlarına karşı grafik çizilerek, regresyon doğrusu ($y=mx+n$) hesaplandı; korelasyon katsayıları, y-kesişim noktaları ve eğimler değerlendirildi.

3.2.2.4 Çalışma Aralığı

%10 ve %160 konsantrasyonlarında hazırlanan Folik asit çözeltilerden HPLC cihazına enjekte edildi.

3.2.2.5 Gözlenebilirlik (LOD) ve Ölçme Sınırı (LOQ)

LOD ve LOQ değerlerini hesaplamak için %100 konsantrasyonda Folik asit çözeltisi hazırlanarak HPLC cihazına enjekte edildi. Yöntem 3.2.1.6'da verilen Eşitlik 2 ve Eşitlik 3'ye göre değerlendirildi.

3.2.2.6 Doğruluk

Miktar tayini için, % 80, % 100 ve % 120 konsantrasyonlarda Folik asit çözeltileri hazırlanarak, HPLC cihazına enjekte edildi.

%80 Konsantrasyonda Numune Çözeltisi: 8 mg Folik asit tartıldı ve 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı. DMSO ile çözündürülerek hacmine tamamlandı (**Ana Stok Çözelti**). Ana stok çözeltisinden 1,0 mL alınarak 10 mL'lik balon jojeye alındı ve üzerine %1 asetik asit çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı (**Ara Stok Çözelti**). Ara stok çözeltiden 1,0 mL alınarak 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve mobil faz ilave edilerek hacmine tamamlandı. HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Folik Asit}} = 0,0080 \text{ mg/mL}$).

%100 Konsantrasyonda Numune Çözeltisi 10 mg Folik asit tartıldı ve 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı. DMSO ile çözündürülerek hacmine tamamlandı (**Ana Stok Çözelti**). Ana stok çözeltiden 1,0 mL alınarak 10 mL'lik balon jojeye alındı ve üzerine %1 asetik asit çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı (**Ara Stok Çözelti**). Ara stok çözeltiden 1,0 mL alınarak 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve mobil faz ilave edilerek hacmine tamamlandı. HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Folik Asit}} = 0,0100 \text{ mg/mL}$).

%120 Konsantrasyonda Numune Çözeltisi: 12 mg Folik asit tartıldı ve 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı. DMSO ile çözündürülerek hacmine tamamlandı (**Ana Stok Çözelti**). Ana stok çözeltiden 1,0 mL alınarak 10 mL'lik balon jojeye alındı ve üzerine %1 asetik asit çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı (**Ara Stok**

Çözelti) . Ara stok çözeltiden 1,0 mL alınarak 10 mL’lik balon jojeye aktarıldı ve mobil faz ilave edilerek hacmine tamamlandı. HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Folik Asit}} = 0,0120 \text{ mg/mL}$).

3.2.2.7 Kesinlik

Yöntem 3.2.1.8’de verildiği gibi hazırlanan Folik asit numune çözeltisinde,

- Sistem Kesinliği
- Tekrarlanabilirlik
- Laboratuvar İçi Kesinlik parametreleri

çalışıldı.

➤ Sistem Kesinliği

Hazırlanan %100 konsantrasyondaki standart çözeltiden verilen enjeksiyon sonunda elde edilen Folik Asit’e ait % Rss değerlendirildi.

➤ Tekrarlanabilirlik

Hazırlanan Folik asit numune çözeltilerinden HPLC cihazına enjeksiyonlar verildi. Her numunedeki Folik asit miktarı % olarak hesaplandı.

➤ Laboratuvar İçi Kesinlik

Uygun çözücüde hazırlanan Folik asit numune çözeltisinden HPLC cihazına enjekte edildi. Elde edilen sonuçların birbirine yakınlık derecelerine göre değerlendirildi.

3.2.2.8 Dayanıklılık

Standart ve Folik Asit numune çözeltileri hazırlandı. Değişen her bir şart için standart çözeltiden ve numune çözeltilerinden HPLC cihazına enjekte edilip, sistem uygunluk parametre kontrolü ile değerlendirildi.

Uygulanan parametreler;

- a. Metot akış hızı 0,9 mL/dk
- b. Metot akış hızı 1,1 mL/dk
- c. Kolona ait sıcaklığı 20°C
- d. Kolona ait sıcaklığı 30°C

3.2.2.9 Cözelti Stabilitesi

Folik asit standart ve numune çözeltileri hazırlanarak HPLC cihazına enjekte edildi. Belli zaman aralıklarında (0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 18, 24, 36, 40, 48. saat) hazırlanan FA standart ve numune çözeltilerinden ikişer enjeksiyon yapılarak 48 saat kontrol edildi.

3.2.3 Folik Asit-Kitosan (FA-CS) Molekülünün Sentezlenmesi

Folik asit-kitosan molekülünün sentezi için Li ve arkadaşları (P. Li et al., 2011) ile Geethakumari ve arkadaşlarının (Geethakumari et al., 2022) kullandığı yöntemler modifiye edilerek, optimize edildi. İncelenen optimizasyon parametreleri Tablo 3-5’de özetlenmektedir. İlk aşamada folik asit (0,09 mmol) susuz DMSO içerisinde çözündürüldü. Folik asit çözeltisine 1-(3-Dimetilaminopropil)-3-etilkarbodiimid hidroklorür (EDC) ile N-hidroksi süksinimid (NHS) eklendi ve karışım oda sıcaklığında 1 saat karıştırılmaya bırakıldı. %1 kitosan çözeltisi hazırlamak amacıyla, %1’lik asetik asit çözeltisi içerisine 50mg kitosan ilave edildi ve bir gece boyunca manyetik karıştırıcı altında karıştırılmaya bırakıldı. Hazırlanan kitosan çözeltisine folik asit/EDC/NHS karışımı damla damla 40°C’de ilave edildi. Damlatma işlemi bittikten sonra karışım 6 saat boyunca manyetik karıştırıcı altında karıştırmaya bırakıldı. 6 saatin sonunda oda sıcaklığına gelen karışımın pH’ı NaOH ile 8-10 arasına ayarlandı ve 14800 rpm’de 30 dk boyunca santrifüj edildi. Çöken pellet NaHCO_3 ile 2 kez yıkandı. Santrifüj sonrası süpernatant çözeltilerinde folik asit miktar tayini yapılması için +4°C’de saklandı. Pellet kısımları ise önce -20 °C’de donduruldu. -20 °C’de dondurulan örnekler liyofilizatör cihazında -50 °C’de 24 saat süreyle kurutuldu. Etkin kurutma sağlanabilmesi adına birincil ve ikincil kurutma işlemlerinde farklı

sıcaklıklar kullanıldı. Liyofilizasyon parametrelerine ait bilgiler ise Tablo 3-6’da verilmektedir.

Tablo 3-5 FACS optimizasyon parametreleri

Formülasyonlar	Folik Asit Miktarı	EDC Miktarı	NHS Miktarı	Kitosan Miktarı	pH ayarı
F(FACS)-1	1	1,5	1,5	1	8-9
F(FACS)-2	1	1,5	1,5	1	9-10
F(FACS)-3	1	2	1	1	8-9
F(FACS)-4	1	1	2	1	8-9
F(FACS)-5	1	2	2	1	8-9
F(FACS)-6	1	2	2	1	9-10
F(FACS)-7	1	2	2	2,5	8-9
F(FACS)-8	1	2	2	2,5	9-10
F(FACS)-9	1	2	2	3,5	8-9
F(FACS)-10	1	2	2	4	8-9
F(FACS)-11	1	2	2	5	8-9
F(FACS)-12	1	2	2	6	8-9

Tablo 3-6 Liyofilizasyon parametreleri

	İşlem Adı		Basınç (mbar)	Sıcaklık (°C)	Zaman (Saat)
Liyofilizasyon Parametreleri	Birincil Kurutma	Dondurma	0,01	-50	2
		Soğutma + Vakum	0,01	-50 - -20	7
		Soğutma + Vakum	0,01	-20 - 0	7
		Isıtma + Vakum	0,01	0 – 20	7
	İkincil Kurutma	Isıtma + Vakum	0,01	25	1

3.2.3.1 Folik Asit-Kitosan Nanopartikülünün (FACS NP) Hazırlanması

Folik asit-kitosan nanopartikülleri Li ve ark.’ları (P. Li et al., 2011) ile Yang ve ark.’larının kullandığı (S. J. Yang et al., 2010) iyonik jelleşme yöntemi modifiye edilerek çalışılmıştır. Bu amaçla, Yöntem 3.2.3’de sentez koşulları optimize edilen folik asit bağlı kitosan polimerinin %1,0’lık (a/h) asetik asit çözeltisi içerisinde % 0,050, 0,100, 0,240 ve 0,400 (a/h) olmak üzere dört farklı konsantrasyonda çözeltisi hazırlandı. Tüm çözeltilerin pH değerleri 5,0’e ayarlandı. % 0,125, 0,250, 0,500

ve 0,750'lik dört farklı konsantrasyonda tripolifosfat (TPP) çözeltileri hazırlandı. Folik asit- kitosan çözeltisine oda sıcaklığında, 750 rpm ve 1 damla/10saniye damlatma hızında TPP çözeltisi ilave edilip, 1 saat karıştırıldı. Karıştırma süresinin sonunda karışım, +4°C'de 14800 rpm hızda 30 dk boyunca santrifüj edildi. Pellet kısmı 2 kez su ile yıkanıp, Tablo 3-6'de belirtilen liyofilizasyon koşullarında kurutma işlemi yapıldı. Elde edilen nanopartiküller +4°C'de muhafaza edildi. Folik asit-kitosan nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasına ilişkin incelenen optimizasyon parametreleri Tablo 3-7'de verilmektedir.

Tablo 3-7 FACS NP'lerine ait optimizasyon parametreleri

Formülasyonlar	Folik asit-Kitosan (%)	TPP (%)
F(FACS NP)-1	0,050	0,125
F(FACS NP)-2		0,250
F(FACS NP)-3		0,500
F(FACS NP)-4		0,750
F(FACS NP)-5	0,100	0,125
F(FACS NP)-6		0,250
F(FACS NP)-7		0,500
F(FACS NP)-8		0,750
F(FACS NP)-9	0,250	0,125
F(FACS NP)-10		0,250
F(FACS NP)-11		0,500
F(FACS NP)-12		0,750
F(FACS NP)-13	0,400	0,125
F(FACS NP)-14		0,250
F(FACS NP)-15		0,500
F(FACS NP)-16		0,750

3.2.3.2 İksabepilon (IXA) Yüklü Folik Asit - Kitosan Nanopartikülünün (IXA/FACS NP) Hazırlanması

IXA yüklü folik asit- kitosan nanopartikül (FACS NP) formülasyonları yöntem 3.2.3.1’de belirlenen en uygun optimum koşullarda hazırlandı. 1,0 mg IXA çözeltisi TPP çözeltisine ilave edilerek belli bir süre karıştırıldı. IXA/TPP çözeltisi dda sıcaklığında 750 rpm karıştırma hızında folik asit- kitosan çözeltisine damlatılarak, 1 saat karıştırma işlemine devam edildi. Oluşan IXA yüklü nanopartikül formülasyonları +4°C’de 14800 rpm hızla santrifüj edilerek toplandı. Süpernatant kısmı enkapsülasyon etkinlik yüzdesinin hesabı içindi ayrıldı. IXA içeren folik asit- kitosan nanopartikül formülasyonlarının optimizasyon parametreleri Tablo 3-8’de verilmektedir.

Tablo 3-8 IXA Yüklü FACS NP formülasyonlarının optimizasyon parametreleri

Formülasyonlar (F)	Folik Asit- Kitosan (%)	TPP (%)	IXA (mg)
F(IXA-FACS NP)-2	0,050	0,250	1,0
F(IXA-FACS NP)-6	0,100		1,0
F(IXA-FACS NP)-10	0,250		1,0
F(IXA-FACS NP)-14	0,400		1,0

3.2.4 Folik Asit- Aljinat (FA-ALG) Molekülünün Sentezlenmesi

Folik asit- Aljinat molekülü sentezine ilişkin çalışmalar modifiye edilerek optimum koşullar belirlendi (Babak et al., 2000; S. Lee and Lee, 2020; Pawar and Edgar, 2011). Aljinat Etanol/HCl çözeltisine eklenerek +4°C’de 24 saat süreyle karıştırıldı. 24 saatin sonunda sentezlenen Aljinik asit Whatman filtre kağıdı yardımıyla vakum altında süzüldü. Klorür iyonu kalıntılarının giderilmesi için birkaç kez etanol ve aseton ile yıkandı. Ardında vakum etüvünde 1 gece boyunca kurutuldu. Aljinik asit eldesindeki optimize koşullar (Tablo 3-9) FTIR analizleri ile belirlendi.

Tablo 3-9 Aljinik asit eldesine ait parametreler

Formülasyonlar (F)	Etanol/ HCl Çözeltilisindeki HCl konsantrasyonu (N)	Yıkama Çözeltisi	Vakum Etüvü Sıcaklığı (oC)
F(Aljinik Asit)-1	0,6	Etanol / Aseton	25
F(Aljinik Asit)-2	0,6	Etanol:Su / Aseton	25
F(Aljinik Asit)-3	6	Etanol / Aseton	25
F(Aljinik Asit)-4	6	Etanol:Su / Aseton	25
F(Aljinik Asit)-5	0,6	Etanol / Aseton	40
F(Aljinik Asit)-6	0,6	Etanol / Aseton	40

Optimum koşullarda elde edilen kurutulmuş Aljinik asit, su ortamında dağıtıldı %4'lük tetrabütilamonyumhidroksit (TBAOH) çözeltisi ile nötralize edildi ve liyofilizatörde kurutuldu. Elde edilen tetrabütilamonyum-aljinat (TBA-ALG) oda koşullarında muhafaza edildi.

Folik asit (0,869 mmol) tartılarak DMSO içerisinde çözündürüldü. Ardından 1,1-Kabonildiimidazol (CDI) (0,869mmol) ilave edildi (**Çözelti-1**). 24 saat boyunca azot gazı altında karıştırıldı. Daha sonra elde edilen TBA-ALG eldesi, %1 tetra-n-butilamonyum florür (TBAF) DMSO çözeltisi içerisinde çözündürüldü (**Çözelti-2**). Çözelti-1, manyetik karıştırıcıda karıştırılan Çözelti-2'nin üzerine yavaş yavaş eklenerek 40°C sıcaklıkta 24 saat karışmaya bırakıldı. 24 saat sonunda 0,01 N HCl içeren soğuk etanol/metanol (1:1) çözeltisi içerisinde çöktürüldü. Ardından vakum yardımıyla süzülerek alkol ile yıkandı. Süzme işleminden sonra çökelti sodyum karbonat çözeltisinde nötrleştirilerek liyofilizatörde kurutuldu. Elde edilen FA-ALG karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi.

3.2.4.1 Folik Asit - Aljinat Nanopartikülünün (FAALG NP) Hazırlanması

Yöntem 3.2.4'de sentezlenen Folik asit- aljinat molekülüne yapılan karakterizasyon çalışmaları sonrasında elde edilen sonuçlar arasında optimum özelliklere sahip olan Folik asit- Aljinat molekülü seçilerek, nanopartikül hazırlama aşamasına geçilmiştir. Bu amaçla, Folik asit-Aljinat nanopartikülleri Lee ve Lee'nin kullandığı iyonik jelleşme yöntemi modifiye edilerek çalışılmıştır. Bu amaçla, farklı yüzdelerde sulu çözeltileri hazırlanan folik asit-aljinat çözeltilerinin (%0,20, 0,50, 0,70 ve 1,00 (a/h)) pH değerleri 5,0'e ayarlandı. %0,20, 0,50, 1,0

ve 2,0 konsantrasyonlarında su içerisinde kalsiyum klorür (CaCl_2) çözeltileri hazırlandı. Folik asit- aljinat çözeltisi oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 750 rpm'de karıştırken, üzerine CaCl_2 çözeltisi 1damla/15sn damlatma hızında ilave edilip, 1 saat süre ile karıştırma işlemine devam edildi. Oluşan nanopartikül formülasyonlarını $+4^\circ\text{C}$ 'de 14.800 rpm hızda 30 dk boyunca santrifüj edildi. Dipte toplanan pelletler fazla CaCl_2 'nin uzaklaştırılması için 2 kez su ile yıkandı. Elde edilen FAALG nanopartikülleri liyofilizatörde kurutuldu. Folik asit-aljinat nanopartikül formülasyonlarının optimizasyon parametreleri Tablo 3-10'de verilmektedir.

Tablo 3-10 FAALG NP formülasyonlarının optimizasyon parametreleri

Formülasyonlar	Folik asit-Aljinat (%)	CaCl_2 (%)
F(FAALG NP)-1	0,20	0,2
F(FAALG NP)-2		0,5
F(FAALG NP)-3		1,0
F(FAALG NP)-4		2,0
F(FAALG NP)-5	0,50	0,2
F(FAALG NP)-6		0,5
F(FAALG NP)-7		1,0
F(FAALG NP)-8		2,0
F(FAALG NP)-9	0,70	0,2
F(FAALG NP)-10		0,5
F(FAALG NP)-11		1,0
F(FAALG NP)-12		2,0
F(FAALG NP)-13	1,0	0,2
F(FAALG NP)-14		0,5
F(FAALG NP)-15		1,0
F(FAALG NP)-16		2,0

3.2.4.2 İksabepilon Yüklü Folik Asit - Aljinat Nanopartikülünün (IXA/FAALG NP) Hazırlanması

IXA yüklü folik asit- aljinat nanopartikül formülasyonları Yöntem 3.2.4’de belirtildiği şekilde hazırlandı. 1,0 mg IXA çözeltisi CaCl_2 çözeltisine ilave edilerek belli bir süre karıştırıldı. Oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 750 rpm’de karıştırılan folik asit- aljinat çözeltisine damlatılarak ilave edildi. Damlatma işlemi sonrasında 1 saat karıştırma işlemine devam edildi. Oluşan IXA yüklü nanopartikül formülasyonlarını ayırabilmek için $+4^\circ\text{C}$ ’de 14800 rpm hızla santrifüj edildi. Süpernatant kısmı enkapsülasyon etkinlik yüzdesinin hesabı için ayrıldı. IXA içeren folik asit- aljinat nanopartikül formülasyonlarının optimizasyon parametreleri Tablo 3-11’de verilmektedir.

Tablo 3-11 IXA yüklü FAALG NP formülasyonlarının optimizasyon parametreleri

Formülasyonlar	Folik Asit- Aljinat (%)	CaCl_2 (%)	IXA (mg)
F(IXA-FAALG NP)-10	0,7	0,5	1,0
F(IXA-FAALG NP)-12		1,0	1,0
F(IXA-FAALG NP)-15	1,0	1,0	1,0
F(IXA-FAALG NP)-16		2,0	1,0

3.2.5 Folik Asit-Kitosan-Folik Asit-Aljinat Blend (FAC-FAALG NP) Nanopartikülünün Hazırlanması

FACS-FAALG blend nanopartiküllerin hazırlanması için Kumar ve ark.’larının kullandığı iyonik jelleşme yöntemi ile oranlar modifiye edilerek çalışılmıştır. Bu amaçla, FAALG molekülünün %0,06, 0,10, 1,0 (a/h) olmak üzere üç farklı konsantrasyonda sulu çözeltileri hazırlandı. Tüm çözeltilerin pH değerleri 4,9’a ayarlandı. Aynı bir yerde ise, su içerisinde kalsiyum klorür (CaCl_2) çözeltileri %0,50, 1,0 ve 2,0 olmak üzere üç farklı konsantrasyonda hazırlandı. FAALG çözeltisi oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 600 rpm ‘de karışırken, üzerine CaCl_2 çözeltisi 1damla/15sn hızla bir damlatılarak ilave edildi. Damlatma işlemi sonrasında, 30 dk süre ile karıştırma işlemine devam edildi (**Çözelti-1**). Aynı bir yerde ise; %0,05, 0,10 ve 0,24 (a/h) olmak üzere üç farklı konsantrasyonda çözelti hazırlandı. Tüm çözeltilerin pH değerleri 4,6’ya ayarlandı. Manyetik karıştırıcıda karıştırılan çözelti-1 üzerine 1damla/10sn hızla damlatıldı.

Karışım 600 rpm’de 1 saat boyunca karıştırılma sonrasında +4°C’de 14800 rpm, 30 dk boyunca santrifüj edildi. Dipte toplanan pelletler 2 kez su ile yıkandı. Elde edilen FACS-FAALG blend nanopartikülleri liyofilizatörde kurutuldu. FACS-FAALG blend nanopartikül formülasyonlarının optimizasyon parametreleri Tablo 3-12’de verilmektedir.

Tablo 3-12 FACS-FAALG blend NP formülasyonlarının optimizasyon parametreleri

Formülasyonlar	Folik asit-Aljinat (%)	Folik Asit-Kitosan (%)
F(FACS/FAALG NP)-1	50	50
F(FACS/FAALG NP)-2	60	40
F(FACS/FAALG NP)-3	25	75
F(FACS/FAALG NP)-4	70	30
F(FACS/FAALG NP)-5	50	40
F(FACS/FAALG NP)-6	30	70
F(FACS/FAALG NP)-7	95	5
F(FACS/FAALG NP)-8	90	10
F(FACS/FAALG NP)-9	80	20

3.2.5.1 İksabepilon Yüklü Folik Asit-Kitosan-Folik Asit-Aljinat Blend Nanopartikülünün (IXA/FACS-FAALG NP) Hazırlanması

Hazırlanan FAALG-FACS blend nanopartikülleriyle yapılan in-vitro karakterizasyon çalışmaları sonrasında elde edilen optimum koşullarda etkin madde yükleme işlemi gerçekleştirildi. IXA yüklü FAALG/FACS blend nanopartikül formülasyonları Yöntem 3.2.5’de belirtildiği şekilde hazırlandı. 1,0 mg IXA çözeltisi CaCl_2 çözeltisine ilave edilerek belli bir süre karıştırıldı. Ardından oda sıcaklığında 600 rpm hızda karıştırılan folik asit- aljinat çözeltisine damlatılarak ilave edildi. Damlatma işlemi sonrasında 30 dk. süre ile karıştırma işlemine devam edildi. Hazırlanan folik asit-kitosan çözeltisi IXA/FAALG NP sistemine 1damla/10 sn hızla damlatıldı ve 1 saat karıştırmaya bırakıldı. Oluşan IXA yüklü FAALG/FACS blend nanopartikül formülasyonları +4°C’de 14800 rpm’de santrifüj edilerek toplandı. Süpernatant kısmı enkapsülasyon verim hesabı

içinayrıldı. IXA içeren FAALG/FACS blend nanopartikül formülasyonlarının optimizasyon parametreleri Tablo 3-13’da verilmektedir.

Tablo 3-13 IXA/FACS-FAALG blend nanopartikül formülasyonlarının optimizasyon parametreleri

Formülasyonlar	Folik Asit-Aljinat (%)	Folik Asit-Kitosan (%)	IXA (mg)
F(IXA/FACS-FAALG NP)-1	50	50	1,0
F(IXA/FACS-FAALG NP)-3	25	75	1,0
F(IXA/FACS-FAALG NP)-7	95	5	1,0
F(IXA/FACS-FAALG NP)-9	80	20	1,0

3.2.6 *In-vitro* Karakterizasyon Çalışmaları

Yöntem 3.2.4 ve 3.2.5’de anlatıldığı gibi sentezlenen FACS ve FAALG moleküllerinin, FACS, FAALG ve FACS/FAALG blend nanopartiküllerinin FTIR, NMR, XRD analizleri, nanopartiküllerin partikül büyüklükleri, polidispersite indeksi, zeta potansiyelleri, yüzey özelliklerine (SEM ve TEM) ait analizler, enkapsülasyon etkinlikleri ve yükleme kapasitelerine ilişkin karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi.

3.2.6.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi Analizi

Etkin madde ve modifiye hazırlanan polimerlerin kimyasal bağlarına ilişkin etkileşimlerinin incelenmesi amacıyla ayrı ayrı, IXA, ALG, Aljinik asit, CS, FA, FACS molekülü, FAALG molekülü, FACS ve FAALG nanopartiküllerinin, FACS/FAALG blend nanopartiküllerinin Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrumları incelendi. Numunelerin spektrumları $400-4000\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında, 10 tekrar sayısında, 4 cm^{-1} çözünürlükte E.Ü Fen Fakültesi Kimya bölümünde bulunan Perlin Elmer marka ATR-FTIR spektrofotometre cihazı kullanılarak alındı.

3.2.6.2 Proton Nükleer Manyetik Rezonans (^1H -NMR) Analizi

Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi, atom çekirdeklerinin etrafındaki yerel manyetik alan hakkında bilgi sağlayan ileri düzey bir analitik teknik olduğu bilinmektedir. Çekirdeğin yerel manyetik alanı, moleküler yapının özellikleri, konfigürasyonu, konformasyonu ve moleküller arası etkileşimler gibi çeşitli faktörlerden doğrudan etkilenir. Bu nedenle, NMR spektroskopisi, kimyasal yapı hakkında benzersiz ve kapsamlı bilgiler sunar ve diğer analitik yöntemlerle kıyaslanamayacak düzeyde ayrıntılı veri sağlar. Atom çekirdekleri, pozitif (+) yük taşır ve kendi eksenleri etrafında rastgele dairesel spin hareketleri sergiler. Moleküllere manyetik alan uygulandığında, çekirdekler farklı enerji seviyelerinde yarıma gösterir ve bu yarılmalar, moleküler yapının aydınlatılmasında önemli rol oynar (Tampieri et al., 2019). Bu amaçla, sentezlenen FACS ve FAALG moleküllerine ait proton nükleer manyetik rezonans analizi döteryumlanmış su kullanılarak E.Ü Nükleer Manyetik Rezonans Uydu Laboratuvarında MERCURYplus-AS 400 model NMR spektrometresi ile gerçekleştirildi.

3.2.6.3 X-Işını Difraksiyon Spektroskopisi (XRD) Analizi

Sentezlenen FA-CS ve FA-ALG moleküllerinin kristal yapısının değerlendirilme amacına ile X-ışını difraksiyon analizi gerçekleştirildi. X-ışını difraksiyon analizi, maddelerin kristal fazın kendine özgü atomik dizilimlerine bağlı olarak, X-ışınlarını karakteristik bir düzen içerisinde kırması esasına dayanır (Nguyen et al., 2019). Bu amaçla, XRD panına FA, CS, ALG, FACS ve FAALG molekülleri ayrı ayrı konularak dakikada 5° 'lık adımlarla $0-50^\circ$ arasında 2θ (2Θ) açısı taramasıyla E.Ü İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma - Uygulama Merkezi'nde (ARGEFAR) bulunan Shimadzu XRD-6100 model XRD cihazı ile gerçekleştirildi (Ghodke, 2021).

3.2.6.4 Termogravimetrik Analiz (TGA)

Hazırlanan NP sistemlerinin ve iksabepilon etkin maddesi yüklü FACS NP, FAALG NP ve FACS-FAALG blend NP'lerin termogravimetrik analiz (TGA) eğrileri E.Ü Fen Fakültesi Kimya bölümünde bulunan, TGA cihazı ile azot

atmosferinde elde edildi. Alüminyum panlar teraziye yerleştirildi ve üzerine 10 mg NP sistemlerinden yerleştirilerek, 5 °C/dk ısıtma hızında, 25°C- 600°C sıcaklık aralığında, azot atmosferinde gerçekleştirildi ve kütlenin zamana bağlı fonksiyonu incelendi (Martínez et al., 2013).

3.2.6.5 Partikül Boyutu, Polidispersite İndeksi ve Zeta Potansiyel Değerlerinin Ölçümü

Hazırlanan NP sistemlerinin ve iksabepilon etkin maddesi yüklü FACS, FAALG ve FACS/FAALG nanopartiküllerin pH 7,4 tampon ortamında partikül büyüklüğü, polidispersite indeksleri ve zeta potansiyeline ait ölçümler dinamik ışık saçılımı yöntemi esasına dayanan E.Ü İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma - Uygulama Merkezi'nde (ARGEFAR) bulunan Zetasizer, Malvern Ultra cihazı ile 25°C'de ölçüldü (n=3).

3.2.6.6 Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi

Hazırlanan İksabepilon etkin maddesi yüklü FACS, FAALG ve FACS/FAALG nanopartiküllerin yüzey özelliklerinin incelenmesi amacıyla taramalı elektron mikroskopisi yöntemi kullanıldı. Örnekler çift taraflı yapışkan bant şeklinde olan karbon grid üzerine konuldu ve ardından örnekler altın ile kaplandı ve SEM görüntüleri Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Deneysel Fen Bilimleri Uygulama Ve Araştırma Merkezi'nde (DEFAM) bulunan Zeiss, Gemini 500 model cihaz ile alındı.

3.2.6.7 Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) Analizi

Hazırlanan NP sistemlerinin ve iksabepilon etkin maddesi yüklü FACS, FAALG ve FACS/FAALG nanopartiküllerin yüzey özelliklerinin incelenmesi için geçirimli elektron mikroskop (TEM) kullanılarak görüntüleri alındı 80 kV voltaj altında hızlandırılan elektronlar numunelerin üzerine gönderilmesiyle, numune yüzeyinde farklı enerjilerde elektronlar ve x-ışınları görüntülenerek Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi ÇOBİLTUM'da bulunan JOEL JEM-1400 Plus model cihaz ile analizlendi.

3.2.6.8 Sentezlenen Folik Asit ile Modifiye Edilen Polimere % Bağlanma Verimi, Hazırlanan Nanopartiküllerde Etkin Madde Enkapsülasyon Etkinliği, Yükleme Kapasitesinin ve Nanopartikül Veriminin Değerlendirilmesi

Yöntem 3.2.2’de anlatıldığı şekilde sentezlenen FACS molekülünde, FA’nin CS’a %bağlanma verimi HPLC cihazında valide edilen FA metodu kullanılarak ve Eşitlik 7’de verilen formüller kullanılarak hesaplandı.

$$\%FA \text{ Bağlanma Verimi} = \frac{\text{Toplam FA Miktarı} - \text{Serbest FA Miktarı}}{\text{Toplam FA Miktarı}} \times 100 \quad (7)$$

IXA etkin madde yüklü nanopartiküller Yöntem 3.2.3.2’de anlatıldığı gibi santrifüj edildikten sonra, süpernatant ve nanopartikül pelletleri ayrıldı. Süpernatantta serbest bulunan IXA etkin madde miktarının tayini Yöntem 3.2.1’de valide edilen HPLC metodu ile belirlenmiştir. Toplam süpernatantın hacmi belirlenerek ve gerekli seyreltmeler yapılarak HPLC cihazına enjekte edildi. Santrifüj sonucunda toplanan nanopartiküllere yüklenen IXA ise, ekstraksiyon yöntemiyle elde edildi. Nanopartiküller etanol içerisinde 30 dk boyunca ultrasonik banyoda tutuldu. Süre sonunda numune 0,22 µm filtreden süzülerek HPLC cihazına enjekte edildi ve IXA miktar tayini hesaplandı. Enkapsülasyon etkinliği (%EE), yükleme kapasitesi (%YK) ve nanopartikül verimi (NP Verimi) Eşitlik 8, Eşitlik 9 ve Eşitlik 10’de verilen formüller kullanılarak hesaplandı (n=3).

$$\%EE = \frac{\text{Toplam Etkin Madde Miktarı} - \text{Serbest Etkin Madde Miktarı}}{\text{Toplam Etkin Madde Miktarı}} \times 100 \quad (8)$$

$$\%YK = \frac{\text{Toplam Etkin Madde Miktarı} - \text{Serbest Etkin Madde Miktarı}}{\text{Nanopartikül ağırlığı (mg)}} \times 100 \quad (9)$$

$$\% \text{ NP Verimi} = \frac{\text{Elde edilen NP ağırlığı}}{\text{Polimer miktarı} + \text{Etkin madde miktarı}} \times 100 \quad (10)$$

3.2.6.9 In-vitro Salım Çalışması

IXA etkin madde yüklü FACS, FAALG ve FACSFAALG blend nanopartiküllerinin, kanser hücre içi pH’ı 5,5, kanser hücrelerin mikroçevrelerini pH’ı 6,5 ve normal dokuyu taklit edebilmek adına üç farklı tampon ortamlarında in-vitro salım çalışması gerçekleştirildi (Shinn, 2022; Alizadeh, 2024). IXA içeren nanopartiküller tampon ortamında disperse edilerek diyaliz membran (14kDa)

içerisine konuldu. 5 mL, pH 5,5, 6,5 ve 7,4 tampon ortamlarında 37°C’de ve 150 rpm hızla karıştırılırken 30.dk, 1., 2., 4., 6., 8., 12., 24., 30., 48. ve 72.saat zamanlarında örnekler alındı ve alınan miktar kadar tampon ortamı ilave edildi. Belirtilen zaman aralıklarında alınan örnekler HPLC cihazına enjekte edildi ve Yöntem 3.2’de anlatılan valide edilen yöntemde verilen kalibrasyon eğrileri ile değerlendirildi. Ayrıca salım çalışması sonlandırıldıktan sonra diyaliz membran içerisindeki numunelerin de miktar tayini yapıldı. *In-vitro* salım değerleri ile kinetik modellere uyumluluğu kontrol edildi. Sıfırıncı derece, Birinci derece, Higuchi ve Korsmeyer-Peppas kinetiklere uyumları regresyon doğrusu ile incelenerek aşağıda verilen Eşitlikler kullanılarak değerlendirildi.

$$Q_t = Q_0 + K_0t \text{ (Sıfırıncı derece)} \quad (11)$$

Q_t : t sürede çözünen ilaç miktarı

Q_0 : Çözeltideki başlangıçtaki ilaç miktarı

K_0 : salım katsayısı

t: zaman

$$\log C = \log C_0 - Kt / 2.303 \text{ (Birinci derece)} \quad (12)$$

C_0 : İlacın başlangıç konsantrasyonu

K: Birinci dereceden hız sabiti

t: Zaman

$$Q = \frac{\sqrt{D\delta}}{\sigma} (2C - \delta CS) CS t \text{ (Higuchi)} \quad (13)$$

D: Çözücüdeki ilaç molekülünün difüzyon katsayısı

δ :Matrisin gözenekliliği

σ : Matrisin kıvrımlılığı

Cs: İlacın matris ortamındaki çözünürlüğü

C: İlacın başlangıç konsantrasyonu

$$M_t / M_\infty = Kt^n \text{ (Korsmeyer-Peppas)} \quad (14)$$

M_t / M_∞ : t zamanında salınan ilacın bir kesri

K: salınım hızı sabitidir

n: salınım üssü

3.2.7 Stabilite Çalışmaları

Polimerlerin yapılarının bozulması kimyasal stabilite, boyut dağılımının ve enkapsülasyon etkinliğinin değişmesi fiziksel stabilite ile açıklanır. Bu amaçla optimal koşulları sağlayan nanopartikül formülasyonları buzdolabında +4°C’de, 25 ± 2 °C % 60 ± 5 relatif nem koşullarında ve 40 ± 2 °C % 75 ± 5 relatif nem koşullarında takip edildi. Başlangıç, 1., 3. ve 6.aylarında partikül boyutu takibi yapıldı (International Council for Harmonisation, 2003) (ICH Topic Q 1 A (R2)).

3.2.8 *In-vitro* Sitotoksosite Çalışmaları

In-vitro sitotoksosite çalışmalarını için MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) ve MDA-MB-232 (MD Anderson Metastatic Breast-231 Cells) hücre hatları kullanıldı.

MDA-MB-231 hücre hattı, üçlü negatif meme kanseri olarak bilinmektedir. Östrojen hormon reseptörü (ER), progesteron hormon reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) negatiftir. Ayrıca oldukça agresif bir meme kanseri tipidir (Polyak, 2007). MCF-7 hücre hattı, östrojen hormon reseptörü (ER), progesteron hormon reseptörü (PR) pozitifdir. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre dizilerinin her ikisi de folat reseptörünü eksprese etmesine rağmen,

MDA-MB-231 hücreleri folat reseptörünü MCF-7 hücrelerinden daha fazla eksprese eder.

İksabepilon etkin maddenin IC_{50} (The half maximal inhibitory concentration= %50) maksimum inhibitör konsantrasyon değerini belirlemek ve nanopartikül formülasyonların hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi adına MTT testi yapıldı. İksabepilon etkin maddesinin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre dizileri üzerindeki sitotoksik etkisini 24., 48. ve 72. Saat IC_{50} değerleri incelenerek belirlendi. İksabepilon içermeyen FACS ile FAALG nanopartiküllerinin ve FACS-FAALG blend nanopartikül formülasyonlarının hücre hatları üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisinin olup olmadığını gözlemleyebilmek amacı ile 24., 48. ve 72. saat IC_{50} değerleri incelenerek değerlendirildi.

3.2.8.1 Besiyeri Ortamının Hazırlanması

MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre dizileri için L-glutamin içeren MEM (Minimum Essential Medium) besiyeri ortamı kullanıldı. Bu besiyeri ortamına %10 FBS (Fetal Bovine Serum), %1 MEM-Eagle Non-esansiyal amino asit, %1 Penisilin streptomisin, %1 Sodyum pürivat eklendi. Hazırlanan besiyeri ortamı +4 °C’de saklandı.

3.2.8.2 Pasajlama Çalışması

Hücre dizileri hazırlanan steril besiyeri ortamında 37°C’de, %5 CO₂ içeren inkübatörde kültür edilerek çoğaltıldı. Hücreler çoğaldıkları zaman yeni flasklara pasajlandı. Pasajlama için Tripsin/EDTA enzimi kullanılarak hücreler kaldırıldı. Kaldırma işlemi yapılmadan önce besiyeri ortamı flasktan uzaklaştırıldı ve atıldı. Tripsin-EDTA daha iyi bir etki gösterebilmesi için hücreler PBS ile yıkanarak, hücre içi artıkların PBS ile atılması sağlandı. Bu işlemin ardından Tripsin/EDTA flasklara ilave edilerek 3 dk inkübatörde bekletildi. Hücrelerin yapıştıkları flask tabanından ayrılmaları mikroskop ile gözlenir gözlenmez, eklenen Tripsin/EDTA miktarının en az 3 katı kadar taze besiyeri ortamı ilave edilerek Tripsin/EDTA inhibe edildi. Pipetaj yapıldı ve hücreler 15mL’lik steril santrifüj tüplerine alındı.

1500 rpm’de 5 dk santirüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı ve kalan pellet halindeki hücreler yeni flasklara alınarak pasajlama işlemleri yapıldı.

3.2.8.3 Hücrelerin Dondurulması

Pasajlama işlemlerinden sonra hücrelerin bir kısmı çalışmalarda kullanılmak üzere stoklanıp, donduruldu. Hücreler flasktan kaldırıldıktan sonra besiyeri ortamı ilave edilerek 1500 rpm’de 5 dk santirüj edildi. Süpernatant atıldı ve kalan pellet halindeki hücreler %95 hazırlanan besiyeri ortamı ve %5 (v/v) DMSO’dan oluşan dondurma ortamı içerisinde süspanse edildi. Süspanse edilen hücreler cryo tüplere dağıtıldı. Kademeli dondurma yapmak adına izopropil alkol içeren dondurma kabı içinde 24 saat -80°C’de tutuldu. Daha sonra cryo tüplerden bir kısmı -80°C’ye bir kısmı ise sıvı nitrojen tankına transfer edildi.

3.2.8.4 Hücre Sayımı

Kültüre edilen ve flask yüzeyinden kaldırılan hücre solüsyonlarından 100 µL alındı ve üzerine 100 µL Tripan mavisi eklenerek, pipetaj yapıldı. Pipetaj yapılan hücre solüsyonundan 10 µL alınarak Neubauer lamına yüklendi ve mikroskop altında büyük karelerde görüntülenen hücreler sayıldı. Hücre miktarı Eşitlik 15 kullanılarak hesaplandı.

$$\text{mL'deki Hücre Sayısı} = \frac{\text{Sayılan Hücre Miktarı} \times \text{Seyrelme Faktörü}}{\text{Sayılan Büyük kare Miktarı}} \times 10000 \quad (15)$$

3.2.8.5 MTT Analizi

Flasklarda bulunan MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre dizileri Tripsin/EDTA kullanılarak tabandan kaldırıldı ve süspanse edildi. Yöntem 3.2. 8.4’de anlatıldığı şekilde hücre sayımı yapıldı. Ardından 96 kuyulu plaklara kuyucuk başına 5000 hücre olacak şekilde ekildi. Ekilen hücreler kuyucukların yüzeyine tutunmaları için 24 saat inkübe edildi. İksabepilon etkin maddesinin DMSO ortamında stok çözeltisi hazırlandı. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre dizilerinin bulunduğu kuyucuklardaki derişim 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 ve 20 µM olacak şekilde besiyeri ortamı ile seyreltilerek kuyucuklara 4’er paralel olarak eklendi. İksabepilon içermeyen FACS

ve FAALG nanopartiküller ile FACS-FAALG blend nanopartikülleri 0,5, 1, 5, 10, 50, 100 ve 500 µg/mL konsantrasyonda 4 paralel olarak kuyucuklara eklendi. Böylece IXA etkin maddesi dışında nanopartiküllerin hazırlanışı esnasında kullanılan diğer bileşenlerin hücre dizileri üzerinde sitotoksik etkisi olup olmadığı değerlendirildi. 24., 48. ve 72. saatlerde 5mg/mL MTT stok çözeltisinden 15'er µL eklendi. 4 saat boyunca %5 CO₂ ve 37°C'deki inkübatörde inkübe edildi. Süre sonunda tüm besiyeri kuyucuklardan uzaklaştırıldı. DMSO eklenip, 10 dk. çalkalayıcıda bekletildi. Ardından 570 nm ELISA plak okuyucu yardımıyla spektrofotometrik olarak elde edilen absorbans değerleri kaydedildi. Ardından hücre canlılığı Eşitlik 16 kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{İlaç Uygulanmış Kuyucuk Absorbansı} - \text{Blank Absorbansı}}{\text{İlaç Uygulanmamış Kuyucuk Absorbansı} - \text{Blank Absorbansı}} \times 100 \quad (16)$$

MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre dizilerinde İksabepilon için 24., 48. ve 72. saat IC₅₀ değerleri optimum plasebo nanopartikül ve blend nanopartiküllerine ait dozlar belirlendi. Belirlenen plasebo nanopartikül ve blend nanopartikül formülasyonlarına IC₅₀ değeri ve bir alt değer yüklenerek MTT çalışmaları yapıldı.

3.2.9 Radyoişaretleme Çalışmaları

^{99m}Tc ile radyoişaretleme çalışmaları pH 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 değerleri denenerek, İnce Tabaka Radyo Kromatografi (TLRC) analizi için uygun banyo türü de optimize edildi. Sodyum perteknetat'ın (Na^{99m}TcO₄) hidrolize edilebilmesi için kalay(II) dihidrat (SnCl₂.2H₂O) 1 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde taze hazırlandı. SnCl₂.2H₂O ve Na^{99m}TcO₄ içeren ayrı bir ependorf daha hazırlanarak radyoişaretleme sonrası ortamda hidroliz olan ^{99m}Tc'in varlığı kontrol edilerek, kalite kontrol çalışmaları gerçekleştirildi. Radyoişaretleme çalışmaları E.Ü Nükleer Bilimler Enstitüsünde gerçekleştirildi.

3.2.9.1 IXA Etkin Maddesinin, IXA/FACS NP'in, IXA/FAALG NP ve IXA/FACS-FAALG blend NP'inin ^{99m}Tc ile Radyoisaretleme Çalışmaları

IXA etkin maddesi, FACS-NP, FAALG-NP ve Blend NP 1 mg/mL olacak şekilde pH 5,5 tampon ortamında hazırlandı. 100 μg IXA, 100 μg FACS-NP, 100 μg FAALG-NP, 100 μg blend nanopartikül ayrı ayrı ependorflara alındı ve tüm ependorflara 25 μg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden konularak 0,1 M NaOH ile pH'ı 13'e ayarlandı. Ependorfa 1mCi ^{99m}Tc eklendi. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon sonrasında kalite kontrol çalışması yapıldı.

3.2.9.2 Radyoisaretili Maddelerin İnce Tabaka Radyo Kromatografisi (TLRC) Analizi ile Kalite Kontrol Çalışmaları

^{99m}Tc -IXA maddesinin TLRC analizi için Serum Fizyolojik (SF) ve Aseton olmak üzere iki farklı banyo sistemi kullanıldı. Farklı pH değerlerinde (7, 8, 9, 10, 11, 12, 13) çalışmalar denendi. Silika kaplı alüminyum tabakaları 1,50 x 10 cm'lik şeritler halinde hazırlandı. Hazırlanan şeritlerin taban seviyesinden 0,50 cm yukarıda olacak şekilde hidrolize ^{99m}Tc , ^{99m}Tc -IXA, ^{99m}Tc -IXA-FACSNP, ^{99m}Tc -IXA-FAALG NP ve ^{99m}Tc -IXA-FACS/FAALG blend NP damlatıldı. Damlatma ardından kuruyan alüminyum şeritler, aseton banyo tankına yerleştirildi. Tanktaki çözünün belli bir cm ilerlemesinden sonra alüminyum şeritler tanktan çıkartılarak kuruması beklenildi. Kuruma işleminden sonra şeritlerin üzeri yapışkan bir bant yardımıyla kapatılarak herhangi bir bulaşın olmasına izin verilmeden TLRC Scanner (Bioscanner) cihazında ölçüm alınarak Relative Front (R_f) değerleri hesaplandı.

3.2.9.3 Stabilite Çalışması

Yöntem 3.2.9.1'de anlatıldığı gibi işaretlenen ^{99m}Tc -IXA, ^{99m}Tc -IXA-FACS NP, ^{99m}Tc -IXA-FAALG NP ve ^{99m}Tc -IXA-FAALG/FACS blend NP formülasyonlarının stabilite çalışmaları için oda koşulunda bekletilen örneklerden 0., 30., 60., 90., 120., ve 240., dakikalarında numune alınarak TLRC yöntemiyle % bağlanma verimleri kaydedildi ve zamana bağlı değişimleri incelendi.

3.2.9.4 Lipofilite Çalışması

Literatürde verilen protokole göre çalışılmıştır (S. R. Banerjee et al., 2014). Tüpelere, 150 mL n-oktanol ve 150 mL su alındıktan sonra tüplere ayrı ayrı 100 µL radyoışaretili ^{99m}Tc -IXA, ^{99m}Tc -IXA/FA-CsNP, ^{99m}Tc -IXA/FA-AlgNP ve ^{99m}Tc -IXA-FACS/FAALG Blend-NP ilave edilerek, her tüp 1 dakika boyunca vortekslendi. Ardından 2500 rpm'de 30 dakika santrifüjlenerek üst ve alt fazın ayrıldı. Ayrılan bu fazlardan örnekler alınarak kadminyum tellür (Cd(Te)) sintilasyon detektöründe sayım alındı. Elde edilen değerler yardımıyla, deneysel lipofilite değerleri Eşitlik 17'a göre hesaplandı.

$$\text{Lipofilite Değeri} = \frac{\text{n-oktanol fazı sayım değeri}}{\text{Sulu faz sayım değeri}} \quad (17)$$

3.2.9.5 Radyoışaretili Moleküllerin *In-vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları

^{99m}Tc , ^{99m}Tc -IXA, ^{99m}Tc -IXA-FACS NP, ^{99m}Tc -IXA-FAALG NP ve ^{99m}Tc -IXA-FACS/FAALG Blend NP formülasyonlarının hücre kültürü çalışmalarında meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 kullanılarak inkorporasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Besiyeri ortamının hazırlanması, hücrelerin pasajlanması ve sayımı Yöntem 3.2.8'de verildiği gibi gerçekleştirildi.

3.2.9.6 İnkorporasyon Çalışması

MDA-MB-231 hücreleri hazırlanan besiyeri içerisinde 24'lü kuyucuklu plaklara ekildi ve 37 °C'de %5 CO₂ ortamında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki besiyerleri çekildi, ölü hücreleri ortamdan uzaklaştırmak için her bir kuyucuk Fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile 2'şer kez yıkandı. Her bir kuyucuğa 0,500 mL ^{99m}Tc -IXA içeren besiyerleri ilave edildi. Aynı prosedür ^{99m}Tc , ^{99m}Tc -IXA-FACS NP, ^{99m}Tc -IXA-FAALG NP ve ^{99m}Tc -IXA-FAALG/FACS Blend NP içinde uygulandı. Çalışmanın başında belirlenen 30., 60., 120., ve 240., dakikalardan önce her bir kuyucuktaki hücreler üzerindeki işaretli ortamın Cd (Te) detektöründe sayımı yapılarak başlangıç radyoaktiviteleri (A_0) tespit edilip kaydedildi. Ardından belirlenen zaman aralıklarında radyoaktivite değerlerinin

sayımı (A_1) yapılarak kaydedildi. Kaydedilen A_0 ve A_1 değerleri birbirine oranlanarak % bağlanma değerleri bulunmuştur ($n=6$).

3.2.10 Optik Görüntüleme Yöntemi ile *In-vivo* Çalışmalar

Hazırlanan nanopartikül ve blend nanopartikül formülasyonlar arasında yapılan karakterizasyon, *in-vitro* salım, stabilite ve sitotoksosite çalışmaları sonucunda ideal blend nanopartikül formülasyonu seçilerek *in-vivo* çalışmalara geçilmiştir. Bu amaçla Ege Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan onay formu 28.02.2024 tarihli ve 2024-010 sayılı etik kurul izin belgesi olarak alınmıştır. Ayrıca çalışmalar E.Ü İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma - Uygulama Merkezi (ARGEFAR)'da bulunan Faz Öncesi Biriminde gerçekleştirilmiştir.

3.2.10.1 Kanserli Hayvan Modeli Oluşturulması

Biyodağılım ve etkinlik çalışmalarına başlamadan önce, sağlıklı Balb/c (21 adet) ve sağlıklı Balb/c nude dişi (21 adet) farelerde tümör oluşturabilmek için 100 μ L PBS içerisinde 1×10^8 MDA-MB-231 hücresi enjekte edildi (Danilin, 2012). Belli günlerde enjeksiyon tekrarlandı. Planlanan gün sonunda fareye kuyruk venlerinden 100 μ L IVISense Vascular Fluorescent Receptor 680 prob enjeksiyonu yapıldı. 24 saat beklenmenin ardından tüm farelerin IVIS görüntüleri izofluran anestezi altında uyarılma dalga boyu (excitation) 640 nm, emisyon (emission) 700 nm dalga boyu, Bining:4 ve F/Stop:1 ayarları kullanılarak tümörler saptandı.

3.2.10.2 IRDye®-800 rs Boya Maddesi ile İşaretli CS-ALG NP ve FACS-FAALG Blend NP'in Hazırlanması

IRDye®-800 rs boya maddesi ile işaretli NP hazırlanma sırasında pH 7,4 ortamında, konsantrasyonu 1 mg/mL olan IRDye®-800 rs çözeltisi hazırlanarak kullanıldı.

IRDye®-800 rs boya maddesi işaretli blend NP'leri hazırlamak için, yöntem 3.2.5'de anlatılan NP hazırlama prosedürü kullanıldı. Boya maddesi, çapraz bağlayıcı ilave edilmeden önce polimer çözeltisine 150 μ L ilave edilerek 30dk

boyunca karıştırıldı. Karıştırma sonrası işaretli blend NP hazırlama, prosedürde anlatıldığı şekilde devam edildi.

Hedeflemenin biyodağılımda etkisini gözlemleyebilmek için folik asit içermeyen, IRDye®-800 rs işaretli aktif hedefsiz CS-ALG blend NP'leri hazırlandı. hedefli blend NP'leri hazırlanırken kullanılan CS ve ALG konsantrasyonları ile aynı prosedür uygulanarak hazırlandı.

Sentez basamağının son aşamasında, santrifüj sonunda elde edilen IRDye®-800 rs- FACS-FAALG blend NP ve IRDye®-800 rs-CS-ALG blend NP liyofilizatör cihazında kurutuldu ve +4°C'de saklandı. Süpernatant kısmı ise, boyanın NP'lere % bağlanma oranını bulabilmek için HPLC cihazında metot geliştirilerek kontrol edildi.

Tablo 3-14 IRDye®-800 rs için HPLC cihaz parametreleri

Cihaz	HPLC
Dedektör	PDA
Kolon	ACE C18 3,5µm 4.6 x 150 mm
Dalga Boyu	210 nm
Akış Hızı	1,0 mL/dk.
Enjeksiyon Hacmi	30,0 µL
Analiz Süresi	15 dk.
Kolon Sıcaklığı	25°C
Tray sıcaklığı	25°C
Mobil Faz	(%60) Asetonitril: (%40) %0,1 H ₃ PO ₄ Sulu Çözelti
Çalışma Türü	İzokretik
Çözücüler	pH 7,4 (Stok), %1 Asetik asit çözeltisi

IRDye®-800 rs boya maddesi: 0,1mg/mL stok boya standart çözeltisinden 0,150 µL alınarak 5 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve üzerine sentez ortamı ilave edildi (%50 asetik asit (%1'lik asetik asit çözeltisi) çözeltisi: %50 saf su) ve çalkalanarak hacmine tamamlandı (Ara stok C IRDye®-800 rs = 0,003 mg/mL). Bu çözeltiden 0,5 mL alınarak üzerine 0,5 mL pH 7,4 tampon ortamı ilave edildi, vortekslendi ve HPLC cihazına enjekte edildi (C IRDye®-800 rs = 0,0015 mg/mL).

0,1 mg/mL stok boya standart çözeltisinden 0,500 mL alınarak 5 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve üzerine sentez ortamı ilave edildi (%50 asetik asit çözeltisi

(%1'lik asetik asit çözeltisi), %50 saf su) ve çalkalanarak hacmine tamamlandı (Ara stok C IRDye®-800 rs = 0,010 mg/mL). Bu çözeltiden 0,5 mL alınarak üzerine 0,5 mL pH 7,4 tampon ortamı ilave edildi, vortekslendi ve HPLC cihazına enjekte edildi (C IRDye®-800 rs = 0,005 mg/mL).

Hazırlanan iki farklı konsantrasyonda IRDye®-800 rs boya maddesi arda arda enjeksiyonlar yapılarak birbiri içerisinde %Rss değeri kontrol edildi.

3.2.10.3 Biyodağılım Çalışması

Kanserli hayvan modeli oluşturulduktan sonra hazırlanan aktif hedefli IRDye®-800 rs- FACS-FAALG blend NP ve aktif hedefsiz IRDye®-800 rs-CS-ALG blend NP formülasyonları I.V yolla kanserli dişi Balb/c farelere verilerek biyodağılım çalışmaları gerçekleştirildi. Kanserli dişi Balb/c fareler 4 gruba ayrılarak, ağırlıkları kaydedildi. 25±2°C sıcaklık ve %55±5 rölatif neme sahip laboratuvar koşullarında tutuldu.

IRDye®-800rs boya maddesi, FACS/FAALG blend nanopartikül (aktif hedefli) ve CS/ALG blend nanopartikül (aktif hedefsiz) %0,9 izotonik sodyum klorür çözeltisi içerisinde dağıtılarak dişi Balb/c farelere kuyruk venlerinde 100 µL olacak şekilde uygulandı. Enjeksiyondan sonra 45.dk, 1., 3., 5., 7. ve 24. saatlerde izofloran anestezisi altında uyarılma dalga boyu (excitation) 745 nm ile emisyon dalga boyu (emission) 850 nm, Bining:4 ve F/Stop:1 IVIS cihazı ayarları kullanılarak görüntüler alındı.

24. saat sonunda *ex-vivo* görüntüler alınması amacıyla fareler sakrifiye edilip akciğer, karaciğer, kalp, böbrekler, yumurtalık, bağırsaklar gibi organları çıkarılarak görüntüleme yapıldı.

3.2.10.4 Etkinlik Çalışması

Etkinlik çalışması için dişi Balb/c nude fareler 4'lü gruba ayrıldı. Fareler ksenograft modeli ile meme kanseri oluşturuldu. Dişi BALB/C nude farelerde tümör oluşturabilmek için 100 µL PBS içerisinde 2×10^6 MDA-MB-231 hücresi

enjekte edildi (Tanei et al., 2016). Belli günlerde enjeksiyon tekrarlandı. Planlanan gün sonunda fareye kuyruk venlerinden 100 µL IVISense Vascular Fluorescent Receptor 680 prob enjeksiyonu yapıldı. 24 saat beklenmenin ardından tüm fareler izofluran ile anestezi altında uyarılma dalga boyu (excitation) 640 nm ile emisyon (emission) 700 nm, Binning:4 ve F/Stop:1 IVIS cihazı ayarları kullanılarak görüntüler alındı ve tümörler saptandı.

1. Grup: SF uygulanan (n=7)
2. Grup: Paklitaksel uygulanan (n=7)
3. Grup: FACS/FAALG blend nanopartikül formülasyonu uygulanan (n=7)

4 günde bir olmak üzere tedavi enjeksiyonları yapıldı. Tedavi sürecinde tümör boyutlarındaki değişimi incelemek amacıyla IVISense Vascular Fluorescent Receptor 680 prob enjeksiyonu yapılarak IVIS ölçümleri alındı. Çalışma boyunca hayvanların ağırlıkları kaydedildi.

3.2.10.5 Ex-vivo Çalışmalar ve Patolojik Değerlendirme

Yöntem 3.2.10.4'te anlatılan biyodağılım ve yöntem 3.2.10.5'de anlatılan etkinlik çalışmaları sonrası fareler sakrifiye edilerek meme, yumrutalık, karaciğer, gibi organlar çıkarıldı ve patolojik çalışmalar için ayrıldı. Bu amaçla öncelikle PBS çözeltisi içerisinde yıkandı. Ardından tüm organlar formalin çözeltisi içerisinde saklandı. Patolojik çalışmalara başlarken tüm organlar küçük parçalara ayrılarak parafinize edildi. Parafin bloklardan kesitler alınarak hematoksilin ve eozin (H&E) ile boyanıp mikroskop ile değerlendirildi.

3.2.11 İstatistik Değerlendirme

Elde edilen sitotoksosite sonuçları arasındaki farklılık veya benzerlik Graphpad Prism 8.0 istatistik programında analiz edildi. Anlamlılık düzeyleri için One-Way ANOVA analizi ile ($p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**), $p < 0,05$ (*) anlamlı kabul edildi) değerlendirildi.

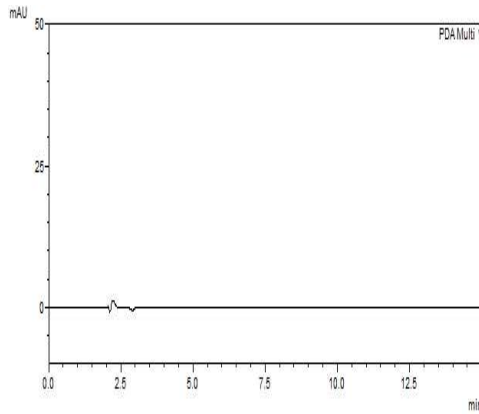
4 BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Etkin Madde Analitik Yöntem Validasyonuna Ait Bulgular

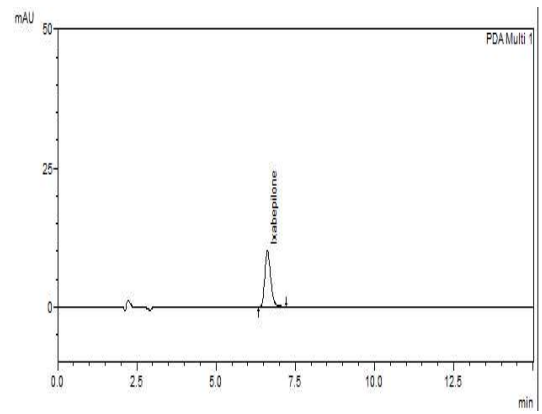
Etkin madde analitik yöntem validasyon çalışmasında tüm parametreler FDA 2003’de yer alan “ICH Validation of Analytical Procedures” kriterlerine göre değerlendirildi (FDA, 2003).

4.1.1 Seçicilik Parametresine Ait Bulgular

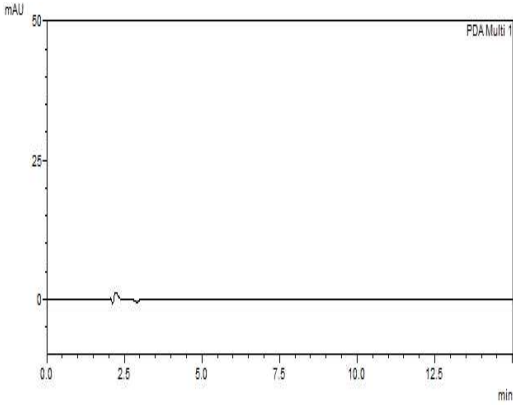
Seçicilik çalışmasında yöntem 3.2.1.3’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. HPLC cihazına enjekte edilen çözücülerin (Etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,4), IXA standart çözeltisi ve numune çözeltisinin kromatogramları incelenerek, pik saflığı değerlendirilmiş ve IXA pikinin altında herhangi bir girişim elde edilememiştir. Şekil 4.1’de elde edilen tüm kromatogramlar verilmektedir.



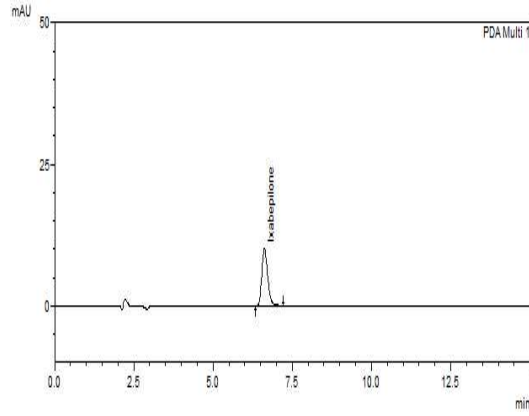
pH 5,5 Çözücü Kromatogramı



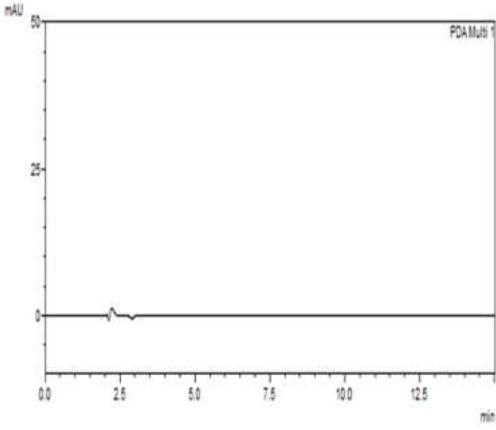
pH 5,5 ortamındaki IXA Standart Çözelti
Kromatogramı



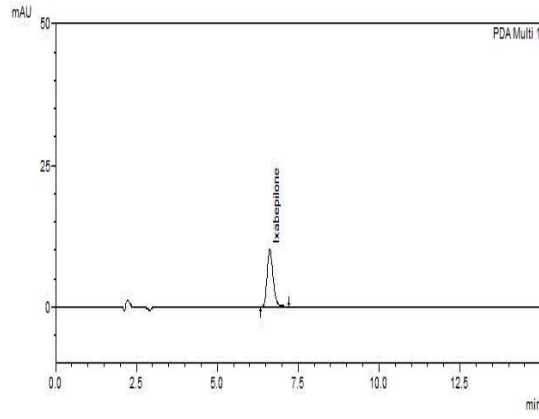
pH 6,5 Çözücü kromatogramı



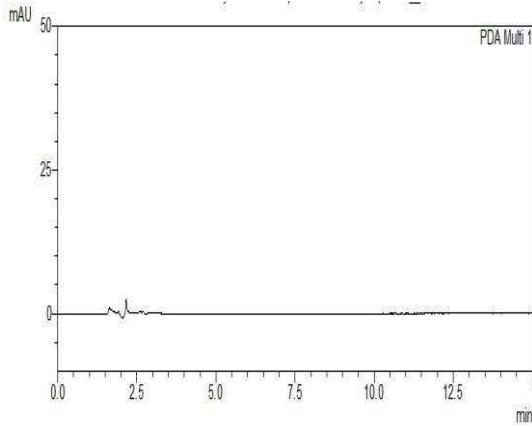
pH 6,5 IXA Standart çözelti kromatogramı



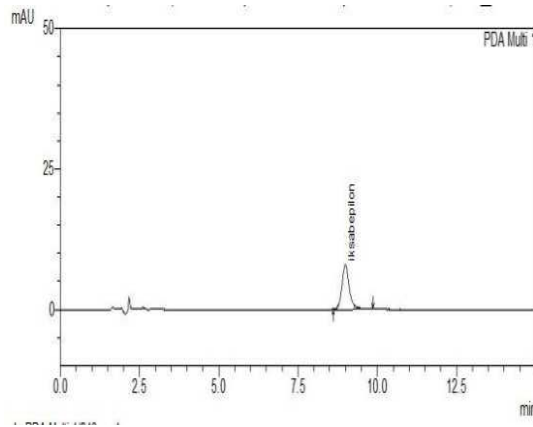
pH 7,5 Çözücü kromatogramı



pH 7,5 IXA Standart çözelti kromatogramı



Etanol çözücü kromatogramı



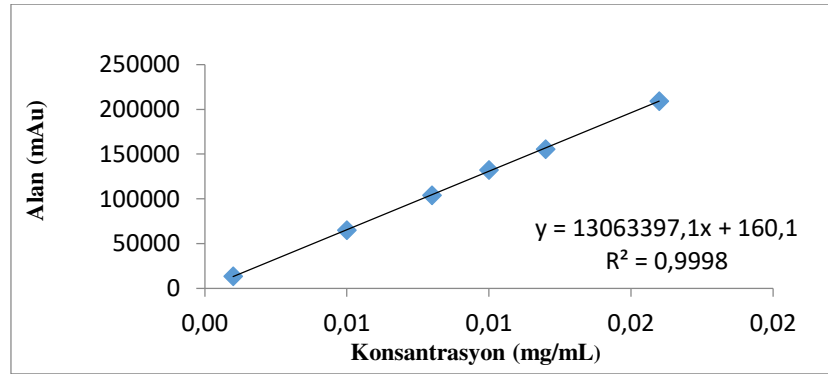
Etanol IXA standart çözelti kromatogramı

Şekil 4.1 IXA etkin maddesinin seçicilik parametresine ait HPLC kromatogramları

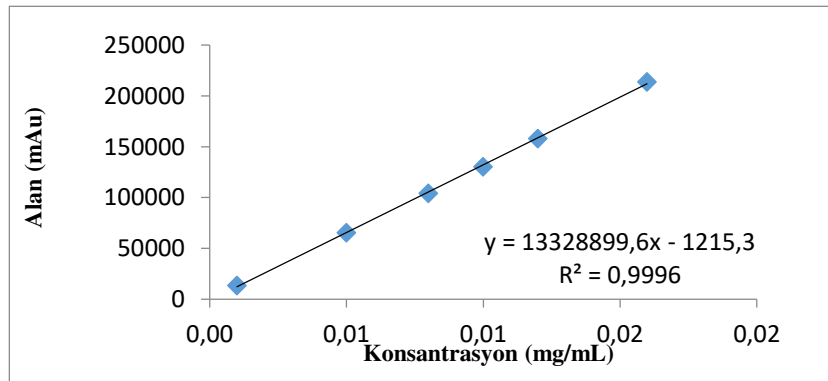
Çalışmaların gerçekleştirildiği etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,4 ortamlarında IXA pikinin altında herhangi bir girişim bulunmadığı gösterilerek, metodun her bir çözücü ortamında özgün ve seçici olduğu gösterilmiştir.

4.1.2 Doğrusallık Parametresine Ait Bulgular

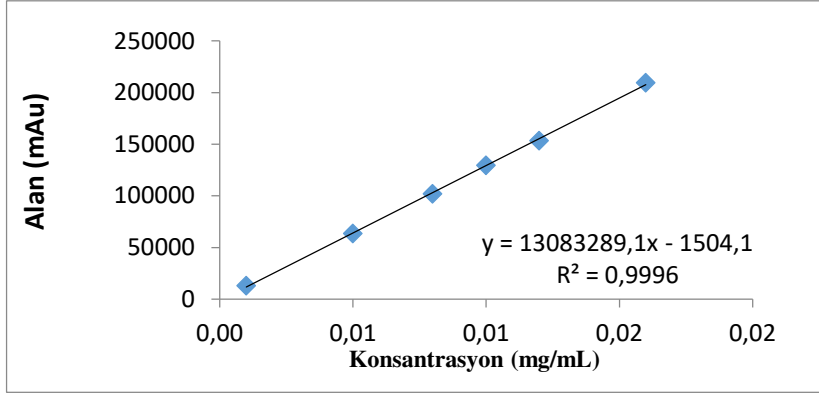
Doğrusallık parametresi yöntem 3.2.1.4. 'de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Etanol çözücüsü ile hazırlanan IXA standart stok çözeltisi kullanılarak konsantrasyonu %10 ile %160 arasında 6 farklı çözelti pH 5,5, 6,5 ve 7,4 ortamlarında hazırlanarak HPLC cihazına enjekte edildi. Enjeksiyonların ortalaması ve kalibrasyon eğrisi kullanılarak korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Doğrusallık parametresine ait kalibrasyon grafikleri Şekil 4-2, Şekil 4-3, Şekil 4-4 ve Şekil 4-5'de, elde edilen veriler ise Tablo 4-1 'de verilmektedir.



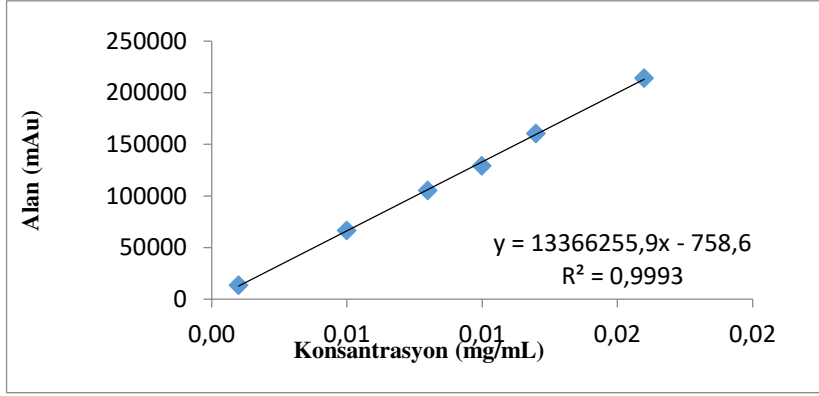
Şekil 4.2 IXA etkin maddesinin etanol çözücüsündeki kalibrasyon eğri grafiği



Şekil 4.3 IXA etkin maddesinin pH 5,5 tampon çözücüsündeki kalibrasyon eğri grafiği



Şekil 4.4 IXA etkin maddesinin pH 6,5 tampon çözütüsündeki kalibrasyon eğri grafiği



Şekil 4.5 IXA etkin maddesinin pH 7,4 tampon çözütüsündeki kalibrasyon eğri grafiği

Tablo 4-1 Etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,4 çözücü ortamlarında IXA standart çözeltisinin doğrusallık parametresine ait veriler

Konsantrasyonlar (mg/mL)	Alan değerleri (Etanol)	Ortama Alan değerleri (Etanol)	Alan değerleri (pH5,5)	Ortama Alan değerleri (pH 5,5)	Alan değerleri (pH6,5)	Ortama Alan değerleri (pH6,5)	Alan değerleri (pH7,4)	Ortama Alan değerleri (pH7,4)
0,0010	13525	13488 ± 55,1	13783	13412 ± 333,4	12577	12852 ± 240,6	13729	13525 ± 316,3
	13425		13137		12953		13161	
	13515		13317		13025		13686	
0,005	64604	64931 ± 288,4	66263	65506 ± 674,6	65422	63431 ± 1727,5	67469	66755 ± 645,3
	65089		64969		62541		66213	
	65117		65285		62330		66584	
0,008	104432	104064 ± 398,4	104128	104200 ± 572,9	102435	102056 ± 484,4	104830	105394 ± 813,3
	103641		103667		101510		105025	
	104119		104806		102222		106326	
0,010	132569	132430 ± 127,4	131192	130434 ± 659,7	129746	129460 ± 433,7	128373	129311 ± 1762,1
	132319		129992		128961		128217	
	132401		130117		129673		131344	
0,012	155663	155614 ± 168,5	157967	157978 ± 45,5	153903	153510 ± 1258,8	160135	160696 ± 14718,3
	155426		157939		152102		159644	
	155752		158028		154526		162309	
0,016	209182	20924 ± 286,0	213478	213796 ± 309,4	209037	209522 ± 590,8	215864	214325 ± 1988,5
	209563		214096		210180		212080	
	209003		213814		209349		215032	

Doğrusallık verileri incelendiğinde her bir çözücü ortamlarındaki R^2 0,9998, 0,9996, 0,9996 ve 0,9993 şeklinde bulundu. Bu değerlerin doğrusallığın kabul kriterleri olan (R^2) ≥ 0.999 değerini sağladığı görülmektedir.

4.1.3 Çalışma Aralığı Parametresine Ait Bulgular

Çalışma aralığı parametresi yöntem 3.2.1.5.'de anlatıldığı gibi çalışılmıştır. Etanol ile stok çözeltisi hazırlanan IXA standart çözeltisinin seyreltmeleri pH 5,5, pH 6,5 ve pH 7,4 ortamlarında %10 ve %160 konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Altı tekrarlı enjeksiyon sonucu pik alanları arasındaki Rss değerlerinin %2'den fazla olup olmadığı değerlendirilerek sonuçlar Tablo 4-2'de verilmektedir.

Tablo 4-2 Çalışma aralığı parametresine ait bulgular

	%10 (0.001 mg/mL) (Etanol)	%10 (0.001 mg/mL) (pH 5,5)	%10 (0.001 mg/mL) (pH 6,5)	%10 (0.001 mg/mL) (pH 7,4)	%160 (0.016 mg/mL) (Etanol)	%160 (0.016 mg/mL) (pH 5,5)	%160 (0.016 mg/mL) (pH 6,5)	%160 (0.016 mg/mL) (pH 7,4)
1.enjeksiyon	13525	13137	12577	13729	209182	213478	209037	215864
2.enjeksiyon	13425	13137	12953	13361	209563	214096	210180	212080
3.enjeksiyon	13515	13317	13025	13686	209003	213814	209349	215032
4.enjeksiyon	13325	13220	12852	13243	208718	213684	208540	213056
5.enjeksiyon	13541	13407	13025	13219	208720	212602	210245	214528
6.enjeksiyon	13541	13098	13152	13455	208990	213031	210254	212588
ort	13478,7	13219,3	12930,7	13448,8	209029,3	213450,8	209600,8	213858,0
SS	86,9	120,9	199,3	218	317,2	547,7	732,6	1501
%Rss	0,6	0,9	1,5	1,62	0,2	0,3	0,3	0,7

Çalışma aralığı parametresinde IXA etkin maddesinin etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,4 tampon ortamlarında verilen enjeksiyonlara ait alanlar arasındaki %Rss 2'den küçük bulunmuştur. Böylece, IXA etkin maddesinin seçilen çözücü ortamlarının çalışmamıza uygun olduğu sonucuna varılmaktadır.

4.1.4 Gözlenebilirlik (LOD) ve Ölçme Sınırı (LOQ)

LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanması için Yöntem 3.2.1.6’da anlatıldığı gibi çalışılmıştır. IXA’nın etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,4 ortamlarında bulunan LOD ve LOQ değerleri Tablo 4-3’de verilmektedir.

Tablo 4-3 IXA’nın etanol, pH 5,5, pH 6,5 ve pH 7,4 ortamlarındaki LOD ve LOQ değerlerine ait bulgular

	Etanol	pH 5,5	pH 6,5	pH 7,4
LOD (mg/mL)	0,000082	0,00011	0,000102	0,000104
LOQ (mg/mL)	0,00025	0,00034	0,00031	0,00031

4.1.5 Doğruluk Parametresine Ait Bulgular

Yöntem 3.2.1.7’de anlatıldığı gibi çalışılmıştır. IXA’nın etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,4 ortamlarının her biri için %80, %100 ve %120 konsantrasyonlarında bulunan doğruluk parametresi sonuçları Tablo 4-4, Tablo 4-5, Tablo 4-6 ve Tablo 4-7’de verilmektedir.

Tablo 4-4.IXA’nın etanol ortamındaki doğruluk parametresine ait bulgular

% Konsantrasyon Değerleri	Tartım miktarları (mg)	Teorik Konsantrasyon (mg/mL)	DeneySEL Konsantrasyon (mg/mL)	Geri kazanım (%)	Ortalama (%)	Standart Sapma (±)	Rss (%)
80	8,00	0,008	0,0080	99,5	99,0	0,6	0,6
	8,01	0,008	0,0079	98,4			
	8,02	0,008	0,0079	99,0			
100	10,01	0,010	0,0102	101,7	101,0	0,7	0,7
	10,20	0,010	0,0103	100,9			
	10,03	0,010	0,0100	100,3			
120	12,25	0,012	0,0124	101,5	100,5	1,2	1,2
	12,30	0,012	0,0122	99,2			
	12,00	0,012	0,0121	101,0			

Tablo 4-5. IXA'nın pH 5,5 ortamındaki doğruluk parametresine ait bulgular

% Konsantrasyon Değerleri	Tartım miktarları (mg)	Teorik Konsantrasyon (mg/mL)	DeneySEL Konsantrasyon (mg/mL)	Geri kazanım (%)	Ortalama (%)	Standart Sapma (±)	Rss (%)
80	8,02	0,008	0,0080	99,3	98,7	0,5	0,5
	7,95	0,008	0,0078	98,5			
	8,03	0,008	0,0079	98,2			
100	9,987	0,010	0,0099	99,2	99,5	0,6	0,5
	10,00	0,010	0,0099	99,1			
	10,00	0,010	0,0100	100,2			
120	12,03	0,012	0,0119	98,8	98,5	0,4	0,4
	12,08	0,012	0,0118	98,1			
	11,98	0,012	0,0118	98,5			

Tablo 4-6. IXA'nın pH 6,5 ortamındaki doğruluk parametresine ait bulgular

% Konsantrasyon Değerleri	Tartım miktarları (mg)	Teorik Konsantrasyon (mg/mL)	DeneySEL Konsantrasyon (mg/mL)	Geri kazanım (%)	Ortalama (%)	Standart Sapma (±)	Rss (%)
80	8,01	0,008	0,0078	99,4	98,8	0,6	0,6
	8,03	0,008	0,0079	98,2			
	8,03	0,008	0,0080	98,9			
100	10,05	0,010	0,0101	101,33	100,4	0,8	0,8
	10,32	0,010	0,0100	99,7			
	10,05	0,010	0,0101	100,1			
120	12,22	0,012	0,0119	101,8	100,7	1,0	1,0
	12,12	0,012	0,0119	100,6			
	12,15	0,012	0,0119	99,7			

Tablo 4-7. IXA'nın pH 7,4 ortamındaki doğruluk parametresine ait bulgular

% Konsantrasyon Değerleri	Tartım miktarları (mg)	Teorik Konsantrasyon (mg/mL)	DeneySEL Konsantrasyon (mg/mL)	Geri kazanım (%)	Ortalama (%)	Standart Sapma (±)	Rss (%)
80	8,00	0,008	0,0080	99,5	99,0	0,6	0,6
	8,01	0,008	0,0079	98,4			
	8,02	0,008	0,0079	99,0			
100	10,01	0,010	0,0102	101,7	101,0	0,7	0,7
	10,2	0,010	0,0103	100,9			
	10,03	0,010	0,0100	100,3			
120	12,25	0,012	0,0124	101,5	100,5	1,2	1,2
	12,30	0,012	0,0122	99,2			
	12,00	0,012	0,0121	101,0			

Doğruluk parametresinde hazırlanan her bir örnekte % geri kazanım ve enjeksiyonlar arası %Rss hesaplandı. Tüm çözücü ortamlarında bulunan tüm geri kazanım verileri %98,0- %102,0 arasında ve %Rss değerleri %2'den küçük bulundu. Böylece tüm veriler kabul kriterlerine uygun bulunmaktadır.

4.1.6 Kesinlik parametresine ait bulgular

4.1.6.1 Sistem Kesinliği Parametresine Ait Bulgular

Sistem kesinliği yöntem 3.21.8'de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Etanol, pH 5,5, pH 6,5 ve pH 7,4 ortamlarında verilen altı enjeksiyon sonucunda alan değerleri, alan değerleri arasındaki %Rss ve alıkonma zamanları Tablo 4-8'de verilmektedir.

Tablo 4-8 IXA'nın etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,4 ortamlarında sistem kesinliği parametresine ait bulgular

	Alan (Etanol)	Alıkonma Zamanı (dk.) (Etanol)	Alan (pH 5.5)	Alıkonma Zamanı (dk.) (pH 5.5)	Alan (pH 6.5)	Alıkonma Zamanı (dk.) (pH 6.5)	Alan (pH 7.4)	Alıkonma Zamanı (dk.) (pH 7.4)
1.enjeksiyon	130801	8,8	132645	8,9	128923	8,8	135274	8,9
2.enjeksiyon	129629	8,8	133779	8,9	128632	8,8	135141	8,6
3.enjeksiyon	131777	8,8	131231	8,9	129396	8,8	134620	8,7
4.enjeksiyon	131887	8,9	132527	8,9	128110	8,8	135062	8,7
5.enjeksiyon	131916	8,9	130906	8,9	128634	8,8	134532	8,8
6.enjeksiyon	132237	8,8	132283	8,9	128095	8,8	134687	8,7
ort	131374,5	8,9	132228,5	8,9	128631,7	8,8	134886,0	8,8
SS	983,6	0,04	1040,5	0,001	495,8	0,004	310,6	0,10
%Rss	0,7	0,5	0,8	0,02	0,4	0,05	0,2	1,2

Sistem kesinliği parametresinde, her bir çözücü ortamında yapılan enjeksiyonlar sonucu elde edilen alanlar ve alıkonma zamanları değerlendirildi. %Rss değerleri %2'den küçük olduğu için kabul kriterini sağladığı bulunmuştur.

4.1.6.2 Tekrarlanabilirlik Parametresine Ait Bulgular

Yöntem 3.2.1.8'de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. IXA'nın etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,4 ortamlarında hazırlanan altı farklı numunenin enjeksiyonları ile alanlar arasındaki uyum ve her bir numuneki %IXA miktarlarına ait elde edilen sonuçlar Tablo 4-9, Tablo 4-10, Tablo 4-11 ve Tablo 4-12'de verilmektedir.

Tablo 4-9 IXA'nın etanol ortamında tekrarlanabilirlik parametresine ait bulgular

Numune Enjeksiyon Sayısı	Alan Değerleri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.1	130254	99,0	99,5
1.2	131412	99,9	
2.1	132524	100,5	100,5
2.2	132454	100,5	
3.1	133254	101,2	101,0
3.2	132698	100,8	
4.1	131147	99,2	99,3
4.2	131247	99,3	
5.1	132598	99,4	99,1
5.2	131783	98,8	
6.1	132985	100,8	100,9
6.2	133214	101,0	
ORT			100,0
SS			0,9
%Rss			0,9

Tablo 4-10 IXA'nın pH 5,5 ortamında tekrarlanabilirlik parametresine ait bulgular

Numune Enjeksiyon Sayısı	Alan Değerleri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.1	136934	101,1	101,1
1.2	136852	101,1	
2.1	132816	101,4	101,5
2.2	132951	101,5	
3.1	133595	102,0	101,1
3.2	131190	100,2	
4.1	133787	100,2	100,6
4.2	134899	101,0	
5.1	135796	101,0	101,0
5.2	135655	100,9	
6.1	134954	101,1	100,6
6.2	133428	100,0	
ORT			101,0
SS			0,3
%Rss			0,3

Tablo 4-11 IXA'nın pH 6,5 ortamında tekrarlanabilirlik parametresine ait bulgular

Numune Enjeksiyon Sayısı	Alan Değerleri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.1	132461	100,9	100,1
1.2	130371	99,3	
2.1	131575	99,2	99,0
2.2	130888	98,7	
3.1	131545	99,2	98,7
3.2	130192	98,2	
4.1	133165	101,3	101,1
4.2	132691	101,0	
5.1	132269	100,2	100,5
5.2	133071	100,8	
6.1	130712	98,6	99,2
6.2	132167	99,7	
ORT			99,8
SS			1,0
% Rss			1,0

Tablo 4-12 IXA'nın pH 7,4 ortamında tekrarlanabilirlik parametresine ait bulgular

Numune Enjeksiyon Sayısı	Alan Değerleri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.1	132739	100,6	101,2
1.2	134344	101,8	
2.1	132920	99,9	100,3
2.2	133871	100,6	
3.1	131830	99,1	99,7
3.2	133298	100,2	
4.1	134258	101,8	101,5
4.2	133422	101,2	
5.1	132268	99,9	100,1
5.2	132763	100,3	
6.1	133318	100,3	99,2
6.2	130432	98,1	
ORT			100,3
SS			0,9
% Rss			0,9

Tablo 4-13 IXA'nın tekrarlanabilirlik parametresinde standart alan ve %uyum değerleri

	Etanol	pH 5,5	pH 6,5	pH 7,4
Standart Çözelti Alan (Analiz Başlangıcı)	134587	132898	132860	133005
	135474	132675	128462	133146
Standart Çözelti Alan (Analiz Sonu)	133214	132880	132679	133205
	132523	132406	132120	13324
Analiz Başlangıcında %Uyum	%98,2	%100,0	%100,1	%98,6
Analiz Sonunda %Uyum	%99,7	%100,1	%98,8	%98,5

Tekrarlanabilirlik parametresinde, çalışılan tüm çözücü ortamlarında verilen enjeksiyonlar sonucunun birbiri içerisindeki %Rss değeri %2'nin altında olup, analiz başlangıcında ve sonunda verilen standart çözelti enjeksiyonlarının birbiriyle uyumlu olduğu, %98-%102 arasında bulunan sonuçlarda görülmektedir.

4.1.6.3 Laboratuvar İçi Kesinlik Parametresine Ait Bulgular

Laboratuvar içi kesinlik parametresi için yöntem 3.2.1.8'de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,4 ortamlarında hazırlanan numuneler üzerindeki laboratuvar varyasyonlarının sonuçları değerlendirilmiş ve %fark olarak sonuçlar Tablo 4-14, Tablo 4-15, Tablo 4-16, Tablo 4-17, Tablo 4-18, Tablo 4-19, Tablo 4-20, Tablo 4-21 'da verilmektedir.

Tablo 4-14 IXA'nın etanol ortamında laboratuvar içi kesinlik parametresine ait bulgular-1

Numune Enjeksiyon Sayısı	Alan Değerleri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.1	132574	101,8	101,6
1.2	131986	101,3	
2.1	132546	100,3	101,2
2.2	134765	102,0	
3.1	133254	101,0	101,2
3.2	133621	101,3	
4.1	132451	101,2	101,7
4.2	133784	102,2	
5.1	132789	100,5	100,4
5.2	132513	100,3	
6.1	133821	101,3	100,9
6.2	132547	100,4	
ORT			101,1
SS			0,5
%Rss			0,5

Tablo 4-15 IXA'nın etanol ortamında laboratuvar içi kesinlik parametresine ait bulgular-2

Numune Sayısı	Cihaz I / Gün I (Tekrarlanabilirlik Değerleri)	Cihaz II /Gün II
1	99,5	101,6
2	100,5	101,2
3	101,0	101,2
4	99,3	101,7
5	99,1	100,4
6	100,9	100,9
Ortalama	100,0	101,1
	100,6	
SS	0,9	0,5
%Rs	0,9	0,5
% Fark	1,1	

Tablo 4-16 IXA'nın pH 5,5 ortamında laboratuvar içi kesinlik parametresine ait bulgular-1

Numune Enjeksiyon Sayısı	Alan Değerleri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.1	134125	98,6	98,6
1.2	133874	98,5	
2.1	133124	101,3	100,9
2.2	132123	100,5	
3.1	133412	101,5	101,7
3.2	133985	101,9	
4.1	133745	99,8	100,1
4.2	134547	100,3	
5.1	134124	99,4	99,4
5.2	134102	99,4	
6.1	133874	99,9	100,0
6.2	133958	100,0	
ORT			100,1
SS			1,1
%Rss			1,1

Tablo 4-17 IXA'nın pH 5,5 ortamında laboratuvar içi kesinlik parametresine ait bulgular-2

Numune Sayısı	Cihaz I / Gün I (Tekrarlanabilirlik Değerleri)	Cihaz II /Gün II
1	101,1	98,6
2	101,5	100,9
3	101,1	101,7
4	100,6	100,1
5	101,0	99,4
6	100,6	100,0
Ortalama	101,6	100,1
	100,5	
SS	0,3	1,1
%Rss	0,3	1,1
% Fark		0,9

Tablo 4-18 IXA'nın pH 6,5 ortamında laboratuvar içi kesinlik parametresine ait bulgular-1

Numune Enjeksiyon Sayısı	Alan Değerleri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.1	133845	100,9	100,5
1.2	132954	100,2	
2.1	132369	98,8	99,3
2.2	133746	99,8	
3.1	133845	99,9	99,5
3.2	132976	99,2	
4.1	133697	100,7	100,8
4.2	133985	100,9	
5.1	133659	100,2	100,0
5.2	132954	99,7	
6.1	133946	100,0	100,0
6.2	133886	100,0	
ORT			100,0
SS			0,6
%Rss			0,6

Tablo 4-19 IXA'nın pH 6,5 ortamında laboratuvar içi kesinlik parametresine ait bulgular-2

Numune Sayısı	Cihaz I / Gün I	Cihaz II /Gün II
1	100,1	100,5
2	99,0	99,3
3	98,7	99,5
4	101,1	100,8
5	100,5	100,0
6	99,2	100,0
Ortalama	99,8	100,0
	99,9	
SS	1,0	0,6
%Rss	1,0	0,6
% Fark	-0,3	

Tablo 4-20 IXA'nın pH 7,4 ortamında laboratuvar içi kesinlik parametresine ait bulgular-1

Numune Enjeksiyon Sayısı	Alan Değerleri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.1	132547	100,5	100,8
1.2	133254	101,0	
2.1	133254	100,3	100,0
2.2	132523	99,7	
3.1	131254	98,7	99,2
3.2	132545	99,7	
4.1	133125	101,1	100,7
4.2	132145	100,3	
5.1	132269	100,0	99,8
5.2	131745	99,6	
6.1	133895	100,8	99,8
6.2	131258	98,8	
ORT			100,0
SS			0,6
%Rss			0,6

Tablo 4-21 IXA'nın pH 7,4 ortamında laboratuvar içi kesinlik parametresine ait bulgular-2

Numune Sayısı	Cihaz I / Gün I	Cihaz II /Gün II
1	101,2	100,8
2	100,3	100,0
3	99,7	99,2
4	101,5	100,7
5	100,1	99,8
6	99,2	99,8
Ortalama	100,3	100,0
	100,2	
SS	0,9	0,6
%Rss	0,9	0,6
% Fark	0,3	

Laboratuvar içi kesinlik parametresinde, farklı günlerde ve farklı cihazlarda tekrarlanan çalışma sonuçlarının birbiri içerisindeki yakınlık derecesini ifade eden

% fark değeri hesaplandı. Tüm çözücü ortamlarında % fark değeri %2'den küçük bulunarak kabul kriter değerini sağladığı gösterilmiştir.

4.1.7 Dayanıklılık Parametresine Ait Bulgular

Yöntem 3.2.1.9'da anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Her değişen parametreye karşılık numunelerdeki % miktar, % Rss ve % fark değerlendirilmiştir. Ayrıca alıkonma zamanları ve kuyruklanma faktörleri Tablo 4-22, Tablo 4-23, Tablo 4-24 ve Tablo 4-25'de verilmektedir.

Tablo 4-22 IXA'nın etanol ortamında dayanıklılık parametresine ait bulguları

Parametre	% Miktar	%Rss	% Fark	Alıkonma Zamanı	Kuyruklanma Faktörü
Normal çalışma koşulları	100,0	0,1	-	8,8	1,1
Akış hızı 0,9 mL/dk	100,2	0,4	-0,2	9,8	1,2
Akış hızı 1,1 mL/dk	101,4	0,4	-1,4	8,2	1,1
Kolon Sıcaklığı 20°C	100,4	0,1	-0,4	8,8	1,1
Kolon Sıcaklığı 30°C	101,1	0,1	-1,1	8,9	1,2
Tampon pH'ı 4,7	100,9	0,5	-0,9	9,2	1,2
Tampon pH'ı 5,3	101,0	0,1	-1,0	8,8	1,1
Farklı Lod Numaralı Kolon	101,2	0,3	-1,3	8,9	1,1

Tablo 4-23 IXA'nın pH 5,5 ortamında dayanıklılık parametresine ait bulguları

Parametre	% Miktar	%Rss	% Fark	Alıkonma Zamanı	Kuyruklanma Faktörü
Normal çalışma koşulları	100,5	0,1	-	8,9	1,2
Akış hızı 0,9 mL/dk	100,6	0,4	-0,1	9,9	1,1
Akış hızı 1,1 mL/dk	100,7	0,3	-0,2	8,2	1,2
Kolon Sıcaklığı 20°C	100,0	0,3	0,6	8,8	1,2
Kolon Sıcaklığı 30°C	100,5	0,3	-0,1	9,0	1,2
Tampon pH'ı 4,7	98,9	1,0	1,6	9,4	1,1
Tampon pH'ı 5,3	98,6	0,6	1,8	8,8	1,1
Farklı Lod Numaralı Kolon	99,5	0,5	0,9	9,0	1,1

Tablo 4-24 IXA'nın pH 6,5 ortamında dayanıklılık parametresine ait bulguları

Parametre	% Miktar	% Rss	% Fark	Alıkonma Zamanı	Kuyruklanma Faktörü
Normal çalışma koşulları	100,0	0,1	-	8,8	1,1
Akış hızı 0,9 mL/dk	99,4	0,3	0,7	9,8	1,1
Akış hızı 1,1 mL/dk	101,3	0,5	-1,3	8,1	1,1
Kolon Sıcaklığı 20°C	100,3	0,4	-0,3	8,8	1,1
Kolon Sıcaklığı 30°C	101,6	0,3	-1,6	8,9	1,1
Tampon pH'ı 4,7	98,6	0,8	1,4	9,8	1,0
Tampon pH'ı 5,3	99,3	0,3	0,1	8,8	1,1
Farklı Lod Numaralı Kolon	99,4	0,6	0,6	8,9	1,1

Tablo 4-25 IXA'nın pH 7,4 ortamında dayanıklılık parametresine ait bulguları

Parametre	% Miktar	% Rss	% Fark	Alıkonma Zamanı	Kuyruklanma Faktörü
Normal çalışma koşulları	100,7	0,3	-	8,8	1,1
Akış hızı 0,9 mL/dk	99,6	0,1	1,01	9,9	1,1
Akış hızı 1,1 mL/dk	100,9	0,1	-0,3	8,2	1,2
Kolon Sıcaklığı 20°C	99,7	0,4	0,9	8,8	1,1
Kolon Sıcaklığı 30°C	99,5	0,1	1,1	8,9	1,1
Tampon pH'ı 4,7	100,6	0,2	0,1	9,7	1,1
Tampon pH'ı 5,3	99,5	0,9	1,2	8,9	1,1
Farklı Lod Numaralı Kolon	99,8	0,5	0,1	8,8	1,1

Dayanıklılık parametresinde, normal koşullara karşılık çalışılan tüm koşullarda, kabul kriterleri olan kuyruklanma faktörü <2,0 ve %fark <2,0 değerini sağlayıp sağlamadığı değerlendirilmiştir. Bulunan tüm sonuçlar kabul kriterleri aralığında bulunmaktadır.

4.1.8 Çözelti Stabilitesi Parametresine Ait Bulgular

Yöntem 3.2.1.10.'da anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. IXA standart ve numunesine ait belirli saatlerde enjekte edilen enjeksiyonlardan elde edilen alanlar ve 0.zamana göre %fark değerleri Tablo 4-26 ve Tablo 427'de verilmektedir.

Tablo 4-26 IXA'nın etanol, pH 5,5, 6,5 ve 7,4 ortamlarında standart çözeltisi stabilitesine ait bulgular

Zaman	Alan Değeri (Etanol)	%Fark (Etanol)	Alan Değeri (pH 5,5)	%Fark (pH 5,5)	Alan Değeri (pH 6,5)	%Fark (pH 6,5)	Alan Değeri (pH 7,4)	%Fark (pH 7,4)
Başlangıç zamanı	132835	-	132422	0,4	133842	-	131630	-
2. saat	132684	0,1	131914	0,4	133808	0,03	132129	0,4
4. saat	133458	0,5	131882	0,9	132178	1,24	131649	0,0
6. saat	132985	0,1	131272	0,8	132509	1,00	131692	0,0
8. saat	133458	0,5	133497	0,6	133884	-0,03	131297	0,3
10. saat	134158	1,0	133211	1,0	133011	0,62	132270	0,5
12. saat	133695	0,6	133720	1,1	131555	1,71	132584	0,7
24. saat	133879	0,8	133915	1,2	131949	1,41	133142	1,1
36. saat	134002	0,9	130770	1,4	131988	1,39	132425	0,6
48. saat	134212	1,0	132620	0,4	132018	1,36	132542	0,7

Tablo 4-27 IXA'nın etanol, pH 5,5, pH 6,5 ve pH 7,4 ortamlarında numune çözeltisi stabilitesine ait bulgular

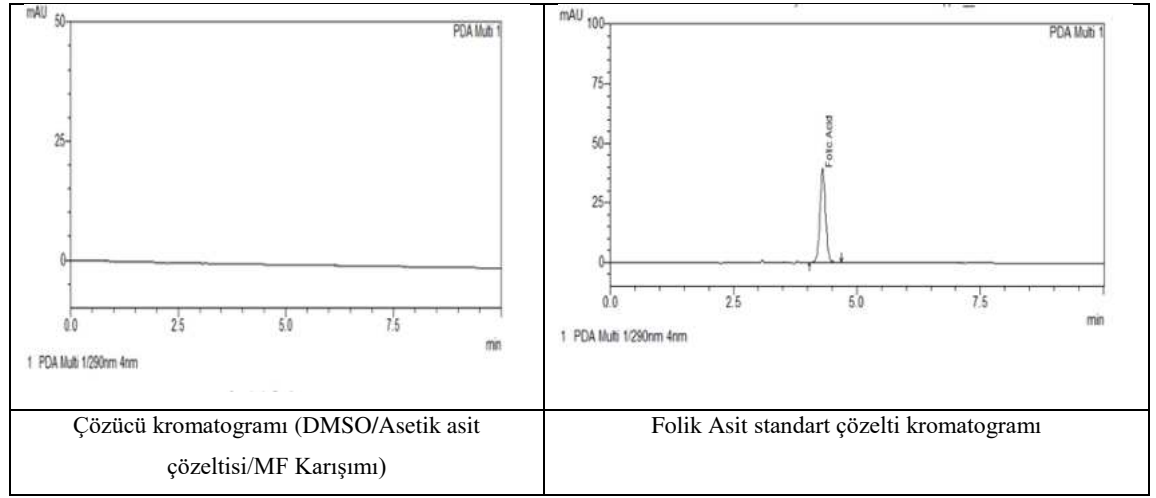
Zaman	Alan Değeri (Etanol)	%Fark (Etanol)	Alan Değeri (pH 5,5)	%Fark (pH 5,5)	Alan Değeri (pH 6,5)	%Fark (pH 6,5)	Alan Değeri (pH 7,4)	%Fark (pH 7,4)
Başlangıç zamanı	132358	-	134307	-	131766	-	132157	-
2. saat	133124	0,6	134466	0,1	130427	1,0	132322	0,1
4. saat	131149	0,9	135874	1,2	132509	0,6	132764	0,5
6. saat	131651	0,5	134952	0,5	131158	0,5	133437	1,0
8. saat	130900	1,1	134521	0,2	130169	1,2	132949	0,6
10. saat	132003	0,3	134223	0,1	132742	0,7	131104	0,8
12. saat	131777	0,4	134651	0,3	130856	0,7	132453	0,2
24. saat	131174	0,9	133871	0,3	129330	1,8	131961	0,1
36. saat	131509	0,6	132726	1,2	130502	1,0	131741	0,3
48. saat	132546	0,1	132193	1,6	129843	1,5	131412	0,6

Tablo 4-26 ve 4-27’de verilen sonuçlar değerlendirildiğinde, tüm çözücü ortamlarında IXA çözeltileri 48 saat boyunca stabil olduğu, başlangıç enjeksiyon ile 48 saat boyunca alınan enjeksiyon alanları arasındaki % fark’ın 2’den küçük bulunması nedeni ile kabul kriterleri sağlanmaktadır.

4.2 Folik Asit Analitik Yöntem Validasyonuna Ait Bulgular

4.2.1 Seçicilik Parametresine Ait Bulgular

Yöntem 3.2.2.2’de anlatıldığı şekilde çalışılmış olup, çözücü ve Folik Asit enjeksiyonu sonrasında pik saflığı değerlendirilmiştir. Folik Asit pikinin altında herhangi bir girişim elde edilememiştir. Kromatogramlar Şekil 4-6’da gösterilmektedir.

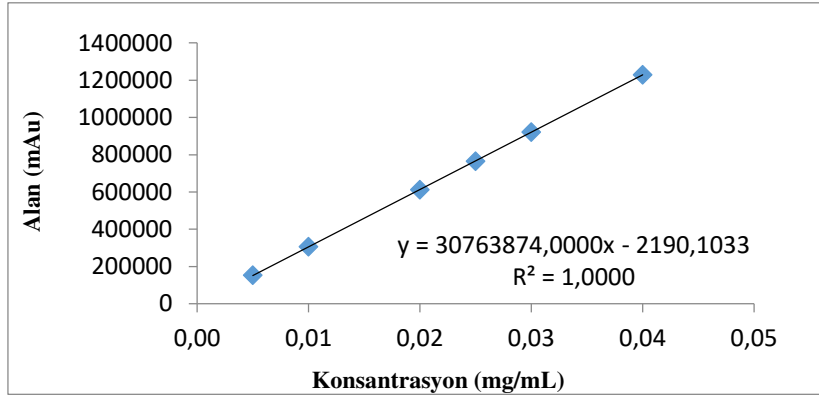


Şekil 4.6 Folik Asit maddesinin seçicilik parametresine ait HPLC kromatogramları

Şekil 4.6 verilen çözücü ortamında Folik asit pikinin altında herhangi bir girişim bulunmadığı gösterilerek, metodun her bir çözücü ortamında özgün ve seçici olduğu görülmektedir.

4.2.2 Doğrusallık Parametresine Ait Bulgular

Yöntem 3.2.2.3’de anlatıldığı şekilde çalışılmış olup, %10 ve %160 konsantrasyonları arasında değişen beş farklı konsantrasyondaki çözeltilerden elde edilen enjeksiyon alanlarının ortaması ve kalibrasyon eğrisi kullanılarak korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Doğrusallık parametresine ait kalibrasyon grafiği Şekil 4.7’de, elde edilen veriler ise Tablo 4-28’de verilmektedir.



Şekil 4.7 Folik Asit'in çözücü ortamındaki kalibrasyon eğri grafiği

Tablo 4-28 Folik asit standart çözeltisinin doğrusallık parametresine ait veriler

Konsantrasyonlar (mg/mL)	Alan Değerleri	Ortalama Alan Değerleri
0,005	152845	152985
	153125	
	152985	
0,010	304587	305356
	305621	
	305861	
0,020	612452	612138
	611478	
	612485	
0,025	766832	764379
	761784	
	764521	
0,030	917254	921947
	922741	
	925848	
0,040	1223004	1229356
	1241525	
	1223541	

Doğrusallık verileri incelendiğinde çözücü ortamında Folik asit kalibrasyon grafiğinde, R^2 1,0000 şeklinde bulunmuştur. Bu değer in doğrusallığın kabul kriterleri olan $(R^2) \geq 0.999$ koşulunu sağlamaktadır.

4.2.3 Çalışma Aralığı Parametresine Ait Bulgular

Çalışma aralığı Yöntem 3.2.2.4'de anlatıldığı gibi çalışılmıştır. Çözücü ortamında %10 ve %160 konsantrasyonda altı adet verilen enjeksiyonların alanları

ve pik alanları arasındaki Rss değerlerinin %2'den fazla olup olmadığı değerlendirilerek sonuçlar Tablo 4-29'de verilmektedir.

Tablo 4-29 Çalışma aralığı parametresine ait bulgular

	% 10 (0.025 mg/mL)	% 160 (0.040mg/mL)
1.enjeksiyon	152845	1223004
2.enjeksiyon	153125	1241525
3.enjeksiyon	152985	1223541
4.enjeksiyon	153256	1234548
5.enjeksiyon	152368	1234521
6.enjeksiyon	152988	1225242
ort	152927,8	1230396,8
ss	307,8	7567,1
%Rss	0,2	0,6

Çalışma aralığı parametresinde Folik asit'in çözücü ortamında %10 ve %160 konsantrasyonlarda hazırlanarak verilen enjeksiyonlara ait alanlar arasındaki %Rss değerlendirildiğinde kabul kriteri olan $\%Rss < 2$ sağlanmıştır.

4.2.4 Gözlenebilirlik (LOD) ve Ölçme Sınırı (LOQ)

Folik asit maddesine ait LOQ ve LOD değerleri yöntem 3.2.2.5'de anlatıldığı şekilde çalışmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-30'da verilmektedir.

Tablo 4-30 Folik Asit LOD ve LOQ değerlerine ait bulgular

	Çözücü Ortamı
LOD (mg/mL)	0,000070
LOQ (mg/mL)	0,000213

4.2.5 Doğruluk Parametresine Ait Bulgular

Yöntem 3.2.2.6'da anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Folik Asit için %80, %100 ve %120 konsantrasyonlarında bulunan doğruluk parametresi sonuçları Tablo 4-31'de verilmektedir.

Tablo 4-31 Folik Asit doğruluk parametresine ait bulgular

% Konsantrasyon Değerleri	Tartım miktarları (mg)	Teorik Konsantrasyon (mg/mL)	DeneySEL Konsantrasyon (mg/mL)	Geri kazanım (%)	Ortalama (%)	Standart Sapma	Rss (%)
80	4,032	0,020	0,0204	101,1	101,0	0,4	0,4
	4,055	0,020	0,0205	101,2			
	4,121	0,020	0,0207	100,4			
100	5,025	0,025	0,0251	100,0	100,0	0,5	0,5
	5,012	0,025	0,0249	99,5			
	5,022	0,025	0,0252	100,5			
120	6,014	0,030	0,0304	101,1	100,3	0,7	0,7
	6,020	0,030	0,0302	100,2			
	6,110	0,030	0,0304	99,7			

Folik asit için, doğruluk parametresinde hazırlanan her bir örnekte % geri kazanım ve enjeksiyonlar arası %Rss hesaplanmıştır. Çözücü ortamında Folik asit pikine ait bulunan tüm geri kazanım verileri %98,0- %102,0 arasında olup, %Rss değerleride %2'den küçük bulunarak, tüm veriler kabul kriterlerini sağlamaktadır.

4.2.6 Kesinlik Parametresine Ait Bulgular

4.2.6.1 Sistem Kesinliği Parametresine Ait Bulgular

Yöntem 3.2.2.7'de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Çözücü ortamında verilen altı enjeksiyon sonucunda alan değerleri, alan değerleri arasındaki %Rss ve alıkonma zamanları Tablo 4-32'de verilmektedir.

Tablo 4-32 Folik asit sistem kesinliğine ait bulgular

	Alan Değerleri	Alıkonma Zamanı (dk.)
1.enjeksiyon	765249	4,4
2.enjeksiyon	775489	4,3
3.enjeksiyon	754512	4,4
4.enjeksiyon	756984	4,4
5.enjeksiyon	768547	4,4
6.enjeksiyon	774587	4,3
Ort	765894,7	4,4
SS	8763,8	0,05
%Rss	1,1	1,2

Sistem kesinliği parametresinde, çözücü ortamında ard arda yapılan enjeksiyonlar sonucu elde edilen alanlar ve alıkonma zamanları değerlendirildiğinde, %Rss değerleri %2'den küçük bulunarak kabul kriterini sağladığı gösterilmektedir.

4.2.6.2 Tekrarlanabilirlik Parametresine Ait Bulgular

Yöntem 3.2.2.7'de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Folik asit'e ait altı farklı numune enjeksiyon alanları arasındaki uyum ve her bir numunedeki Folik asit %miktarlarına ait elde edilen sonuçlar Tablo 4-33'de verilmektedir.

Tablo 4-33 Folik asit tekrarlanabilirlik parametresine ait bulgular

Numune Enjeksiyon Sayısı	Alan Değerleri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.1	787422	98,8	98,6
1.2	784458	98,4	
2.1	795585	101,2	100,2
2.2	778586	99,1	
3.1	755665	96,9	98,4
3.2	778544	99,9	
4.1	785844	98,1	98,6
4.2	795325	99,2	
5.1	778445	98,4	99,0
5.2	788555	99,7	
6.1	779588	99,3	99,1
6.2	775899	98,8	
ORT			99,0
SS			0,6
%Rss			0,6

Tablo 4-34 Folik Asit'in tekrarlanabilirlik parametresinde standart alan ve %uyum değerler

Standart Çözelti Alan (Analiz Başlangıcı)	774199,0
	784558,0
Standart Çözelti Alan (Analiz Sonu)	774563,0
	785444,0
Analiz Başlangıcında %Uyum	99,8
Analiz Sonunda %Uyum	99,4

Tekrarlanabilirlik parametresinde, çalışılan çözücü ortamında verilen enjeksiyonlar sonucunun Folik asit pikine ait numune alanlarının birbiri içerisindeki %Rss değeri %2'nin altında olup, analiz başlangıcında ve sonunda verilen standart

çözelti enjeksiyonlarının birbiriyle uyumu kontrole edilip, sonuçlar %98-%102 arasında bulunmuştur.

4.2.6.3 Laboratuvar İçi Kesinlik Parametresine Ait Bulgular

Yöntem 3.2.2.7’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. 1.cihaz ve 2.cihaz için farklı günlerde hazırlanan Folik asit maddesi için numuneler üzerindeki laboratuvar varyasyonlarının sonuçları değerlendirilmiş ve %fark olarak sonucu Tablo 4-35 ve Tablo 4-36’de verilmektedir.

Tablo 4-35. Folik asit laboratuvar içi kesinlik parametresine ait bulgular-1

Numune Enjeksiyon Sayısı	Alan Değerleri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.1	788555	100,3	99,5
1.2	776644	98,8	
2.1	776963	99,1	98,7
2.2	771346	98,4	
3.1	783436	99,9	99,3
3.2	773169	98,6	
4.1	782122	99,7	100,7
4.2	796634	101,6	
5.1	794553	99,8	98,7
5.2	776455	97,6	
6.1	778548	98,6	98,4
6.2	775466	98,2	
ORT			99,2
SS			0,8
%Rss			0,8

Tablo 4-36 Folik asit laboratuvar içi kesinlik parametresine ait bulgular-2

Numune Sayısı	Cihaz I / Gün I (Tekrarlanabilirlik Değerleri)	Cihaz II /Gün II
1	98,8	100,3
2	98,4	98,8
3	101,2	99,1
4	99,1	98,4
5	96,9	99,9
6	99,9	98,6
Ortalama	99,0	99,7
SS	0,6	0,8
%Rss	0,6	0,8
% Fark	0,7	

Laboratuvar içi kesinlik parametresinde, farklı günlerde ve farklı cihazlarda tekrarlanan çalışma sonuçlarının birbiri içerisindeki yakınlık derecesini ifade eden

Folik asit numunelerine ait %fark değeri hesaplandı. Folik asit çözücü ortamında %fark değeri %2'den küçük bulunarak kabul kriteri %fark < 2.0 değerini sağladığı gösterilmektedir. Bulunan sonuç, bu koşullarda hazırlanan IXA çözeltisinin bir başka cihaz ve bir başka analist tarafından çalışılabileceği gösterilmektedir.

4.2.7 Dayanıklılık Parametresine Ait Bulgular

Yöntem 3.2.2.8'de anlatıldığı şekilde anlatılmıştır. Folik asit için her bir değişen parametreye karşılık numunelerin %miktar, %Rss ve % fark değerlendirilmiştir. Ayrıca alıkonma zamanları, kuyruklanma faktörleri de Tablo 4-37'de verilmektedir.

Tablo 4-37 Folik asit dayanıklılık parametresine ait bulgular

Parametre	% Miktar	%Rss	% Fark	Alıkonma Zamanı	Kuyruklanma Faktörü
Normal çalışma koşulları	100,8	0,2	-	4,4	1,0
Akış hızı 0,9 mL/dk	101,4	0,3	0,5	5,3	1,1
Akış hızı 1,1 mL/dk	100,4	1,2	0,5	3,4	1,0
Kolon Sıcaklığı 20°C	101,5	0,4	0,6	4,4	1,1
Kolon Sıcaklığı 30°C	100,5	0,2	0,3	4,5	1,1

Dayanıklılık parametresinde, Folik asit için normal koşullara karşılık çalışılan tüm koşullarda, kabul kriterleri olan kuyruklanma faktörü <2,0 ve %fark <2,0 değerini sağlayıp sağlamadığı değerlendirilmiştir. Bulunan tüm sonuçlar kabul kriterleri aralığında bulunmaktadır.

4.2.8 Çözelti Stabilitesi Parametresine Ait Bulgular

Yöntem 3.2.2.9'da anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Folik asit standart ve numunesine ait belirli saatlerde enjekte edilen enjeksiyonlardan elde edilen alanlar ve 0.zamana göre %fark değerleri Tablo 4-38'de verilmektedir.

Tablo 4-38 Folik asit standart çözelti stabilitesine ait bulgular

Zaman (Saat)	Alan Değeri	% Fark
Başlangıç zamanı	778589	-
2.	784457	0,8
4.	778566	0,0
6.	785312	0,9
8.	783369	0,6
12.	774133	0,6
24.	785563	0,9
36.	782214	0,5
48.	775563	0,4

Tablo 4-39 Folik asit numune çözelti stabilitesine ait bulgular

Zaman (Saat)	Alan Değeri	% Fark
Başlangıç zamanı	785563	-
2.	795563	1,3
4.	778558	0,9
6.	785455	0,0
8.	795563	1,3
12.	774114	1,5
24.	785569	0,0
36.	775441	1,3
48.	775685	1,3

Folik asit'in çözelti stabilitesi değerlendirildiğinde, çözücü ortamında Folik asit çözeltileri 48 saat boyunca stabil olduğu, başlangıç enjeksiyon ile 48 saat boyunca alınan enjeksiyon alanları arasındaki % fark'ın 2'den küçük bulunması nedeni ile kabul kriterleri sağlanmaktadır.

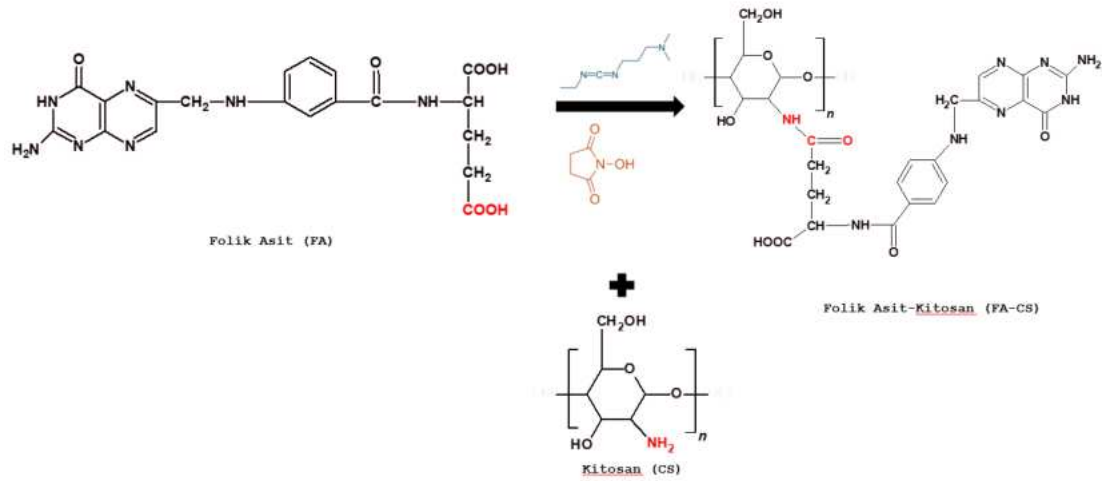
4.3 *In-vitro* Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

In-vitro karakterizasyon çalışmaları kapsamında, IXA yüklü FACS NP, FAALG NP ve FACS-FAALG blend NP sistemleri başarılı bir şekilde hazırlanmış ve FTIR, ¹H-NMR, XRD, SEM, TEM yöntemleri kullanılarak NP sisteminlerine ait kimyasal, morfolojik ve termal özellikleri incelenmiştir. Tez çalışmasının sentez basamalarının, ilk aşamasında polimerlerin (CS, ALG) FA ile modifikasyonu, ikinci aşamada FACS ve FAALG moleküllerinin NP'lerinin hazırlanması, üçüncü aşamada ise IXA etkin maddesinin hazırlanan NP'lere yüklenmesi ve son aşamada IXA yüklü FACS-FAALG nanopartikül blend sisteminin elde edilmesi olarak

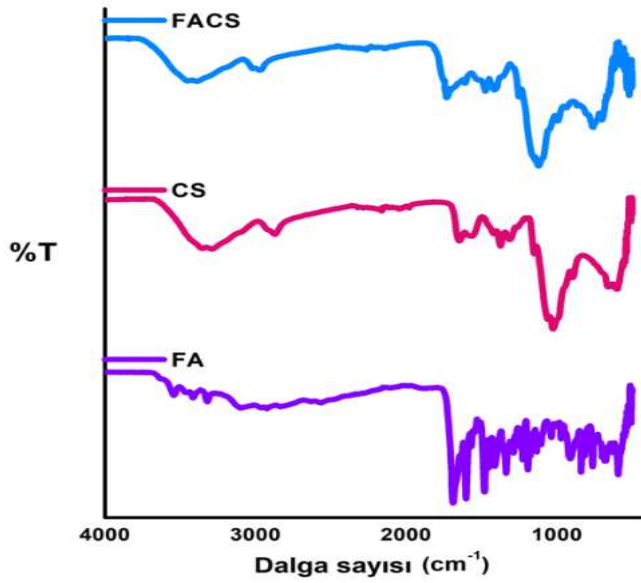
özetlenebilir. Hazırlanan NP'lere ait partikül boyutları ve zeta potansiyelleri incelenmiştir. Yapılan tüm karakterizasyon çalışmalarına ait bulgular Şekil 4.8 – 4.45 arasında ve Tablo 4-40 – 4-46 arasında verilmektedir.

4.3.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi Bulguları

Yöntem 3.2.6.1'de anlatıldığı şekilde folik asit ile modifiye edilerek sentezlenen FACS, yöntem 3.2.3'de anlatıldığı şekilde hazırlanan aljinik asit, folik asit ile modifiye edilerek sentezlenen FAALG moleküllerine ait reaksiyon tepkimeleri Şekil 4.8 ve Şekil 12'de, FTIR spektrumları ise, Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verilmektedir.

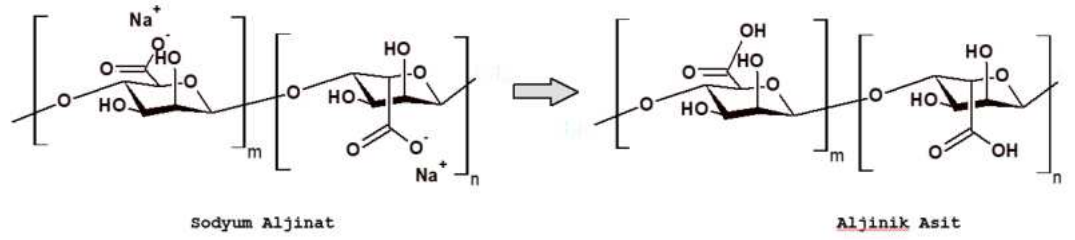


Şekil 4.8 FA-CS Konjugasyonu

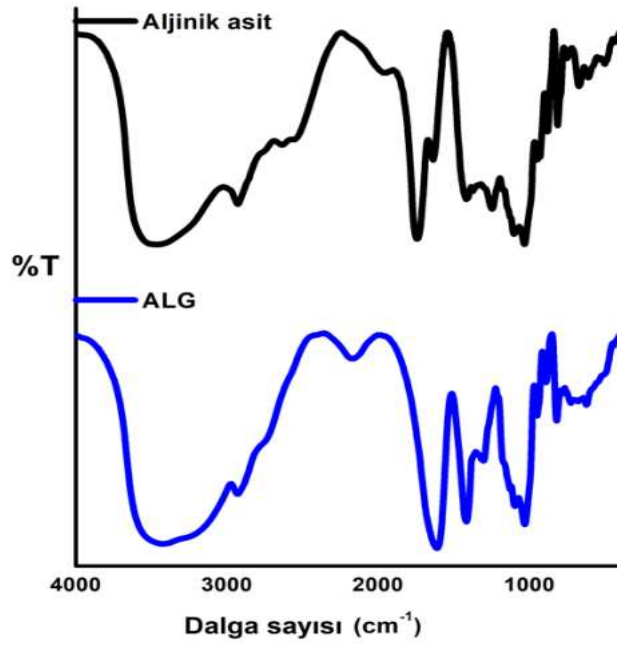


Şekil 4.9 Folik asit, Kitosan ve FACS molekülüne ait FTIR spektrumları

Şekil 4.9'daki FA'e ait karakteristik pikler 3541, 3414, 3319, 2957, 2922, 1688, 1636, 1605, 1481 ve 1412 cm^{-1} 'de gözlemlenmektedir. 3600- 3000 cm^{-1} arasında görünen pikler hidroksil (-OH) gerilmesine ve N-H gerilmesinden kaynaklanmaktadır. Spesifik C=O gerilmesini 1688 cm^{-1} 'de, C=C gerilmesi ise, 1605 cm^{-1} 'de bulunan piklere atfedilmektedir. Ayrıca 839 cm^{-1} keskin pik benzen halkasına ait gerilme pikini göstermektedir (P. Li et al., 2011; Vikas et al., 2021). Kitosan spektrumunda, 3350 cm^{-1} 'deki pik N-H gerilme titreşimini, 2922 cm^{-1} ve 2844 cm^{-1} C-H gerilme titreşiminin fonksiyonel gruplarının varlığını ortaya koymaktadır (Depan et al., 2011). 1647, 1553 ve 1310 cm^{-1} 'deki pikler ise, kitosanın karakteristik özelliğini yansıtmaktadır. Ayrıca 1150 cm^{-1} de uzanan C-O gerilmesi, 1057 cm^{-1} 'de uzanan ise C-O-C gerilme titreşimlerini göstermektedir. Kitosana ait 644 cm^{-1} 'deki pik ise, piranozid halkasına ait gerilmeyi yansıtmaktadır (Ji et al., 2012). FA'in CS'ye başarılı bir şekilde konjugasyonu, hem CS'ye hem de FA'e ait karakteristik bantların varlığının FA-CS spektrumunda görülmesiyle doğrulanmaktadır. CS'de yer alan 1553 cm^{-1} ve 1647 cm^{-1} de amid bantlarının FA-CS spektrumunda 1553 cm^{-1} 'deki bantın kaybolup, 1647 cm^{-1} 'deki bantın ise, 1661 cm^{-1} 'e kaydığı görülmektedir. Ayrıca FA ve CS arasında gelişen hidrojen bağı nedeniyle 3283 cm^{-1} 'de bant genişlemiştir. FTIR analizi sonuçları, FA'in -COOH grubuyla CS'nin -NH₂ grubu arasındaki konjugasyonun başarılı olduğu kanıtlanmaktadır (Ji et al., 2012; Vikas et al., 2021).

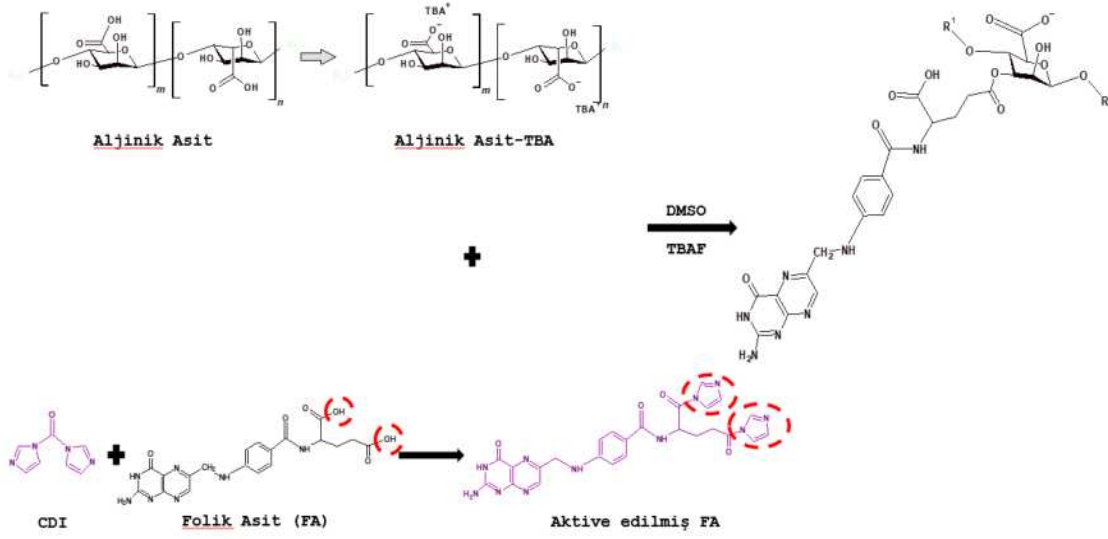


Şekil 4.10 Sodyum Aljinat polimerinden Aljinik asit eldesi

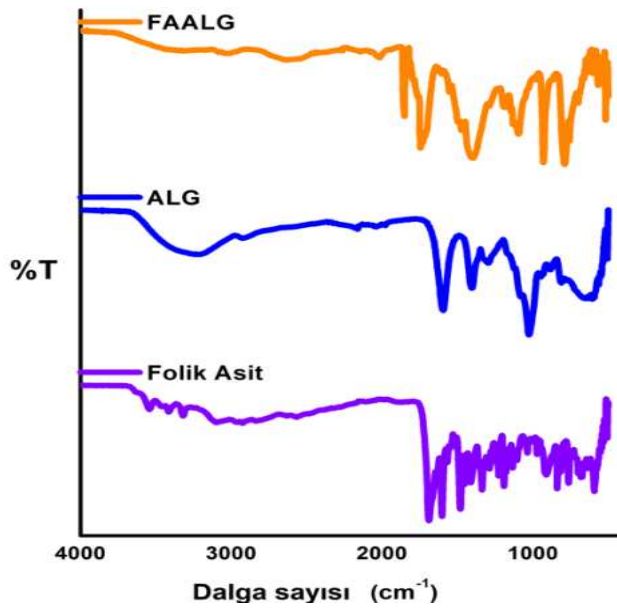


Şekil 4.11 Aljinat ve Aljinik Asit'e ait FTIR spektrumları

Aljinat ve Aljinik asit spektrumu incelendiğinde, Aljinata ait O-H bağlarının gerilmeleri $3600-3000\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenirken, C-H'nin düşük şiddetli gerilme piki, 2925 cm^{-1} 'de gözlemlenmiştir. Karboksilat tuzu gruplarının asimetrik ve simetrik gerilme pikleri sırasıyla, 1629 ve 1400cm^{-1} 'de gözlemlenmiştir. Aljinik asit spektrumunda görülen ise, 1741 cm^{-1} deki bant $-\text{COOH}$ gerilmesine atfedilmektedir (Taha et al., 2005). 3461 cm^{-1} bant, aljinik asitteki $-\text{OH}$ bağlarını gösterirken, 2923 cm^{-1} bant ise, C-H gerilme bantlarını göstermektedir (Hamouda et al., 2021; Rosu et al., 2009).



Şekil 4.12 FA-ALG Konjugasyonu

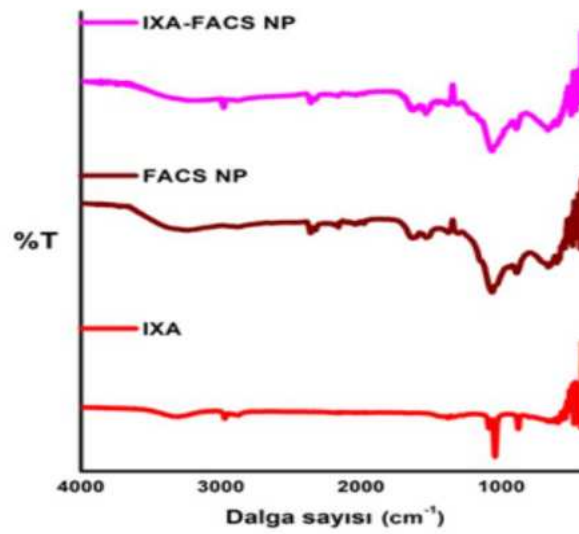


Şekil 4.13 Folik Asit, Aljinat ve FAALG molekülüne ait FTIR spektrumları

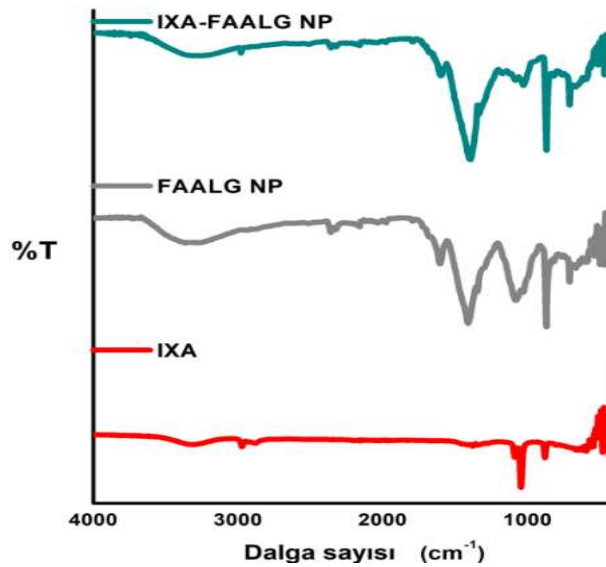
Şekil 4.13’de saf FA’in spektrumu incelendiğinde –OH ve NH– gruplarına ait pik gerilmeleri sırasıyla 3550 cm⁻¹ ve 3300 cm⁻¹ gerilmeleri görülmektedir. Ayrıca 1690 cm⁻¹ ve 1603 cm⁻¹’deki pikler C=O ve N–H gerilmelerine karşılık gelmektedir. Aljinat spektrumu incelendiğinde, spesifik, hidroksil grubu 3300 cm⁻¹’de ve –COO bağının gerilmesi ise 1600 cm⁻¹’de görülmektedir. FAALG molekülüne ait FTIR spektrumunda, 1727 cm⁻¹ ester-karbonil (C=O) gerilme

titreşimlerini, 1188 cm^{-1} C-O-C gerilme titreşimlerini ortaya koymaktadır. FA ve ALG'ın spesifik gruplarına ait pikler FAALG FTIR spektrumunda net bir şekilde görülmüş olması, FAALG molekülünün başarılı bir şekilde sentezlendiğini ortaya konmuştur (Sarmiento et al., 2006; Sinha et al., 2006; Zhang et al., 2008).

Yöntem 3.2.6.1'de anlatıldığı şekilde hazırlanan FACS NP ve IXA yüklü NP'lere ait FTIR spektrumları sırasıyla Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'de verilmektedir.

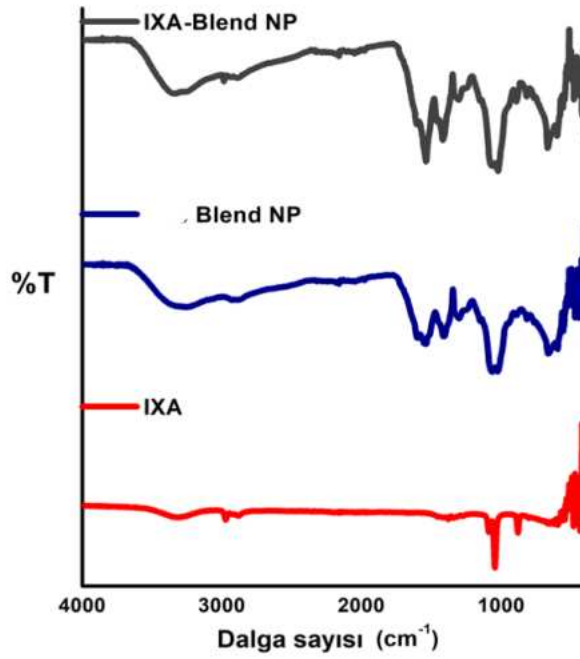


Şekil 4.14 IXA, FACS NP ve IXA yüklü FACS NP ait FTIR spektrumları



Şekil 4.15 IXA, FAALG NP ve IXA yüklü FACS NP'lerine ait FTIR spektrumları

IXA etkin maddesinin FTIR spektrumu incelendiğinde, kimyasal yapısındaki fonksiyonel gruplarına ait olan pikler gözlemlenmiştir. Karakteristik pikler değerlendirildiğinde, 3600-3200 cm^{-1} hidroksil grubuna ait yayvan pik, molekül arası hidrojen bağlarından kaynaklanmaktadır. 2972 cm^{-1} dalga sayısındaki C-H olarak atfedilebilir. IXA yüklü FACS NP ve FAALG NP ile yüklü olmayan NP'lere ait FTIR spektrumları benzerdir (Siafaka et al., 2015).

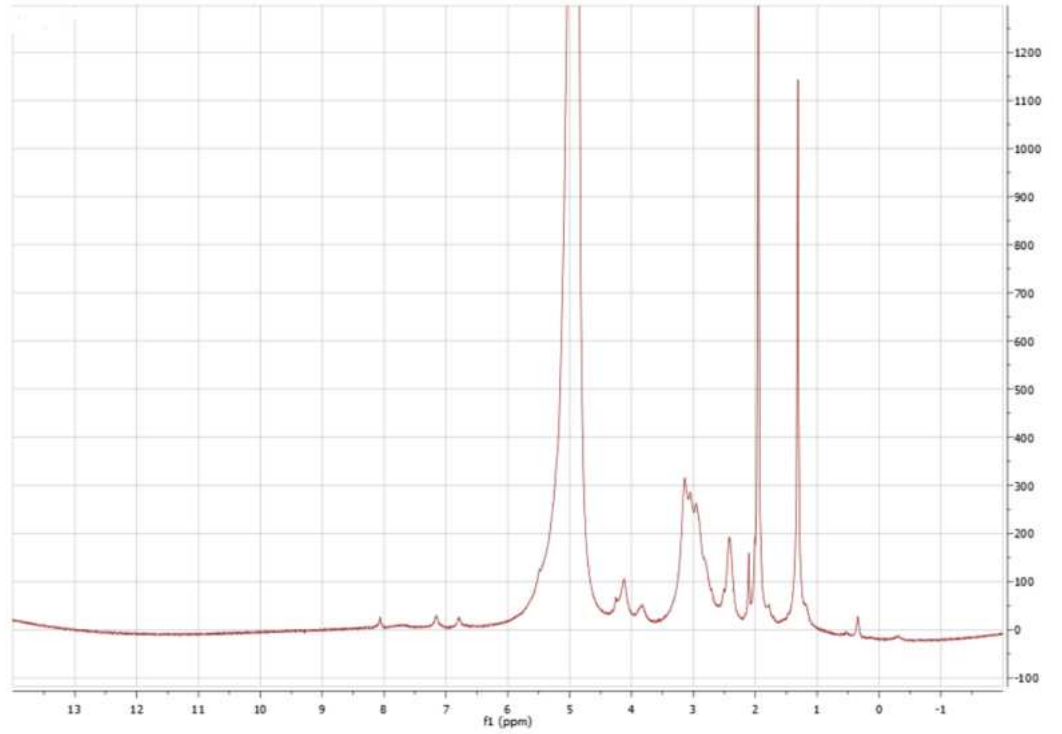


Şekil 4.16 IXA, Blend NP ve IXA yüklü Blend NP ait FTIR spektrumları

Şekil 4.16 incelendiği, IXA yüklü FACS-FAALG blend NP ve FACS-FAALG blend NP'in FTIR spektrumları incelendiğinde, FACS 1628 cm^{-1} 'deki bandı FAALG ile reaksiyondan sonra 1539 cm^{-1} 'e kayıp genişlediğini, 3600-3200 cm^{-1} aralığında -OH ve -NH₂'nin gruplarına ait piklerin üst üste çakıştığı görülmektedir. Bu sonuçlarla, FACS/FAALG blend NP'lerinde FAALG'nin karbosilik grubuyla FACS'deki amonyum gruplarının etkileşim gösterdiği kanıtlanmıştır (A. Wang et al., 2015).

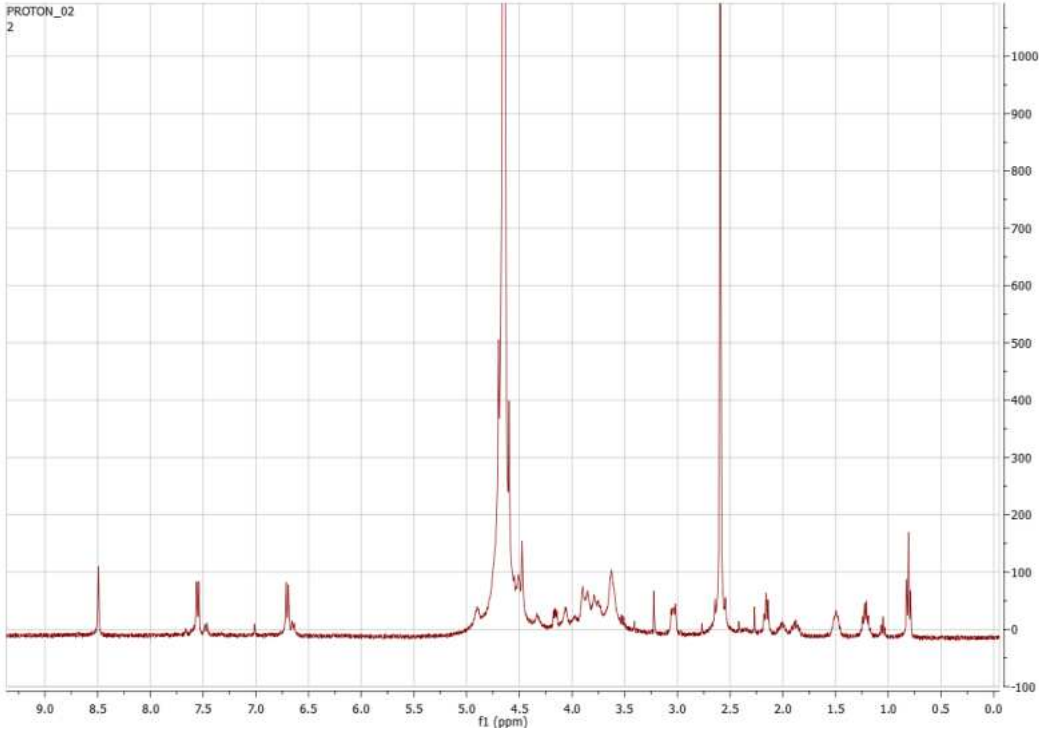
4.3.2 Proton Nükleer Manyetik Rezonans (^1H -NMR) Analiz Bulguları

Folik asit ile modifiye edilerek sentezlenen yeni polimerik FACS ve FAALG moleküllerine ait yapıların aydınlatılabilmesi için alınan ^1H spektrumları Şekil 4.17 ve Şekil 18’de verilmektedir.



Şekil 4.17 FACS molekülüne ait ^1H NMR spektrumu

FACS molekülünün ait ^1H NMR spektrumu incelendiğinde, Şekil 4.17’de görülen 6,2 ve 8,0 ppm arasındaki sinyaller, folik asidin aromatik protonlarına karşılık gelirken, 2,0 ppm’deki sinyal, amidin yanındaki karbon atomuna bağlı gelen protonlara karşılık gelir. Ayrıca kitosana ait şeker halkasındaki karbon atomlarına bağlı protonlara 5,0, 3,20, 2,90 ve 2,5 ppm’deki tepe noktaları karşılık gelir. Tespit edilen tüm tepe noktaları literatürlerle karşılaştırıldığında uyumlu bulundu. Sonuç olarak ^1H -NMR spektrumu, CS polimeri, FA ile başarılı bir şekilde modifiye edilerek sentezlendiğini göstermektedir (P. Li et al., 2011; C. Yang et al., 2014).

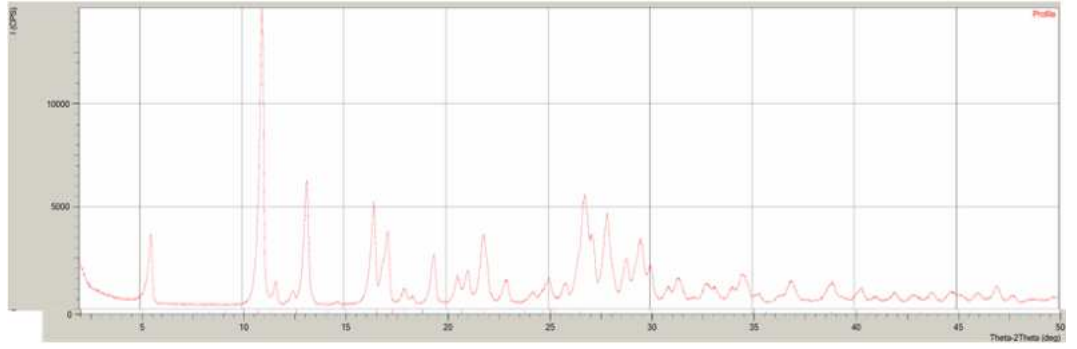


Şekil 4.18 FAALG molekülüne ait ^1H NMR spektrumu

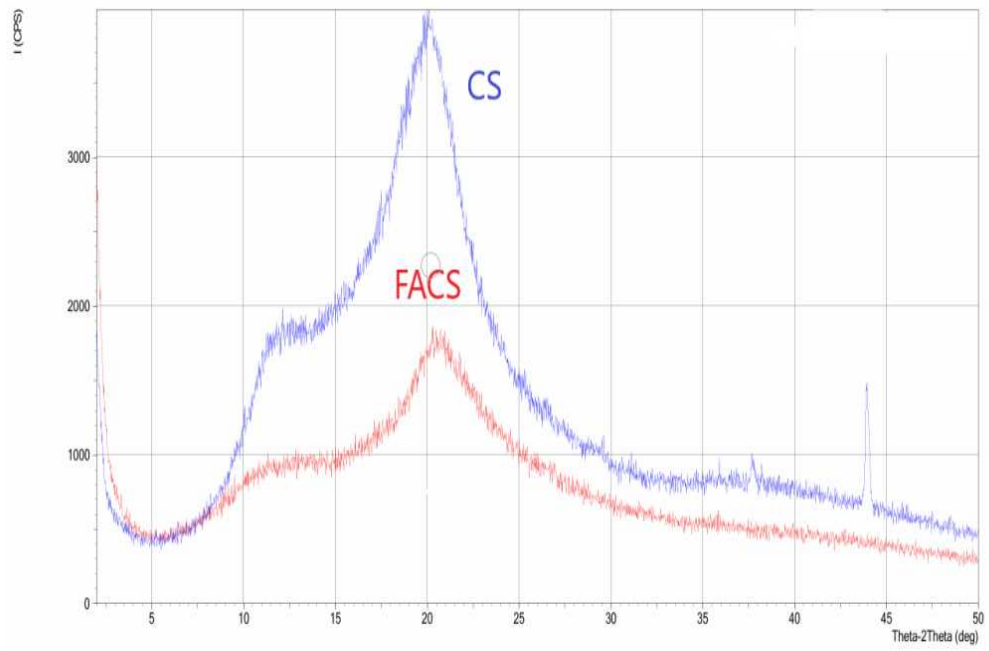
FAALG molekülüne ait ^1H NMR spektrumu incelendiğinde, 8.5 ve 7.6 ppm'deki tepeler Folik asit'in pterin halkasına atfedilirken, 7.5, 6.7 ve 6.6 ppm'deki tepeler ise, Folik asit'in aromatik protonlarına karşılık gelmektedir. Ayrıca 4.0 ile 5.0 ppm arasında görülen tepelerin ise aljinatın temel yapısına atfedilir. Tüm bu veriler, Aljinatın Folik asit ile başarılı bir şekilde modifiye edilerek sentezlendiğini göstermektedir (S. Lee ve Lee, 2020).

4.3.3 X-Işını Difraksiyon Spektroskopisi (XRD) Analiz Bulguları

Yöntem 3.2.6.3'de anlatıldığı gibi XRD analizi gerçekleştirilmiştir. FA, CS, ALG, FACS ve FAALG moleküllerine ait XRD spektrumları Şekil 4-19, Şekil 4-20 ve Şekil 4-21'de verilmektedir.

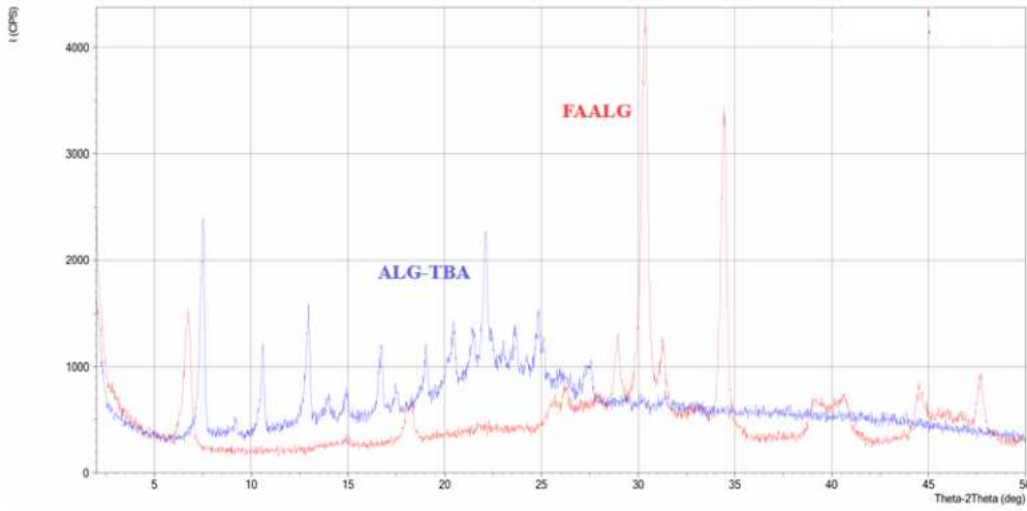


Şekil 4.19 FA'e ait XRD spektrumu



Şekil 4.20 FACS molekülüne ait XRD spektrumu

Kitosana ait iki spesifik kristalin tepe noktalarını 2θ açısıyla $10,8^\circ$ ve $20,0^\circ$ gösterildi. FA'de ise birden fazla kristalin tepe noktaları gözlemlenmektedir. FA-CS spektrumunda ise, $10,8^\circ$ 'deki kaybolması ve $22,0^\circ$ 'de tepe nokta kaymasının ortaya çıkması ise, FA'e ait karboksilik grubunun CS'nin NH_2 grubuna bağlanması şeklinde açıklanmaktadır (Ali et al., 2018; Aziz et al., 2019; Geethakumari et al., 2022).

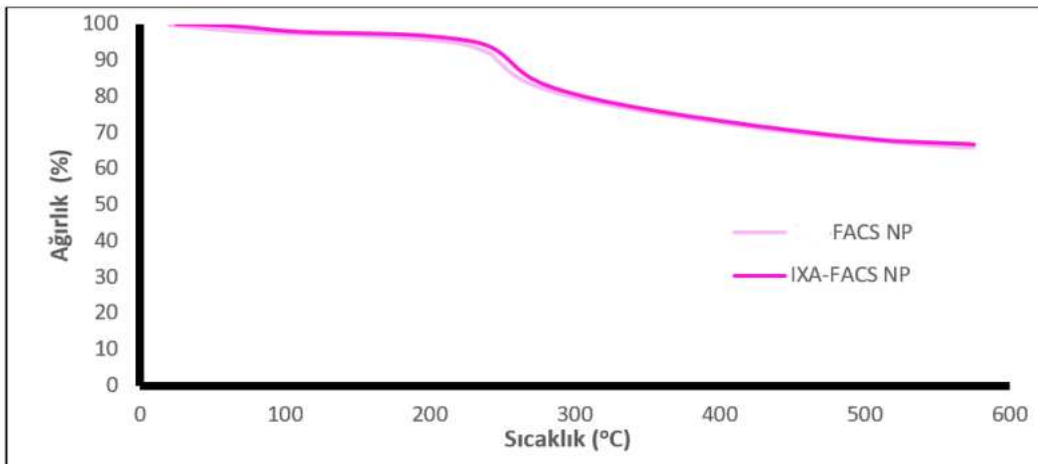


Şekil 4.21 FAALG molekülüne ait XRD spektrumu

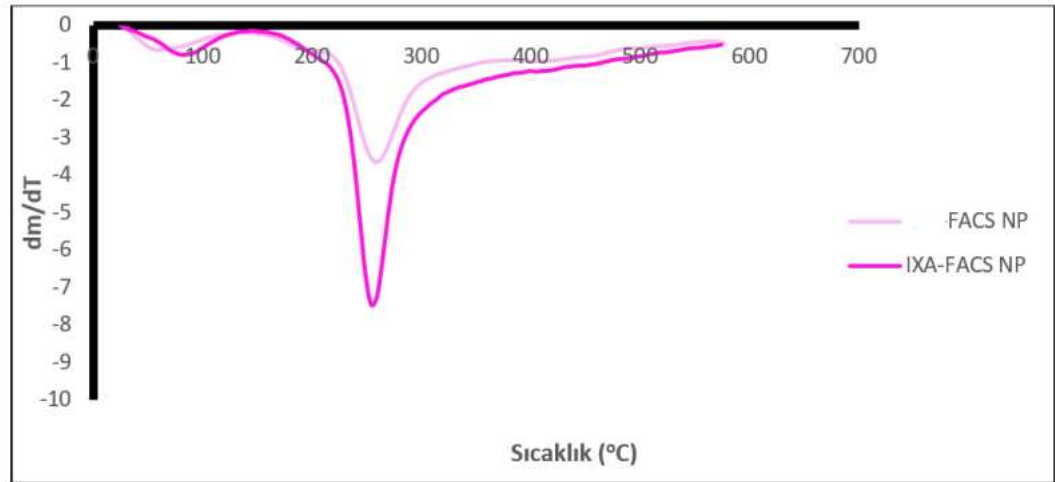
Şekil 4.21’de verilen FAALG molekülüne ait XRD spektrumu incelendiğinde ALG-TBA’nın 8° tepe nokta kayması sonucunda 6°’da gözlemlenmesi, ayrıca ALG-TBA spektrumunda bazı tepe noktalarının kaybolarak FAALG farklı tepe noktalarının oluşması yapının kristalliğinin yapısının azaldığını ve amorf yapı özelliğinin arttığı şeklinde açıklanabilmektedir (Abbasi et al., 2023).

4.3.4 Termogravimetrik Analiz (TGA) Bulguları

FACS NP’e ait TG ve DTG termogramları Şekil 4-22 ve Şekil 4-23’de verilmektedir.



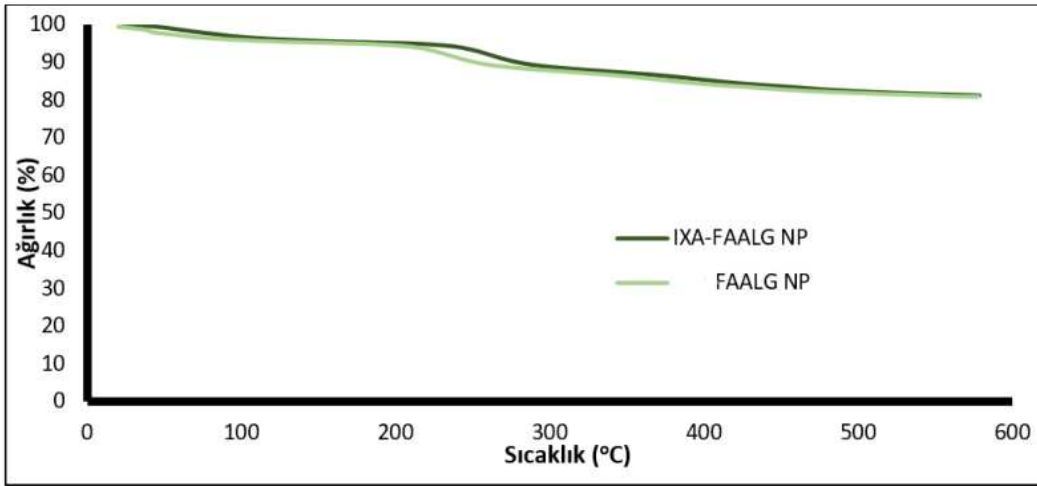
Şekil 4.22 FACS NP ve IXA yüklü FACS NP’üne ait TGA



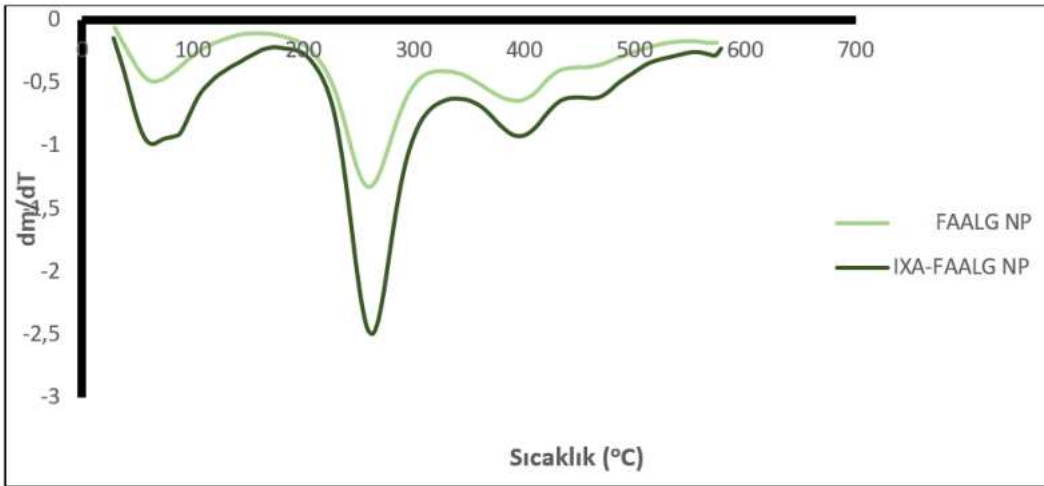
Şekil 4.23 FACS NP ve IXA yüklü FACS NP'üne ait DTG

FACS NP'e ait TG ve DTG termogramları incelendiğinde bozunmanın 2 aşamada gerçekleştiği ve 600 °C'de %66 kalıntı kaldığı görülmektedir. İlk ağırlık kaybı 45 ile 120 °C arasında olup örnek içerisindeki nemin uzaklaşmasından kaynaklanmaktadır. 190°C ile yaklaşık 450°C aralığında gerçekleşen ikinci bozunma adımı ana polimer zincirine ait olan bozunmayı göstermektedir. İkinci bozunma adımı için T_{max} değeri 257 °C olarak kaydedilmiştir. Elde edilen veriler Nguyen ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen pluronik P123-graft kitosan-folat (CP-FA) bileşenine ait TGA verileri ile benzerlik göstermektedir (V. T. Nguyen et al., 2019). IXA/FACS NP'e ait TG ve DTG termogramları incelendiğinde ise, FACS NP'e benzer ısısal davranışa sahip olduğu gözlemlendi. 600°C'de FACS NP ve IXA/FACS NP için arta kalan madde miktarı yaklaşık %66 olarak kaydedilmiştir.

FAALG NP ve IXA/FAALG NP ait TG ve DTG termogramları Şekil 4-24 ve Şekil 4-25'de verilmektedir.



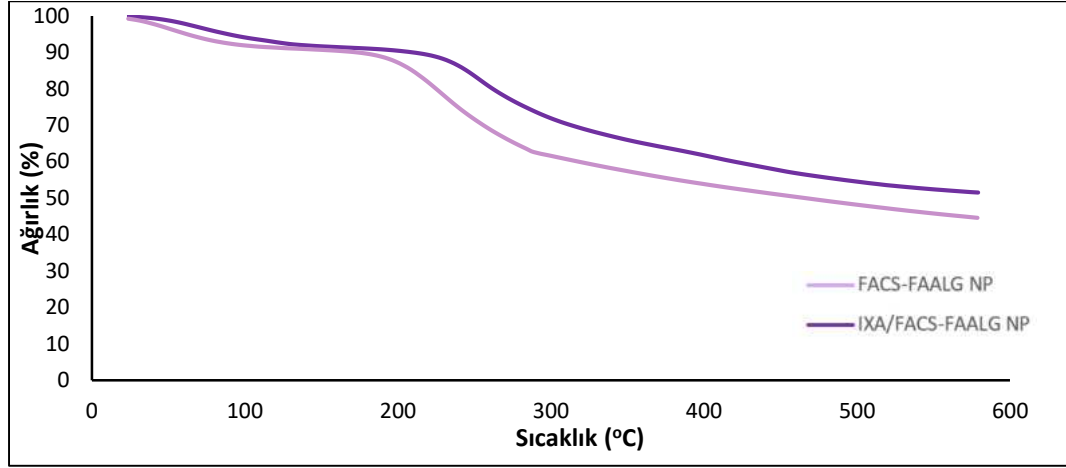
Şekil 4.24 FAALG NP ve IXA yüklü FAALG NP'üne ait TGA



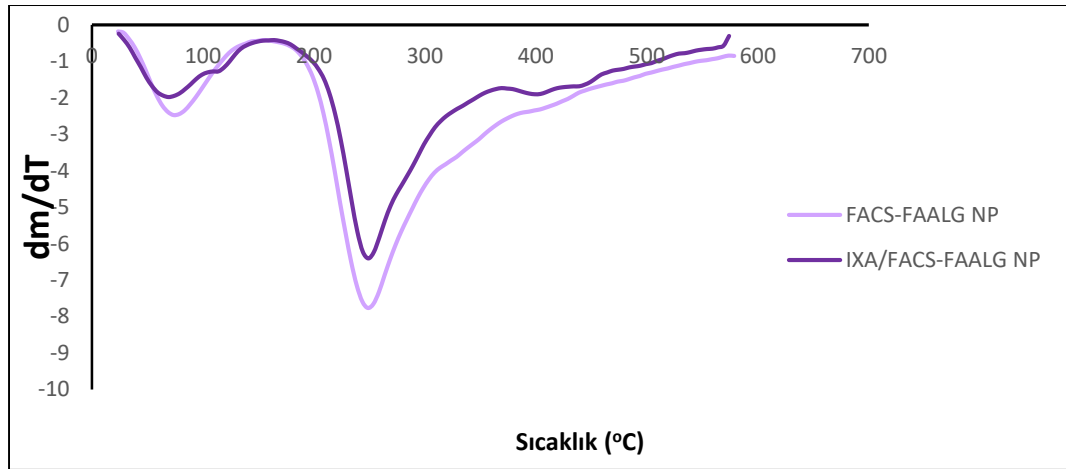
Şekil 4.25 FAALG NP ve IXA yüklü FAALG NP'üne ait DTG

FAALG NP ve IXA/FAALG NP ait termogramlar incelendiğinde termal açıdan her iki nanopartikülün 0 ile 600°C aralığında benzer davranış sergilediği görülmektedir. Nanopartiküller 4 aşamada bozunmaya uğramakta ve 600 °C'de %80 kalıntı bırakmaktadır. İlk ağırlık kaybı 60 ile 120 °C arasında olup örnek içerisindeki nemin uzaklaşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. 204 ile 324°C arasında gerçekleşen ikinci aşamada, artan sıcaklık ile biyopolimerler arasındaki bağların kırılmaya başladığı, konformasyon değişikliklerinin olduğu ve polimer zincirlerinin kırılmasının meydana geldiği düşünülmektedir (Camacho et al., 2019). İkinci bozunma adımı için T_{max} değeri 259 °C olarak kaydedilmiştir. Üçüncü bozunma 344 ile 439°C'de, kalan kütlenin çok yavaş bozunduğunu göstermektedir (Kaidi et al., 2022). Üçüncü bozunma adımı için T_{max} değeri 399 °C olarak

kaydedilmiştir. 4. basamak ise çok yavaş bozunma hızından 444 ile 494 °C sıcaklık aralığında ve 469 °C maksimum bozunma sıcaklığında gerçekleşmektedir.



Şekil 4.26 FACS-FAALG blend NP ve IXA yüklü FACS-FAALG blend NP'üne ait TGA termogramları



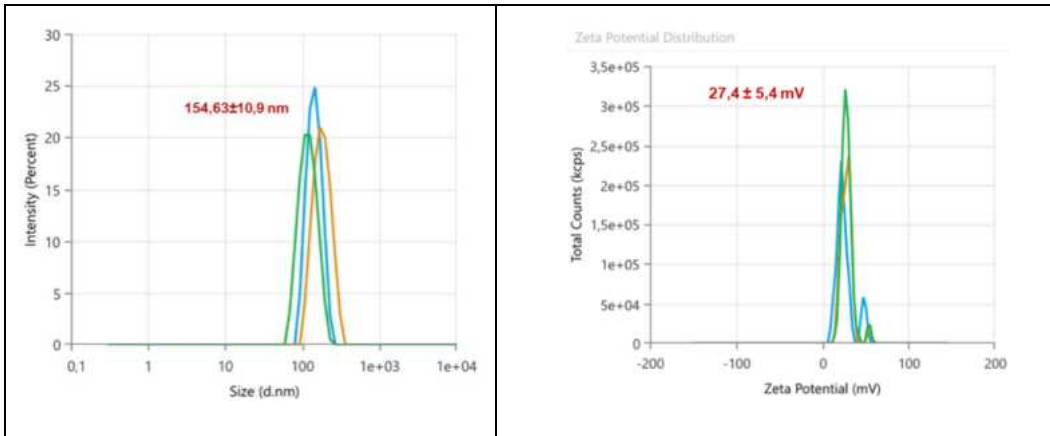
Şekil 4.27 FACS-FAALG blend NP ve IXA yüklü FACS-FAALG blend NP'üne ait DTG termogramları

FACS-FAALG blend NP'e ait TG ve DTG termogramları Şekil 4-26 ve Şekil 4-27'de verilmektedir. FACS-FAALG blend NP ve IXA/FACS-FAALG blend NP'lere ait TG ve DTG termogramları incelendiğinde nanopartiküllerin 2 ana basamakta bozunduğu görülmektedir. İlk bozunma, 50 ile 115 °C arasında olup örnek içerisindeki suyun uzaklaşmasından kaynaklanmaktadır. İkinci bozunma adımı 200 °C'de başlayarak FACS-FAALG blend NP için yaklaşık 335 °C'de

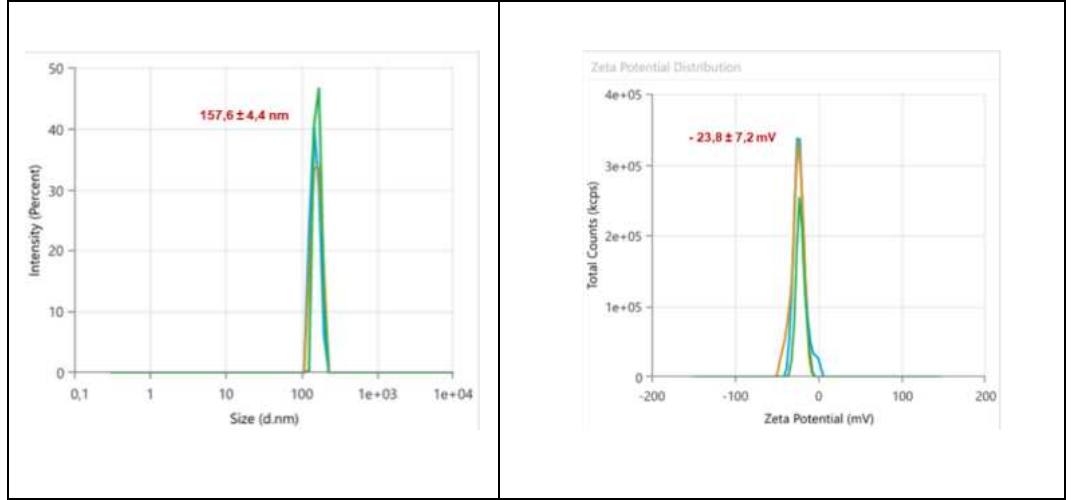
(%58) IXA/FACS-FAALG blend NP için ise 380°C’de (%63)son bulmaktadır. Bu adımda blend NP yapısında bulunan kitosan iskeleti, sakkarit halkalarının dehidrasyon süreciyle ilişkili iki kütle kaybı gösterirken (Furuya et al., 2017), aljinat için ise, alginik asit ve türevlerinin sakkarit halkaları ve makromolekül zincirleri de dahil olmak üzere karmaşık parçalanma süreçlerinden kaynaklanabilmektedir (Elbayomi et al., 2021). Her iki nanopartikülün çok düşük oranda 350 °C’nin üzerinde çok yavaş bozunma hızına sahip 2 adet bozunma basamağı olduğu görülmektedir. 600 °C’de FACS-FAALG NP için %44 ve IXA/FACS-FAALG NP’leri için ise %51 kalıntı kalmıştır.

4.3.5 Partikül Boyutu, Polidispersite İndeksi ve Zeta Potansiyel Değerlerine ait Bulgular

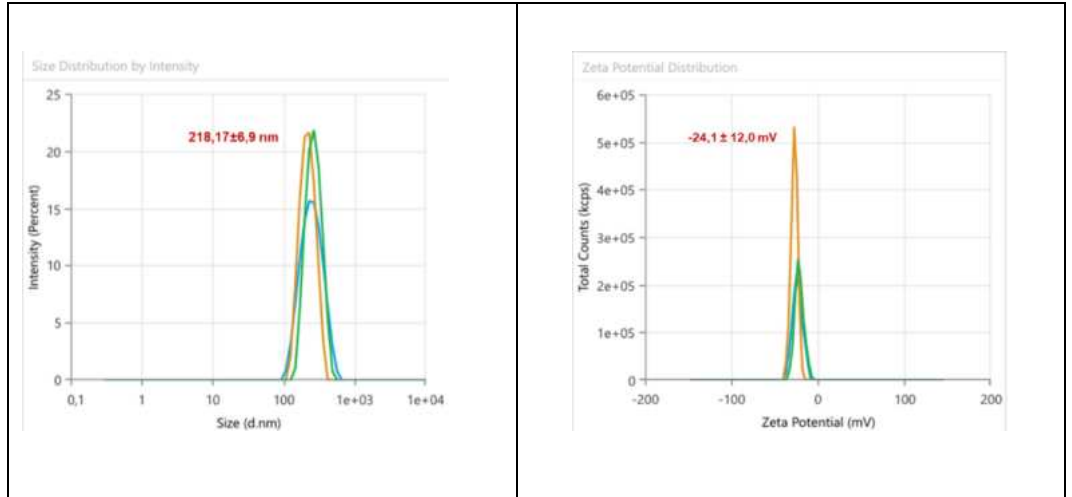
Yöntem 3.2.6.4’de anlatıldığı gibi çalışılmıştır. IXA yüklü FACS, FAALG ve FACS-FAALG blend nanopartiküllerinin boyutları ve zeta potansiyel değerleri Şekil 4.28, Şekil 4.29, Şekil 4.30 ve polidispersite indekslerine ait sonuçlar ise Tablo 4-40’de verilmektedir.



Şekil 4.28 IXA yüklü FACS NP’lerin ortalama boyut ve zeta potansiyel değeri sonucu



Şekil 4.29 IXA yüklü FAALG NP'lerin ortalama boyut ve zeta potansiyel değeri sonucu



Şekil 4.30 IXA yüklü FACS-FAALG blend NP'lerin ortalama boyut ve zeta potansiyel değeri sonucu

Tablo 4-40 Nanopartiküllere ait boyut, zeta potansiyeli ve polidispersite değerleri

İsim	Boyut (nm)	Zeta Potansiyeli(mV)	Polidispersite Değerleri
IXA-FACS NP	154,6±10,9	27,4±5,4	0,5277 ± 0,16
IXA-FAALG NP	157,6±4,4	-23,8±7,2	0,4825 ± 0,12
IXA/FACS-FAALG NP	218,17±6,9	-24,1±12,0	0,5161 ± 0,03

Li ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada FACS NP'lerinin boyutunu 100 nm bulurken, Wang ve arkadaşları ise, FACS NP'lerin boyutunun 161-180 nm arası değiştiğini, Lee ve Lee'nin yapmış oldukları FA-ALG NP boyutlarının ise, 100-400 nm arasında değiştiğini bildirmişlerdir. NP'lerin boyutları FACS-NP,

FAALG NP ve FACS-FAALG NP için sırasıyla $138,8 \pm 7,8$, $147,1 \pm 7,6$, $210,4 \pm 10,1$ bulunurken, IXA yüklü FACS NP, IXA yüklü FAALG NP ve IXA/FACS-FAALG blend NP boyutları sırasıyla $154,63 \pm 10,9$, $157,6 \pm 4,4$ ve $218,17 \pm 2,9$ nm şeklinde bulunmuştur.

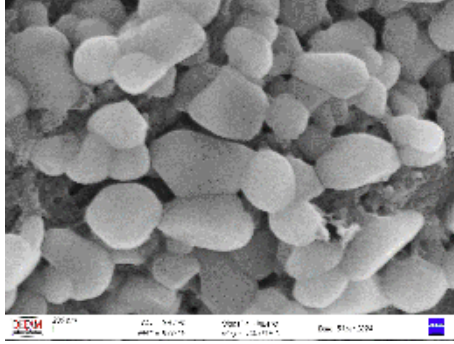
Zeta potansiyelleri, yüklü parçacıklar arasındaki elektrostatik itme veya çekim derecesini yansıtan parçacıkların net yükü olarak tanımlanmaktadır (Warsito vd., 2020). Ayrıca zeta potansiyeli, kolloidal yapıların ne kadar kararlı olduklarını ortaya koymaktadır (Teeranachaideekul et al., 2007). Hazırlanan IXA/FACS NP, IXA/FAALG NP ve IXA/FACS-FAALG blend NP'lerin zeta potansiyelleri sırasıyla $27,4 \pm 5,4$, $-23,8 \pm 7,2$ ve $-24,1 \pm 12,0$ olarak bulunmuştur. FACS NP'nin pozitif zeta potansiyeline sahip olması kitosanın NH_2 grubu üzerindeki NH_3^+ pozitif yüküne atfedilmektedir (Zhang et al., 2004). FAALG NP lerin negatif zeta potansiyeline sahip olması ise, NP yüzeyinde iyonize karboksil gruplarının varlığına atfedilmektedir (El-Houssiny et al., 2017). IXA/FACS-FAALG blend NP zeta potansiyelinin negatif olması ise, blend sisteminde ALG miktarı %80 iken CS miktarı %20 olmasından kaynaklanmaktadır.

Polidispersite indeksi (PDI), parçacık boyut dağılımını gösteren bir parametredir. PDI değeri $>0,7$ olması, formülasyonun parçacık boyut dağılımının DLS yöntemiyle analiz edilmeye uygun olmadığını göstermektedir (Danaei et al., 2018). Tablo 4.40'da görüldüğü gibi hazırlanan tüm NP sistemlerinin PDI değerlerinin $<0,7$ bulunması parçacık boyutlarının homojen olduğunu göstermekte olup, sonuçlarımız literatürle uyumludur.

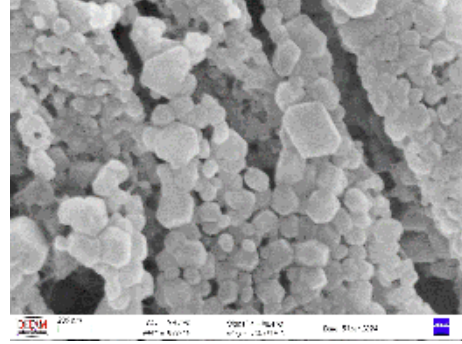
4.3.6 Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizine ait Bulgular

IXA etkin maddesi yüklü FACS, FAALG ve FACS/FAALG nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri Şekil 4-31'de verilmektedir. Hazırlanan tüm nanopartikül sistemlerin SEM görüntülerinde, homojen boyut dağılımı ve küresel morfolojiye sahip oldukları gösterilmiştir. Ayrıca, DLS yöntemiyle bulunan boyut sonuçları ile SEM boyut sonuçları birbirleri ile uyumlu oldukları

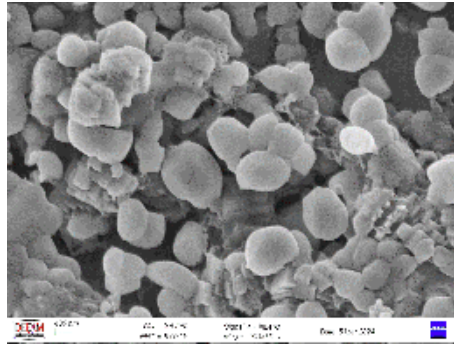
bulunmuştur. Literatürde verilen çalışma sonuçlarıyla elde edilen veriler uyumludur (Ahmad et al., 2023).



(A)



(B)

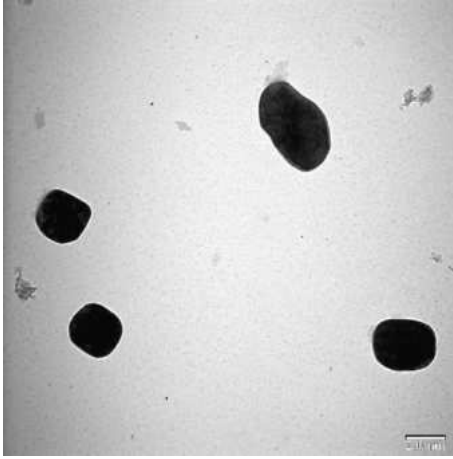


(C)

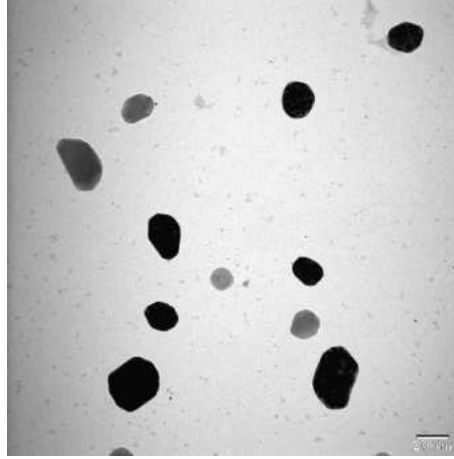
Şekil 4.31 IXA/FACS NP (A), IXA/FAALG (B) ve IXA/FACS-FAALG blend (C) NP'lerine ait SEM görüntüleri

4.3.7 Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) Analizine ait Bulgular

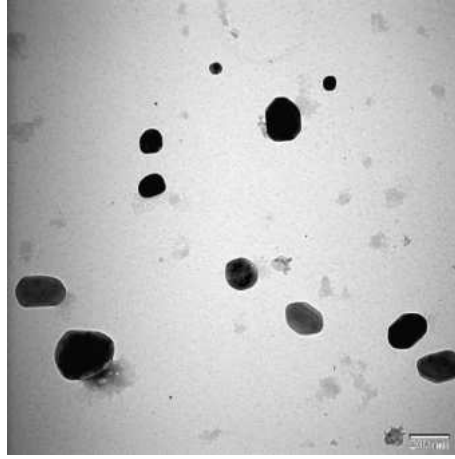
IXA etkin maddesi yüklü ve karakterizasyon çalışmaları sonucunda nihai formülasyon olarak seçilen IXA/FACS NP, IXA/FAALG NP ve IXA/FACS/FAALG blend nanopartiküllerine ait TEM görüntüleri Şekil 4.32'de verilmektedir.



(A)



(B)



(C)

Şekil 4.32 IXA/FACS NP (A), IXA/FAALG NP (B) ve IXA/FACS-FAALG blend NP'lerine (C) ait TEM görüntüleri

Elde edilen TEM görüntüleri SEM ve partikül boyutu analiziyle sonuçlarıyla uyumludur.

4.3.8 Sentezlenen Folik Asit ile Modifiye Edilen Polimere % Bağlanma Verimi, Hazırlanan Nanopartiküllerde Enkapsülasyon Etkinliği, Yükleme Kapasitesine ve Nanopartikül Verimine Ait Bulgular

Yöntem 3.2.3 ve 3.2.4'de anlatıldığı gibi sentezlenen FACS ve FAALG moleküllerinde, FA'ın polimerlere % bağlanma verimleri valide edilen FA HPLC metodu ile belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 4-41'de verilmektedir.

Tablo 4-41 %Bağlanma verimine ait sonuçlar

Modifiye Polimerler	% Bağlanma Verimi
FACS	71,5±2,6
FAALG	82,8±2,8

NP'lere yüklenen IXA etkin maddesine ilişkin miktar tayini yöntem 3.2.6.5'de anlatıldığı şekilde belirlenmiş ve Eşitlik 9, 10 ve 11 kullanılarak enkapsülasyon etkinliği, yükleme kapasitesi ve nanopartikül verimleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4-42'de verilmektedir.

Tablo 4-42 Nanopartikül sistemlerinin enkapsülasyon verimi, yükleme kapasitesi ve nanopartikül sentez verimi sonuçları

Nanopartikül Sistemler	Enkapsülasyon Verimi (%)	Yükleme Kapasitesi (%)	Nanopartikül Sentez Verimi
IXA/FACS NP	51,3±4,6	2,3±1,2	%43,5±3,6
IXA/FAALG NP	47,6±5,0	3,8±2,2	%40,1±4,2
IXA/FACS-FAALG Blend NP	53,7±7,7	3,1±0,8	%46,1±3,5

Nanopartiküllere ilaçların enkapsüle edilmesi, polimerin moleküler ağırlığı, kristalinite ve makromoleküler zincirlerdeki hidrofilik segmentlerin oranı gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilmektedir (Hu et al., 2013). Tablo 4-42'de hazırlanan tüm NP sistemlere ait enkapsülasyon verimi, yükleme kapasitesi ve NP sentez verimleri verilmektedir. Sonuçlar incelendiğinde FAALG NP'leri FACS NP'lerine kıyasla daha az IXA yüklendiği görülmektedir. FA ile modifiye edilen poli(etilen glikol)-poli(propylene succinate) (PEG-PPSu) kopolimeriyle hazırlanan NP'lere IXA etkin maddesi yüklenerek, enkapsülasyon verimi %38,80 ve yükleme kapasitesi %3,53 olarak bulunmuştur (Siafaka et al., 2015). Elde ettiğimiz sonuçlarla, literatürlere kıyasla daha yüksek enkapsülasyon veriminin sağlandığı görülmekteyken, yükleme kapasiteleri de çok benzer bulunmuştur.

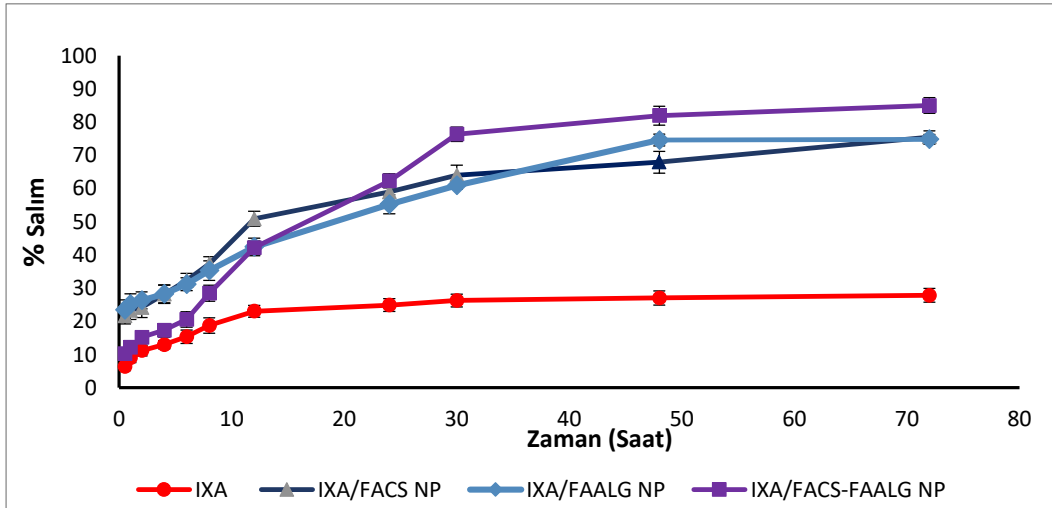
4.3.9 *In-Vitro* Salım Çalışmalarına Ait Bulgular

pH 5,5, 6,5 ve 7,4 tampon ortamlarında IXA, IXA/FACS NP, IXA/FAALG NP ve IXA/FACS-FAALG blend NP'lerine ait sonuçlar Tablo 4-43, Tablo 4-44 ve 4-45'de, *in-vitro* salım grafikleri ise, Şekil 4.33, Şekil 4.34 ve Şekil 4.35'de

verilmektedir (n=3). Salım çalışmasının sonlandırıldığında diyaliz membran içerisindeki IXA miktarına ait sonuçlar ise, Tablo 4-46 'da verilmektedir. Ayrıca nanopartikül sistemlerin salım kinetiklerinin modellere uyumluluğu hesaplanmış ve IXA/FACS NP, IXA/FAALG NP ve IXA/FACS-FAALG blend nanopartiküllere ait sonuçlar Tablo 4-46'da verilmektedir.

Tablo 4-43 pH 5,5 Tampon ortamında *in-vitro* salım sonuçları (n=3)

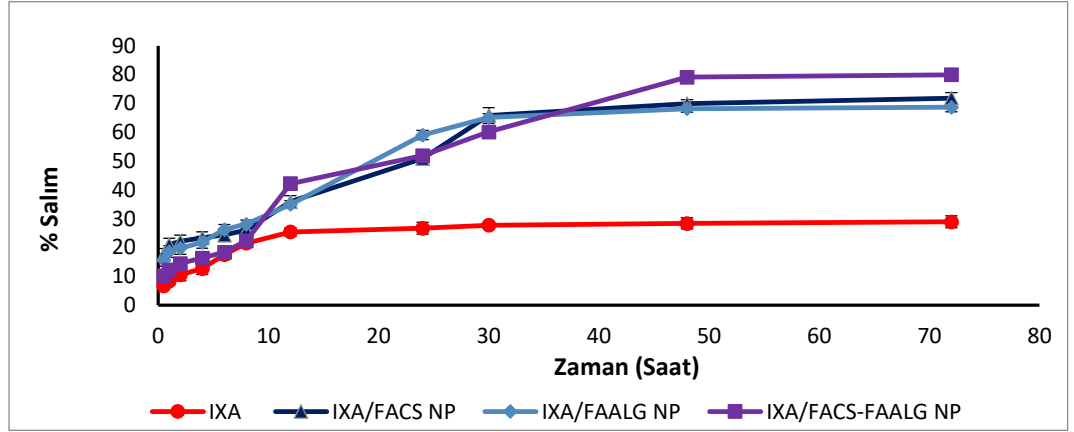
Zaman (saat)	% IXA $\pm$ SS	% IXA/FACS NP $\pm$ SS	% IXA/FAALG NP $\pm$ SS	% IXA/FACS-FAALG blend NP $\pm$ SS
0,5	6,4 $\pm$ 1,0	21,6 $\pm$ 2,4	23,4 $\pm$ 3,0	10,3 $\pm$ 1,8
1	9,0 $\pm$ 1,3	23,3 $\pm$ 2,8	25,2 $\pm$ 3,1	12,1 $\pm$ 2,0
2	11,2 $\pm$ 2,0	24,1 $\pm$ 3,0	26,3 $\pm$ 2,6	15,2 $\pm$ 2,0
4	13,0 $\pm$ 2,0	28,2 $\pm$ 2,8	28,2 $\pm$ 2,7	17,3 $\pm$ 2,0
6	15,4 $\pm$ 1,8	32,3 $\pm$ 2,1	31,2 $\pm$ 1,9	20,6 $\pm$ 2,3
8	18,7 $\pm$ 1,5	37,3 $\pm$ 2,1	35,3 $\pm$ 2,9	28,4 $\pm$ 2,4
12	23,0 $\pm$ 1,4	50,9 $\pm$ 2,3	42,4 $\pm$ 2,6	42,2 $\pm$ 2,1
24	24,9 $\pm$ 2,0	58,9 $\pm$ 1,7	55,2 $\pm$ 2,8	62,3 $\pm$ 2,1
30	26,3 $\pm$ 1,1	64,0 $\pm$ 3,0	60,9 $\pm$ 1,2	76,3 $\pm$ 2,2
48	27,0 $\pm$ 2,0	67,9 $\pm$ 3,3	74,6 $\pm$ 1,8	81,9 $\pm$ 2,9
72	27,8 $\pm$ 2,1	75,5 $\pm$ 1,8	74,8 $\pm$ 1,5	85,0 $\pm$ 2,4



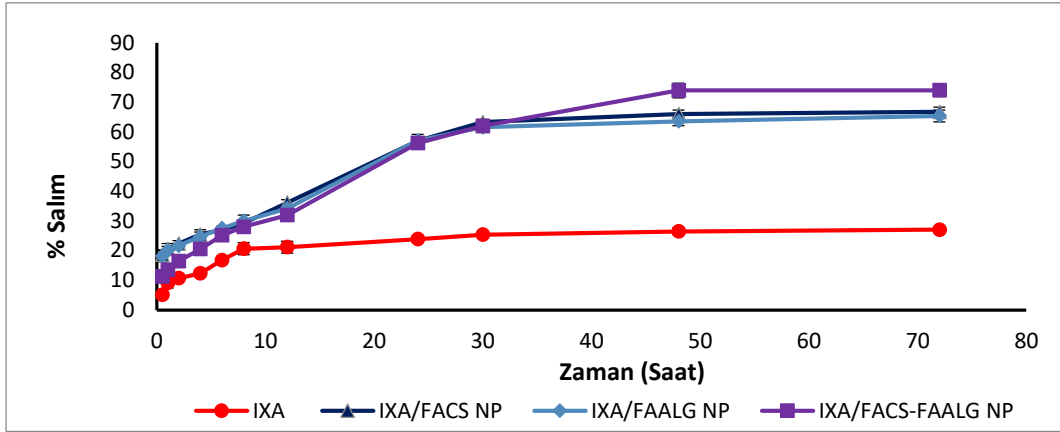
Şekil 4.33 pH 5,5 Ortamında *in-vitro* salım grafiği

Tablo 4-44 pH 6,5 Tampon ortamında *in-vitro* salım sonuçları (n=3)

Zaman (saat)	% IXA±SS	% IXA/FACS NP±SS	% IXA/FAALG NP±SS	% IXA/FACS-FAALG blend NP±SS
0,5	6,67 ± 1,3	17,5 ± 2,2	15,7 ± 2,2	10,3 ± 1,9
1	8,33 ± 1,4	21,0 ± 2,1	18,6 ± 2,2	12,2 ± 2,2
2	10,50 ± 1,6	22,1 ± 2,1	19,8 ± 2,2	14,4 ± 2,0
4	12,67 ± 1,3	23,3 ± 2,0	21,8 ± 2,1	16,3 ± 1,
6	17,53 ± 2,1	24,4 ± 1,8	26,2 ± 2,2	18,3 ± 1,7
8	21,50 ± 2,3	26,1 ± 1,4	28,1 ± 2,0	22,3 ± 2,2
12	25,40 ± 1,8	35,9 ± 1,3	34,9 ± 2,0	42,2 ± 2,0
24	26,70 ± 1,9	50,9 ± 1,6	59,0 ± 1,9	51,9 ± 1,7
30	27,73 ± 2,0	65,8 ± 1,3	65,1 ± 2,8	60,1 ± 2,0
48	28,37 ± 2,1	69,9 ± 1,2	68,2 ± 1,4	79,1 ± 1,1
72	28,90 ± 2,1	71,8 ± 1,5	68,7 ± 2,0	79,9 ± 1,4

**Şekil 4.34.** pH 6,5 ortamında *In-vitro* salım grafiği**Tablo 4-45** pH 7,4 Tampon ortamında *in-vitro* salım sonuçları (n=3)

Zaman (saat)	% IXA±SS	% IXA/FACS NP±SS	% IXA/FAALG NP±SS	% IXA/FACS-FAALG blend NP±SS
0,5	5,17 ± 1,0	18,6 ± 1,5	18,5 ± 2,0	11,3 ± 1,3
1	9,17 ± 1,8	20,6 ± 1,8	20,2 ± 21,2	13,5 ± 1,1
2	10,73 ± 1,1	22,4 ± 1,0	21,7 ± 0,7	16,4 ± 1,4
4	12,33 ± 1,0	25,4 ± 0,9	24,7 ± 2,3	20,5 ± 1,1
6	16,83 ± 1,3	27,0 ± 0,6	27,6 ± 0,7	25,2 ± 1,5
8	20,67 ± 2,0	29,3 ± 1,2	30,0 ± 1,9	28,0 ± 1,3
12	21,17 ± 2,0	36,2 ± 1,0	34,2 ± 0,9	32,0 ± 1,8
24	23,87 ± 1,0	56,9 ± 0,4	57,1 ± 2,0	56,2 ± 1,2
30	25,40 ± 1,0	63,3 ± 1,0	61,6 ± 1,7	62,0 ± 1,7
48	26,50 ± 1,2	66,0 ± 1,4	63,9 ± 1,5	74,0 ± 2,5
72	27,07 ± 1,1	66,8 ± 1,6	65,4 ± 2,0	74,0 ± 2,2



Şekil 4.35. pH 7,4 ortamında *in-vitro* salım grafiği

Tablo 4-46 Tampon ortamlarında diyaliz membran içi miktar tayini sonuçları

	%IXA (pH 5,5)	%IXA (pH 6,5)	%IXA (pH 7,4)
IXA/FACS NP	23,2	27,2	30,1
IXA/FAALG NP	25,0	30,0	31,5
IXA/FACS-FAALG NP	13,7	20,0	24,5

Tablo 4-47 pH 5,5, pH 6,5 ve pH 7,4 Ortamlarında salım kinetik modellere ait sonuçlar

		R ² Değerleri		
		pH 5,5	pH 6,5	pH 7,4
IXA/FACS NP	Sıfırıncı Derece	0,8305	0,8609	0,8125
	Birinci Derece	0,7347	0,8045	0,7603
	Higuchi	0,9704	0,9212	0,9254
	Korsmeyer-Peppas	0,9454	0,8872	0,9186
IXA/FAALG NP	Sıfırıncı Derece	0,8941	0,8052	0,8071
	Birinci Derece	0,8259	0,7451	0,7542
	Higuchi	0,9704	0,9212	0,9235
	Korsmeyer-Peppas	0,9200	0,9258	0,9239
IXA/FACS-FAALG blend NP	Sıfırıncı Derece	0,8374	0,8838	0,8613
	Birinci Derece	0,7190	0,7600	0,7448
	Higuchi	0,9704	0,9587	0,9600
	Korsmeyer-Peppas	0,9505	0,9336	0,9712

Çalışmamızda, *in-vitro* salım çalışmaları normal dokuyu taklit etmek için pH 7,4'te, kanserli hücre dokusunun nispeten asidik mikro çevresini taklit etmek için pH 6,5 ve kanser hücre içini taklit etmek için pH 5,5'te gerçekleştirilmiştir. pH 5,5, pH 6,5 ve pH 7,4 ortamlarında validasyonu gerçekleştirilen HPLC metotları ile etkin madde IXA'nın miktar tayinleri yapıldı. Yapılan literatür araştırması

sonucunda 2015 yılında Siafaka ve arkadaşları tarafından yapılan, IXA yüklü NP ile ilgili olarak bir çalışmaya ulaşılmaktadır. Çalışma, folik asit (FA) fonksiyonelleştirilmiş poli(etilen glikol)-poli(propilen süksinat) (PEG-PPSu) kopolimerine dayalı yeni poliester nanopartiküllerinin hazırlanması ve iksabepilon (IXA) yüklenmesini içermektedir. Yapılan çalışmada IXA'nın *in-vitro* salım çalışması, dissolüsyon yöntemiyle ve vücut sıvılarının (SBF) inorganik bileşiminde gerçekleştirilmiştir (Siafaka et al., 2015). Sonuçları incelediğimizde, IXA etkin maddesi tek başına tüm salım ortamlarında çözünürlüğü çok düşük olduğu görülmektedir. IXA etkin maddesinin suda düşük çözünürlüğü bilgisiyle de uyumlu olduğu gösterilmektedir (Goldstein, Cobham, & Donovan, 2009). 72.saat sonunda pH 7,4 salım ortamında IXA/FACS NP %66,8, IXA/FAALG %65,4 ve IXA/FACS-FAALG NP %74,0 olarak bulundu. pH 6,5 salım ortamında IXA/FACS NP %71,8, IXA/FAALG %68,7 ve IXA/FACS-FAALG NP %79,9 bulundu. pH 5,5 salım ortamında ise, IXA/FACS NP %75,5, IXA/FAALG %74,8 ve IXA/FACS-FAALG NP %85,0 salım ile az miktarda bir artış gösterdiği görülmektedir. NP sistemlerin salım oranları karşılaştırıldığından IXA etkin maddesinin salım yüzdesinin, salım ortamlarının pH değeri düştükçe artış göstermektedir. Salım ortamlarının herhangi birinde ön salım (brust salım) gerçekleşmemiştir. 72. Saat sonunda membran içinde kalan %IXA miktarları ile %salım sonuçları birbiriyle uyumlu bulunmaktadır.

In-vitro salım profilleri kinetik modellere uyumluluğunun incelendiği NP sistemlerde en sık kullanılan Sıfıncı derece, Birinci derece, Higuchi ve Korsmeyer-Peppas modelleri IXA/FACS NP, IXA/FAALG NP ve IXA/FACS-FAALG blend NP sistemlerine uygulanarak analiz edildi (Siafaka et al., 2015). pH 5,5 tampon ortamında IXA/FACS NP, IXA/FAALG NP ve IXA/FACS-FAALG blend NP'leri Higuchi kinetiğine uyum sağlamıştır. pH 6,5 tampon ortamında IXA/FACS NP ve IXA/FACS-FAALG blend NP'leri Higuchi kinetiğine uyum sağlarken IXA/FAALG NP ise Korsmeyer-Peppas kinetiğine uyum sağlamıştır. pH 7,4 tampon ortamında ise, IXA/FACS NP Higuchi, IXA/FACS NP ve IXA/FACS-FAALG blend NP'leri ise Korsmeyer-Peppas kinetiğine uyum sağlamıştır. Higuchi kinetik model, bir ilacın zamana bağlı salımını ifade ederken, etkin madde ilaç taşıyıcı sisteminin tek boyutta difüzyon gerçekleştiği prensbine dayanmaktadır (Kaur ve Datta, 2014). Korsmeyer-peppas kinetik model, ilaç etkin maddesinin ilaç

taşıyıcı sistemden salımı hem erozyon hem de difüzyon kontrollü olarak gerçekleştiği prensibine dayanmaktadır.

4.4 Stabilite Çalışmalarına Ait Sonuçlar

Hazırlanan NP'lerin 6 ay boyunca stabilite çalışmaları 5 ± 3 °C, $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; % 60 RH $\pm$ %5RH ve $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; % 75 RH $\pm$ %5RH ortamlarında çalışıldı. IXA etkin maddesinin saklama koşulu 2-8°C arasında olması nedeniyle ICH tarafından belirlenen optimum koşullara ek 5 ± 3 °C koşulu da eklenerek stabilite çalışmaları yürütüldü. Belirtilen zamanlarda NP'lerin partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel takibi yapıldı. IXA/FACS NP'üne ait stabilite çalışmasının bulguları Tablo 4-48'de, IXA/FAALG NP'üne ait stabilite çalışmasının bulguları Tablo 4-49'da ve IXA/FACS-FAALG blend NP'üne ait stabilite çalışmasının bulguları ise, Tablo 4-50'de verilmektedir.

Tablo 4-48 IXA/FACS NP'e ait stabilite verileri

	5 ± 3 °C				25°C±2°C; % 60 RH±%5RH				40°C±2°C; % 75 RH±%5RH			
	0.Ay	1.Ay	3.Ay	6.Ay	0.Ay	1.Ay	3.Ay	6.Ay	0.Ay	1.Ay	3.Ay	6.Ay
Partikül Boyutu (nm)	154,63 ± 7,5	160,1 ± 2,5	162,6 ± 1,6	165,2 ± 2,2	154,6 ± 7,5	159,1 ± 6,8	164,4 ± 6,8	165,5 ± 10,1	154,6 ± 10,6	160,5 ± 10,6	175,6 ± 7,6	180,1 ± 9,5
PDI	0,52	0,45	0,48	0,55	0,52	0,58	0,54	0,6	0,52	0,55	0,52	0,61
Zeta Potansiyeli (mV)	27,4 ± 5,4	26,5 ± 2,4	26,1 ± 2,8	25,1 ± 1,2	27,4 ± 5,4	27,2 ± 2,1	26,2 ± 3,1	24,5 ± 2,8	27,4 ± 5,4	25,1 ± 3,2	23,2 ± 2,2	20,1 ± 1,8

Tablo 4-49. IXA/FAALG NP'e ait stabilite verileri

	5 ± 3 °C				25°C±2°C; % 60 RH±%5RH				40°C±2°C; % 75 RH±%5RH			
	0.Ay	1.Ay	3.Ay	6.Ay	0.Ay	1.Ay	3.Ay	6.Ay	0.Ay	1.Ay	3.Ay	6.Ay
Partikül Boyutu (nm)	154,63 ± 7,5	155,0 ± 6,2	160,1 ± 4,2	162,2 ± 4,9	154,63 ± 7,5	169,1 ± 6,8	174,4 ± 6,8	185,5 ± 10,1	154,63 ± 10,6	170,5 ± 10,6	185,6 ± 7,6	200,1 ± 9,5
PDI	0,48	0,50	0,51	0,53	0,48	0,52	0,53	0,60	0,48	0,55	0,58	0,66
Zeta Potansiyeli (mV)	-23,8 ± 7,2	-23,5 ± 2,5	-22,5 ± 5,1	-22,0 ± 2,5	-23,8 ± 7,2	-22,2 ± 5,1	-20,2 ± 5,0	-19,8 ± 4,3	-23,8 ± 7,2	-20,1 ± 75,2	-19,2 ± 5,5	-18,5 ± 4,8

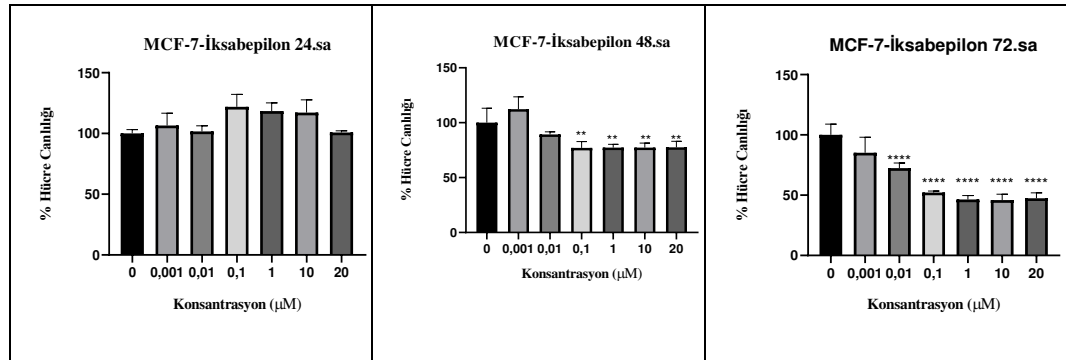
Tablo 4-50 IXA/FACS-FAALG NP'e ait stabilite verileri

	5 ± 3 °C				25°C±2°C; % 60 RH±%5RH				40°C±2°C; % 75 RH±%5RH			
	0.Ay	1.Ay	3.Ay	6.Ay	0.Ay	1.Ay	3.Ay	6.Ay	0.Ay	1.Ay	3.Ay	6.Ay
Partikül Boyutu (nm)	218,17 ± 6,9	219,1 ± 5,2	221,5 ± 4,8	223,5 ± 5,1	218,17 ± 6,9	228,5 ± 5,3	230,5 ± 8,2	245,2 ± 8,2	218,17 ± 6,9	235,8 ± 7,5	242,8 ± 10,5	248,5 ± 8,6
PDI	0,51	0,65	0,54	0,55	0,51	0,45	0,56	0,55	0,51	0,51	0,53	0,61
Zeta Potansiyeli (mV)	-24,1 ± 4,2	-23,8 ± 5,2	-22,1 ± 4,7	-22,0 ± 5,2	-24,1 ± 4,2	-23,1 ± 3,5	-22,5 ± 4,2	-21,3 ± 5,1	-24,1 ± 4,2	-22,2 ± 3,5	-21,6 ± 5,2	-20,5 ± 3,5

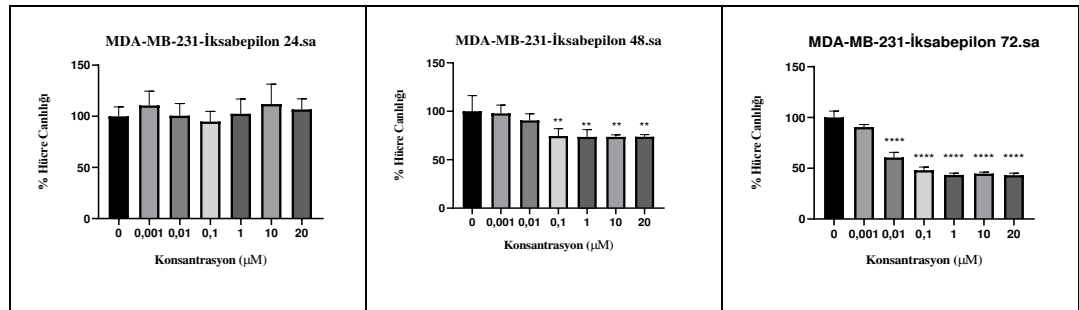
IXA etkin maddesinin saklama koşulu 2-8°C arasında olduğundan dolayı ICH tarafından belirlenen optimum $25 \pm 2^\circ\text{C}$ % 60 ± 5 ve $40 \pm 2^\circ\text{C}$ % 75 ± 5 koşullara ek $5 \pm 3^\circ\text{C}$ koşulu da eklenerek stabilite çalışmaları yürütüldü. Stabilite çalışmaları değerlendirildiğinde, üç farklı NP sisteminde boyut, PDI ve zeta potansiyellerinde önemli bir değişim olmadığı gözlemlenmiştir. Ayrıca stabilite çalışmaları sırasında partikül boyutu büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerinin değişimi literatürlerde de verilen değişimler ile benzer bulunmuştur (Anwer et al., 2020; Gundogdu et al., 2015).

4.5 *In-vitro* Sitotoksosite Çalışmalarına ait Bulgular

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında öncelikle IXA etkin maddesinin 24., 48. ve 72. saatlerde IC_{50} değerleri elde edildi. Bu amaçla MTT çalışmasıyla hücre canlılığının 24., 48. ve 72. saatlerdeki değişimine ait veriler Şekil 4-36 ve Şekil 4-37’de verilmektedir.



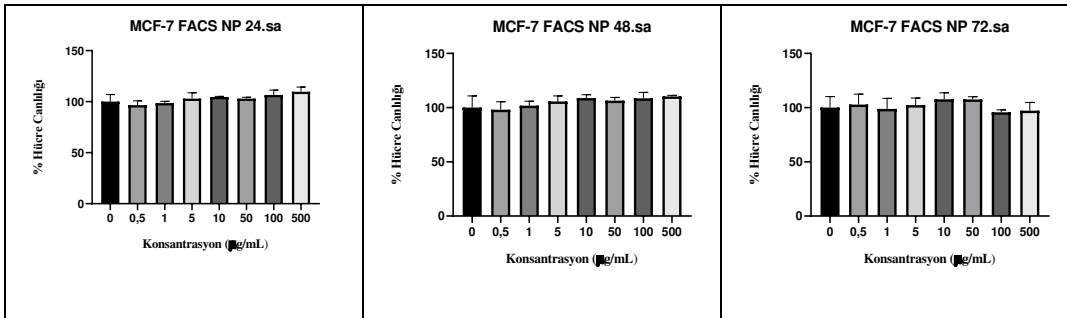
Şekil 4.36 MCF-7 Hücre hattı üzerinde IXA etkin maddesinin 24. saat, 48.saat ve 72.saat hücre canlılığı verileri



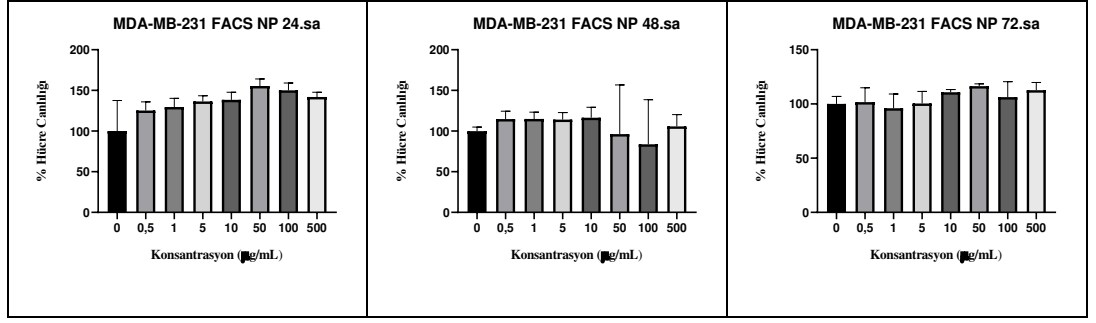
Şekil 4.37 MDA-MB-231 Hücre hattı üzerinde IXA etkin maddesinin 24. saat, 48.saat ve 72.saat hücre canlılığı verileri

MTT (3-[4,5-dimetil tiyazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolyum bromür) testindeki amaç, hücre canlılığının tespit edilebilmesidir. Nikotinamid Adenin Dinükleotid (NADH)'e bağlı hücresel oksidoredüktaz enzimlerinin, sarı renkli tetrazolyum MTT halkasını parçalayarak mor renkli suda çözünmeyen formazan tuzlarına indirgeme özelliğine bağlı olup, 570 nm'de ELISA plak okuyucu sayesinde canlı hücre hakkında bilgi verme prensibine dayanmaktadır (Stockert et al., 2018). MTT sitotoksitesite çalışmasında öncelikle IXA etkin maddesinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 20 μ M olacak şekilde deney tasarımı oluşturuldu. MCF-7 hücre hattı için 72.saat IC_{50} 0,1 μ M ve MDA-MB-231 hücre hattı için ise, 72.saat IC_{50} değeri 0,1 μ M olarak hesaplandı. Sonuçlar literatür verileri ile benzer bulundu (Francis Y.F. Lee et al., 2009; Tanei et al., 2016).

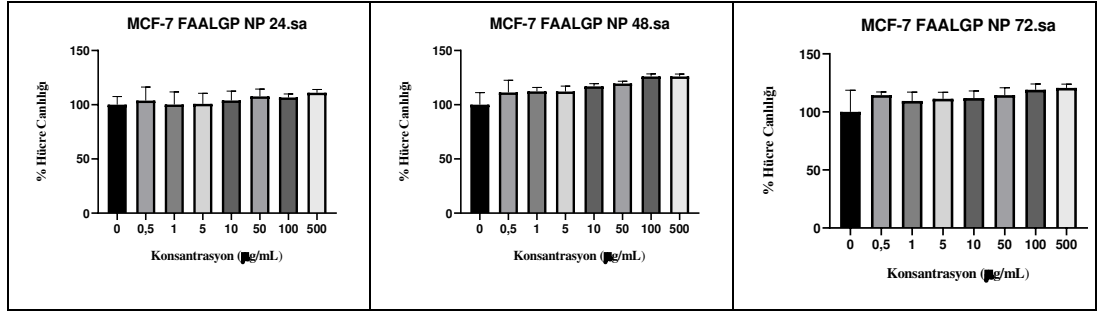
IXA etkin maddesi içermeyen FACS NP, FAALG NP ve FACS-FAALG NP'nin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde 24.saat, 48.saat ve 72.saatler de herhangi bir sitotoksik etkisinin olup olmadığı gösterildi. 0,5 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M ve 500 μ M konsantrasyonlarda uygulamalar yapılarak optimal doz belirlendi. 24., 48.saat ve 72.saatlere ait sonuçlar Şekil 4.38, Şekil 4.39, Şekil 4.40 Şekil 4.41'de verilmektedir.



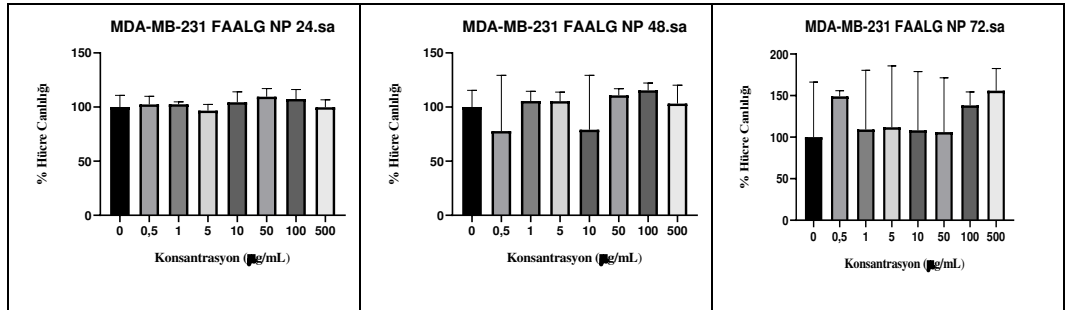
Şekil 4.38 MCF-7 Hücre hattı üzerinde FACS NP'üne ait 24. saat, 48.saat ve 72.saat hücre canlılığı verileri



Şekil 4.39 MDA-MB-231 Hücre hattı üzerinde FACS NP'üne ait 24. saat, 48.saat ve 72.saat hücre canlılığı verileri



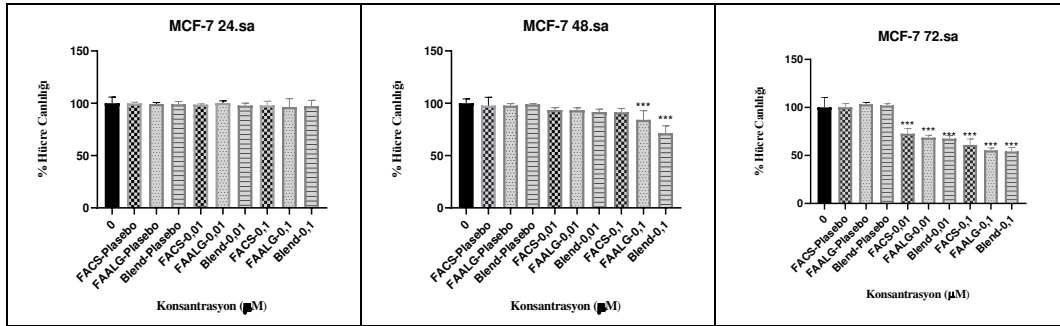
Şekil 4.40 MCF-7 Hücre hattı üzerinde FAALG NP'üne ait 24. Saat, 48.saat ve 72.saat hücre canlılığı verileri



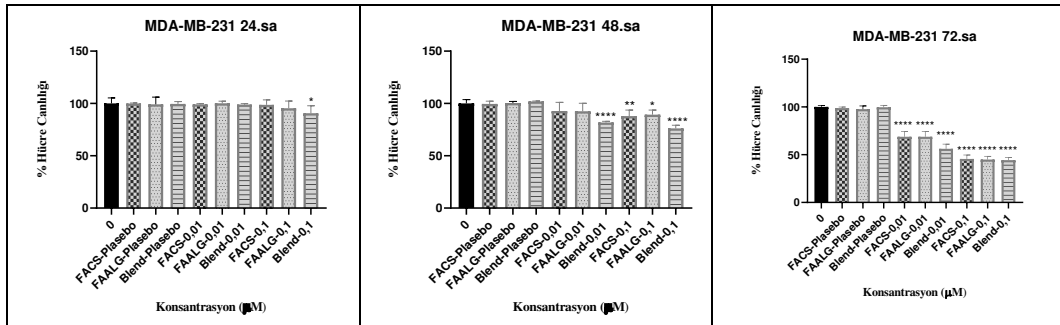
Şekil 4.41 MDA-MB-231 Hücre hattı üzerinde FAALG NP'üne ait 24. saat, 48.saat ve 72.saat hücre canlılığı verileri

Sonuçlar incelendiğinde hazırlanan NP sistemlerinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerinde 72 saat boyunca herhangi bir sitotoksik etki göstermediği gösterildi. Hem IXA'nın hem de hazırlanan NP'in MTT analiz sonuçları değerlendirildiğinde kuyucuklar arası standart sapmanın en az olduğu ve proliferasyonun gözlemlenmediği 72.saat enkapsüle edilecek IXA'nın karşılaştırılacağı zaman olarak belirlendi.

72. saatte IXA MCF-7 hücre hattı üzerinde 0,01 μ M ve 0,1 μ M konsantrasyonlarının %hücre canlılığı sırasıyla %72,4 ve %52,2 iken, aynı konsantrasyonların MDA-MD-231 hücre hattı üzerindeki %hücre canlılığı %60,5 ve %48,1 olarak bulundu. Bu amaçla, IXA etkin maddesinin hazırlanan NP sistemlere 2 farklı konsantrasyonu enkapsüle edilerek deney tasarımı oluşturuldu. Bu çalışmada aynı plate üzerinde, hücre içermeyen besiyeri (blank), IXA etkin maddesinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerine 0,01 μ M ve 0,1 μ M konsantrasyonda iki farklı IC₅₀ dozlarını içeren NP sistemler uygulanarak MTT çalışmaları yapıldı ve sonuçlar Şekil 4.42 ve Şekil 4.43’de verilmektedir.



Şekil 4.42 MFC-7 Hücre hatları üzerinde plasebo, IXA’nın 72.saat IC₅₀ dozları yüklü FACS NP, FAALG NP ve FACS-FAALG NP blend NP’lerine ait MTT sonuçları



Şekil 4.43 MDA-MB-231 Hücre hatları üzerinde plasebo, IXA’nın 72.saat IC₅₀ dozları yüklü FACS NP, FAALG NP ve FACS-FAALG NP blend NP’lerine ait MTT sonuçları

IXA yüklü FACS NP, FAALG NP ve FACS-FAALG NP’lerin 72. saatte MCF-7 hücre hattı üzerinde 0,01 μ M konsantrasyonunda sırasıyla %73,5, %75,3 ve %71,0 iken, 0,1 μ M konsantrasyonunda sırasıyla, %68,5, %67,9 ve %63,3’ü canlı bulunurken, MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 0,01 μ M konsantrasyonunda sırasıyla %68,8, %68,7 ve %51,6, 0,1 μ M konsantrasyonunda ise, sırasıyla %45,5,

%44,9 ve %44,3'ü canlı bulundu. MTT çalışması için yapılan istatistiksel analiz sonucunda, IXA'nın 72.saat 0,01 μ M konsantrasyonundaki hücre canlılığı %60,5 iken, blend NP'in 72.saat 0,01 μ M konsantrasyonundaki hücre canlılığı %51,6 bulunarak aralarında anlamlı bir farklanma gözlemlendi.

4.6 Radyoişaretleme Çalışmalarına ait Bulgular

Radyoişaretleme çalışmaları kapsamında literatürler incelenmiş, ancak IXA etkin maddesinin ^{99m}Tc ile radyoişaretleme çalışmasına rastlanmamıştır. Radyoişaretleme verimine yönelik optimizasyon çalışmaları sırasında farklı pH değeri ile çalışılmıştır. %100 aseton içeren TLC banyosunda, en yüksek radyoişaretleme verimi pH 13 ile yapılan radyoişaretleme çalışmalarında tespit edilmiştir.

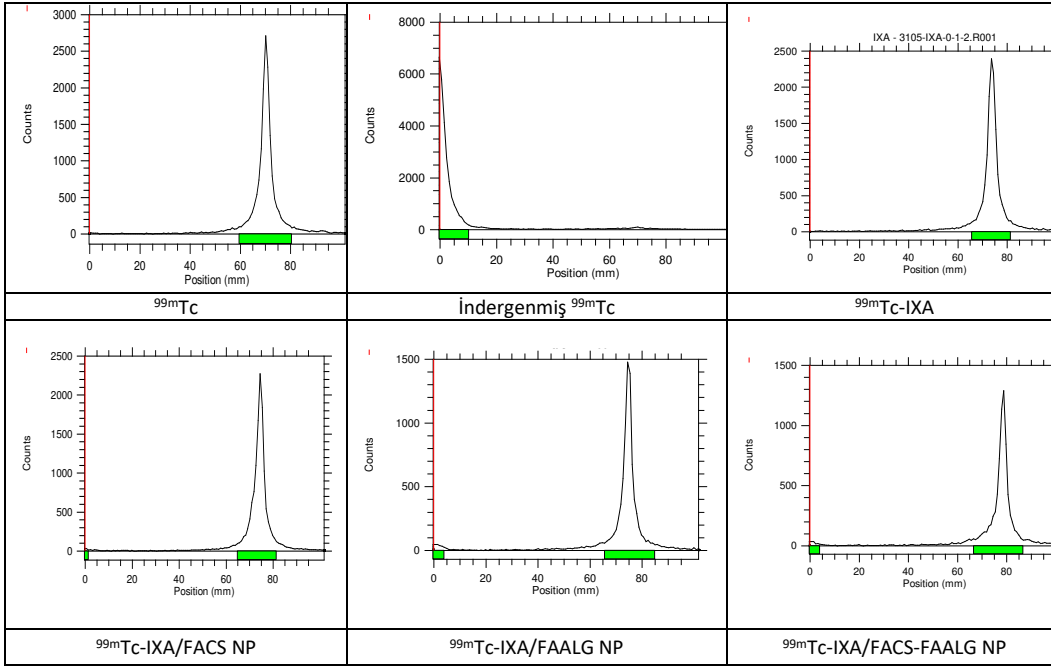
4.6.1 TLRC Analizine ait Bulgular

Yöntem 3.2.9'da yer aldığı üzere farklı pH değerlerinde ^{99m}Tc 'un IXA etkin maddesi, IXA/FACS NP, IXA/FAALG NP ve IXA/FACS-FAALG blend NP'e %bağlanma verimleri TLRC analiz yöntemi ile tespit edildi. Sonuçlar Tablo 4-51'de verilmektedir.

Tablo 4-51 ^{99m}Tc -IXA etkin maddenin, ^{99m}Tc -IXA/FACS NP, ^{99m}Tc -IXA/FAALG NP ve ^{99m}Tc -IXA/FACS-FAALG blend NP'lerin pH değişimine göre % bağlanma verimleri

pH Değeri	Bağlanma Verimi (%)			
	İksabepilon	IXA/FACS NP	IXA/FAALG NP	IXA/FACS-FAALG Blend NP
7	30,3 $\pm$ 0,2	24,6 $\pm$ 1,5	27,8 $\pm$ 3,5	35,9 $\pm$ 0,5
8	27,4 $\pm$ 3,7	38,9 $\pm$ 4,7	40,4 $\pm$ 2,7	57,7 $\pm$ 0,8
9	30,7 $\pm$ 3,5	46,4 $\pm$ 5,4	55,2 $\pm$ 0,2	70,2 $\pm$ 2,5
10	55,2 $\pm$ 0,7	68,2 $\pm$ 4,2	72,7 $\pm$ 0,8	78,2 $\pm$ 1,8
11	64,9 $\pm$ 0,5	72 $\pm$ 2,6	78,6 $\pm$ 2,1	82,6 $\pm$ 3,0
12	83,9 $\pm$ 0,5	79 $\pm$ 1,4	85,8 $\pm$ 2,0	87,0 $\pm$ 0,9
13	99,7 $\pm$ 0,1	97,9 $\pm$ 0,1	97,8 $\pm$ 1,6	97,9 $\pm$ 0,5

Tablo 4-51'de verilen veriler incelendiğinde en iyi bağlanmanın pH 13 değerinde olduğu tespit edilmiştir. Radyoişaretleli maddelere ait TLRC kromatogramları Şekil 4.44'de verilmektedir. Tablo 4-52'de R_f ve %bağlanma değerleri verilmektedir.



Şekil 4.44 Radyoişaretli maddelere ait TLRC kromatogramları

Tablo 4-52 R_f ve %bağlanma verimleri($n=5$)

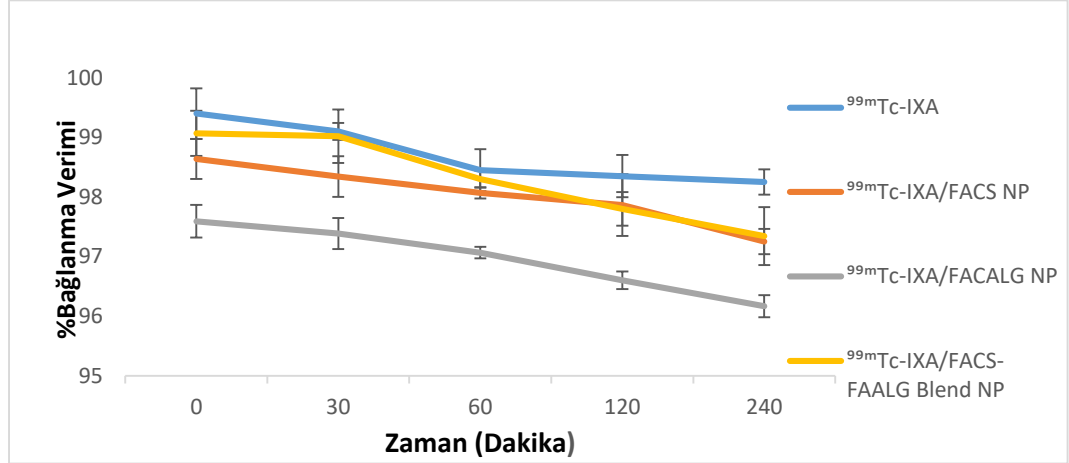
R _f ve % Bağlanma Verimi						
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	Ind. ^{99m}Tc	$^{99m}\text{Tc-IXA}$	$^{99m}\text{Tc-IXA/FACS NP}$	$^{99m}\text{Tc-IXA/FAALG NP}$	$^{99m}\text{Tc-IXA/FACS-FAALG NP}$
R _f	0,854	0,022	0,877	0,901	0,890	0,894
Bağlanma Verimi (%)	-	-	99,7±0,1	97,9±0,1	97,8±1,4	97,9±0,5

Şekil 4.44 ve Tablo 4-52'ye göre, etkin madde IXA ve enkapsüle edilmiş IXA/FACS-NP, IXA/FAALG NP ve IXA/FACS-FAALG blend NP'lerine ^{99m}Tc 'in bağlanma verimleri sırasıyla, %99,7±0,1, %97±1,04, %97,8±1,4 ve %97,9±0,5 olarak tespit edilmiştir.

4.6.2 Stabilite Çalışmalarına ait Bulgular

$^{99m}\text{Tc-IXA}$, $^{99m}\text{Tc-IXA/FACS NP}$, $^{99m}\text{Tc-IXA/FAALG NP}$ ve $^{99m}\text{Tc-IXA/FACS-FAALG blend NP}$ 'lerin stabilitelerini incelemek amacıyla 0., 30., 60., 120., ve 240. dakikalarında Yöntem 3.2.9.3'de anlatıldığı şekilde stabilite çalışması

üç tekrar (n=3) olacak şekilde gerçekleştirildi. Şekil 4.45’de $^{99m}\text{Tc-IXA}$, $^{99m}\text{Tc-IXA/FACS NP}$, $^{99m}\text{Tc-IXA/FAALG NP}$ ve $^{99m}\text{Tc-IXA/FACS-FAALG blend NP}$ ’lerin zamana bağlı değişimleri verilmektedir.



Şekil 4.45 Radyoişaretleli bileşiklerin % bağlanma verimlerinin zamana bağlı olarak değişimi

Stabilite çalışması incelendiğinde, tüm maddelerin oda koşullarında bağlanma verimleri 240 dk boyunca önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir. $^{99m}\text{Tc-IXA}$, $^{99m}\text{Tc-IXA/FACS NP}$, $^{99m}\text{Tc-IXA/FAALG NP}$ ve $^{99m}\text{Tc-IXA/FACS-FAALG blend NP}$ ’nin 240 dk sonunda bağlanma verimleri sırasıyla, $98,7 \pm 0,30$, $98,0 \pm 0,30$, $97,0 \pm 0,19$ ve $98,3 \pm 0,35$ bulunmuştur.

4.6.3 Lipofilite Çalışmasına ait Bulgular

Lipofilite çalışması Yöntem 3.2.9.4’de anlatıldığı gibi 5 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. $^{99m}\text{Tc-IXA}$, $^{99m}\text{Tc-IXA/FACS NP}$, $^{99m}\text{Tc-IXA/FAALG NP}$ ve $^{99m}\text{Tc-IXA/FACS-FAALG blend NP}$ ’lerine ait logP değerleri Tablo 4-53’de verilmektedir.

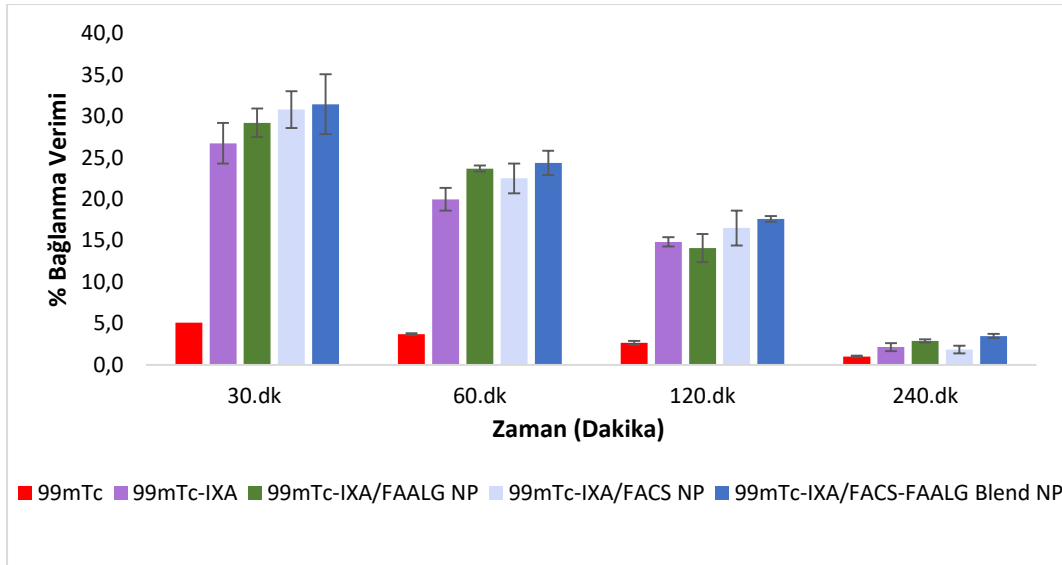
Tablo 4-53 Radyoişaretleli maddelerin lipofilite değerleri (n=5)

Radyoişaretleli Bileşikler	Log P Değeri (Dağılım Katsayısı)
$^{99m}\text{Tc-IXA}$	$-1,55 \pm 0,38$
$^{99m}\text{Tc-IXA/FACS NP}$	$-1,35 \pm 0,13$
$^{99m}\text{Tc-IXA/FAALG NP}$	$-1,40 \pm 0,26$
$^{99m}\text{Tc-IXA/FACS-FAALG Blend NP}$	$-0,84 \pm 0,11$

Lipofilite bir ilacın davranışını anlamak ve vücuttaki dağılımını tahmin etmek için kullanılan bir değer olduğu bilinmektedir (De, 2011). Bu amaçla Tablo 53’de görüldüğü gibi, $^{99m}\text{Tc-IXA}$, $^{99m}\text{Tc-IXA/FACS NP}$, $^{99m}\text{Tc-IXA/FAALG NP}$ ve $^{99m}\text{Tc-IXA/FACS-FAALG blend NP}$ ’lerine ait logP değerleri sırasıyla $-1,55\pm0,38$, $-1,35\pm0,13$, $-1,40\pm0,26$ ve $-0,84\pm0,11$ olarak hesaplanmıştır. (Gokulu et al., 2024).

4.6.4 İnkorporasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

Radyoişaretli bileşiklere ait inkorporasyon çalışmaları, MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde yapılarak %bağlanma değerleri incelenmiştir. $^{99m}\text{Tc-IXA}$, $^{99m}\text{Tc-IXA/FACS NP}$, $^{99m}\text{Tc-IXA/FAALG NP}$ ve $^{99m}\text{Tc-IXA/FACS-FAALG blend NP}$ ’lerinin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla %değişimi Şekil 4.46’da verilmektedir.



Şekil 4.46 Radyoişaretli maddelerin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde %bağlanma verileri

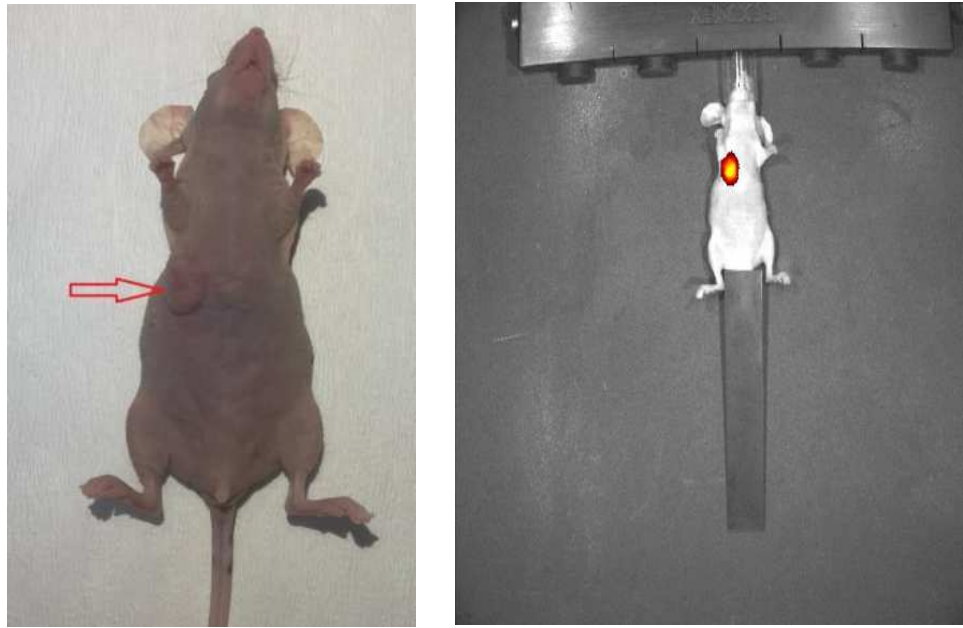
MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki bağlanma verimleri incelendiğinde, ilk 30 dk’da en yüksek bağlanma verimi $^{99m}\text{Tc-IXA/FACS-FAALG Blend NP}$ ’lerinde % 31,5 olarak görülmektedir. IXA/FACS-FAALG Blend NP’inde 240.dk’da %3,5 seviyelerine kadar azaldığı görülmektedir. Ayrıca $^{99m}\text{Tc-IXA/ FACS NP}$ %30,8, $^{99m}\text{Tc-IXA/ FAALG NP}$ %29,2 ve $^{99m}\text{Tc-IXA}$ % 26,7 hücrelere tutulum gösterdiği

hesaplanmıştır. Sonuçlar incelendiğinde radyoişaretli tüm bileşiklerin hücre üzerinde tutulum gösterdiği görülmektedir. Özellikle MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki en fazla tutulumun ^{99m}Tc -IXA/FACS-FAALG Blend NP'lerinde olması, folat reseptörüne hedefli ve biyouyumlu FACS ve FAALG modifiye polimerinin etkileşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

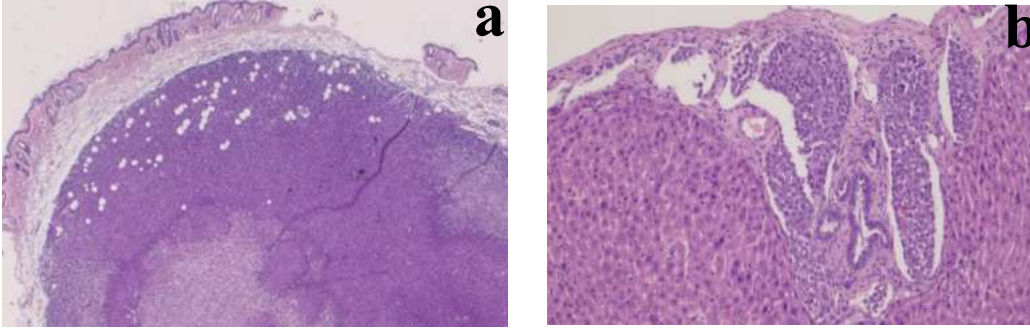
4.7 *In-vivo* Çalışmalara Ait Bulgular

4.7.1 Kanserli Hayvan Modellerinin Oluşturulmasına Ait Bulgular

Yöntem 3.2.10.1'de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Karantina süreci biten sağlıklı dişi BALB/C farelere ve sağlıklı dişi BALB/C nude farelere 100 μL PBS içerisinde 1×10^8 MDA-MB-231 hücresi enjekte edildi. Sağlıklı BALB/C dişi farelerde oluşturulan tümörler IVIS cihazında ölçümler alınarak saptandı. Kanserli dokuların varlığı, hayvanların sakrifiye edilmesi ve patolojik incelemelerin yapılması ile teyit edildi. Tümör fotoğrafı ve IVIS spektrum cihazı ile alınan görüntü Şekil 4.47'de verilmektedir.



Şekil 4.47 Kanser oluşturulan deney hayvanlarına ait fotoğraf ve IVIS spektrum cihazı ile alınan görüntüler

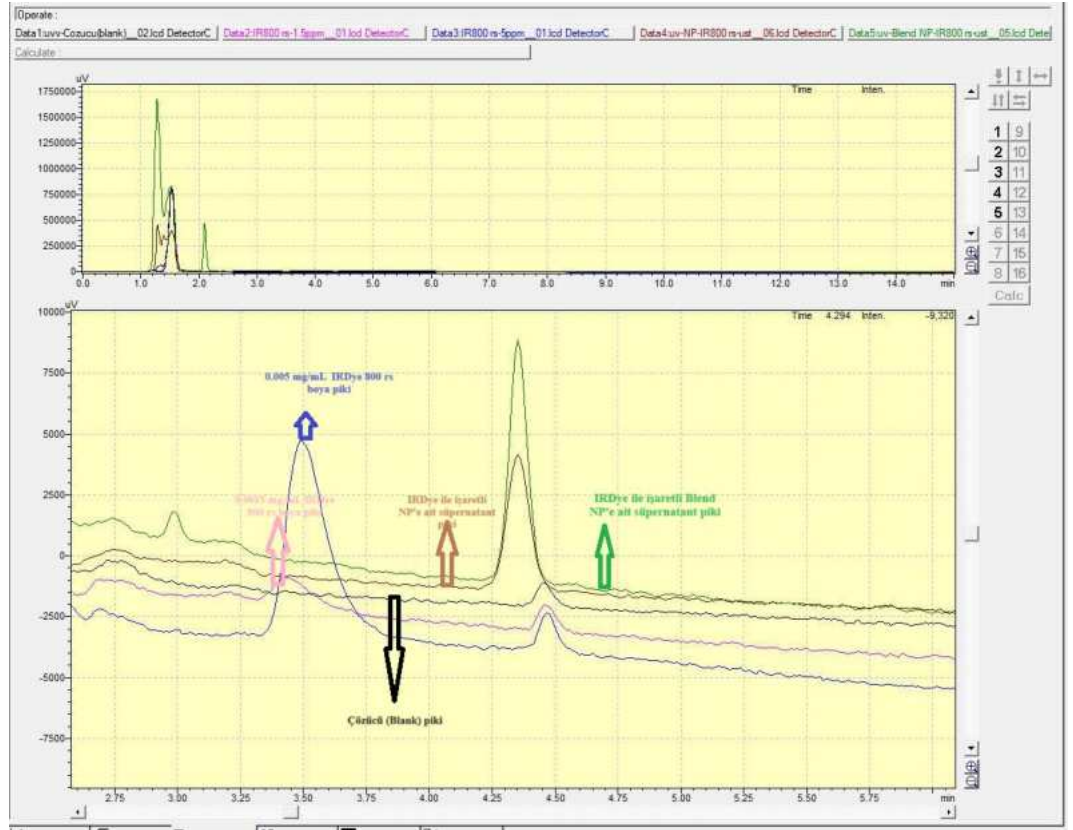


Şekil 4.48 MDA-MB-231 hücre hattı ile dişi nude farelerde oluşturulmuş kanserli hayvan modellerinin histopatolojik incelemelere ait görüntüler

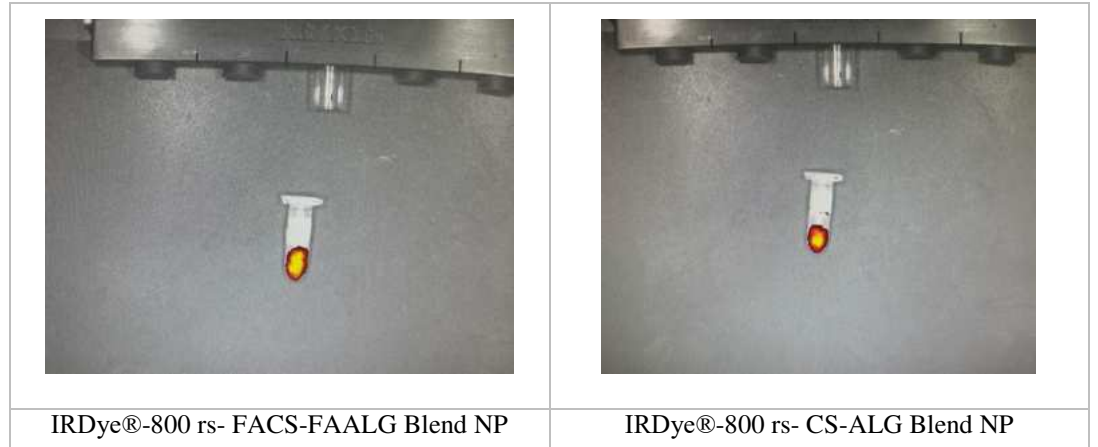
MDA-MB-231 hücre hattının belli aralıklarla enjeksiyonundan sonra nude farelerden alınan IVIS spektrum cihazı görüntülerinde, kanser olduğu belirlenen hayvanların sakrifikasyonu sonrası primer tümörleri ve karaciğer dokuları histopatolojik olarak değerlendirildi. Elde edilen histopatolojik görüntü örnekleri Şekil 4.48'de görülmektedir. Şekil 4.48a meme cilt dokusunun altında gelişen büyük tümörlü bölgeyi göstermektedir. Şekil 4.48b'de karaciğer dokusuna ait patolojik inceleme sonucunu göstermektedir. Karaciğer portalı alanında lenfatiklerle gelmiş tümör dokuları net bir şekilde görülmektedir. Doku içerisindeki safra kanalları etrafında yoğun tümörlü bölge (tümör trompları) tespit edilmiştir. Elde edilen patolojik bulgular ve IVIS spectrum cihazı ile alınan kanserli bölge görüntüleri birbirleri ile uyumlu sonuçlar vermektedir.

4.7.2 IRDye®-800 rs Boya Maddesi ile İşaretli CS-ALG Blend NP ve FACS-FAALG Blend NP'lerin Hazırlanması

Yöntem 3.2.10.2'de anlatıldığı yöntem kullanılarak IRDye®-800 rs floresan boya maddesi ile işaretlenmiş ve işaretlenme verimi HPLC analizleri ile belirlenmiştir. HPLC verilerine ait kromatogramlar ve işaretli NP'lere ait IVIS görüntüleri sırası ile Şekil 4.49 ve Şekil 4.50'de verilmektedir.



Şekil 4.49 IRDye®-800 RDye 0,005 mg/mL ve 0,0015 mg/mL konsantrasyonlarındaki Standart boya çözeltileri ve sentez sonrası supernatant kısımlarına ait HPLC pikleri



Şekil 4.50 İşaretli NP'lere ait görseller

Şekil 4.50'da verilen IRDye®-800 rs boya maddesi ile işaretlenen CS-ALG blend NP ve FACS-FAALG blend NP'lerinin sentez sonrası ayrılan süpernatant kısımlarının HPLC cihazı ile analiz sonuçlarından NP'lerin %100 bağlanma verimiyle hazırlandığı kanıtlanmıştır.

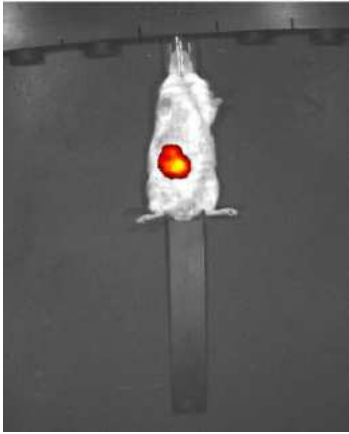
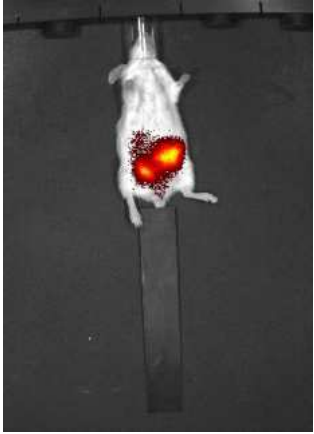
4.7.3 Biyodağılım Çalışmasına Ait Bulgular

Biyodağılım çalışması Yöntem 3.2.10.3’de anlatıldığı şekilde çalışıldı ve kanserli dişi Balb/c fareler aşağıda ayrıntılı olarak açıklanan gruplara ayrıldı.

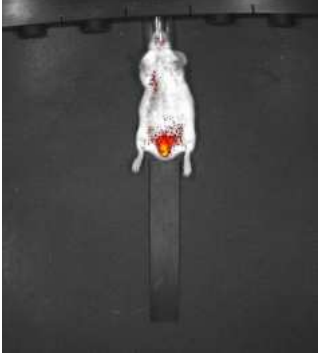
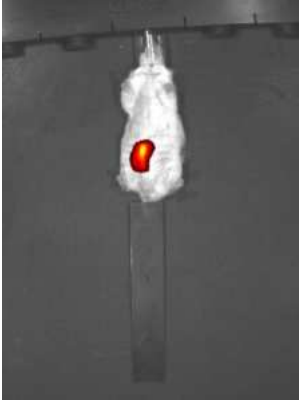
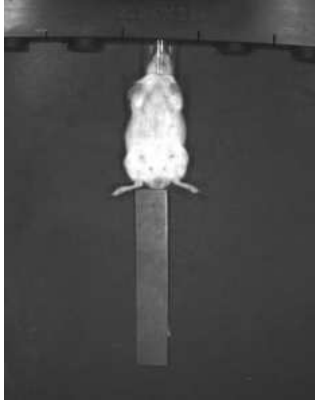
1. Grup: Irdye®-800rs boya maddesi enjekte edilen grup (n=7)
2. Grup: Irdye®-800rs-CS/ALG blend NP formülasyonu enjekte edilen grup (Aktif Hedefsiz NP) (n=7)
3. Grup: Irdye®-800rs-FACS/FAALG blend NPformülasyonu enjekte edilen grup (Aktif Hedefli NP) (n=7)

Aynı gruptaki farelerin görüntüleri birbiriyle benzer olduğu için her gruptan bir farenin görüntüleri verildi. Irdye®-800rs boya ile işaretli aktif hedefli FACS-FAALG blend NP uygulandığı 3.grupta grupta ve Irdye®-800rs serbest boyanın uygulandığı 1.grupta 45. dk’da karın bölgesinde gösterdiği aktivite, Irdye®-800rs boya ile işaretli aktif hedefsiz CS-ALG NP uygulandığı 2. grupta, 45.dakikada aktivitede göstermediği gözlemlendi. 3. Grupta 3.saat ve 7.saat aralığında artan bir aktivite gözlemlenirken, 2.grupta aktivite artışı gözlemlenmemiştir.

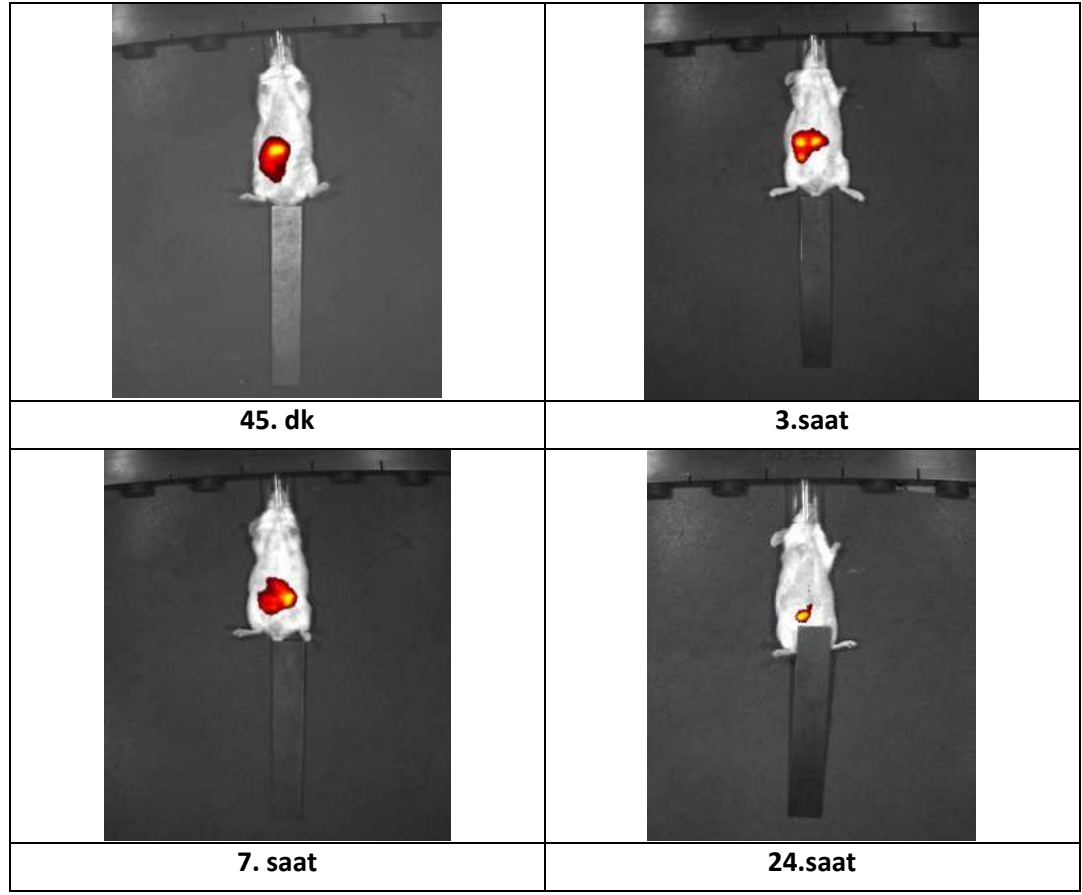
1.gruba, 2.gruba ve 3.gruba ait IVIS 45.dk., 3.saat, 7.saat ve 24.saat verileri Şekil 4-51’de, Şekil 4-52 ve Şekil 4-53’da verilmektedir. Ayrıca 24.saat sonunda sakrifiye edilen farelere ait *ex-vivo* ve elde edilen patoloji görüntüleri Şekil 4-54, Şekil 4-55 ve Şekil 4-56’da verilmektedir.

	
45. dk	3.saat
	
7. saat	24.saat

Şekil 4.51: 1.grup: IRIye®-800rs boya maddesi enjekte edilen gruba ait IVIS görüntüleri

	
45. dk	3.saat
	
7. saat	24.saat

Şekil 4.52 2.grup: IRDye®-800rs-CS/ALG blend NP formülasyonu enjekte edilen grubuna (Aktif Hedefsiz NP) ait IVIS görüntüleri



Şekil 4.53 3.Grup IReDye®e-800rs-FACS/FAALG blend NPformülasyonu enjekte edilen grubuna (Aktif Hedefli NP) ait IVIS görüntüleri

Şekil 4.51, 4.52 ve 4.53’de verilen biyodağılım çalışmasına ait IVIS görüntülerin verileri incelendiğinde, 1.Grup (IReDye®-800rs boya maddesi)45.dk’dan 7.saatte kadar dağılım gösterdiği, 24.saatte ise vücuttan elimine edildiği gözlemlendi. 2.grup (Aktif Hedefsiz NP) IVIS görüntüleri değerlendirildiğinde, dağılımın serbest boya ve hedefli NP kıyasla daha yavaş olduğu ve vücuda tam dağılmadığını, 24. saatte ise, vücuttan elimine olduğu gözlemlendi. 3. gruba (Aktif Hedefli NP) ait IVIS görüntüleri değerlendirildiğinde, 45. dk’dan başlayıp 7.saatte de dağılım gösterdiği, 24.saatte sonunda vücutta olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.54 1. Grup *Ex-vivo* görüntüsü



Şekil 4.55 2. Grup *Ex-vivo* görüntüsü



Şekil 4.56 3. Grup *Ex-vivo* görüntüsü

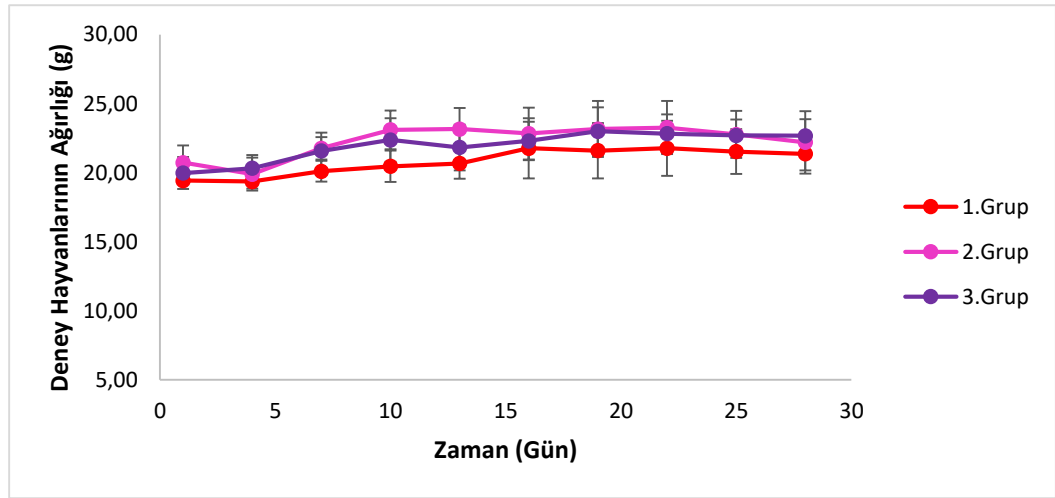
Aktif hedefli hazırlanan blend nanopartikül sistemin folat reseptörünün çok daha fazla ekprese olduğu kanserli dokularda (karaciğer) birikim gösterdiği ve vücuttaki kalım süresinin arttığı kanıtlanmıştır. Patoloji sonucunda karaciğer dokularında kanser hücrelerinin belirlenmiş olması IVIS ve patoloji görüntülerinin birbiriyle uyumlu olduğunu göstermektedir.

4.7.4 Etkinlik Çalışmasına Ait Bulgular

IXA/FACS-FAALG blend NP sisteminin tedavi potansiyelini belirlemek amacı ile yöntem 3.2.10.4'de anlatıldığı gibi çalışıldı. Balb/c dişi nude kanserli

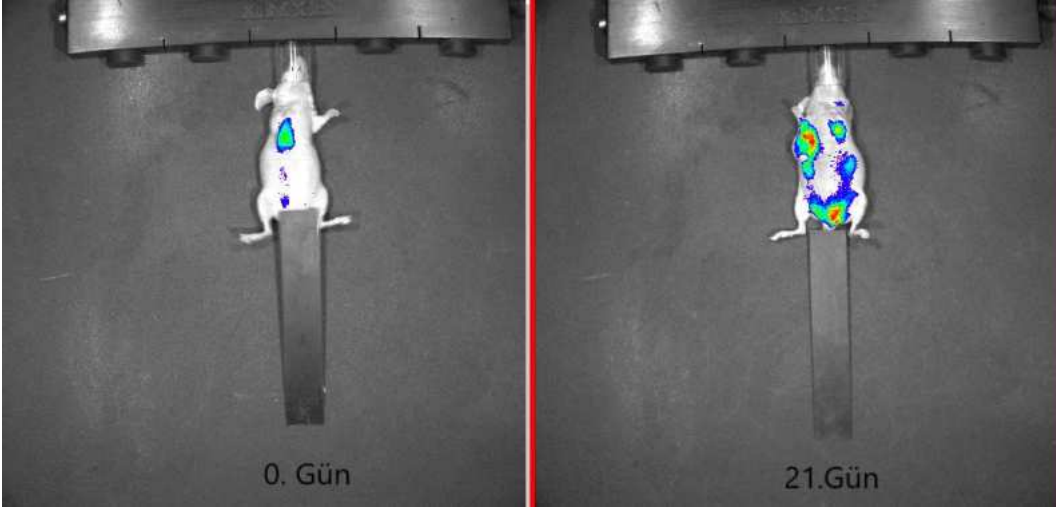
hayvan modeli oluşturulmuş hayvanlar rastgele seçilerek aşağıda belirtilen 3 farklı gruba ayrıldı. Çalışma süresince oluşturulan kanserli hayvanların ağırlıkları izlendi ve 21 gün boyunca kayda değer bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4-57 görülmektedir.

1. Grup: SF Uygulanan (n=7)
2. Grup: Piyasa Preparatı (Paklitaksel) Uygulanan (n=7)
3. Grup: IXA/FACS-FAALG blend NP formülasyonu uygulanan (n=7)

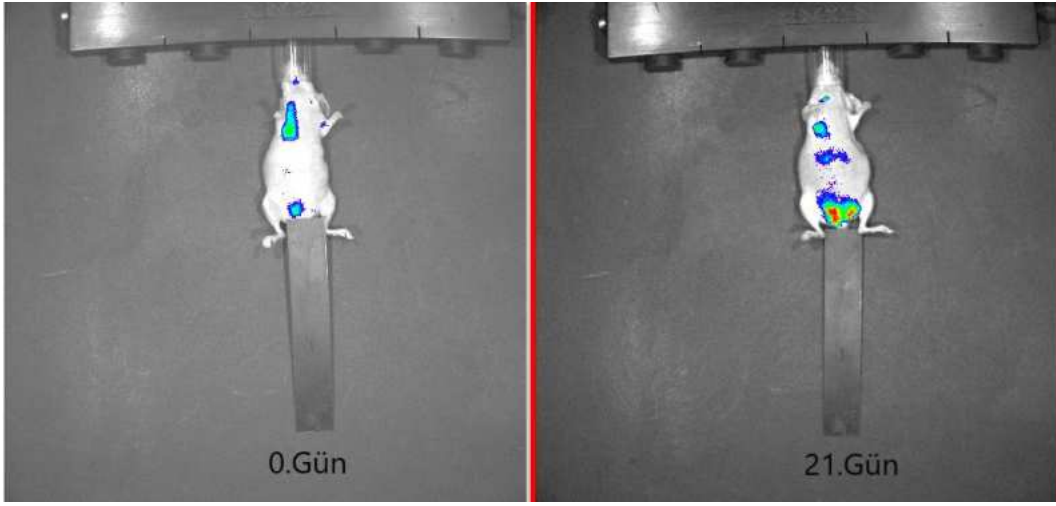


Şekil 4.57 Deney hayvanlarının ağırlıklarına ait grafik

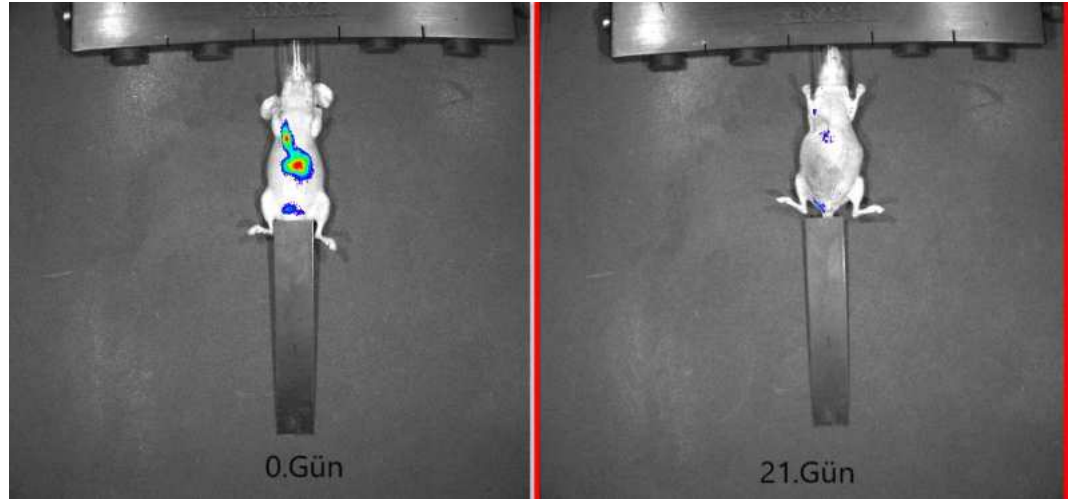
Tüm gruplardaki farelerin IVIS görüntüleri IVISense Vascular Fluorescent Probe ile gerçekleştirildi. Probun farelere kuyruk veni enjeksiyonunu takiben 24. saatte IVIS cihazında görüntüler uyarılma (excitation) dalga boyu 640 nm emisyon (emission) dalga boyu 700 nm de çalışılarak kanserli bölgeler belirlendi. 0. gün ve 21. gün tedavi sonrasında elde edilen IVIS spektrum görüntülerine ilişkin örnekler Şekil 4-58, Şekil 4-59 ve Şekil 4-60'da ve kanserli bölgelerin ROI (Region of Interest) değerleri Tablo 4-54 'da gösterilmektedir.



Şekil 4.58 SF uygulanan gruba ait 0. gün ve 21. güne ait IVIS görüntüleri (1.Grup)



Şekil 4.59 Piyasa preparatı uygulanan gruba ait 0. gün ve 21. güne ait IVIS görüntüleri (2. Grup paklitaksel)



Şekil 4.60 IXA/FACS-FAALG blend NP uygulanan gruba ait 0. gün ve 21. güne ait IVIS görüntüleri (3.Grup)

Tablo 4-54 IVIS cihazından okunan ROI değerleri

Grup İsimleri	Başlangıç Ortalama ROI Değeri	21. Gün Sonunda Ortalama ROI Değeri	Ortalama % Değişim
1.Grup(SF Uygulanan)	494500000	1554950000	314,4±14,8
2.Grup(Paklitaksel Uygulanan)	1645100000	2785100000	169,3±8,6
3.Grup(Blend NP Uygulanan)	1497200000	431240000	28,8±7,8

Şekil 4.58, 4.59 ve 4.60’da verilen IVIS spektrum görüntüleri incelendiğinde, 1.grup (SF uygulanan grup) farelerin tümörleri zamanla büyüdüğü ve metastazların olduğu, 2. grup (Paklitaksel uygulanan grup) farelerde birincil tümörlerinin tedavi edildiği fakat metastazların meydana geldiği, IXA yüklü aktif hedefli blend nanopartikülü uygulanan 3.grup farelerde ise 21 gün sonunda tümörün neredeyse kaybolduğu gözlemlendi. Böylece IXA yüklü aktif hedefli blend nanopartikülünde bulunan FA sayesinde tümöre hedefleme artırılmış ve daha etkin bir tedavi sağlandığı düşünülmektedir.

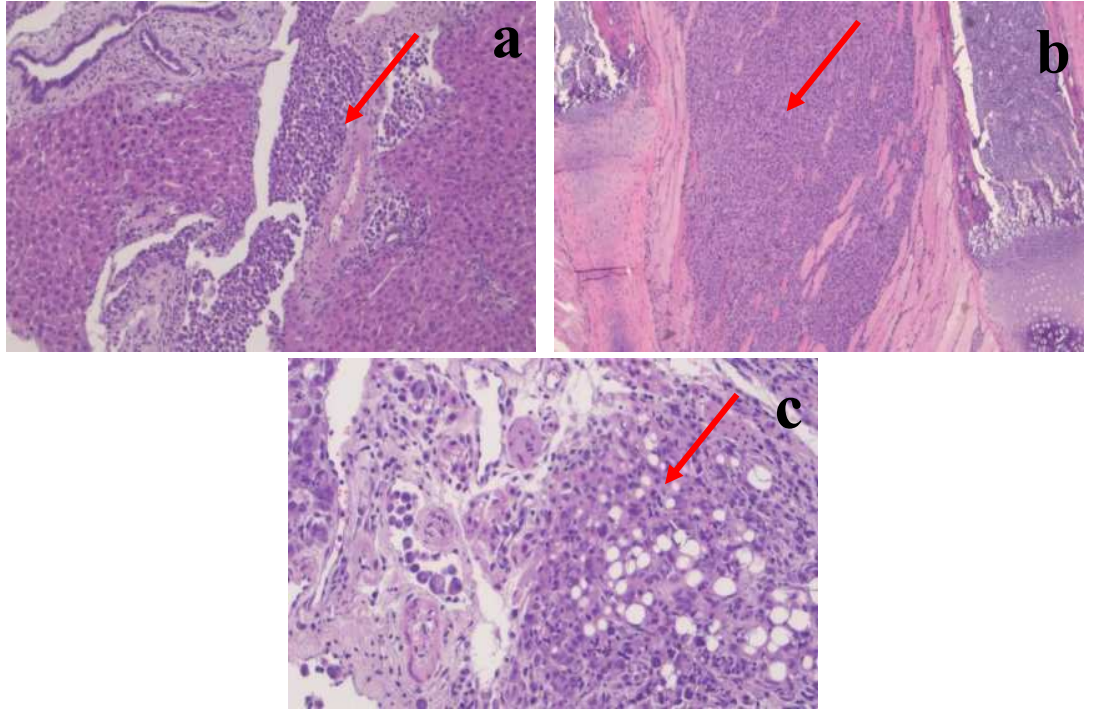
Geleneksel meme kanseri kemoterapi tedavisinin ciddi yan etkilerinin klinikte başarısının önündeki en büyük engel olmaya devam etmesi nedeni ile, Metawea ve arkadaşları, akıllı taşıyıcıların uyarlanması üzerinde bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Meme kanseri aktif hedefleme ligandı olan Folik asit ile modifiye nanojeller (NG) geliştirmişlerdir. FA-NG’lerin tümör büyümesini

baskıladığını ve membrana bağlı reseptörler aracılığıyla tümör dokusunda artan hücrel alım ve birikim olduğunu kanıtlamışlardır (Metawea et al., 2023). Fong ve arkadaşlarının yapmış olduğu diğer bir çalışmada ise, Doksorubisin (DOX) yüklü ve FA ile konjuge edilmiş grafen oksit ilaç taşıyıcı sistem hazırlayarak meme kanseri üzerindeki etkinliğini incelemiştir. DOX yüklü GOFA ilaç taşıyıcı sistemin MCF-7 meme kanseri hücrelerine yönelik sitotoksitesi FA hedefleme etkisine atfedildiğini MTT deneyleri ve akış sitometrisi analiziyle doğrularak, spesifik hedefleme etkisini *in-vivo* fare modeli üzerinde de güvenli ve etkili bir ilaç taşıyıcı sistem olduğunu kanıtlamışlardır (Fong et al., 2017). Tez çalışmamızda hazırladığımız IXA yüklü blend sistemimiz ile elde ettiğimiz sonuçlar literatürde Dox yüklü FA hedefli GO (Fong et al., 2017) ve Resveratrol yüklü FA hedefli nanojel (Metawea et al., 2023) sistemlerinde olduğu gibi serbest kemoterapi ilaçlarına kıyasla daha etkili olduğu görülmüştür.

4.7.5 Patolojik Değerlendirmeye Ait Bulgular

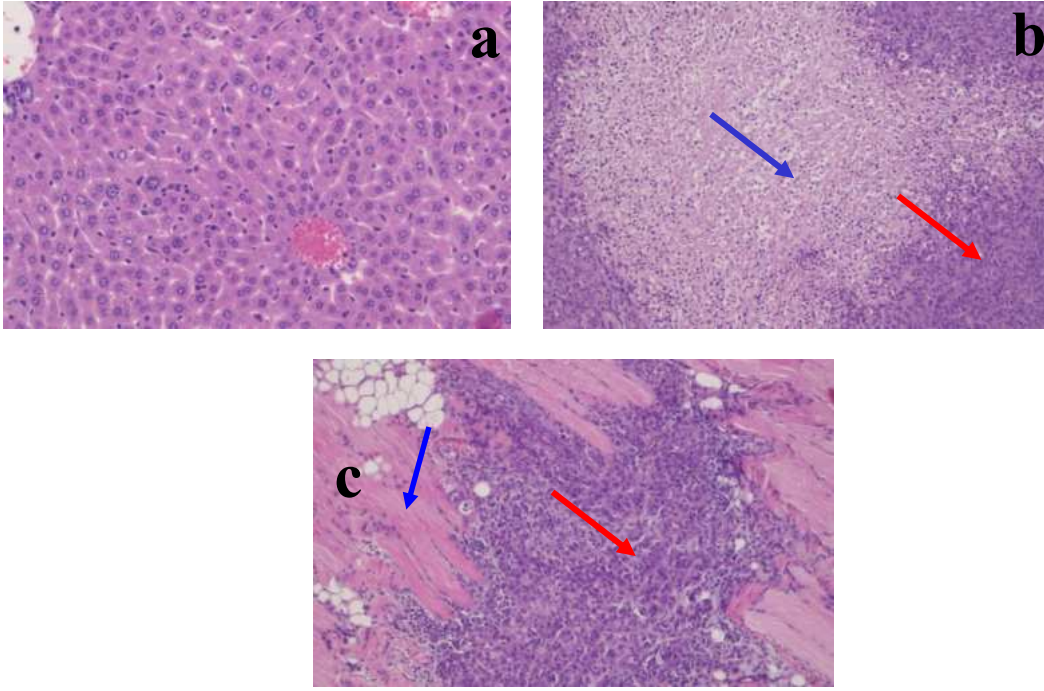
Patolojik çalışmalar, kanser oluşumu ve tedaviden sonra organlarda meydana gelen hücrel değişiklikleri saptamak adına oldukça önemlidir. Yöntem 3.2.10.5’de anlatıldığı gibi çalışıldı.

SF uygulanan (1.grup) grup, paksitaksel uygulanan (2.grup) grup ve hazırlanan hedeflendirilmiş (IXA/FACS-FAALG blend NP sistemi) blend NP sistem ile 21 gün boyunca belli aralıklarla tedavi edilen gruplardan, tedavi sonrası alınan primer tümörler, karaciğer ve genital bölgeye ilişkin patolojik görüntü örnekleri Şekil 4.61, Şekil 4.62 ve Şekil 4.63 de görülmektedir. Sakrifiyasyon sonunda alınan örnekler hemen formaldehit çözeltisine konuldu ve sonrasında parafine gömülmüş kesitleri ile ışık mikroskopunda incelenmesi gerçekleştirildi.



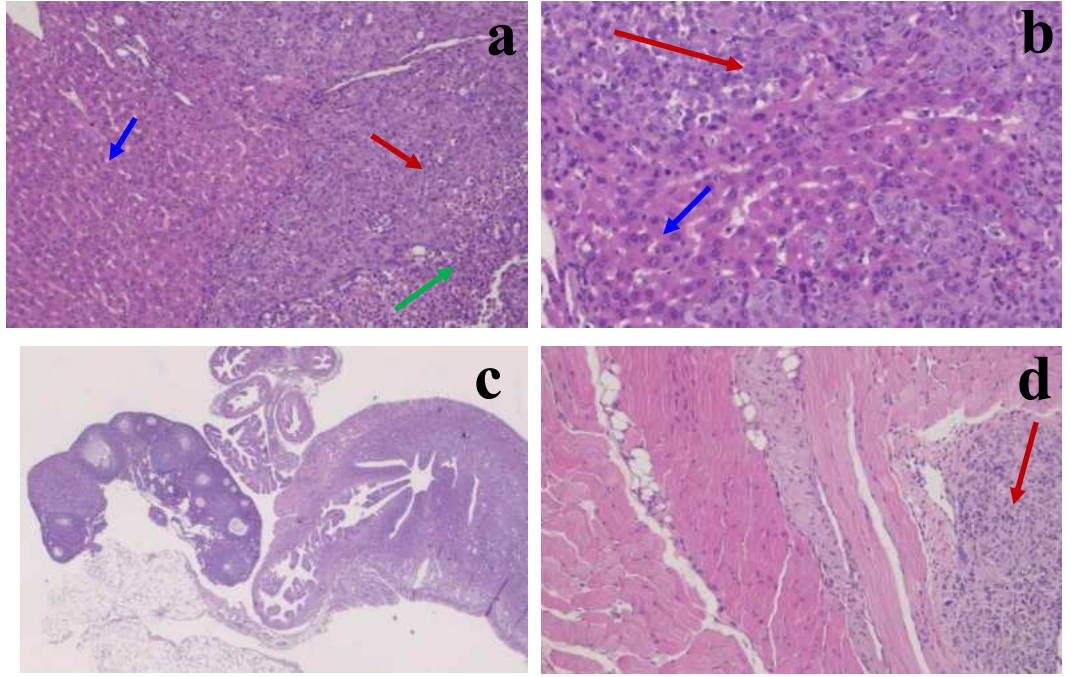
Şekil 4.61 MDA-MB-231 hücre hattı ile kanser oluşturulma sonrasında 21 gün boyunca SF uygulanan 1.grubun, sakrifiye edilen dişi nude farelerinden alınan primer tümörler, karaciğer ve peritondaki metastaza ait patoloji görüntüleri

Şekil 4.61’de 1.gruptan (SF uygulanan) alınan patolojik görüntülerde, Şekil 4.61a’da karaciğer doku kapsülünde gelişmiş tümör dokusu görülmektedir. Şekil 4.61b’de ise, 2 kosta kemiği (kemik ilikleri de görülmekte) arasında yumuşak dokuda gelişen büyük tümör metastazı mevcuttur. Son Şekil 4.61c’de peritondaki yağ hücreleri ve aralarında yaygın şekilde metastaz yapmış tümör hücreleri görülmektedir. (Kırmızı oklar kanserli bölgeleri göstermektedir.)



Şekil 4.62 MDA-MB-231 hücre hattı ile kanser oluşturulma sonrasında 21 gün boyunca Paklitaksel ile tedavi edilen 2.grubun, sakrifiye edilen dişi nude farelerinden alınan karaciğere ve yumuşak dokuya ait patoloji görüntüleri

Şekil 4.62 Paklitaksel ile tedavi edilen grupta n alınan patolojik görüntülerde Şekil 4.62a’da sağlıklı karaciğer görüntüsü elde edilirken, Şekil 4.62b’de kanserli doku bölgeler ve sağlıklı bölgeler görülmektedir. Şekil 4.62b kanserin olduğu ama tedavi sonucunda iyileşmelerin gözüktüğü nekroze dokuların varlığı görülmektedir. Şekil 4.62c’de yumuşak dokudaki yaygın kanser infiltrasyonu belirlenmiştir. Sonuç olarak kanserli bölgeler azalma göstermesine rağmen kanserin yoğun olarak devam ettiği görülmüştür. (Kırmızı oklar kanserli bölgeleri, mavi oklar iyileşmiş bölgeleri göstermektedir.)



Şekil 4.63 MDA-MB-231 hücre hattı ile kanser oluşturulma sonrasında 21 gün boyunca IXA/FACS-FAALG blend NP sistemi ile tedavi edilen 3.grubun, sakrifiye edilen dişi nude farelerinden alınan karaciğer, genital sistem ve kasa metastazına ait patoloji görüntüleri

Şekil 4.63’de IXA yüklü blend NP sistemi ile tedavi edilen 3. gruptan alınan patolojik görüntülerde Şekil 4.63a ve Şekil 4.63b karaciğer dokusuna aittir. Şekil 4.63a ve b’de mavi ok ile işaret edilen bölgeler sağlıklı dokuları gösterirken kırmızı ok ile kanserli bölgeler gösterilmektedir. Yeşil ok ile gösterilen kısım ise tedavi sonrası nekroze olan bölgeleri göstermektedir. Sonuç olarak kanserli bölgelerde gözle görülen azalmalar söz konudur. Tedavi edilmiş hücreliliği azalmış kası tutan kanser dokusu (Şekil 4.63d) görülmektedir. Şekil 4.63c’de genital bölgeye (over, tuba, uterus ve omentum) ilişkin patolojik değerlendirmesi görülmektedir ve genital bölgeye metastaz olmadığı sonucu elde edilmiştir.

In-vivo denemeler sonucu elde edilen doku örneklerinin patolojik açıdan değerlendirilmesi ile elde edilen sonuçlar IVIS görüntüleri ile elde ettiğimiz tümör boyutlarındaki küçülmeler ve ROI değerleri ile bulunan aktivitedeki yüzde azalışı desteklemektedir.

5 SONUÇ VE ÖNERİLER

Meme kanserinin, dünyada kadınlarda en çok rastlanan kanser türü olması ve uygulanan geleneksel tedavi yöntemlerinin neden olduğu yan etkilerin ortadan kaldırılabilmesi açısından etkili ve güvenli bir tedavi yönteminin geliştirilebilmesi önemlidir. Bu amaçla tez çalışmamızda, öncelikle biyouyumlu olan kitosan ve aljinat polimerleri folik asit ile modifiye edilmiştir. Modifiye edilerek sentezlenen FACS ve FAALG moleküllerinin karakterizasyonu hem FA'nın miktar tayini HPLC cihazında tayin edilerek, hem de moleküllerin NMR analizleri yapılarak gerçekleştirilmiştir.

FACS, FAALG ve FACS-FAALG blend nanopartikülleri hazırlanıp, model ilaç etkin madde İksabepilon enkapsülasyon yöntemiyle nanopartiküllere sırasıyla %51,3±4,6, %47,6±5,0 ve 53,7±7,7 verimle yüklendi. IXA/FACS NP, IXA/FAALG NP ve IXA/FACS-FAALG blend nanopartiküllerin partikül boyutları Zetasizer, Malvern Ultra cihazında sırasıyla 154±10,9, 157,6±4,4 ve 218,1±6,9 nm boyutlarında bulundu. SEM ve TEM analizleriyle, DLS boyut sonuçları karşılaştırıldığında yaklaşık aynı sonuçlar olduğu bulundu. Ayrıca SEM analiziyle, hazırlanan nanopartiküllerin homojen ve küresel morfolojiye sahip oldukları da belirlendi.

Hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemlerin *in-vitro* salım çalışmaları normal dokuyu taklit etmek için pH 7,4'de, kanserli hücre dokusunun nispeten asidik mikro çevresini taklit etmek için pH 6,5 ve kanser hücre içini taklit etmek için pH 5,5'te gerçekleştirildi. Asidik pH değerinde, normal doku pH değerine göre daha fazla ilaç salımı olduğu saptandı. Bu durum kanserli dokuyu hedef alarak hazırladığımız taşıma sistemlerinin kanserli hücre dokusunun nispeten asidik mikro çevresinde ve kanser hücreleri içinde daha fazla salım göstermesi ile tedavi etkinliğinin de önemli bir avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

Tüm formülasyonların MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerindeki *in-vitro* hücre kültürü çalışmalarında belirlenen, IC₅₀ değerleri ve IC₅₀ değerlerinin bir alt konsantrasyonları folat ligandı taşıyan ilaç taşıyıcı sistemlere yüklenerek

çalışma gerçekleştirildi. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde IXA etkin maddesinin 0,010 μ M konsantrasyonunda 72.saat sonunda hücre canlılığı %60,5 iken, IXA yüklü FACS-FAALG blend nanopartikül sistemin 72.saat sonunda hücre canlılığı %51,6 olarak bulunmuştur. Böylece hazırlanan IXA/FACS-FAALG blend nanopartikül taşıyıcı sisteminin folik asitin varlığında hücre içerisine girdiği ve IXA etkin maddesinin daha fazla toksisite oluşturduğu bulunmuştur.

^{99m}Tc radyoişaretli IXA, IXA/FACS NP, IXA/FAALG NP ve IXA/FACS-FAALG blend NP'leri %95'in üstünde verimle işaretleme gerçekleştirilmiştir. Lipofilite ve stabilite tayinleri sonucunda, etkin maddenin NP'lere enkapsülasyonu lipofilitesini arttırmış olup, kararlı yapıda oldukları bulunmuştur. Ayrıca inkorporasyon çalışmaları ile IXA yüklü blend nanopartikülün IXA, IXA yüklü FACS NP ve FAALG NP'lerine göre MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde daha fazla tutulum gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen bu veriler sonucunda, meme kanseri teşhisinde, kemeteropik ajan olarak kullanılan IXA'nın, radyoişaretli formunun hazırlanması ve nanopartiküle yüklenmesi ile sintigrafik görüntülemeye kullanılabilme potansiyeli olabileceği gösterilmiştir. Ayrıca tümörlü dokularda kemoteropi ve radyoaktivitenin göstereceği etkinlik ile çift yönlü tümörlü dokunun tedavisinin sağlanabileceği düşünülmektedir. Bu amaçla bir sonraki çalışma olarak ^{99m}Tc işaretli IXA ve FACS, FAALG ve FACS/FAALG'nin *in-vivo* hayvan deneylerinin yapılması planlanmaktadır.

Optik görüntüleme yöntemi IVIS spektrum cihazı kullanılarak, hazırlanan folik asit ile modifiye edilmiş ve IXA yüklü nanopartikül blend sisteminin biyodağılım ve tedavi potansiyeli incelenmiştir. Kanserli Balb/c dişi fareler ile gerçekleştirilen biyodağılım çalışmalarında, folik asit ile modifiye polimerlerle hazırlanan blend nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemin, folat reseptörünün yoğun olduğu karın bölgesinde, folik asitsiz hazırlanan nanopartiküllere göre daha iyi birikim gösterdiği kanıtlanmıştır. Ayrıca boya maddesinin uygulandığı farelerden 24.saat sonunda IVIS spektrum cihazı ile alınan görüntülerde, boyanın vücuttan tamamiyle atılmasına rağmen hazırlanan blend nanopartiküllerinin atılmadığı görülmüştür. Böylelikle tez çalışması kapsamında hazırlanan folat reseptörü hedefli

ilaç taşıyıcı sistemin spesifik olarak dokularda birikebildiği ortaya konmuştur. Tedavi etkinliğinin incelenmesi amacı ile 1.grup (SF uygulanan) 2. grup (Paklitaksel uygulanan) ve 3.grup (IXA FACS/FAALG blend NP uygulanan) olarak 21 günlük tedavi sonucunda IVIS spektrum cihazı ile tümör büyüklükleri izlenmiştir. 1. ve 2. Grupta sırası ile % $314,4 \pm 14,8$ ve % $169,3 \pm 8,6$ olarak tümör boyutları artarken, IXA FACS/FAALG blend NP uygulanan (3.grup) grupta tümör boyutunun % $28,8 \pm 7,8$ 'e düştüğü (%71,2 azalma) görülmüştür. Tedavi sonunda kurbanıye edilen farelerden alınan karaciğer, genital sistem ve tümör doku örneklerinin patolojik değerdendirmeleri sonucunda hazırlanan NP blend sisteminin, Paklitaksel uygulanan grubuna kıyasla daha etkili olduğı desteklenmiştir. Sonuç olarak, tez kapsamında hazırlanan IXA yüklü folik asit ile modifiye edilmiş kitosan/aljinat blend nanopartikül sisteminin *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalarına ait elde edilen tüm sonuçlar IXA yüklü FACS-FAALG blend nanopartiküllerinin meme kanseri tedavisinde umut vaat eden ilaç taşıyıcı sistem olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- A. Zielinski, B., & Aebischer, P. (1994). Chitosan as a matrix for mammalian cell encapsulation. *Biomaterials*, 15(13), 1049–1056. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(94\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0142-9612(94)90090-6)
- Adeyemi, S. B., Akere, A. M., Orege, J. I., Ejeromeghene, O., Orege, O. B., & Akolade, J. O. (2023). Polymeric nanoparticles for enhanced delivery and improved bioactivity of essential oils. *Heliyon*, 9(6), e16543. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16543>
- al., R. et. (2018). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(5), 139–148. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801473>.The
- Alberto, R. (2023). Role of Pure Technetium Chemistry: Are There Still Links to Applications in Imaging? *Inorganic Chemistry*, 62(50), 20539–20548. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.3c01620>
- Aldawsari, M. F., Ahmed, M. M., Fatima, F., Anwer, M. K., Katakam, P., & Khan, A. (2021). Development and characterization of calcium-alginate beads of apigenin: In vitro antitumor, antibacterial, and antioxidant activities. *Marine Drugs*, 19(8). <https://doi.org/10.3390/md19080467>
- Allahverdiyev, A. M., Parlar, E., Dinparvar, S., Bagirova, M., & Abamor, E. Ş. (2018). Current aspects in treatment of breast cancer based of nanodrug delivery systems and future prospects. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(sup3), S755–S762. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1511573>
- Alliance, S. B., & Heath, J. (2003). 423010a. 423(May).
- Altmann, K. H., Wartmann, M., & O'Reilly, T. (2000). Epothilones and related structures - A new class of microtubule inhibitors with potent in vivo antitumor activity. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1470(3), 79–91.

[https://doi.org/10.1016/S0304-419X\(00\)00009-3](https://doi.org/10.1016/S0304-419X(00)00009-3)

American Cancer Society. (2022). Breast cancer facts and figures 2022-2024. *American Cancer Society*, pp. 1–44.

Anjum, S., Naseer, F., Ahmad, T., Jahan, F., Qadir, H., Gul, R., ... Shabbir, A. (2024). Enhancing therapeutic efficacy: sustained delivery of 5-fluorouracil (5-FU) via thiolated chitosan nanoparticles targeting CD44 in triple-negative breast cancer. *Scientific Reports*, 14(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55900-1>

Anselmo, A. C., & Mitragotri, S. (2014). An overview of clinical and commercial impact of drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 190, 15–28. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.053>

Arachchige, M. C. M., Reshetnyak, Y. K., & Andreev, O. A. (2015). Advanced targeted nanomedicine. *Journal of Biotechnology*, 202, 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.01.009>

Arano, Y. (2002). Recent advances in ^{99m}Tc radiopharmaceuticals. *Annals of Nuclear Medicine*, 16(2), 79–93. <https://doi.org/10.1007/BF02993710>

Babak, V. G., Skotnikova, E. A., Lukina, I. G., Pelletier, S., Hubert, P., & Dellacherie, E. (2000). Hydrophobically associating alginate derivatives: Surface tension properties of their mixed aqueous solutions with oppositely charged surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*, 225(2), 505–510. <https://doi.org/10.1006/jcis.2000.6788>

Back, M., Ahern, V., Delaney, G., Graham, P., Steigler, A., & Wratten, C. (2005). Absence of adverse early quality of life outcomes of radiation therapy in breast conservation therapy for early breast cancer. *Australasian Radiology*, 49(1), 39–43. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1673.2005.01392.x>

Banerjee, S., Ambikalmajan Pillai, M. R., & Ramamoorthy, N. (2001). Evolution

of Tc-99m in diagnostic radiopharmaceuticals. *Seminars in Nuclear Medicine*, 31(4), 260–277. <https://doi.org/10.1053/snuc.2001.26205>

Banerjee, S. R., Pullambhatla, M., Foss, C. A., Nimmagadda, S., Ferdani, R., Anderson, C. J., ... Pomper, M. G. (2014). ⁶⁴Cu-labeled inhibitors of prostate-specific membrane antigen for PET imaging of prostate cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(6), 2657–2669. <https://doi.org/10.1021/jm401921j>

BAZAK, R., HOURI, M., ACHY, S. EL, HUSSEIN, W., & REFAAT, T. (2014). Passive targeting of nanoparticles to cancer: A comprehensive review of the literature. *Molecular and Clinical Oncology*, 2(6), 904–908. <https://doi.org/10.3892/mco.2014.356>

Belay, Simane, Hunachew Beyene², Wakgari Deressa², Abera Kumie², Kiros Berhane³, and J. S. (2018). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2017.01.013>. Taking

Ben Amar Cheba. (2011). *Chitin and Chitosan: Marine Biopolymers with Unique Properties and Versatile Applications*. (April), 149–153. Retrieved from <http://idosi.org/gjbb/gjbb6%283%2911/7.pdf>

Bhatia, S. (n.d.). *Saurabh Bhatia (auth.)-Natural Polymer Drug Delivery Systems_ Nanoparticles, Plants, and Algae-Springer International Publishing (2016).pdf*.

Birrer, M. J., Moore, K. N., Betella, I., & Bates, R. C. (2019). Antibody-Drug Conjugate-Based Therapeutics: State of the Science. *Journal of the National Cancer Institute*, 111(6), 538–549. <https://doi.org/10.1093/jnci/djz035>

Bockisch, A., Freudenberg, L. S., Schmidt, D., & Kuwert, T. (2009). Hybrid Imaging by SPECT/CT and PET/CT: Proven Outcomes in Cancer Imaging. *Seminars in Nuclear Medicine*, 39(4), 276–289.

<https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2009.03.003>

Brinton, L. A., Sherman, M. E., Carreon, J. D., & Anderson, W. F. (2008). Recent trends in breast cancer among younger women in the United States. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(22), 1643–1648. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn344>

Cabioğlu, N. (2012). Memenin anatomisi ve fizyolojisi. In *Meme hastalıkları kitabı*. Retrieved from www.guneskitabevi.com

Calzoni, E., Cesaretti, A., Polchi, A., Di Michele, A., Tancini, B., & Emiliani, C. (2019). Biocompatible polymer nanoparticles for drug delivery applications in cancer and neurodegenerative disorder therapies. *Journal of Functional Biomaterials*, 10(1), 1–15. <https://doi.org/10.3390/jfb10010004>

Cárdenas-Triviño, G., Monsalve-Rozas, S., & Vergara-González, L. (2021). Microencapsulation of erlotinib and nanomagnetite supported in chitosan as potential oncologic carrier. *Polymers*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/polym13081244>

Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., ... Millikan, R. C. (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Journal of the American Medical Association*, 295(21), 2492–2502. <https://doi.org/10.1001/jama.295.21.2492>

Carr, C., Ng, J., & Wigmore, T. (2008). The side effects of chemotherapeutic agents. *Current Anaesthesia and Critical Care*, 19(2), 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.cacc.2008.01.004>

Chan, J. M., Valencia, P. M., Zhang, L., Langer, R., & Farokhzad, O. C. (2010). Chapter 11 Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. *Cancer Nanotechnology*, 163–175. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-609-2>

Cheng, L., Ma, H., Shao, M., Fan, Q., Lv, H., Peng, J., ... Zong, X. (2017).

Synthesis of folate-chitosan nanoparticles loaded with ligustrazine to target folate receptor positive cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 16(2), 1101–1108. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6740>

Contents, T. O. F. (2020). *Ffi Ci Ffi Ci*. 1–37.

Daniel, M. C., & Astruc, D. (2004). Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications Toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chemical Reviews*, 104(1), 293–346. <https://doi.org/10.1021/cr030698+>

Dawidczyk, C. M., Russell, L. M., & Searson, P. C. (2014). Nanomedicines for cancer therapy: State-of-the-art and limitations to pre-clinical studies that hinder future developments. *Frontiers in Chemistry*, 2(AUG), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00069>

Denduluri, N., & Swain, S. M. (2008). Ixabepilone for the treatment of solid tumors: A review of clinical data. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 17(3), 423–435. <https://doi.org/10.1517/13543784.17.3.423>

Deng, S., Gu, J., Jiang, Z., Cao, Y., Mao, F., Xue, Y., ... Cai, K. (2022). Application of nanotechnology in the early diagnosis and comprehensive treatment of gastrointestinal cancer. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 1–29. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01613-4>

Derman, S., Kizilbey, K., & Akdeste, Z. M. (2013). *Polymeric Nanoparticles Journal of Engineering and Natural Sciences Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi Review Paper / Derleme Makalesi*. (May 2014).

Desai, A., Sequeira, J. M., & Quadros, E. V. (2016). The metabolic basis for developmental disorders due to defective folate transport. *Biochimie*, 126, 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.02.012>

Deshmukh, R., Wagh, P., & Naik, J. (2016). Solvent evaporation and spray drying

technique for micro- and nanospheres/particles preparation: A review. *Drying Technology*, 34(15), 1758–1772.
<https://doi.org/10.1080/07373937.2016.1232271>

Divya, K., & Jisha, M. S. (2018). Chitosan nanoparticles preparation and applications. *Environmental Chemistry Letters*, 16(1), 101–112.
<https://doi.org/10.1007/s10311-017-0670-y>

Dzik-Jurasz, A. S. K. (2003). Molecular imaging in vivo: An introduction. *British Journal of Radiology*, 76(SPEC. ISS. 2). <https://doi.org/10.1259/bjr/25833499>

Ekinci, M., Ilem-Ozdemir, D., Gundogdu, E., & Asikoglu, M. (2015). Methotrexate loaded chitosan nanoparticles: Preparation, radiolabeling and in vitro evaluation for breast cancer diagnosis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 30, 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.10.004>

European Pharmacopeia. (2005). 4.1.3. buffer solutions.

Fakirov, S. (2019). Condensation Polymers: Their Chemical Peculiarities Offer Great Opportunities. *Progress in Polymer Science*, 89, 1–18.
<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2018.09.003>

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, 149(4), 778–789.
<https://doi.org/10.1002/ijc.33588>

Ferreira Soares, D. C., Domingues, S. C., Viana, D. B., & Tebaldi, M. L. (2020). Polymer-hybrid nanoparticles: Current advances in biomedical applications. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 131(September), 110695.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110695>

Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N., & Benita, S. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent

displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 55(1), 1–4.
[https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90281-0](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90281-0)

Fornier, M. N. (2007). Ixabepilone, first in a new class of antineoplastic agents: The natural epothilones and their analogues. *Clinical Breast Cancer*, 7(10), 9–15.
<https://doi.org/10.3816/CBC.2007.n.036>

Frigerio, B., Bizzoni, C., Jansen, G., Leamon, C. P., Peters, G. J., Low, P. S., ... Figini, M. (2019). Folate receptors and transporters: Biological role and diagnostic/therapeutic targets in cancer and other diseases. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 38(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1186/s13046-019-1123-1>

Geethakumari, D., Bhaskaran Sathyabhama, A., Raji Sathyan, K., Mohandas, D., Somasekharan, J. V., & Thavarool Puthiyedathu, S. (2022). Folate functionalized chitosan nanoparticles as targeted delivery systems for improved anticancer efficiency of cytarabine in MCF-7 human breast cancer cell lines. *International Journal of Biological Macromolecules*, 199(December 2021), 150–161.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.070>

George, A., & Cyriac, J. (2017). Nano particle based drug delivery systems. *Proceedings of the 3rd IEEE International Conference on Advances in Electrical and Electronics, Information, Communication and Bio-Informatics, AEEICB 2017*, 70, 75–79. <https://doi.org/10.1109/AEEICB.2017.7972386>

Ghodke, P. K. (2021). High-quality hydrocarbon fuel production from municipal mixed plastic waste using a locally available low-cost catalyst. *Fuel Communications*, 8, 100022. <https://doi.org/10.1016/j.jfueco.2021.100022>

Gnach, A., Lipinski, T., Bednarkiewicz, A., Rybka, J., & Capobianco, J. A. (2015). Upconverting nanoparticles: Assessing the toxicity. *Chemical Society Reviews*, 44(6), 1561–1584. <https://doi.org/10.1039/c4cs00177j>

- Gradishar, W. (2009). Management of advanced breast cancer with the epothilone B analog, ixabepilone. *Drug Design, Development and Therapy*, (3), 163–171. <https://doi.org/10.2147/dddt.s3122>
- Graidist, P., Martla, M., & Sukpondma, Y. (2015). Cytotoxic activity of Piper cubeba extract in breast cancer cell lines. *Nutrients*, 7(4), 2707–2718. <https://doi.org/10.3390/nu7042707>
- Guterres, S. S., Alves, M. P., & Pohlmann, A. R. (2007). Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. *Drug Target Insights*, 2(1), 147–157. <https://doi.org/10.33393/dti.2007.1300>
- Higino, T., & França, R. (2022). Drug-delivery nanoparticles for bone-tissue and dental applications. *Biomedical Physics and Engineering Express*, 8(4). <https://doi.org/10.1088/2057-1976/ac682c>
- Hoffman, A. S. (2012). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.), 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.010>
- Homayouni, A., Ehsani, M. R., Azizi, A., Yarmand, M. S., & Razavi, S. H. (2007). Effect of lecithin and calcium chloride solution on the microencapsulation process yield of calcium alginate beads. *Iranian Polymer Journal (English Edition)*, 16(9), 597–606.
- Hosseinzadeh, H., Atyabi, F., Dinarvand, R., & Ostad, S. N. (2012). Chitosan-Pluronic nanoparticles as oral delivery of anticancer gemcitabine: Preparation and in vitro study. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 1851–1863. <https://doi.org/10.2147/IJN.S26365>
- Ilkar Erdagi, S., Ngwabebhoh, F. A., & Yildiz, U. (2020). Pickering stabilized nanocellulose-alginate: A diosgenin-mediated delivery of quinalizarin as a potent cyto-inhibitor in human lung/breast cancer cell lines. *Materials Science and Engineering C*, 109(December 2019), 110621.

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110621>

International Council for Harmonisation. (2003). International Conference on Harmonisation (ICH). Guidance for industry: Q1A(R2) Stability Testing of New drug Substances and Products. *ICH Harmonised Tripartite Guideline*, 4(February), 24.

Kedar, U., Phutane, P., Shidhaye, S., & Kadam, V. (2010). Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(6), 714–729. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.05.005>

Kim, Y., & Je, Y. (2014). Vitamin D intake, blood 25(OH)D levels, and breast cancer risk or mortality: A meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 110(11), 2772–2784. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.175>

Köse, A. (2009). *E ğ i t i m b i l i m l e r i a n a b i l i m d a l i*. 46–68.

Kumari, P., Ghosh, B., & Biswas, S. (2016). Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. *Journal of Drug Targeting*, 24(3), 179–191. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2015.1051049>

Lakshmana, P., & Suriyaprakash, T. (2017). Nov Appro Drug Des Dev Role of Natural Polymers in Drug Delivery Systems as Challenging Ailments. *Mini Review*, 3(1), 1–5. Retrieved from <https://juniperpublishers.com/napdd/pdf/NAPDD.MS.ID.555605.pdf>

Lee, F. Y.F., Borzilleri, R., Fairchild, C. R., Kim, S. H., Long, B. H., Reventos-Suarez, C., ... Kramer, R. A. (2001). BMS-247550: A novel epothilone analog with a mode of action similar to paclitaxel but possessing superior antitumor efficacy. *Clinical Cancer Research*, 7(5), 1429–1437.

Lee, Francis Y.F., Borzilleri, R., Fairchild, C. R., Kamath, A., Smykla, R., Kramer, R., & Vite, G. (2008). Preclinical discovery of ixabepilone, a highly active

antineoplastic agent. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 63(1), 157–166. <https://doi.org/10.1007/s00280-008-0724-8>

Lee, S., & Lee, K. (2020). Ph-sensitive folic acid conjugated alginate nanoparticle for induction of cancer-specific fluorescence imaging. *Pharmaceutics*, 12(6), 1–14. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12060537>

Leise, M. D., Poterucha, J. J., & Talwalkar, J. A. (2014). Drug-induced liver injury. *Mayo Clinic Proceedings*, 89(1), 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.09.016>

Li, J., Ren, J., & Sun, W. (2017). Systematic review of ixabepilone for treating metastatic breast cancer. *Breast Cancer*, 24(2), 171–179. <https://doi.org/10.1007/s12282-016-0717-0>

Li, P., Wang, Y., Zeng, F., Chen, L., Peng, Z., & Kong, L. X. (2011). Synthesis and characterization of folate conjugated chitosan and cellular uptake of its nanoparticles in HT-29 cells. *Carbohydrate Research*, 346(6), 801–806. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.01.027>

Li, R., Zhang, Y., Lin, Z., Lei, Q., Liu, Y., Li, X., ... Zha, Z. (2021). Injectable halloysite-g-chitosan hydrogels as drug carriers to inhibit breast cancer recurrence. *Composites Part B: Engineering*, 221(January), 109031. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2021.109031>

Li, S. D., & Huang, L. (2008). Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 5(4), 496–504. <https://doi.org/10.1021/mp800049w>

Li, X., Zeng, D., Ke, P., Wang, G., & Zhang, D. (2020). Synthesis and characterization of magnetic chitosan microspheres for drug delivery. *RSC Advances*, 10(12), 7163–7169. <https://doi.org/10.1039/c9ra10792d>

López-García, J., Lehocký, M., Humpolíček, P., & Sába, P. (2014). HaCaT

Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation. *Journal of Functional Biomaterials*, 5(2), 43–57. <https://doi.org/10.3390/jfb5020043>

Lopus, M., Smiyun, G., Miller, H., Oroudjev, E., Wilson, L., & Jordan, M. A. (2015). Mechanism of action of ixabepilone and its interactions with the β III-tubulin isotype. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 76(5), 1013–1024. <https://doi.org/10.1007/s00280-015-2863-z>

Luini, A., Galimberti, V., Zurrida, S., Venezian, V. G., & Veronesi, U. (1994). *Surgeries* © 1994. 70–75.

Luo, F., Fan, Z., Yin, W., Yang, L., Li, T., Zhong, L., ... Zhang, Q. (2019). pH-responsive stearic acid-O-carboxymethyl chitosan assemblies as carriers delivering small molecular drug for chemotherapy. *Materials Science and Engineering C*, 105(January), 110107. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110107>

Maher, S., Kalil, H., Liu, G., Sossey-Alaoui, K., & Bayachou, M. (2023). Alginate-based hydrogel platform embedding silver nanoparticles and cisplatin: characterization of the synergistic effect on a breast cancer cell line. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 10(October), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1242838>

Malmiri, H. J., Jahanian, M. A. G., & Berenjian, A. (2012). Potential applications of chitosan nanoparticles as novel support in enzyme immobilization. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8(4), 203–219. <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2012.203.219>

Mansoori, G. A., & Soelaiman, T. A. F. (2005). Nanotechnology - An introduction for the standards community. *Journal of ASTM International*, 2(6), 17–38. <https://doi.org/10.1520/JAI13110>

Merrell, B. J., & McMurry, J. P. (2022). Folic acid Folic acid. *StatPearls-NCBI*

Bookshelf, 151(9), 1–7.

- Mi, Y., Zhao, J., & Feng, S. S. (2012). Vitamin e TPGS prodrug micelles for hydrophilic drug delivery with neuroprotective effects. *International Journal of Pharmaceutics*, 438(1–2), 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.08.038>
- Mohammed, G. M., ElZorkany, H. E. S., Farroh, K. Y., Abd El-Aziz, W. R., & Elshoky, H. A. (2021). Potential improvement of the immune response of chickens against E. coli vaccine by using two forms of chitosan nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 395–404. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.200>
- Mumper, R. J., Huffman, A. S., Puolakkainen, P. A., Bouchard, L. S., & Gombotz, W. R. (1994). Calcium-alginate beads for the oral delivery of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1): stabilization of TGF- β 1 by the addition of polyacrylic acid within acid-treated beads. *Journal of Controlled Release*, 30(3), 241–251. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(94\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0168-3659(94)90030-2)
- NCADV. (2017). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1113216>.Pertuzumab
- Nguyen, T. H., Ghorbel, E., Fares, H., & Cousture, A. (2019). Bacterial self-healing of concrete and durability assessment. *Cement and Concrete Composites*, 104(June), 103340. <https://doi.org/10.1016/j.cemconcomp.2019.103340>
- No, H. K., Young Park, N., Ho Lee, S., & Meyers, S. P. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1–2), 65–72. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00717-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00717-6)
- Nyamweya, N. N. (2021). Applications of polymer blends in drug delivery. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s43094->

020-00167-2

- Ovais, M., Khalil, A. T., Raza, A., Khan, M. A., Ahmad, I., Islam, N. U., ... Shinwari, Z. K. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles via plant extracts: Beginning a new era in cancer theranostics. *Nanomedicine*, 12(23), 3157–3177. <https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0279>
- Oyen, W. J. G., Bodei, L., Giammarile, F., Maecke, H. R., Tennvall, J., Luster, M., & Brans, B. (2007). Targeted therapy in nuclear medicine - Current status and future prospects. *Annals of Oncology*, 18(11), 1782–1792. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdm111>
- Pawar, S. N., & Edgar, K. J. (2011). Chemical modification of alginates in organic solvent systems. *Biomacromolecules*, 12(11), 4095–4103. <https://doi.org/10.1021/bm201152a>
- Pedroso-Santana, S., & Fleitas-Salazar, N. (2020). Ionotropic gelation method in the synthesis of nanoparticles/microparticles for biomedical purposes. *Polymer International*, 69(5), 443–447. <https://doi.org/10.1002/pi.5970>
- Pinto Reis, C., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., & Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2(1), 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.12.003>
- Puhalla, S., & Brufsky, A. (2008). Ixabepilone: A new chemotherapeutic option for refractory metastatic breast cancer. *Biologics: Targets and Therapy*, 2(3), 505–515. <https://doi.org/10.2147/btt.s3539>
- Rajabi, H., Rasaneh, S., & Salehi, S. (2016). Synthesis and Biological Evaluation of ^{99m}Tc-Chitosan Nanoparticles as a Potential Radiopharmaceutical for Liver Imaging. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry*, 46(10), 1450–1454. <https://doi.org/10.1080/15533174.2015.1137010>

- Reddy, A. R. K., & Grace, J. R. (2016). Anticancer Activity of Methanolic Extracts of Selected Mangrove Plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(9), 3852–3856. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7\(9\).3852-56](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7(9).3852-56)
- Rothermel, J., Wartmann, M., Chen, T., & Hohneker, J. (2003). EPO906 (epothilone B): A promising novel microtubule stabilizer. *Seminars in Oncology*, 30(3 SUPPL. 6), 51–55. [https://doi.org/10.1016/S0093-7754\(03\)00125-8](https://doi.org/10.1016/S0093-7754(03)00125-8)
- Sahu, T., Ratre, Y. K., Chauhan, S., Bhaskar, L. V. K. S., Nair, M. P., & Verma, H. K. (2021). Nanotechnology based drug delivery system: Current strategies and emerging therapeutic potential for medical science. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 63(March), 102487. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102487>
- Samad, A., Sultana, Y., Khar, R. K., Aqil, M., Kalam, M. A., Chuttani, K., & Mishra, A. K. (2008). Radiolabeling and evaluation of alginate blend-isoniazid microspheres by ^{99m}Tc for the treatment of tuberculosis in rabbit model. *Journal of Drug Targeting*, 16(6), 509–515. <https://doi.org/10.1080/10611860802201076>
- Sarasam, A. R., Krishnaswamy, R. K., & Madihally, S. V. (2006). Blending chitosan with polycaprolactone: Effects on physicochemical and antibacterial properties. *Biomacromolecules*, 7(4), 1131–1138. <https://doi.org/10.1021/bm050935d>
- Shien, T., & Iwata, H. (2020). Adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 50(3), 225–229. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyz213>
- Shimizu, T., Yamamoto, N., Yamada, Y., Fujisaka, Y., Yamada, K., Fujiwara, Y., ... Tamura, T. (2008). Phase I clinical and pharmacokinetic study of 3-weekly,

3-h infusion of ixabepilone (BMS-247550), an epothilone B analog, in Japanese patients with refractory solid tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 61(5), 751–758. <https://doi.org/10.1007/s00280-007-0530-8>

Siafaka, P., Betsiou, M., Tsolou, A., Angelou, E., Agianian, B., Koffa, M., ... Bikiaris, D. (2015). Synthesis of folate- pegylated polyester nanoparticles encapsulating ixabepilone for targeting folate receptor overexpressing breast cancer cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26(12), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s10856-015-5609-x>

Sichert, J. A., Tong, Y., Mutz, N., Vollmer, M., Fischer, S., Milowska, K. Z., ... Feldmann, J. (2015). Quantum Size Effect in Organometal Halide Perovskite Nanoplatelets. *Nano Letters*, 15(10), 6521–6527. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b02985>

Siddique, S., & Chow, J. C. L. (2020). Gold nanoparticles for drug delivery and cancer therapy. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/app10113824>

Siegel, R. L., Giaquinto, A. N., & Jemal, A. (2024). Cancer statistics, 2024. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(1), 12–49. <https://doi.org/10.3322/caac.21820>

Singh, A., Mittal, A., & Benjakul, S. (2021). Chitosan nanoparticles: preparation, food applications and health benefits. *ScienceAsia*, 47(1), 1–10. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2021.020>

Sinha, R., Kim, G. J., Nie, S., & Shin, D. M. (2006). Nanotechnology in cancer therapeutics: Bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(8), 1909–1917. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0141>

Song, W., Su, X., Gregory, D. A., Li, W., Cai, Z., & Zhao, X. (2018). Magnetic alginate/chitosan nanoparticles for targeted delivery of curcumin into human

breast cancer cells. *Nanomaterials*, 8(11).
<https://doi.org/10.3390/nano8110907>

Srinivasarao, M., & Low, P. S. (2017). Ligand-Targeted Drug Delivery. *Chemical Reviews*, 117(19), 12133–12164.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00013>

Sulman, E. P., Ismaila, N., & Chang, S. M. (2017, February 1). Radiation therapy for glioblastoma: American society of clinical oncology clinical practice guideline endorsement of the American society for radiation oncology guideline. *Journal of Oncology Practice*, Vol. 13, pp. 123–127. American Society of Clinical Oncology. <https://doi.org/10.1200/JOP.2016.018937>

Sun, J. G., Nie, P., Herdewijn, P., & Li, X. J. (2024). Exploring the synthetic approaches and clinical prowess of established macrocyclic pharmaceuticals. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 264(October 2023), 116051.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.116051>

Thackery, E. (2002). *The GALE Cancer* (Vol. 1, 2).

Thomas, E. S., Gomez, H. L., Li, R. K., Chung, H. C., Fein, L. E., Chan, V. F., ... Roché, H. H. (2007). Ixabepilone plus capecitabine for metastatic breast cancer progressing after anthracycline and taxane treatment. *Journal of Clinical Oncology*, 25(33), 5210–5217.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2007.12.6557>

Tønnesen, H. H., & Karlsen, J. (2002). Alginate in drug delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(6), 621–630.
<https://doi.org/10.1081/DDC-120003853>

Trivedi, M., Budihardjo, I., Loureiro, K., Reid, T. R., & Ma, J. D. (2008). Epothilones: A novel class of microtubule-stabilizing drugs for the treatment of cancer. *Future Oncology*, 4(4), 483–500.
<https://doi.org/10.2217/14796694.4.4.483>

- Tüylek, Z. (2019). Arşiv Kaynak Tarama Dergisi Archives Medical Review Journal İlaç Taşıyıcı Nanosistemler Drug Delivery Nanosystems. *Archives Medical Review Journal*, 28(2), 184–192. <https://doi.org/10.17827/aktd.425917>
- Tymon-Rosario, J., Adjei, N. N., Roque, D. M., & Santin, A. D. (2021). Microtubule-interfering drugs: Current and future roles in epithelial ovarian cancer treatment. *Cancers*, 13(24), 1–20. <https://doi.org/10.3390/cancers13246239>
- Ulery, B. D., Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2011). Biomedical applications of biodegradable polymers. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, 49(12), 832–864. <https://doi.org/10.1002/polb.22259>
- Veselov, V. V., Nosyrev, A. E., Jicsinszky, L., Alyautdin, R. N., & Cravotto, G. (2022). Targeted Delivery Methods for Anticancer Drugs. *Cancers*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/cancers14030622>
- Wang, Y., Sun, X., & Meng, F. (2016). On the conditional and partial trade credit policy with capital constraints: A Stackelberg model. *Applied Mathematical Modelling*, 40(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.apm.2015.04.036>
- Yang, J., Woong Chung, T., Nagaoka, M., Goto, M., Cho, C. S., & Akaike, T. (2001). Hepatocyte-specific porous polymer-scaffolds of alginate/galactosylated chitosan sponge for liver-tissue engineering. *Biotechnology Letters*, 23(17), 1385–1389. <https://doi.org/10.1023/A:1011600414225>
- Yang, S. J., Lin, F. H., Tsai, K. C., Wei, M. F., Tsai, H. M., Wong, J. M., & Shieh, M. J. (2010). Folic acid-conjugated chitosan nanoparticles enhanced protoporphyrin IX accumulation in colorectal cancer cells. *Bioconjugate Chemistry*, 21(4), 679–689. <https://doi.org/10.1021/bc9004798>
- Yildirim, Z., Oncul, N., & Yıldırım, M. (2016). *KİTOSAN Antimikrobiya Özellikleri (Chitosan and Antimicrobial Properties)*. 5(1), 19–36.

Yokoyama, M. (2005). Drug targeting with nano-sized carrier systems. *Journal of Artificial Organs*, 8(2), 77–84. <https://doi.org/10.1007/s10047-005-0285-0>

中山貴寛, & 野口眞三郎. (2010). Breast cancer chemosensitivity. In 最新医学 (Vol. 65).

TEZ İLE İLGİLİ YAPILAN BİLDİRİ VE PROJE

1. Preparation and Characterization of Folic Acid-Bound Biopolymer Nanoparticles, Ayça MEHMETOĞLU AL^a, İskender İNCE^{b,c}, Yeliz YILDIRIM^{c,d}, Poster presentation, 12. Drug Chemistry Conference, 2024.
2. Folik Asit ile Modifiye Polimerik Nanoyapılı Blendlerin Meme Kanseri Üzerinde In-vivo Etkinliğinin Belirlenmesi, TÜBİTAK 1002-B Projesi, Proje No: 124S427, (Proje Yürütücüsü).
3. İksabepilon Yüklü Folik asit bağlı aljinat kitosan nanopartikül blendlerinin sentezi karakterizasyonu ve invitro etkinliğinin belirlenmesi, Ege Üniversitesi, ÖNAP projesi, Proje No: 23821, (Doktora Öğrencisi).

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmalarımın yürütülmesi sırasında bilgilerini ve deneyimlerini esirgemeyen ve her daim beni cesaretlendiren, desteğini her zaman ve her konuda hissettiğim, başarımlarım konusunda beni yüreklendiren tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM'a,

Tez çalışmam sırasında her zaman ve her konuda desteğini gördüğüm, çalışmalarla ilgili olarak deneyimlerini benimle paylaşan ve yönlendiren ikinci danışman hocam Sayın İskender İNCE'ye,

Tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Erdem GÖKER'e,

Tez çalışmamın radyoışaretleme kısmıyla ilgili olarak tüm bilgi birikimini ve deneyimlerini esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Faziler Zümrüt BİBER MÜFTÜLER'e,

İn-vitro hücre kültürü çalışmalarımın süreci boyunca deneyimlerini ve katkılarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Erkan KAHRAMAN'a,

Pataloji çalışmalarımda tezime yaptığı değerli yönlendirme ve katkılarından dolayı Prof. Dr. Necmettin ÖZDEMİR'e,

Tezimin yazım ve biçimsel düzenlemelerle ilgili olarak yardımlarını benden esirgemeyen Sayın Dr. Ecz. Mehmet Ali Ege ve Sayın Tanju TOP'a,

Doktora çalışmalarım sırasında bana olan desteği, problemlerime her daim çözüm üreten ve sonsuz yardımlarıyla yanımda olan Araş. Gör. Özge VARDAR'a, her konuda desteğiyle yanımda olan Yük. Kim. Seçil ÇAVUŞOĞLU'na,

Tecrübelerinden her zaman yararlandığım ve her anlamda yanımda olan Dr. Öğr. Üyesi Gülbeyaz YILDIZ TÜRKYILMAZ'a, tez çalışmalarım sırasında tüm

problemlerime çözüm üreten ve desteklerini esirgemeyen Dr. Ecz. Tuğçe ANAKÖK'e, Dr. Kim. Mine DİRİL'e, Yük. Kim. Tuğba KESKİN'e, tez çalışmamın radyoişaretleme çalışmalarımın yürütülmesinde bana olan desteği ve sonsuz yardımlarıyla her zaman yanımda olan Dr. Kim. Buşra KARATAY'a ve laboratuvar çalışmalarımın ilerlemesini kolaylaştıran Duygu Tuğçe BARAN ile Rumesya ÇELİK'e,

Hayatımın her anında bana olan destekleri ile yanımda olan dostlarım Merve ÇELİK ve Candan VAROL HİNİZ'a,

Tüm zorlukları benimle göğüsleyen, hayatımın her evresinde bana destek olan ve her daim ne kadar şanslı olduğumu hissettiren değerli eşim İnanç AL'a,

Hayatım boyunca hep destekteklerini hissettiren ve fedakarlıklarını hiçbir zaman esirgemeyen en büyük şansım annem Fatma MEHMETOĞLU ve babam Ayhan MEHMETOĞLU'ya yardımları için en içten teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

11.09.2024

Ayça MEHMETOĞLU AL

ÖZGEÇMİŞ

2009 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde lisans eğitimime başladım ve 2014 yılının haziran ayında mezun oldum. 2015 yılının bahar döneminde Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. 2018 yılının haziran ayında yüksek lisans eğitimimi tamamlayarak, aynı yıl eylül ayında Ege Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım. 2017 yılının haziran ayından itibaren 5180004 no'lu Tübitak 1505 Üniversite-Sanayi iş birliği proje kapsamında Sedef İlaç ve Medikal Ürünleri Ltd. Şti.'de çalışmaya başladım.