

**DAİDZEİN-YÜKLÜ NANOPARTİKÜLER
SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI VE *İN VİTRO*
OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzm. Ecz. Rukiye SEVİNÇ ÖZAKAR

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Meltem ÇETİN

Doktora Tezi – 2015

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DAİDZEİN-YÜKLÜ NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİN
HAZIRLANMASI VE *İN VİTRO* OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzm. Ecz. Rukiye SEVİNÇ ÖZAKAR

**Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Meltem ÇETİN**

**ERZURUM
2015**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**DAİDZEİN-YÜKLÜ NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİN
HAZIRLANMASI VE *İN VİTRO* OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzm. Ecz. Rukiye SEVİNÇ ÖZAKAR

Tez Savunma Tarihi : 17.12.2015

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Meltem ÇETİN (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Selma ŞAHİN (Hacettepe Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. İmran VURAL (Hacettepe Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Abdülkadir ÖZER (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ayşe Vildan BEŞE (Atatürk Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM
Enstitü Müdürü

**Doktora Tezi
ERZURUM – 2015**

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	V
ÖZET.....	VI
ABSTRACT.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
TABLolar DİZİNİ.....	XVI
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	3
2.2. Nanopartiküllerin Üstünlükleri ve Sakıncaları	5
2.3. Nanopartikül Hazırlamada Kullanılan Polimerler.....	6
2.3.1. Biyoparçalanamayan Polimerler.....	8
2.3.2. Biyoparçalanabilen Polimerler.....	8
2.3.2.1. PLGA.....	8
2.4. Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri.....	11
2.4.1. Emülsiyon Oluşturma-Çözücü Buharlaştırma Yöntemi.....	11
2.4.2. Nanopresipitasyon Yöntemi.....	12
2.4.3. Emülsiyon Oluşturma-Çözücü Difüzyonu Yöntemi.....	12
2.5. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler İçin Kullanılan Sterilizasyon Yöntemleri.....	13
2.6. Gelucire® 44/14.....	14
2.7. Flavonoidler.....	15
2.7.1. Daidzein.....	16
2.7.1.1. Daidzeinin Fizikokimyasal Özellikleri.....	16

2.7.1.2. Daidzein İçin Miktar Tayini Yöntemleri.....	18
2.7.1.3. Daidzeinin Farmakokinetik Özellikleri.....	18
2.7.1.4. Daidzeinin Farmakodinamik Özellikleri.....	21
2.7.1.5. Daidzein İçeren İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	23
2.7.1.6. Daidzein İçeren Ticari Ürünler.....	24
2.7.1.7. Daidzeinin Stabilitesi.....	24
2.8. Glioblastoma Multiforme.....	28
2.9. Hücre Kültürü.....	30
2.10. Sitotoksosite Çalışması ve MTT Tayini.....	31
2.11. U-87 MG (ATCC® HTB-14™) Hücre Hattı.....	32
3. MATERYAL VE METOT.....	34
3.1. Materyal.....	34
3.2. Metot.....	36
3.2.1. Daidzeinin UV-VIS Spektrofotometre ile Miktar Tayini.....	36
3.2.2. Daidzeine Ait Kalibrasyon Doğrusunun Elde Edilmesi.....	36
3.2.3. Daidzein için Geliştirilen Analitik Yöntemin Validasyonu.....	36
3.2.4. Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanması.....	39
3.2.4.1. PLGA (75:25) Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin M-EO-ÇD Yöntemi Kullanılarak Hazırlanması.....	40
3.2.4.2. PLGA (75:25)-Gelucire® 44/14 Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin M-EO-ÇD Yöntemi Kullanılarak Hazırlanması.....	41
3.2.4.3. PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin EO-ÇD Yöntemi Kullanılarak Hazırlanması.....	41
3.2.4.4. PLGA (75:25)-Gelucire® 44/14 ve PLGA (50:50)-Gelucire® 44/14 Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin EO-ÇD Yöntemi Kullanılarak	

Hazırlanması.....	42
3.2.5. Hazırlanan Nanopartiküler Sistemlerin Karakterizasyonu.....	46
3.2.5.1. Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi.....	46
3.2.5.2. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel (ZP) Ölçümü.....	46
3.2.5.3. Hazırlama Verimi.....	46
3.2.5.4. Enkapsülasyon Etkinliği ve Yükleme Kapasitesinin (YK)	
Saptanması.....	47
3.2.5.5. <i>İn Vitro</i> Salım Çalışması.....	47
3.2.5.6. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi.....	48
3.2.5.7. Fourier Dönüşümlü-Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi Analizi.....	48
3.2.6. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	49
3.2.6.1. Nörotoksisite Testi.....	49
3.2.6.2. Sitotoksisite Testi.....	51
3.2.7. İstatistiksel Analiz.....	53
4. BULGULAR.....	54
4.1. Daidzeinin UV-VIS Spektrofotometre ile Miktar Tayini.....	54
4.2. Daidzeine Ait Kalibrasyon Doğrusunun Elde Edilmesi.....	54
4.3. Daidzein İçin Geliştirilen Analitik Yöntemin Validasyonu.....	55
4.4. Hazırlanan Nanopartiküler Sistemlerin Karakterizasyonu.....	56
4.4.1. Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi.....	56
4.4.2. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümü.....	59
4.4.3. Hazırlama Verimi, Enkapsülasyon Etkinliği ve Yükleme Kapasitesinin	
Saptanması.....	60
4.4.4. <i>İn Vitro</i> Salım Çalışması.....	61
4.3.5. DSC Analizi.....	63

4.3.6. FT-IR Analizi.....	75
4.4. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	86
4.4.1. Nöron Hücreleri Kullanılarak Gerçekleştirilen MTT Test Sonuçları.....	86
4.4.2. U-87 MG Hücreleri Kullanılarak Gerçekleştirilen MTT Test Sonuçları....	87
5. TARTIŞMA.....	90
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	114
KAYNAKLAR.....	115
EKLER.....	141
EK-1. ÖZGEÇMİŞ.....	141
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU.....	142

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, hem değerli bilgi, tecrübe ve katkılarından hem de bizlere sunmuş olduğu laboratuvar imkânlarından dolayı Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı saygıdeğer danışman hocam Sayın Doç. Dr. Meltem ÇETİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım kapsamında zeta potansiyel ve partikül boyutu ölçümlerini almamızda bize imkân sağlayan Sayın Prof. Dr. Süeda HEKİMOĞLU'na ve Sayın Prof. Dr. İmran VURAL'a (Hacettepe Üniversitesi, Ankara), hücre kültürü çalışmaları boyunca yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'na ve Sayın Ali TAGHİZADEHGHAEHJOUGHİ'ne (Atatürk Üniversitesi, Erzurum), DSC termogramlarının alınmasındaki yardımları ve yakın ilgileri için Sayın Prof. Dr. M. Şahin GÜLABOĞLU'na ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Hatice BAYRAKÇEKEN'e (Atatürk Üniversitesi, Erzurum) ve FT-IR spektrumlarının alınmasında emeği geçen Sayın Yrd. Doç. Dr. Hatice BAYRAKÇEKEN'e (Atatürk Üniversitesi, Erzurum), cihaz desteğini benden esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Mine GÜLABOĞLU'na (Atatürk Üniversitesi, Erzurum), lisans ve lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım tüm hocalarıma, benden manevi desteklerini esirgemeyen tüm iş arkadaşlarıma, çalışmalarım sırasındaki desteklerinden dolayı aileme, eşimin ailesine, eşim Arş. Gör. Emrah ÖZAKAR'a, oğlum Halil Mete ÖZAKAR'a ve bu tez çalışması kapsamında yer alan PLGA (75:25) ve PLGA (75:25)-Gelucire® 44/14 nanopartiküllerinin hazırlanması, *in vitro* karakterizasyonu ve kanser hücreleri üzerinde yapılan sitotoksikite çalışmalarını SBAG 1002-115S085 proje numarası ile destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Uzm. Ecz. Rukiye SEVİNÇ ÖZAKAR

ÖZET

Daidzein-Yüklü Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanması ve *İn Vitro* Olarak Değerlendirilmesi

Amaç: Bu çalışmanın amacı, malign beyin tümörlerinin tedavisine yönelik daidzein-yüklü PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartiküllerini hazırlamak ve *in vitro* karakterizasyon çalışmalarını (morfolojik inceleme, partikül boyutu, ZP, % EE, salım çalışmaları, nörotoksisitenin ve sitotoksisitenin değerlendirilmesi) gerçekleştirmektir.

Materyal ve Metot: Klasik ve modifiye edilmiş emülsiyon oluşturma-çözücü difüzyonu yöntemleri kullanılarak PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartikül formülasyonları hazırlanmıştır. UV-VIS spektrofotometrik yöntemle daidzein miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin yüzey morfolojisi, partikül boyutu, ZP, % EE ve *in vitro* salım özellikleri (PB, pH 7.4) incelenmiştir. Ayrıca, FT-IR ve DSC de bu sistemleri karakterize etmek için kullanılmıştır. Uygun özelliklere sahip nanopartiküllerin nöronlar üzerindeki nörotoksisiteleri ve U-87 MG hücre hattına karşı sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir.

Bulgular: Hazırlanan tüm nanopartiküllerin ortalama partikül boyutu ve ZP değerleri sırasıyla 198.52 ± 7.04 - 672.78 ± 70.95 nm ($p \geq 0.05$) ve -14.70 ± 0.36 - -0.50 ± 0.34 mV ($p \geq 0.05$) aralığında saptanmıştır. SEM görüntülerinden nanopartiküllerin yaklaşık olarak küresel oldukları saptanmıştır. Hazırlanan nanopartiküllerin % EE değerleri sırasıyla, % 35.79 ± 3.43 - 84.85 ± 2.20 ($p \geq 0.05$)'dir. Daidzein-yüklü nanopartikül formülasyonları için % 100 kümülatif daidzein salımı, salımların 19.-37. günlerinde gerçekleşmiştir. Hazırlanan nanopartiküler sistemlerin daidzeinin nörotoksik etkilerini azalttığı ve daidzeine benzer sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır ($p > 0.05$).

Sonuç: Daidzeinin sürekli salımı, yüksek dozlarda (200 μ M ve 300 μ M) daidzeinin nörotoksik etkilerinin azaltılması ve kanser hücrelerine karşı da sitotoksik etkisinin korunması açısından hazırlanan nanopartiküllerin faydalı sistemler olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Daidzein, Gelucire® 44/14, nörotoksisite, PLGA, sitotoksisite, U-87 MG.

ABSTRACT

Preparation and *In Vitro* Evaluation of Daidzein-Loaded Nanoparticulate Systems

Aim: The aim of this study was to prepare daidzein-loaded PLGA and PLGA-Gelucire® 44/14 nanoparticles for treatment of malignant brain tumors and investigate their *in vitro* characteristics (morphology, particle size, ZP, EE %, release studies, the evaluation of neurotoxicity and cytotoxicity).

Material and Method: The PLGA and PLGA-Gelucire® 44/14 nanoparticles were prepared by using non-modified and modified emulsion-solvent diffusion method. The amount assay of daidzein was carried out using UV-VIS spectrophotometric method. The surface morphology, particle size, ZP, EE % and *in vitro* release characteristics (in PB, pH 7.4) of nanoparticles were investigated. Furthermore, FT-IR, DSC and SEM were used to characterize these systems. The neurotoxicity on neurons and cytotoxicity against U-87 MG cell line of the chosen nanoparticle formulations in terms of appropriate *in vitro* characteristics were evaluated.

Results: The mean particle size and ZP values of all prepared nanoparticles were range of 198.52 ± 7.04 - 672.78 ± 70.95 nm ($p \geq 0.05$) and -14.70 ± 0.36 - -0.50 ± 0.34 mV ($p \geq 0.05$), respectively. SEM images of nanoparticles revealed their approximately spherical shape. The EE % values of nanoparticles were range of % 35.79 ± 3.43 - 84.85 ± 2.20 ($p \geq 0.05$). The cumulative daidzein release from daidzein-loaded nanoparticle formulations were up to about 100 % at 19-37 days of release. It was found that the prepared nanoparticulate systems reduced the neurotoxic effects of daidzein and showed similar cytotoxic effects to those of daidzein ($p > 0.05$).

Conclusion: The prepared nanoparticles are useful systems for sustained release of daidzein, reduction of the neurotoxic effects of daidzein at high doses (200 μ M and 300 μ M) and maintaining of its cytotoxic activity against cancer cells.

Key Words: Cytotoxicity, daidzein, Gelucire® 44/14, neurotoxicity, PLGA, U-87 MG.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACE	: Aseton
ATCC	: American Type Culture Collection
BSS	: Bağlı Standart Sapma
CF	: Kloroform
CS	: Kitosan
DCM	: Diklorometan
DMAB	: Didodesildimetil Amonyum Bromür
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EA	: Etil Asetat
EE	: Enkapsülasyon Etkinliği
EMA	: Avrupa İlaç Ajansı
EO-ÇD	: Emülsiyon Oluşturma-Çözücü Difüzyonu
FBS	: Fetal Sığır Serum
FDA	: Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü-Kızılötesi
G	: Gauge
G3 PAMAM	: 3. Nesil Poliamido Amin
G4 PPI	: 4. Nesil Polipropilen İmin
GBM	: Glioblastoma Multiforme
GA	: Glikolik Asit
GRAS	: Genel Olarak Güvenilir

HBSS	: Hanks' Balanced Salt Solution
HFI	: Hekzafloroizopropanol
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
KBB	: Kan-Beyin Bariyeri
LA	: Laktik Asit
LDH	: Laktat Dehidrojenaz
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
LOD	: Saptama Sınırı
LOQ	: Miktar Tayini Sınırı
M-EO-ÇD	: Modifiye Edilmiş Emülsiyon Oluşturma-Çözücü Difüzyonu
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difenil-2H-Tetrazolyum Bromür
mV	: Milivolt
NBM	: Nörobazal Ortam
NP	: Nanopartikül
OD	: Optik Dansite
PB	: Fosfat Tamponu
PBS	: Fosfatla Tamponlanmış Tuz Çözeltisi
PEG	: Polietilen Glikol
PGA	: Poli(Glikolik Asit)
PLA	: Poli(Laktik Asit)
PLGA	: Poli(Laktik-ko-Glikolik Asit)
PVA	: Polivinil Alkol
R²	: Belirlilik Katsayısı
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu

SLN	: Katı Lipid Nanopartikül
SMEDDS	: Kendiliğinden Mikro-Emülsifiye Olabilen Sistemler
SS	: Standart Sapma
TRAIL	: Tümör Nekroz Faktör-İlişkili Apoptozisi İndükleyici Ligand
T_g	: Camsı Geçiş Sıcaklığı
THF	: Tetrahidrofuran
T_m	: Erime Derecesi
YK	: Yükleme Kapasitesi
λ_{maks}	: Maksimum Dalga Boyu
ZP	: Zeta Potansiyel

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>		<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1.	PGA, PLA ve PLGA'nın kimyasal yapısı.....	9
Şekil 2.2.	Gelucire® 44/14'ün bileşimi.....	14
Şekil 2.3.	Daidzeinin kimyasal yapısı.....	17
Şekil 2.4.	MTT'nin formazana dönüşümü.....	32
Şekil 3.1.	% BH hesaplanmasında kullanılan eşitlik.....	38
Şekil 3.2.	Varyasyon katsayısının hesaplanmasında kullanılan eşitlik.....	38
Şekil 3.3.	LOD hesaplanmasında kullanılan eşitlik.....	39
Şekil 3.4.	LOQ hesaplanmasında kullanılan eşitlik.....	39
Şekil 3.5.	Nanopartiküllerin M-EO-ÇD yöntemi ile hazırlanmasının şematik gösterimi.....	44
Şekil 3.6.	Nanopartiküllerin EO-ÇD yöntemi ile hazırlanmasının şematik gösterimi.....	45
Şekil 3.7.	Hazırlama veriminin hesaplanmasında kullanılan eşitlikler.....	46
Şekil 3.8.	Nöron hücrelerine ait mikroskopik görüntü.....	50
Şekil 3.9.	% Hücre canlılığının hesaplanmasında kullanılan eşitlik.....	50
Şekil 3.10.	U-87 MG hücre hattına ait mikroskopik görüntü.....	52
Şekil 4.1.	Daidzeine ait kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi.....	54
Şekil 4.2.	F2-D kodlu nanopartiküllere ait SEM görüntüsü.....	56
Şekil 4.3.	F4-DG kodlu nanopartiküllere ait SEM görüntüsü.....	57
Şekil 4.4.	F6-D kodlu nanopartiküllere ait SEM görüntüsü.....	57
Şekil 4.5.	F8-DG kodlu nanopartiküllere ait SEM görüntüsü.....	58
Şekil 4.6.	F10-D kodlu nanopartiküllere ait SEM görüntüsü.....	58
Şekil 4.7.	F12-DG kodlu nanopartiküle ait SEM görüntüsü.....	59

Şekil 4.8.	Daidzein-yüklü PLGA nanopartiküllerine ait salım grafikleri.....	62
Şekil 4.9.	Daidzein-yüklü PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartiküllerine ait salım grafikleri.....	62
Şekil 4.10.	Daidzein-yüklü PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartiküllerine ait salım grafikleri.....	63
Şekil 4.11.	Daidzeine ait DSC termogramı.....	64
Şekil 4.12.	PLGA (75:25) kopolimerine ait DSC termogramı.....	64
Şekil 4.13.	PLGA (50:50) kopolimerine ait DSC termogramı.....	65
Şekil 4.14.	Gelucire® 44/14'e ait DSC termogramı.....	65
Şekil 4.15.	PLGA (75:25)-daidzein fiziksel karışımına ait DSC termogramı..	66
Şekil 4.16.	PLGA (50:50)-daidzein fiziksel karışımına ait DSC termogramı..	66
Şekil 4.17.	PLGA (75:25)-Gelucire® 44/14-daidzein fiziksel karışımına ait DSC termogramı.....	67
Şekil 4.18.	PLGA (50:50)-Gelucire® 44/14-daidzein fiziksel karışımına ait DSC termogramı.....	67
Şekil 4.19.	F1-B formülasyonuna ait DSC termogramı.....	68
Şekil 4.20.	F2-D formülasyonuna ait DSC termogramı.....	68
Şekil 4.21.	F3-BG formülasyonuna ait DSC termogramı.....	69
Şekil 4.22.	F4-DG formülasyonuna ait DSC termogramı.....	69
Şekil 4.23.	F5-B formülasyonuna ait DSC termogramı.....	70
Şekil 4.24.	F6-D formülasyonuna ait DSC termogramı.....	70
Şekil 4.25.	F7-BG formülasyonuna ait DSC termogramı.....	71
Şekil 4.26.	F8-DG formülasyonuna ait DSC termogramı.....	71
Şekil 4.27.	F9-B formülasyonuna ait DSC termogramı.....	72
Şekil 4.28.	F10-D formülasyonuna ait DSC termogramı.....	72

Şekil 4.29.	F11-BG formülasyonuna ait DSC termogramı.....	73
Şekil 4.30.	F12-DG formülasyonuna ait DSC termogramı.....	73
Şekil 4.31.	Daidzeine (11), PLGA (75:25) kopolimerine (12), Gelucire® 44/14'e (14), PLGA (75:25)-daidzein fiziksel karışımına (15), PLGA (75:25)-Gelucire® 44/14-daidzein fiziksel karışımına (17), F1-B (1), F2-D (2), F3-BG (3) ve F4-DG (4) formülasyonlarına ait DSC termogramları.....	74
Şekil 4.32.	Daidzeine (11), PLGA (75:25) kopolimerine (12), Gelucire® 44/14'e (14), PLGA (75:25)-daidzein fiziksel karışımına (15), PLGA (75:25)-Gelucire® 44/14-daidzein fiziksel karışımına (17), F5-B (5), F6-D (6), F7-BG (7) ve F8-DG (8) formülasyonlarına ait DSC termogramları.....	74
Şekil 4.33.	PLGA (50:50) kopolimerine (13), Gelucire® 44/14'e (14), PLGA (50:50)-daidzein fiziksel karışımına (16), PLGA (50:50)-Gelucire® 44/14-daidzein fiziksel karışımına (18), F9-B (19), F10-D (9), F11-BG (20) ve F12-DG (10) formülasyonlarına ait DSC termogramları.....	75
Şekil 4.34.	Daidzeine ait FT-IR spektrumu.....	76
Şekil 4.35.	PLGA (75:25) kopolimerine ait FT-IR spektrumu.....	76
Şekil 4.36.	PLGA (50:50) kopolimerine ait FT-IR spektrumu.....	77
Şekil 4.37.	Gelucire® 44/14'e ait FT-IR spektrumu.....	77
Şekil 4.38.	PLGA (75:25)-daidzein fiziksel karışımına ait FT-IR spektrumu.	78
Şekil 4.39.	PLGA (50:50)-daidzein fiziksel karışımına ait FT-IR spektrumu.	78
Şekil 4.40.	PLGA (75:25)-Gelucire® 44/14-daidzein fiziksel karışımına ait FT-IR spektrumu.....	79

Şekil 4.41.	PLGA (50:50)-Gelucire® 44/14-daidzein fiziksel karışımına ait FT-IR spektrumu.....	79
Şekil 4.42.	F1-B formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.....	80
Şekil 4.43.	F2-D formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.....	80
Şekil 4.44.	F3-BG formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.....	81
Şekil 4.45.	F4-DG formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.....	81
Şekil 4.46.	F5-B formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.....	82
Şekil 4.47.	F6-D formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.....	82
Şekil 4.48.	F7-BG formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.....	83
Şekil 4.49.	F8-DG formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.....	83
Şekil 4.50.	F9-B formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.....	84
Şekil 4.51.	F10-D formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.....	84
Şekil 4.52.	F11-BG formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.....	85
Şekil 4.53.	F12-DG formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.....	85
Şekil 4.54.	Daidzein, PLGA (75:25) ve PLGA (75:25)-Gelucire® 44/14 nanopartikül formülasyonlarının nöron hücreleri üzerindeki nörotoksik etkileri.....	86
Şekil 4.55.	Daidzein, PLGA (50:50) ve PLGA (50:50)-Gelucire® 44/14 nanopartikül formülasyonlarının nöron hücreleri üzerindeki nörotoksik etkileri.....	87
Şekil 4.56.	Daidzein, PLGA (75:25) ve PLGA (75:25)-Gelucire® 44/14 nanopartikül formülasyonlarının U-87 MG hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri.....	88
Şekil 4.57.	Daidzein, PLGA (50:50) ve PLGA (50:50)-Gelucire® 44/14 nanopartikül formülasyonlarının U-87 MG hücreleri üzerindeki	

sitotoksik etkileri.....	88
Şekil 4.58. Nöron ve U-87 MG hücreleri üzerindeki nörotoksisite ve	
sitotoksisite testlerine ait tüm veriler.....	89

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan polimerler.....	7
Tablo 2.2. Farklı PLA:PGA oranına göre elde edilen PLGA'ların fiziksel özellikleri.....	10
Tablo 2.3. Gelucire® 44/14 yapısındaki yağ asitlerinin dağılımı.....	15
Tablo 2.4. Daidzein içeren ticari preparatlar.....	25
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.....	34
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	35
Tablo 3.3. Hazırlanan PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartikül formülasyonları.....	43
Tablo 3.4. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan gruplar.....	51
Tablo 4.1. Analitik yöntemle ait gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri.....	55
Tablo 4.2. Hazırlanan PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartiküllerine ait ortalama partikül boyutu ve ZP verileri.....	60
Tablo 4.3. Hazırlanan PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartiküllerine ait % hazırlama verimi, % EE ve % YK verileri	61

1. GİRİŞ

Daidzein başlıca *Leguminosae* familyası bitkilerinden elde edilen, suda çözünmeyen, polifenolik yapıda fitoöstrojenik bir izoflavondur ve östrojen reseptörlerine bağlanmaktadır. Bundan dolayı, hormon eksikliğine bağlı hastalıklar üzerindeki etkileri açısından gittikçe önemi artan daidzeinin ayrıca; antienflamatuar, antioksidan, enzim inhibitörü özellikleri de vardır ve düşük dansiteli lipoprotein (LDL) düzeyinde ise düşüşe neden olmaktadır. Daidzeinle ilgili yapılan çalışmalar, insan sağlığı açısından bu maddenin çok çeşitli faydalarının olduğunu ortaya koymaktadır. Bunlar arasında, kardiyovasküler hastalıkların ve kanserin önlenmesi/tedavisi, östrojen takviyesi/tedavisi için bir alternatif olması, osteoporozun (menopoz sonrası kemik kaybı olan kadınlarda) önlenmesi/tedavisi ve diyabetin önlenmesi sayılabilir. Prostat kanseri, rahim ağzı kanseri, beyin kanseri, meme kanseri ve kolon kanseri hücreleri üzerinde daidzeinle ilgili çalışmalar yapılmış ve antikanserojen etkili olduğu gösterilmiştir. Daidzein, hücre döngüsü ilerlemesini kontrol eden genlerin modülasyonu yoluyla kanser hücrelerinin büyümesini inhibe etmektedir. Daidzein, genellikle oral yolla kullanılmaktadır. Daidzein süspansiyonunun sıçanlara oral olarak uygulanması sonrası mutlak biyoyararlanımının % 6.1 olduğu saptanmıştır. Daidzeninin düşük çözünürlüğü ve düşük partiyon katsayısı gibi fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra bağırsak ve karaciğerde uğradığı yoğun metabolizasyon da düşük oral biyoyararlanımına neden olmaktadır. Bu nedenle, daidzein için ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi amacıyla yoğun bir şekilde çalışmalar yapılmaktadır.

GLOBOCAN 2012 [Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yayınlanır] verilerine göre, beyin ve merkezi sinir sistemi kanserlerine sahip 256000 (% 1.8) yeni vaka tespit edilmiş ve 186000 (% 2.3) ölüm vakasının gerçekleştiği saptanmıştır. En yüksek insidans ve mortalite hızları gelişmiş

bölgelerde (Avustralya, Yeni Zelanda, Avrupa, Kuzey Amerika), en düşük insidans ve mortalite hızları ise Afrika ve Pasifikte elde edilmiştir. Klinikte, beyin tümörlerinin tedavisine yönelik olarak cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi uygulamaları mevcut olmasına rağmen, beyin tümörleri hızlı gelişimi ve kötü prognozu nedeniyle hala aşılması gereken önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Glioma en sık görülen beyin tümörüdür (tüm primer beyin ve merkezi sinir sistemi tümörlerinin % 29'unu oluşturur) ve bu durumda, tedavi olmayan hastalar 3 aydan daha az yaşarken, kombinasyon halinde tedavi alan hastalar için ise ortalama yaşam süresi 20 aydan azdır.

Nanopartiküllerin partikül boyutu ve yüzey özelliklerinin kontrol edilmesi (pasif hedeflendirme) veya özel tasarımıyla hedeflendirilebilmesi (aktif hedeflendirme) ve/veya etkin madde salım hızının/yerinin kontrol edilmesi sonucu istenen bölgede terapötik olarak optimum dozda ve hızda etkinliğin sağlanması, etkin maddenin parçalanmaya karşı korunması, toksisite veya yan etkilerinin azaltılması gibi çok sayıdaki üstünlükleri bu taşıyıcı sistemleri kanser teşhisinde/tedavisinde kullanılmak üzere popüler sistemler haline getirmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında, malign beyin tümörlerinin tedavisine yönelik olarak daidzein-yüklü PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması ve *in vitro* karakterizasyon çalışmalarının [yüzey morfolojisinin, partikül boyutunun, partikül boyutu dağılımının, % enkapsülasyon etkinliği (EE)'nin, fosfat tamponu (PB: phosphate buffer) pH 7.4 ortamında *in vitro* salım özelliklerinin, nöron hücre kültüründe nörotoksitesinin ve U-87 MG (Glioblastoma Multiforme; GBM) hücre hattında ise sitotoksitesinin incelenmesi] yapılması planlanarak gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İlaç Taşıyıcı Sistemler

Konvansiyonel ilaç tedavisi, stabilitesinden, aktivitesinden ve biyoyararlanımından emin olunarak hazırlanmış bir terapötik ajanın periyodik aralıklarla dozlanmasını içermektedir. Birçok etkin madde için konvansiyonel dozaj şekilleri oldukça etkindir. Ancak, konvansiyonel dozaj şekillerinin kullanımında etkin maddenin plazma konsantrasyonunu terapötik pencere aralığında tutmak için gün içinde birkaç kez dozlama yapılması gerekmektedir. Bu durum, istenmeyen yan etkilerin ortaya çıkmasına, hasta uyuncunun azalmasına ve tedavi etkinliğinin düşmesine neden olabilmektedir. Değiştirilmiş salım sistemleri aracılığıyla konvansiyonel ilaç tedavisinde görülen bu sınırlamaların üstesinden gelinebilmektedir. Bundan dolayı, özellikle biyoparçalanabilir polimerik ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ve uygulanması, Farmasötik Teknoloji alanında bilimsel ve ekonomik yarar açısından kabul gören alternatif yaklaşımlar olmuştur.¹

İlaç taşıyıcı sistemler, insanlar ve hayvanlar üzerinde terapötik etki oluşturmak amacıyla bir farmasötik bileşiğin salım hızını/yerini kontrol etmek, etkinliğini, stabilitesini artırmak gibi birçok nedenle geliştirilen sistemlerdir. İlaç taşıyıcı sistemler, 1960'lı yılların ortalarında bir grup araştırmacının tavşanların kan damarlarında kullandıkları bir silikon-kauçuk arterio-venöz fistül ile yaptıkları çalışma nedeniyle makrosistemler olarak ortaya çıkmıştır. Bu makrosistemler, daha sonra Lupron Depot® ismiyle ticarileşen mikropartiküllerle birlikte mikrosistemlere dönüşmüştür.² Yine 1960'lı yıllarda lipozomların ve 1970'li yılların sonuna doğru polimer-ilâç konjugatlarının ve nanoteknoloji kavramının ortaya çıkmasıyla nano-boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir (başlangıçta aşı ve antikanserojen ajanlar için).^{2, 3} Nanotaşıyıcılar, küçük boyutlarından dolayı etkin bir şekilde hücre içerisine alınmaları,⁴

hedeflemeye imkân vermeleri, yan etkileri azaltmaları ve daha uzun süre etkin madde salımı sağlamaları gibi üstünlüklere sahiptirler.² 1997 yılında Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi (FDA) tarafından onaylanan AmBisome®, ilk ticarileşen nano-boyutlu ilaç taşıyıcı sistem olmuş ve bu sistemlere olan ilgiyi artırmıştır.²

Nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistemler olarak tasarlanmasındaki temel hedef, partikül boyutu ve yüzey özelliklerinin kontrol edilmesi (pasif hedeflendirme) veya özel tasarımıyla hedeflendirilmesi (aktif hedeflendirme) ve/veya etkin madde salım hızının kontrol edilmesi sonucu istenen bölgede terapötik olarak optimum dozda ve hızda etkinliğin sağlanmasıdır.⁵ Etkin maddenin degradasyondan korunması, toksisite veya yan etkilerinin azaltılması ve hedeflendirilmeye imkân sağlamaları gibi üstünlüklerinden dolayı lipozomlar potansiyel taşıyıcılar olarak kullanılmalarına rağmen, düşük % EE ve saklama stabilitesi gibi problemler lipozomların etkin bir şekilde kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Buna karşılık, polimerik nanopartiküler sistemler ise faydalı kontrollü salım özellikleri ve artmış stabilite (kuru halde) gibi üstünlüklere sahiptirler.^{6,7}

Nanopartiküller, boyutları 10-1000 nm (genellikle 50-300 nm) arasında değişen, doğal/sentetik polimer veya katı yağ kullanılarak hazırlanan, özgün fizikokimyasal özelliklere sahip katı-kolloidal partiküllerdir.^{5, 8, 9} Etkin madde, nanopartiküler sistem içerisine hapsolabilir veya sistem yüzeyine tutunabilir. Nanopartiküller kullanılarak hidrofilik-hidrofobik etkin maddeler, aşılarda ve biyolojik makromoleküller taşınabilir.^{6, 10}

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, hazırlama yöntemine bağlı olarak “nanokapsül” veya “nanoküre/nanopartikül” şeklinde hazırlanabilmektedir. Çekirdek maddesinin çeper maddesi ile kaplanması sonucu oluşan nanokapsül yapısında, genellikle, etkin madde sulu veya yağlı çekirdek içerisinde olacak şekilde hazırlanmaktadır. Bu sistemler, rezervuar sistemler olarak da tanımlanmaktadır. Nanopartiküllerde ise, etkin madde polimerik matriks içerisinde çözünmüş veya disperse

edilmiş veya taşıyıcı sistem yüzeyine adsorbe haldedir.^{8, 11, 12} Ayrıca, alternatif olarak etkin madde yüzey üzerine kovalent olarak tutturulabilir.¹³

2.2. Nanopartiküllerin Üstünlükleri ve Sakıncaları

Üstünlükleri¹⁴⁻¹⁹

1. Nanopartiküllerin küçük partikül boyutu, onların küçük kapillerlerden (vücutta en küçük kapillerler 5-6 µm çapındadır, nanopartiküller agregat oluşturmayıp emboliye sebep olmazlar) geçerek penetrasyonunu ve hücrelere alınmasını sağlar, böylelikle hedef bölgede etkili ilaç birikiminin sağlanması,
2. Uygun formülasyonla, günler hatta haftalar boyunca süren periyotlarda hedef dokuda sürekli etkin madde salımına imkân sağlaması,
3. Tedavi etkinliğinin artırılması, istenmeyen yan etkilerin/toksisitenin azaltılması,
4. Nanopartikül halinde etkin madde stabilitesinin sağlanması,
5. Etkin madde oral biyoyararlanımının iyileştirilmesi/artırılması,
6. Yüksek taşıma kapasitesine sahip olması ve uygun tasarımla alana özgün hedeflendirme yapılabilmesi,
7. Hidrofobik ve hidrofilik etkin maddelerin nanopartiküllere hapsedilebilmesi,
8. Kan-beyin bariyerinin (KBB) aşılabilmesi için uygun nanopartiküler sistemlerin hazırlanabilmesi,
9. Farklı yollarla (oral, pulmoner, parenteral, nazal vb.) uygulanabilmesi,
10. Nanopartiküllerin farklı yöntemlerle sterilize edilebilmesi,
11. Üretim tekniklerinin genellikle basit ve kolay olmasıdır.

Nanopartiküllerin yararlarının yanı sıra, bazı sakıncaları da bulunmaktadır.

Nanopartiküllerin, sahip oldukları oldukça küçük boyutları ve geniş yüzey alanı partiküller arası agregasyona neden olabilmekte, bu da nanopartiküllerin dispersiyonları

halinde saklanması zorlaştırmaktadır. Ayrıca, küçük boyut ile geniş yüzey alanı, düşük etkin madde yüklenmesine ve etkin madde salımında ani patlama etkisine “burst release, ani salım, patlama etkisi” yol açabilmektedir.⁷

2.3. Nanopartikül Hazırlamada Kullanılan Polimerler

Polimer biliminin gelişmesi, modern ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması ve geliştirilmesinde çok önemli bir basamaktır. Bu gelişmeler polimerlere yeni ve faydalı özellikler kazandırmaktadır, böylelikle geliştirilen polimerler, etkin maddelerin sürekli salımı için mekanik destek olarak, etkin maddelerin çözünürlüğünü artırıcı veya stabilize edici olarak kullanılabilirler.²⁰ Nanopartikül hazırlamada kullanılacak olan ideal bir polimerin aşağıdaki özellikleri taşıması beklenmektedir. Bunlar:²¹

- ✓ Sentezi ve karakterizasyonu kolay olmalı,
- ✓ Biyouyumlu olmalı,
- ✓ Biyoparçalanabilir olmalı,
- ✓ Non-immünojenik olmalı,
- ✓ Non-toksik olmalı,
- ✓ Ucuz olmalıdır.

Polimerleri doğal ve sentetik veya biyoparçalanamayan ve biyoparçalanabilen polimerler şeklinde sınıflandırabiliriz (Tablo 2.1).²²

Tablo 2.1. İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan polimerler.²²

Sınıflandırma	Polimerler
Doğal Polimerler	
Protein Kaynaklı Polimerler	Kolajen, albümin, jelatin
Polisakkaritler	Agar, aljinat, karragenan, hiyaluronik asit, dekstran, kitosan (CS), siklodekstrin
Sentetik Polimerler	
Biyoparçalanamayan Polimerler	
Selüloz Türevleri	Karboksimetil selüloz, etil selüloz, selüloz asetat, selüloz asetat propiyonat, hidroksipropil metil selüloz
Silikonlar	Polidimetilsiloksanlar, kolloidal silika
Akrilik Polimerler	Polimetakrilatlar, poli(metil metakrilat), poli hidro(etil metakrilat)
Diğerleri	Polivinil pirolidon, etil vinil asetat, poloksamerler, poloksaminler
Biyoparçalanabilen Polimerler	
Poliesterler	Poli(laktik asit) (PLA), poli(glikolik asit) (PGA), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), poli(hidroksi bütirat), poli(ε-kaprolakton), poli(β-malik asit), poli(dioksanon)
Polianhidritler	Poli(sebasik asit), poli(adipik asit), poli(terftalik asit) ve çeşitli kopolimerler
Poliamitler	Poli(imino karbonat), poli(amino asit)
Fosfor Kaynaklı Polimerler	Polifosfatlar, polifosfonatlar, polifosfazenler
Diğerleri	Poli(alkil-siyano akrilat), poliüretanlar, poliorto esterler, polidihidropiran, poliasetal

2.3.1. Biyoparçalanamayan Polimerler

Biyoparçalanamayan polimerler kullanılarak yapılan ilk çalışma 1964 yılında gerçekleşmiştir.²³ Kullanım şekillerine göre rezervuar ve implant tipinde olmak üzere ikiye ayrılabilirler. Rezervuar tipinde merkezde bir ilaç çekirdeği vardır. Bu çekirdekten ilaç, ya yarı-geçirgen polimerden yavaşça salınabilir ya da dıştaki polimer üzerinde açılan sabit bir delikten salınabilir.^{23, 24} İmplant tipinde ise biyoparçalanamayan taşıyıcı sistem, vücuda enjekte veya implante edilebilir.²⁴

Biyoparçalanamayan polimerlerin ilaç salımı bittikten sonra vücuttan uzaklaştırılması gereği, vücutta kronik reaksiyonlara ve toksik etkiye sebep olması ile implantasyona ve cerrahiye bağlı olarak yan etkilerin görülmesi gibi sakıncaları mevcuttur.²⁴⁻²⁶

2.3.2. Biyoparçalanabilen Polimerler

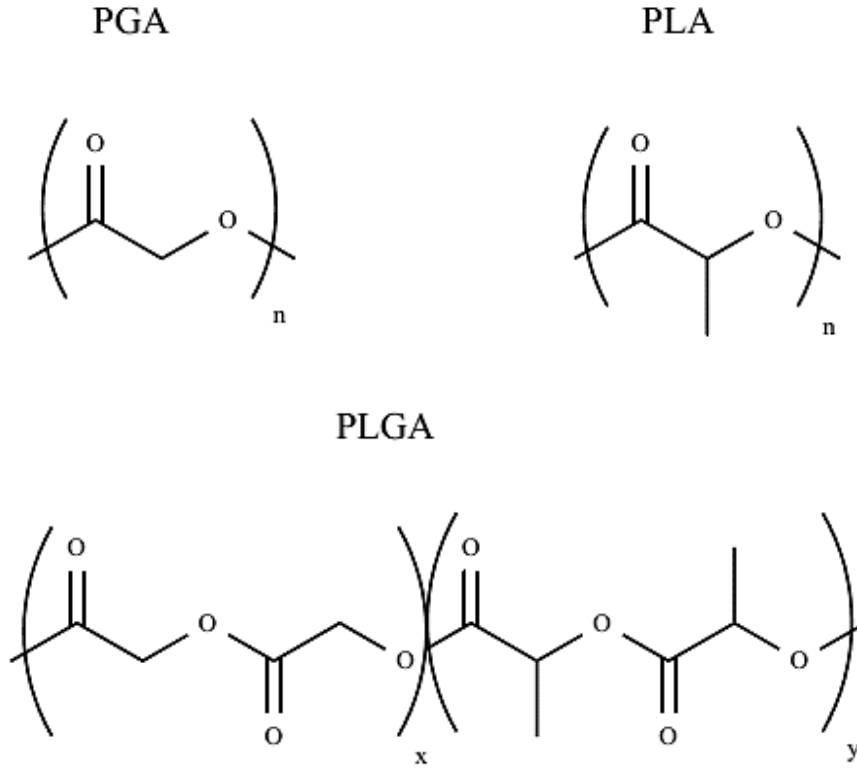
In vivo ortamda enzimatik veya non-enzimatik yolla parçalanabilen, biyouyumlu polimerlerdir. Toksisitelerinin olmaması/düşük olması ve etkin madde salımı bittikten sonra uzaklaştırma gerektirmemeleri diğer üstünlükleridir ve bu nedenle, sıklıkla biyomedikal uygulamalarda tercih edilmektedirler. Bu polimerler normal metabolik yollarla metabolize olur ve atılırlar.^{25, 27}

2.3.2.1. PLGA

PLGA, FDA ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA: European Medicine Agency) tarafından çeşitli ilaç taşıyıcı sistemleri hazırlamak ve insanlar üzerinde kullanılmak üzere onaylanan bir polimerdir.^{11, 28} Düşük toksisiteye ve immunojenisiteye sahip biyouyumlu ve güvenilir bir polimer olan PLGA, biyoparçalanabilen ilaç taşıyıcı sistemlerin ve medikal aletlerin hazırlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır.^{29, 30}

PLGA kopolimeri, zincir açılma kopolimerizasyonu veya polikondenzasyon yöntemleri kullanılarak iki farklı monomerden (PLA ve PGA) hareketle sentezlenir.³¹

Polimerizasyon süresince monomerik birimler ester bağlarıyla bağlanarak düz, amorf alifatik poliester yapısını oluştururlar.²⁸ PGA, PLA ve PLGA'nın kimyasal yapısı Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. PGA, PLA ve PLGA'nın kimyasal yapısı.³²

PLGA, yapısında bulunan laktik asit (LA) ve glikolik asit (GA) oranlarına göre farklı kristalinite derecelerine ve molekül ağırlıklarına sahip olmaktadır. Kristal yapıdaki PGA, PLA ile polimerize edildiğinde kristalinite derecesi azalır ve hidrasyon ile hidroliz oranını artırır. PLGA kopolimerinin parçalanma zamanı ve oranını, başlıca kopolimer sentezi sırasında kullanılan monomerlerin oranı, LA'nın stereoizomer kompozisyonu ve kopolimerin molekül ağırlığı etkiler (birkaç haftadan birkaç yıla kadar sürebilir).^{11, 24, 25} Piyasada PLA:PGA oranı 50:50, 65:35, 75:25 ve 85:15 olan PLGA çeşitlerini bulmak mümkündür (Tablo 2.2).³³

Tablo 2.2. Farklı PLA:PGA oranına göre elde edilen PLGA'ların fiziksel özellikleri.³³

PLA:PGA Oranı (%)	Viskozite (dL/g)	Fiziksel Hal	Tg (°C)	Çözünürlük	Yaklaşık Parçalanma Zamanı (Ay)
50:50	0.55-0.75	Amorf	45-50	ACE, THF, HFI, CF, EA, DCM	1-2
65:35	0.55-0.75	Amorf	45-50	ACE, THF, HFI, CF, EA, DCM	3-4
75:25	0.55-0.75	Amorf	50-55	ACE, THF, HFI, CF, EA, DCM	4-5
85:15	0.55-0.75	Amorf	50-55	ACE, THF, HFI, CF, EA, DCM	5-6

Tg: Camısı geçiş sıcaklığı, ACE: Aseton, THF: Tetrahidrofuran, HFI: Hekzafloroizopropanol, CF: Kloroform, EA: Etil asetat, DCM: Diklorometan.

Genellikle GA oranı ne kadar fazlaysa, parçalanma için gereken süre o kadar kısadır. Ancak PLA:PGA oranı 50:50 olan PLGA'da en hızlı parçalanma görülür (Tablo 2.2).^{11, 24, 25, 31} Düşük molekül ağırlıklı PLGA, genellikle daha hızlı parçalanmaya uğramakta ve daha hızlı bir salım göstermektedir. PLGA'nın ester veya serbest karboksil grubuyla sonlanması da kopolimerin parçalanması üzerinde etkilidir. Serbest karboksil grubu içeren PLGA ile hazırlanan sistemler yüksek bir ani salım gösterir. Serbest karboksil grubu kopolimere daha hidrofilik bir özellik kazandırır ve böylece daha yüksek su absorpsiyonuna neden olur. Sonuç olarak, ester grubuyla sonlanan PLGA'ya göre daha hızlı bir parçalanma görülür.³³ PLGA'ların Tg değeri genellikle 37 °C'den fazladır; bu özellik, ilaç taşıyıcı sistemleri hazırlamak için PLGA kopolimerlerine yeterli mekanik dayanıklılığı sağlar. PLGA'nın molekül ağırlığı ve kopolimer yapısındaki LA oranı azaldıkça, Tg değeri de azalır.³⁴

PLGA, vücut içerisinde ester bağlarının hidrolize uğramasıyla LA ve GA'ya parçalanır. LA, Krebs döngüsüne uğrayarak metabolize olur ve vücuttan H₂O ve CO₂

olarak atılır. GA ise ya değişmeden böbrekler yoluyla ya da Krebs döngüsüne uğrayarak vücuttan H₂O ve CO₂ halinde atılabilir.^{11, 24, 35}

2.4. Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri

Kullanılacak polimerin fizikokimyasal özelliğine ve yüklenecek olan etkin maddeye bağlı olarak polimerik nanopartikül hazırlama yöntemi seçilir.³⁶

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması için çok farklı hazırlama yöntemlerinden faydalanılmaktadır. Emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi, nanopresipitasyon yöntemi ve emülsiyon oluşturma-çözücü difüzyonu (EO-ÇD) yöntemi yaygın olarak kullanılan hazırlama yöntemleridir.

2.4.1. Emülsiyon Oluşturma-Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi, 1979 yılında Vanderhoff ve arkadaşları tarafından klasik yöntem temel alınarak geliştirilmiş ve patentlenmiştir.³⁷ Bu yöntemde seçilen polimer, su ile karışmayan DCM, CF gibi klorlu bir organik çözücü içerisinde çözündürülerek organik faz hazırlanır. Elde edilen organik faz ve yüzey aktif madde içeren sulu faz kullanılarak emülsiyon hazırlanır. Bu aşamada, emülsiyonun damlacık boyutları farklı yöntemler (ultrasonikasyon, mekanik karıştırma veya yüksek hızda homojenizasyon) kullanılarak küçültülür. Daha sonra ise, organik çözücü ortamdan (vakum, sıcaklık veya vakum+sıcaklık uygulanmasıyla) uzaklaştırılır.^{37, 38} Oluşan nanopartiküller, ultrasantrifüjle toplanır, yüzey aktif madde kalıntılarının/yüklenmemiş etkin maddenin uzaklaştırılması için saf su ile yıkanır ve çoğunlukla liyofilize edilerek saklanır.^{39, 40} Bu hazırlama yönteminde polisorbitatlar, poloksamerler ve polivinil alkol (PVA) sıklıkla kullanılan yüzey aktif maddelerdir.^{37, 38} Bu yöntemle hazırlanan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin boyutu; karıştırma hızı, stabilize edici ajanın tipi-miktarı, organik ve sulu fazın viskozitesi, sıcaklık ayarı gibi parametreler değiştirilerek kontrol altında tutulabilir.³⁶

2.4.2. Nanopresipitasyon Yöntemi

Nanopresipitasyon yönteminin ilk uygulaması 1987 yılında Fessi ve arkadaşları tarafından geliştirilen bir patentle olmuştur.³⁷ Bu yöntemde seçilen polimer, etkin madde ve tercihe bağlı olarak lipofilik bir stabilize edici ajan (örn. fosfolipidler) su ile karışabilen ACE ve alkol gibi bir çözücü içerisinde çözündürülür. Bu karışım, bir stabilize edici ajan (örn. PVA veya poloksamerler) içeren/içermeyen sulu bir faza manyetik karıştırıcı üzerinde eklenir ya da enjekte edilir. Çözücünün dış faza hızlı difüzyonu sonucu nanopartiküller anında oluşmaktadır. Çözücü ise daha sonra alçak basınç altında uzaklaştırılmaktadır. Bu yöntemde nanopartiküllerin oluşma mekanizması, çözücünün yer değiştirmesi sırasında oluşan yüzeylerarası türbülansla açıklanmaktadır. Bu basit yöntemin kısıtlayıcı parametreleri, sadece suyla karışabilir çözücülerin kullanılması ve hidrofilik etkin maddelerin enkapsülasyonu için uygun bir yöntem olmamasıdır. Ancak, lipofilik etkin maddelerle yüksek % EE değerleri elde edilmektedir.^{37, 40, 41}

2.4.3. Emülsiyon Oluşturma-Çözücü Difüzyonu Yöntemi

Emülsiyon oluşturma-çözücü difüzyonu yöntemi ilk defa 1995 yılında Leroux ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir.⁴⁰ Bu yöntem için ihtiyaç duyulan 3 adet sıvı faz söz konusudur. Bunlar: 1. Stabilize edici ajan (pluronik F68, PVA vb.) içeren sulu faz, 2. Polimer ve/veya hidrofobik etkin maddeyi içeren organik faz ve 3. Dilüsyon fazı. Organik faz, su ile kısmen karışan propilen karbonat, benzil alkol, EA gibi bir çözücüde çözündürülür ve sulu faz içerisinde yüksek hızda homojenizasyon uygulanarak emülsifiye edilir. Son olarak, organik çözücünün dispers fazdan dış su fazına difüzyonunu sağlamak amacıyla uygun miktarda saf su eklenir ve nanopartiküller elde edilir. Bu yöntemle yüksek % EE değerlerinin (genellikle, % 70'in üzerinde) elde edilmesi ve hidrofobik etkin maddeler için uygun olması önemli üstünlükleridir.⁴⁰⁻⁴² Ayrıca tekrarlanabilirliğinin yüksek olması, ölçek büyötmeye uygun olması, basit bir yöntem

olması, yüksek verim elde edilmesi ve partikül boyutu dağılımının düşük olması yöntemin diğer üstünlükleridir. Yöntemle ilgili en önemli sakınca ise, çözücü difüzyonu aşamasında suda çözünebilir etkin maddelerin sulu dış faza kaçmasıdır. Bu nedenle, bu yöntemin söz konusu etkin maddeler için kullanımı uygun olmamaktadır.^{37, 41, 43}

Polimer oranı/konsantrasyonu, çözücü tipi, yüzey aktif maddenin molekül ağırlığı, organik fazın viskozitesi, faz oranları, karıştırma hızı, sıcaklık ve suyun ilave edilme hızı gibi faktörler hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemlerin partikül boyutuna etki etmektedir.⁴⁴ Ancak, dış fazın viskozitesi ve pH'sı ise partikül boyutu üzerinde sınırlı etkilere sahiptir. Bu yöntemle, genellikle 150 nm civarında partikül boyutuna sahip nanopartiküller taşıyıcı sistemler hazırlanabilmektedir. Çözücünün dış su fazına difüzyonuna bağlı olarak, ilk elde edilen emülsiyon damlacık boyutu zamanla küçülür ve organik çözücünün su ile karışabilirlik derecesi ne kadar yüksekse, elde edilen nanopartiküllerin partikül boyutu da o kadar küçük olur. Polimer konsantrasyonu artışı ise partikül boyutu artışına neden olmaktadır.⁴²

2.5. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler İçin Kullanılan Sterilizasyon Yöntemleri

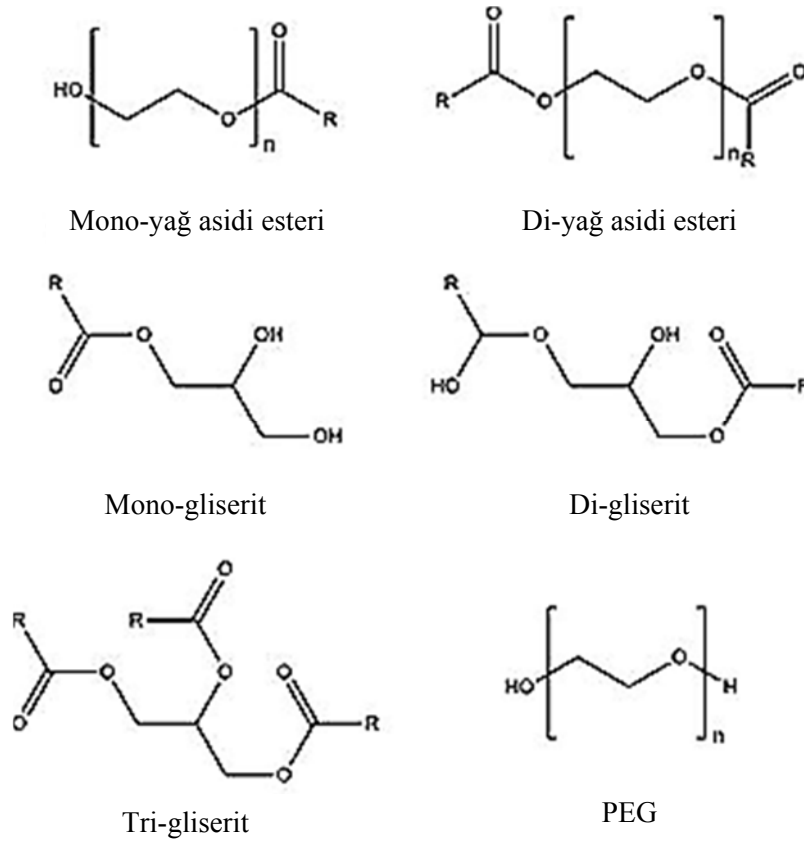
Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler bir çok yöntemle sterilize edilebilirler. Her yöntemin üstünlükleri ve sakıncaları bulunmaktadır. Bu yöntemler aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir:^{17, 45}

- ✓ Aseptik ortamda filtrasyon,
- ✓ Tazyikli su buharı sterilizasyonu,
- ✓ İyonize radyasyon ile sterilizasyon (γ ve x ışınları),
- ✓ UV ışını ile sterilizasyon,
- ✓ Gaz sterilizasyonu (etilen oksit),
- ✓ Gaz plazma sterilizasyonu.

2.6. Gelucire® 44/14

Gelucire® 44/14 inert, amfifilik özellikte, yarı katı mumsu yapıda olan bir yardımcı maddedir.^{46, 47} Gelucire® 44/14, Avrupa Farmakopesinde (EP: European Pharmacopoeia) “Lauroyl Macrogolglycerides” ve Amerikan Farmakopesinde (USP: the United States Pharmacopoeia) ise “Lauroyl Polyoxylglycerides” başlıklı monografda geçmektedir. Gelucire® 44/14, güvenilir (GRAS: Generally Recognized As Safe) bir maddedir.⁴⁸

Gelucire® 44/14, poliglikolize gliserit [“Palm kernel oil” ve polietilen glikol (PEG) 1500’den hareketle hazırlanmıştır] yapısındadır. Bileşiminde mono-, di- ve tri-gliseritler (% 20), PEG 1500’ün mono- ve di- yağ asidi esterleri (% 72) ve serbest PEG 1500 (% 8) bulunmaktadır (Şekil 2.2).⁴⁹ Gelucire® 44/14 yapısındaki yağ asitlerinin dağılımı Tablo 2.3’de verilmiştir.^{48, 49}



Şekil 2.2. Gelucire® 44/14’ün bileşimi.⁴⁹

Tablo 2.3. Gelucire® 44/14 yapısındaki yağ asitlerinin dağılımı.⁴⁸

Yağ Asidi	%
Kaprilik Asit, C8	4-10
Kaprik Asit, C10	3-9
Laurik Asit, C12	40-50
Miristik Asit, C14	14-24
Palmitik Asit, C16	4-14
Stearik Asit, C18	5-15

Gelucire® 44/14'ün özgün bileşimi [sürfaktan (PEG'in mono- ve di- yağ asidi esterleri), ko-sürfaktan (monogliseritler) ve yağlı fazdan (di- ve trigliseritler) oluşan] bu maddeye ilginç özellikler kazandırmaktadır.^{48, 50} Gelucire® 44/14, vücut sıcaklığında, sulu ortamlarla temas ettiğinde küçük damlacık boyutuna sahip emülsiyon oluşturabilmektedir. Sudaki çözünürlüğü zayıf olan etkin maddelerin çözünürlüğünü ve sonuç olarak da biyoyararlanımını artırmaktadır.^{48, 51-53}

Gelucire® 44/14'ün adında geçen 44 değeri nominal erime derecesini, 14 ise Hidrofilik-Lipofilik Denge değerini ifade etmektedir.^{47, 54} Farklı bileşimdeki Gelucire®'ler özellikle lipid yapıdaki nanopartiküllerin kolloidal stabilitesini ve biyoyumumluluğunu artırmak ve yüksek enkapsülasyon etkinliği elde etmek amacıyla formülasyona ilave edilmişlerdir.⁵⁵ Bununla birlikte, P-glikoprotein (P-gp) inhibisyonu ile etkin maddelerin biyoyararlanımını düzeltmek, membran permeabilitesini artırmak ve amorf etkin maddeleri stabilize etmek gibi farklı amaçlarla da çalışılmıştır.⁵⁶ Bundan dolayı, birçok formülasyonda ve taşıyıcı sistemlerde emülgatör, ısılatıcı ve stabilize edici ajan olarak kullanılabilmektedir.^{55, 56}

2.7. Flavonoidler

Bitkilerde bol miktarda bulunan flavonoidler, insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan doğal fenolik bileşiklerdir. Bu bileşikler güçlü antitümör ajanlardır.

Antioksidan (radikal süpürücü etki) ve antiproliferatif fonksiyonlarına bağlı olarak apoptozisi indükleyici, hücre farklılaşmasını ve hücre döngüsünü modüle edici etkileri vardır.⁵⁷⁻⁵⁹ Flavonoidlerin sitotoksik etkileri ile ilgili farklı mekanizmalar ileri sürülmektedir. Bunlar aşağıdaki gibi sıralanabilir:⁶⁰

- ✓ Proteozom inhibisyonu,
- ✓ Yağ asidi sentezinin inhibisyonu,
- ✓ Topoizomeraz inhibisyonu,
- ✓ Fosfatidil-inositol-3-kinaz inhibisyonu,
- ✓ Hücre döngüsü blokajının indüklenmesi,
- ✓ p53 birikimi,
- ✓ c-myc ve c-fos gen ekspresyonlarının artırılması.

Flavonoidler, kimyasal yapılarına göre flavonoller (örn. kersetin, mirisetin), flavonlar (örn. apigenin, luteolin), flavanonlar (örn. hesperidin, naringenin), kateşinler (örn. kateşin, epikateşin), antosiyanin ve antosiyanidinler (örn. pelargonidin, siyanidin) ve izoflavonlar (örn. genistein, daidzein) gibi alt gruplara ayrılırlar.^{59, 61, 62}

Soya fasülyesi ve soya ürünlerinde yoğun olarak bulunan izoflavonlar fitoöstrojenik etkiye sahip bileşiklerdir. Fitoöstrojenler bitki kökenli östrojenler veya östrojene benzer etkiye sahip olan bileşiklerdir.⁶³ İzoflavonların hidrofobik doğası, bu bileşiklerin farmasötik amaçla uygulamalarını kısıtlamaktadır. İzoflavonlar sudaki düşük çözünürlüklerinden dolayı düşük oral biyoyararlanıma sahiptirler ve ayrıca, karaciğer ve ince bağırsakta hızla metabolizasyona uğramaktadırlar.⁶⁴

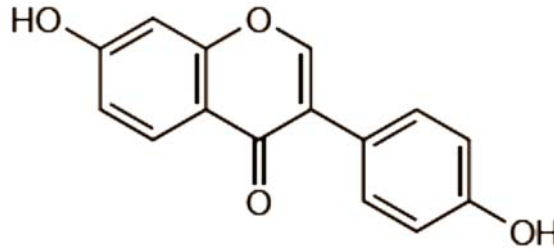
2.7.1. Daidzein

2.7.1.1. Daidzeinin Fizikokimyasal Özellikleri

Antioksidan özelliklere sahip ve güçlü antikanserojen doğal polifenolik bileşikler olan izoflavonlar, aglikon, glikozit, malonil glikozit veya asetil glikozit olmak üzere dört

temel yapıda bulunabilirler. Aglikon yapılar genistein (5, 7, 4'-trihidroksi izoflavon), daidzein (7, 4'-dihidroksi izoflavon) ve glisitein (7, 4'-dihidroksi 6-metoksi izoflavon) gibi konjuge olmamış yapılardır.^{62, 65}

Daidzein (7, 4'-dihidroksi izoflavon; 7-hidroksi-3-(4-hidroksifenil)-4*H*-1-benzopiran-4-on), *Leguminosae* familyasına ait, özellikle soya ve soya türevi gıdalarda yer alan suda çözünmeyen bir izoflavondur (Şekil 2.3).⁶⁶ Molekül ağırlığı 254.2 g/mol ve moleküler formülü C₁₅H₁₀O₄ olan beyaz-açık sarı renkte bir tozdur.^{67 (2391)} Daidzein dimetil sülfoksit (DMSO), etanol ve dimetilformamid gibi çözücülerde çözünmektedir (sırasıyla, 30~33.3 mg/mL, 0.1 mg/ml ve 10 mg/mL). Daidzein sulu tamponlarda zor çözünür ve maksimum çözünürlük için daidzein ilk olarak DMSO içerisinde çözündürülmeli ve daha sonra sulu tampon ile dilüe edilmelidir. Daidzeinin 1:10 DMSO:PBS (fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi) (pH 7.2)'deki çözünürlüğü ~150 µg/mL'dir.^{68, 69} -20 °C'de saklanmaktadır.⁶⁸⁻⁷⁰



Şekil 2.3. Daidzeinin kimyasal yapısı.⁶⁷

Yang ve ark.⁷¹ daidzeinin su, absolü etanol ve etanol:su (80:20) ortamlarındaki çözünürlüğünü farklı sıcaklıklarda tespit etmek üzere daidzein çözeltilerini 2.5 saat manyetik karıştırıcıda karıştırarak ve sonrasında ise 2 saat daha karıştırmadan bekleterek hazırlamışlardır. Söz konusu süre sonunda, UV-spektrofotometrik yöntem (256 nm) kullanılarak daidzein içeriği saptanmıştır. 25 °C'de su, absolü etanol ve etanol:su

içerisindeki daidzein çözünürlükleri sırasıyla, 1.3 µg/mL, 1030 µg/mL, 1250 µg/mL olarak, 35 °C’de ise 3 µg/mL, 1320 µg/mL ve 1500 µg/mL olarak saptanmıştır.

Daidzeinin oral biyoyararlanımını artırmak üzere kendiliğinden mikro-emülsifiye olabilen sistemler (SMEDDS)’in geliştirildiği bir çalışmada, öncelikle çözünürlük çalışması (suda, farklı yağlarda, sürfaktan ve ko-sürfaktanlarda) gerçekleştirilmiş (ultrasonik banyoda: 40 °C’de 20 dakika bekletme ve sonra 25 °C’de 48 saat karıştırma sonrası süzme) ve metanol ile dilüe edilmiş süzüntüdeki daidzein konsantrasyonu HPLC [C18 kolonu (150x4.6 mm i.d., 5 µm); hareketli faz: metanol:distile su (55:45, h/h); UV: 260 nm] kullanılarak saptanmıştır. Buna göre, su, izopropil miristat, etil oleat, Tween 80, etanol ve PEG 400 içerisindeki daidzein çözünürlükleri sırasıyla 8.215 µg/mL, 121 µg/mL, 2327 µg/mL, 5102 µg/mL, 4852 µg/mL ve 8.403 µg/mL olarak belirlenmiştir. Çözünme testi de bu çalışma kapsamında 900 mL PB (pH 6.8) ve HCl (0.1 mol/L) ortamlarında 37 °C’de gerçekleştirilmiştir. PB pH 6.8 ve HCl ortamlarında 30 dakika içerisinde mikroemülsiyonlar için elde edilen % kümülatif çözünen daidzein değerleri, sırasıyla % 81.2 ve % 80.3’tür.⁷²

2.7.1.2. Daidzein İçin Miktar Tayini Yöntemleri

Daidzeinin miktar tayini için birçok farklı yöntem kullanılmıştır. Bunlar arasında ultraviyole-görünür bölge (UV-VIS) spektrofotometresi,^{71, 73} spektrofotometre,^{74, 75} yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC),^{76, 77} sıvı kromatografisi/kütle spektrometresi/kütle spektrometresi (LC/MS/MS)^{78, 79} ve gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GC/MS)^{80, 81} bulunmaktadır.

2.7.1.3. Daidzeinin Farmakokinetik Özellikleri

Flavonoidlerin biyoyararlanımları çok sayıda faktörden etkilendiği için genellikle düşüktür. Bu faktörler aşağıdaki gibi özetlenebilir.^{61, 82-84}

- ✓ Flavonoidlerin kimyasal yapıları ve molekül ağırlıkları,

- ✓ Su içerisindeki çözünürlüklerinin ve absorpsiyonlarının nispeten düşük olması,
- ✓ Bağırsak ve karaciğerde yoğun metabolizasyona uğramaları,
- ✓ Alana özgü bir dağılımın olmaması,
- ✓ Hızlı eliminasyon olması,
- ✓ Düşük partiyon katsayısına sahip olmaları.

Soya tüketildiğinde, glikozit yapılarının yüksek moleköl ağırlıkları ve sudaki düşük çözünürlüklerinden dolayı ince bağırsaktan emilimleri düşüktür. Ancak, hidroliz sonucu aglikonlar açığa çıkarsa bunlar pasif difüzyonla hızlı bir emilime uğrarlar. Glikozidaz aktivitesi, endojen orijinli enzimlerle veya proses sırasında ilave edilebilme sonucu veya kolon mikroflorası tarafından salgılanması sonucu gerçekleşir. İzoflavonlar, emilim sonrası yoğun bir şekilde ilk geçiş etkisine uğrar ve bu nedenle düşük oral biyoyararlanıma sahiptirler. Glikozitler, proksimal ince bağırsakta hidrolize olarak biyolojik olarak aktif olan ve emilebilen aglikonlara dönüşürler, ve ince bağırsaktan (çoğunlukla jejunumdan) emilirler ve Faz II biyotransformasyonu sırasında, yapılarındaki -OH grupları karaciğerdeki sülfotransferaz ve glukronil transferaz enzimleri tarafından sülfasyon ve glukronidasyon konjugasyon tepkimeleri için hedef alanları oluşturur. Oluşan bu konjugatlar dokulara sistemik dolaşım ile taşınır ve sonuç olarak böbrekler yoluyla atılır veya safra aracılığıyla ince bağırsağa dönüp aynı enterohepatik döngüye yeniden katılırlar. Soya tüketildikten sonra, daidzein ve genistein maksimum plazma konsantrasyonuna genellikle 6-8 saat (t_{maks}) gibi bir sürede ulaşır. Soya halinde alındığında, plazma eliminasyon yarı ömürleri daidzein için 3-9 saat, genistein için ise 8-11 saat olarak saptanmıştır. Ancak, saf halde daidzein ve genistein alındığında ise bu süreler sırasıyla 9 ve 7 saat olarak tespit edilmiştir.⁸⁵⁻⁸⁸

Diğer taraftan, daidzeinin özelleşmiş intestinal bakteriler tarafından ileri bir

metabolizasyona uğrayarak ekuol, 4-hidroksi ekuol, dihidrodaidzein veya O-desmetilangolensine dönüştürüldüğü ve ekuolün insan sağlığı ile ilgili birçok biyolojik aktiviteye (daidzeine göre daha yüksek östrojenik ve antioksidan aktivite göstermesi, meme kanseri riskini azaltması gibi) sahip olduğu raporlanmıştır.^{86, 87, 89} Ekuolün biyoyararlanımı daidzeinden daha yüksektir ve daidzeine göre plazmada daha uzun süre kalır. Daidzeinin % 18.7'sine karşın ekuolün % 50'si (bağlanmamış serbest halde) dolaşımda bulunur ve vücutta daha fazla etki eder.⁸⁶

Setchell ve ark.⁹⁰ oral uygulama sonrası daidzein ve genisteinin farmakokinetik özelliklerini menopoz öncesi dönemde bulunan kadınlarda değerlendirmişlerdir. Genistein serum konsantrasyonunun daidzein konsantrasyonundan daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu bileşiklerin eliminasyonunda böbreklerin önemli bir rolü olduğu, feçes yoluyla atılımın ise oldukça düşük olduğu belirtilmiştir. Daidzein için elde edilen dağılım hacmi (biyoyararlanıma normalize edilmiş; V_d/F), klerens (arınma, Cl), eğri altında kalan toplam alan ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$) ve yarı ömür ($t_{1/2}$) ortalama değerleri sırasıyla 336.25 L, 30.09 L/saat, 5.02 $\mu\text{mol.saat/L}$ ve 7.75 saat ve aynı sıralamayla genistein için ise bu değerler 258.76 L, 21.85 L/saat, 6.01 $\mu\text{mol.saat/L}$ ve 7.77 saat olarak saptanmıştır. Daidzein ve genistein serum konsantrasyonları maksimuma (C_{maks} ; sırasıyla 0.36 $\mu\text{mol/L}$ ve 0.46 $\mu\text{mol/L}$) sırasıyla 7.4 ve 5.5 saatte (t_{maks}) ulaşmıştır. Sonuç olarak, genistein biyoyararlanımının daidzeininkinden daha yüksek olduğu vurgulanmıştır.

Qui ve ark.⁹¹ daidzeinin ve onun ana metaboliti olan daidzein-7-O-glukronitin farmakokinetik özellikleri üzerine dozaj formlarının (çözelti ve süspansiyon) etkisini sıçanlarda incelemişlerdir. Oral uygulama sonrası daidzeinin 7-OH pozisyonunun glukronidasyonu sonucu sıçanlarda ve insanlarda daidzeinin ana metaboliti olan daidzein-7-O-glukronit oluşur. Uygulama sonrası daidzein çözeltisi ve süspansiyonu için elde edilen t_{maks} değerleri 0.46 saat ve 5 saat olarak saptanmıştır. Çözelti ve süspansiyon

uygulamasý sonrası saptanan C_{maks} deęerleri, daidzein için sýrasýyla 601.1 $\mu\text{g/L}$ ve 127.3 $\mu\text{g/L}$; daidzein-7-O-glukronit için ise 3000 $\mu\text{g/L}$ ve 192.6 $\mu\text{g/L}$ 'dir. Daidzein (serbest halde) için mutlak biyoyararlaným deęerleri ise % 12.8 (özelti) ve % 6.1 (süspansiyon); toplam daidzein (serbest+konjuge halde) için ise % 47 (özelti) ve % 12.2 (süspansiyon) olarak bulunmuştur.

2.7.1.4. Daidzeinin Farmakodinamik Özellikleri

Daidzein, fizyolojik ve farmakolojik fonksiyonları açısından geniş bir spektruma sahiptir. *İn vitro* ve *in vivo* olarak antioksidan özelliğe sahip olduğu gösterilen daidzein, düşük maliyet, yaygın bulunuşu, klinik olarak güvenli oluşu gibi nedenlerden birçok hastalığın tedavisi için umut vadeden bir ajan olarak görölmektedir.^{83, 92}

İzoflavonlar, fitoöstrojenik etkiye sahip ve endojen östrojene benzer aktiviteler gösterebilen bileşiklerdir. Farklı derecelerde östrojenik etki gösteren fitoöstrojenler, vücutta bulunan östrojenlerle yarışarak ilgili reseptörlere bağlanıp doğrudan etki gösterebilirler. Ayrıca, östrojen metabolizmasında rol oynayan bazı enzimlerin etkinliğini değiştirebilirler.⁶³ Bununla birlikte, güçlü antitümör ajanlardır. Antioksidan ve antiproliferatif fonksiyonlarına bağlı olarak apoptozisi indükleyici, hücre farklılaşmasını ve döngüsünü modüle edici etkileri vardır. Sahip oldukları antioksidan aktivite, serbest radikallerin veya kanserojen maddelerin sebep olduğu deoksiribonükleik asit (DNA) hasarını önlemekte ve böylece kanserin başlangıç aşaması bloke edilebilmektedir.⁶¹ Ayrıca, daidzeinin antienflamatuar ve enzim inhibitörü özellikleri de vardır ve LDL düzeyini düşürür. Ayrıca, sitokinleri, hücre adezyon proteinlerini ve platelet agregasyonunu inhibe eder ve nitrik oksit üretimini ise indükler.⁹³ Daha önceki çalışmalarda, daidzeinin kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği, hiyaluronik asit üretimini uyardığı ve topikal uygulandığında ise cildi oksidatif hasardan (UV ışınlarından) koruduğu gösterilmiştir.⁹⁴⁻⁹⁷ Daidzein özellikle postmenopozal bayanlarda

yaşlanmayı önleyici olarak umut verici bir ajan olarak görülmektedir.^{96, 97}

Prostat, rahim ağzı, beyin, meme, cilt ve kolon kanseri hücrelerinde daidzeinle ilgili çalışmalar yapılmış ve antikanserojen özellikleri gösterilmiştir.⁹⁸⁻¹⁰²

Daidzeinin kanser hücreleri üzerindeki inhibe edici etkisi hücre tipine, daidzein konsantrasyonuna ve maruz kalma süresine göre değişebilmektedir. Daidzein kanser hücreleri üzerinde bifazik etki gösterebilir, yani, yüksek konsantrasyonlarda inhibitör etkiye, düşük konsantrasyonlarda ise aktive edici fonksiyona sahip olabilir.^{103, 104} Bazen de düşük konsantrasyonlarda yüksek konsantrasyonlara göre daha fazla apoptozisi indükleyici etki gösterebilmektedir.^{103, 105}

Guo ve ark.¹⁰⁴ insan kolon kanseri hücrelerinde (LoVo hücreleri) daidzeinin hücre büyümesi üzerindeki bifazik etkilerini incelemişler ve daidzeinin LoVo hücrelerinin büyümesini düşük konsantrasyonlarda (0.1 μ M ve 1 μ M) artırırken yüksek konsantrasyonlarda (10 μ M, 50 μ M ve 100 μ M) ise inhibe etmişlerdir. Daidzein ve genistein tek başlarına veya kemoterapi, radyasyon terapisi ve/veya immünoterapi ile kombinasyon halinde, apoptozisi indükleyerek, hücre döngüsü ilerlemesini kontrol eden genlerin modülasyonu yoluyla kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ederek, survivin (apoptozisi inhibe edici proteinlerdir) ekspresyonunu azaltarak veya insan telomeraz katalitik mRNA alt ünitesini azaltarak (“down” regülasyonu) *in vitro* ve *in vivo* olarak çeşitli kanser hücrelerinin büyümesini inhibe etmektedir.^{103, 106, 107} Daidzeinin reaktif oksijen türlerini (ROS) (karsinogenez sırasında oluşmaktadır) süpürücü etkisi de antikanserojen etkinliği açısından önemlidir.^{108, 109}

Lo ve ark.¹⁰¹ daidzeinin nöroblastoma (çocuklarda sıklıkla görülen periferik sempatik sinir sistemi tümörü) hücrelerindeki antitümör etkilerini incelemişler ve daidzeinin hücre döngüsü ilerlemesini (G₂/M fazına) önleyerek hücre çoğalmasını inhibe ettiğini saptamışlardır. Başka bir çalışmada ise daidzeinin Bcl-2/Bax apoptotik yolak

yoluyla apoptozisi indükleyen D-galaktozu inhibe edebildiği ve nörodejenerasyon tedavilerinde kullanılmak üzere potansiyele sahip olduğu raporlanmıştır.¹¹⁰ Siegelin ve ark.¹¹¹ tarafından ise daidzeinin glioblastoma hücrelerinde apoptotik yolları inhibe ettiği ve malign glioma hücre ölümünde tümör nekroz faktör-ilişkili apoptozisi indükleyici ligand (TRAIL) ile birlikte kullanıldığında Bcl-2'nin anahtar faktör olduğu ifade edilmiştir.

Bundan dolayı, yapılan çalışmalarda daidzeinin insan sağlığı açısından çok çeşitli faydalarının olduğu raporlanmaktadır. Bunlar arasında kardiyovasküler hastalıklar (hipertansiyon, koroner kalp hastalığı, aterosklerotik kalp hastalığı) ve kanserin önlenmesi/tedavisi, östrojen takviyesi/tedavisi için bir alternatif olması, serebral trombozun önlenmesi/tedavisi, postmenopozal dönemde osteoblast hücrelerinin çoğalmasını sağlayarak osteoporozun önlenmesi/tedavisi ve diyabetin önlenmesi sayılabilir.^{66, 72, 82-84, 92, 97, 112}

2.7.1.5. Daidzein İçeren İlaç Taşıyıcı Sistemler

Daidzeinin hastalıkların önlenmesi ve tedavisine yönelik uygulanabilmesi, biyoyararlanımının artırılması, sürekli salımının sağlanabilmesi amacıyla daidzein-yüklü modern ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi düşünülmüş ve bununla ilgili çalışmalar yapılmıştır.⁸² Son yıllarda nanoteknoloji alanındaki çalışmalara ilgi çok artmıştır. Nanotaşıyıcılar flavonoidlerin düşük çözünürlük, kısa yarı ömür ve düşük biyoyararlanım gibi problemlerinin üstesinden gelinmesi için uygun sistemlerdir. Bu nanotaşıyıcılar arasında lipozomlar, katı lipid nanopartikülleri (SLN: solid lipid nanoparticle), PEG-SLN'ler, PEG-lipozomlar, PLGA ve CS nanopartikülleri/mikropartikülleri, SMEDDS'ler ve nanoemülsiyonlar yer almaktadır. Ancak, flavonoidlerle ilgili yapılan bu çalışmalar yeterli değildir.^{61, 64, 66, 72, 82-84, 95}

2.7.1.6. Daidzein İçeren Ticari Ürünler

Daidzein içeren preparatlar ve gıda destekleri insan sağlığına olan etkilerinden dolayı sıklıkla tüketilmektedir (Tablo 2.4).

2.7.1.7. Daidzeinin Stabilitesi

Daidzeinin stabilitesi ile ilgili literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır. Rostagno ve ark.¹¹³ tarafından soya fasulyesi ekstresindeki (etanol:su; 50:50) izoflavonların ve standart çözeltilerin kısa süreli stabilitelerini farklı sıcaklıklarda (10, 25 ve 40 °C), ışık altında (% 0 ve % 100) 1-7 gün saklanarak incelenmiştir (ters faz HPLC; UV: 254 nm). Malonil izoflavonların saklama koşullarından etkilendiği, glikozit izoflavonların ise etkilenmediği raporlanmıştır. Daidzein ve glisitein konsantrasyonlarının ışık yokluğunda 25 °C’de saklama ile değişmediği ancak ışık varlığında önemli derecede azaldığı saptanmıştır. Sıcaklığın, izoflavonların stabilitesi açısından önemli olduğu, ekstrelerin ve standart çözeltilerin saklama süresini önemli derecede etkilediği, izoflavonların konsantrasyonlarında önemli bir değişim (<% 5) olmadan ekstre ve standart çözeltilerin -20 °C’de 30 gün, 5-10 °C’de ise 7 gün saklanabileceği raporlanmıştır. İzoflavonların 10 °C’nin altındaki sıcaklıklarda ve ışıktan korunarak saklanmaları gerektiği belirtilmiştir. Bu koşullar altında ekstrelerin bir haftaya kadar önemli bir degradasyona (izoflavonlar açısından) uğramadan saklanabileceği ifade edilmiştir.

Tablo 2.4. Daidzein içeren ticari preparatlar.

Ticari İsim	Üretim Yeri	Firma	İçerik	Dozaj Şekli	Kullanılış
Isoflavones	ABD	Solgar	Genistein+Daidzein	Tablet	Gıda takviyesi (Menopoz)
Sojadiol	Arjantin	Rexim	Leciflavon (İzoflavon+Fosfolipid)	Tablet	Menopoz
Pausicaps	Meksika	Gelcaps De Mexico	Soya İzoflavon	Kapsül	Gıda takviyesi (Menopoz)
Soymen Gel	İtalya	Irmed	Soya İzoflavon	Vajinal Jel	Vajinada
Phyto-Care	Hong-Kong	Good Year Trading Marlyn Nutraceuticals	İzoflavon	Kapsül Vajinal Jel	Gıda takviyesi (Menopoz)
Phyto Soya	Fransa	Arkopharma	İzoflavon	Kapsül	Gıda takviyesi (Menopoz)
Inoclim	Fransa	Efarma Innotech Labor	İzoflavon	Kapsül	Gıda takviyesi (Menopoz)
Soyfemme	Brezilya	Aché Laboratórios Farmacêuticos	Soya İzoflavon	Kapsül	Gıda takviyesi (Menopoz)
Soy 50	Brezilya	Nature Made	Soya İzoflavon	Tablet	Gıda takviyesi (Menopoz)
Isoflavin	Brezilya	Herbarium Laboratório Botânico	Soya İzoflavon	Kapsül	Gıda takviyesi (Menopoz)
Tanvimil	Brezilya	Raymos	Soya İzoflavon	Krem	Gıda takviyesi (Menopoz)
Isoflavonas				Tablet	
Promensil	İndonezya	Natrol	Fitoöstrojen	Tablet	Gıda takviyesi (Menopoz), Ateş Basması, Kalp ve Göğüs Sağlığı
Soy Isoflavones	ABD	Best Naturals Nature's Way GNC	Soya İzoflavon	Kapsül	Gıda takviyesi (Menopoz)

Soya sütünün farklı sıcaklıklara (95, 121 ve 140 °C) ve belli sürelerle maruz bırakılması sonrası içerdiği aglikonların (daidzein, genistein, glisitein) konsantrasyonlarının HPLC (ters faz; UV: 254 nm) ile tayin edildiği başka bir çalışmada ise daidzein ve glisiteine göre genisteinin yüksek sıcaklıklarda daha dayanıklı olduğu saptanmış, sıcaklık artışının ilk aşamasında genistin genisteine dönüşmesi sonucu genistein konsantrasyonunun arttığı, daidzein ve glisitein içeriğinin ise ilk aşamada hızla azaldığı, ancak işlemin devamında ise daidzein içeriğindeki azalmanın yavaşladığı saptanmıştır. 95 °C’de 60 dakika bekletme sonrası daidzein içeriği ~% 77 oranında (başlangıç konsantrasyonuna göre daidzein içeriği % 23'lere düşmüş) azalmıştır. Uygulanan sıcaklık derecesi ve maruz bırakılan zaman pastörizasyon, kutuda sterilizasyon ve UHT’deki koşullara göre 95 °C/0-60 dakika, 121 °C/0-10 dakika ve 140 °C’de/0-90 saniye’dir. Ancak, soya sütlerinin 121 °C’de 5 dakika tutulması durumunda yaklaşık daidzeinin % 87’sinin ve genisteinin ise % 17’sinin tahrip olacağını ifade etmişlerdir.¹¹⁴

Grün ve ark.¹¹⁵ ise tofu içerisindeki izoflavonların sıcaklık (80, 90 ve 100 °C) ve bu sıcaklıklarda tutulma süresiyle [0 (kontrol), 10, 20, 30 ve 40 dakika] nasıl değiştiğini saptamışlardır. İzoflavon içeriği ters faz-HPLC (ters faz kolon: C18 kolonu (25 cmx4.6 mm i.d., 5 µm); UV: 254 nm; hareketli faz: A: % 0.1 glasiyel asetik asit-su ve B: % 0.1 glasiyel asetik asit-asetonitril) tayin yöntemiyle analiz edilmiştir. 80 °C’de 40 dakika bekletme sonrasında daidzeinin ~% 80’inin hala korunduğu, 100 °C’de aynı süreyle bekletildiğinde ise daidzeinin % 47’sinin korunduğu tespit edilmiştir.

Ungar ve ark.¹¹⁶ tarafından da daidzein ve genisteinin termal stabilitesi incelenmiştir. Daidzeinin ve genisteinin iki farklı pH’ya (pH 7 ve 9) sahip çözeltileri hazırlanmış ve farklı sıcaklıklarda (70, 80, 90 ve 120 °C) stabilitesi değerlendirilmiştir. İzoflavonlar için degradasyonun 1. derece kinetikle gerçekleştiği, 90 °C’de daidzeinin pH

7 ve 9 ortamlarındaki çözeltileri için bulunan E_a (aktivasyon enerjisi) değerlerinin sırasıyla 21.69 kcal/mol ve 8.38 kcal/mol olduğu saptanmıştır. Daidzein ve genisteinin yüksek sıcaklıklara maruz kaldığında degradasyona uğradığı, alkali çözeltilerde daidzeinin genisteine (~% 60 azalma) göre termal uygulamadan (120 °C, 20 dakika) daha az etkilendiği ve daidzein konsantrasyonunda % 15 gibi küçük bir azalmanın gerçekleştiği görülmüştür. Ancak, nötral pH'da ise daidzeinin genisteine (% 22 azalma) göre daha az stabil olduğu ve daidzein içeriğinde % 40'a varan bir azalmanın gerçekleştiği belirtilmiştir.

Bununla birlikte, Nemitz ve ark.'nın¹¹⁷ yaptıkları bir çalışmada ise izoflavon içeren nanoemülsiyon ve jel formülasyonlarını hazırlamışlar ve izoflavonların (daidzein, glisitein, genistein) stabilitesinin değerlendirilmesi amacıyla ultra-hızlı sıvı kromatografisi (UFLC) yöntemi geliştirilmiş (% 0.1 trifloroasetik asit çözeltisi ve asetonitril hareketli faz olarak kullanılmış, 260 nm'de tayin gerçekleştirilmiş) ve valide edilmiştir. Hazırlanmış olan standart çözeltilerin stabilitesi (asidik, alkali ve nötral koşullarda, oksidasyon ve termal stres açısından) değerlendirilmiştir. 25 °C ve 60 °C'de 6 saatlik maruziyet sırasında oksidatif, asidik ve nötral koşullarda izoflavonlarda önemli bir değişim olmadığı saptanmıştır. Ancak, alkali koşullarda 60 °C'de 6 saat bekletme sonrası daidzeinin % 50'den, genisteinin ise % 20'den fazla oranda degradasyona uğradıkları saptanmıştır.

Zhao ve ark.⁶⁴ daidzeinin sudaki çözünürlüğünün artırmak üzere daidzein ile poliamido amin (G3 PAMAM) ve polipropilen imin (G4 PPI) dendrimerleri ile inklüzyon komplekslerini hazırlamışlardır. Dendrimerlerin varlığında ve yokluğunda, 1 ay boyunca daidzein stabilitesi takip edilmiştir. Daidzein, 28.5 µM dendrimer içeren ve içermeyen DMSO:distile su (8 mL; 55:45, h/h) karışımı içerisinde çözündürülmüştür. Daidzein konsantrasyonu her 2 günde bir olacak şekilde 30 gün boyunca HPLC kullanılarak [C18

kolonu (150x4.6 mm i.d., 5 µm); hareketli faz: metanol:su (50:50, h/h); akış hızı: 1 mL/dakika; UV: 254 nm] analiz edilmiştir. Ancak, stabilite takibinin hangi sıcaklıkta yapıldığı ile ilgili bilgi verilmemiştir. Bu çalışma sonucunda, 30 gün boyunca daidzeinin dendrimer yokluğunda ortamda % 100 oranında, G3 PAMAM ve G4 PPI dendrimerleri varlığında ise % 94 ve % 84 oranlarında korunduğu saptanmıştır. Dendrimer varlığında daidzein için görülen azalmanın agregasyon, inklüzyon veya çökmelerden (dendrimerin katyonik grupları ile daidzeinin negatif yüklü grupları arasındaki etkileşim sonucu oluşurlar) kaynaklandığı, G3 PAMAM-daidzein komplekslerinin G4 PPI-daidzein komplekslerine (daha hidrofobik iç yüzey ve daha küçük boyut yüzünden) göre daha iyi bir stabiliteye sahip olduğu raporlanmıştır.

2.8. Glioblastoma Multiforme

Klinikte, beyin tümörlerinin tedavisine yönelik olarak cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi uygulamaları mevcut olmasına rağmen, hızlı gelişimi ve kötü prognozu nedeniyle beyin tümörleri hala aşılması gereken önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. GLOBOCAN 2008'e göre, malign beyin tümörlerinin dünya çapındaki insidansı 3.5/100000 ve günde ~650 kişiye de malign beyin tümörü teşhisi konmaktadır.^{118, 119} GLOBOCAN 2012'ye göre, beyin ve sinir sistemi tümörlerinin dünya çapındaki insidansı 3.4/100000'dir.¹²⁰ Amerika Birleşik Devletleri'nde 2015 yılında beyin tümörleri ve diğer sinir sistemi tümörlerine göre tahmini 22850 yeni vakanın ve 15320 ölümün meydana geleceği raporlanmıştır.¹²¹ Glioma en sık görülen beyin tümörüdür (tüm primer beyin ve merkezi sinir sistemi tümörlerinin % 29'unu oluşturur). Tedavi olmayan hastalar için ortalama yaşam süresi en fazla 3 ay iken, kombinasyon halinde tedavi alan hastalar için ise ortalama yaşam süresi 20 aydan azdır.^{118, 119}

Beyin tümörlerinin sınıflandırılmasında farklı yaklaşımlar mevcuttur. Tümörün kaynaklandığı hücre grubuna göre sınıflandırmada, glial hücreler, astrositler ve

oligodendrositlerden kaynaklanan tümörler gliomlar olarak adlandırılmaktadır.¹²² Gliomların histolojik sınıflandırması tümör hücrelerinin normal hücrelerle morfolojik benzerlikleri temel alınarak yapılmaktadır. Bundan dolayı, birçok gliom oligodendroglial, astrositik, oligo-astroitik veya ependimal tümör olarak DSÖ tarafından sınıflandırılmaktadır. Astrositik tümörler sık görülen tümörlerdir. Yetişkinlerde oligodendroglial, astrositik ve oligoastroitik tümörlerin beyin çevre dokularına infiltrasyonu söz konusudur (diffüz gliomlar olarak da adlandırılırlar). Bunlar, DSÖ tarafından I-IV arasında yer alacak şekilde derecelendirilmiştir.^{123, 124}

- ✓ Derece I: Piloitik Astrositom
- ✓ Derece II: Diffüz Astrositom
- ✓ Derece III: Anaplastik Astrositom
- ✓ Derece IV: GBM

Derece III ve IV, yüksek dereceli gliomlar ya da malign gliomlar olarak değerlendirilirler.¹²⁴ GBM en yaygın görülen, çok hızlı seyir gösteren ölümcül bir primer beyin tümörüdür. Tüm gliomların % 51'inden fazlasını oluşturmaktadır.¹²⁵⁻¹²⁷ GBM, genel olarak intrakranial bölgede sınırlıdır. Ancak, seyrek de olsa hastalığın geç evrelerinde metastaz yaptığı (servikotorakalintrameduller, konus medullaris, spinal leptomeningeal, kemik) görülmüştür.^{122, 128, 129} Yoğun terapötik uygulamalara ve destekleyici bakıma rağmen, yeni teşhis edilen GBM hastalarının ortalama yaşam süresi müdahale sonrasında ~14 aydır ancak % 5'den daha az oranda 5 yıl hayatta kalım süresi görülmüştür.^{124, 125} Birincil GBM'nin erkeklerde görülme sıklığı kadınlara göre 3 kat fazladır. Birincil GBM, gençlerde nadiren görülmektedir ve görülen tüm merkezi sinir sistemi tümörlerinin sadece % 8.8'ini oluşturmaktadır.¹²⁷

Yüksek dereceli gliomada cerrahi işlem en önemli tedavi seçeneğidir ve hastanın yaşam süresinde en etkili tedavi yoludur. Tam veya tama yakın rezeksiyon sonrası

radoterapi ve kemoterapi bir arada kullanılmaktadır. Kemoterapötik ajanların tek veya kombinasyon halinde kullanımlarından hiçbirisi yaşam süresinin uzatılmasında (1 yıldan az) henüz bir üstünlük gösterememiştir. Bu nedenle, konvansiyonel kemoterapi seçeneklerinin yanı sıra tedavide yeni yaklaşımlar denenmektedir.¹³⁰⁻¹³³

2.9. Hücre Kültürü

Hayvan deneylerinin giderek kısıtlanması, hücre kültürü çalışmalarının kullanımını artırmıştır. Özellikle, 1950'li yılların başında hücre kültürü alanında sağlanan gelişmeler bilimsel alanda önemli ilerlemelere neden olmuştur.¹³⁴ Hücre kültürü çalışmalarında, primer kültürler (doğrudan dokulardan elde edilir), hücre hatları ve hücre suşları kullanılabilmektedir.^{135, 136} Hücre kültürleri, çok farklı amaçlarla [örn. virüs üretiminde/tanımlanmasında, aşı üretiminde, yeni ilaç araştırma ve geliştirme çalışmalarında (özellikle kansere karşı) vb.] yoğun bir şekilde kullanılmaktadır.

Hücre kültürü çalışmalarının üstünlüklerinin yanı sıra birtakım sakıncaları da söz konusudur.^{137, 138}

Üstünlükleri

1. Hücre kültür ortamında, pH, sıcaklık, ozmotik basınç, O₂ ve CO₂ kısmi basınç gibi fizikokimyasal koşulların daha iyi kontrol edilebilmesi,
2. Hormon ve besin konsantrasyonlarının kontrol edilebilmesi,
3. Hücre hattı homojenitesinin (hücre klonlama, seçici ortam kullanımıyla) kontrol edilebilmesi,
4. Hücre hatlarının kolaylıkla karakterize (sitoloji, DNA profillemesi, immün boyama ile) edilebilmesi,
5. Hücre kültürü çalışmaları yapılarak hayvan deneylerinde karşılaşılan yasal ve etik problemlerin giderilmesi,
6. Orijinlerinin, saflıklarının ve elde edilme tarihlerinin doğrulanıp kayıt altında

tutulabilmesi,

7. Bilimsel araştırmalar için hayvan kullanımının azaltılmasına imkân sağlaması.

Sakıncaları

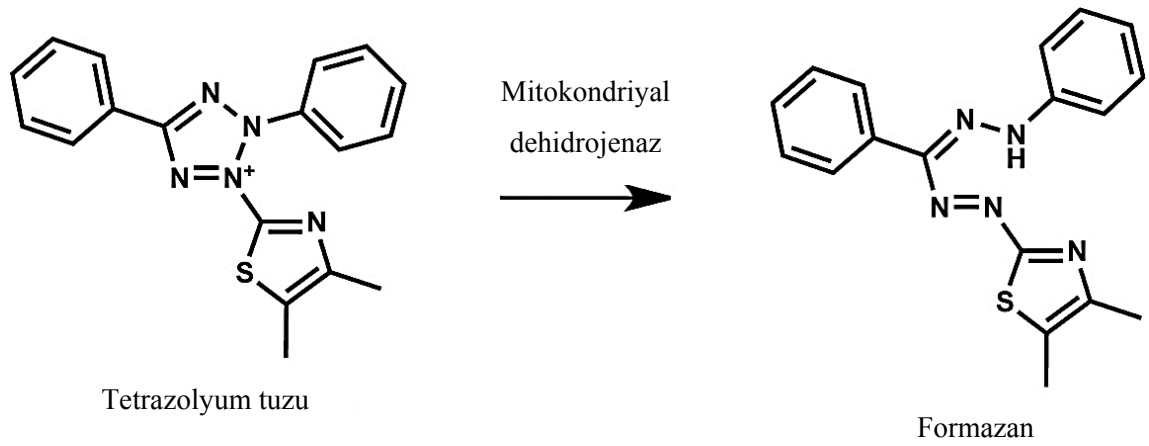
1. Hücre kültürü çalışmalarının uzmanlık gerektirmesi (aseptik koşulların sağlanması, kimyasal ve mikrobiyal kontaminasyonun önlenmesi, hatalı tanımlamanın nlenmesi),
2. Hücre kültüründe kullanılan materyallerin maliyetli olması (kullanılan ortam, serum, tek kullanımlık sarf malzemeler),
3. Genetik dayanıksızlığın (heterojenite, değişkenlik) ve fenotipik dayanıksızlığın (farklılaşma, adaptasyon, seçici aşırı büyüme) görülebilmesi,
4. Hücre tanımlanması ile ilgili bazı zorluklarla karşılaşılabilmesi (apraz kontaminasyon riski, hücre karakterizasyonu için stabil marker gerekliliği).

2.10. Sitotoksisite alışması ve MTT Tayini

Sitotoksisite terimi, ilaç araştırma ve geliştirme alanında iyi tanımlanamamış geniş bir anlama sahiptir. *İn vitro* hücre kültürü sistemlerinde, bir bileşik ya da uygulama eğer hücrelerin yüzeyle tutunmasını engellerse, hücre morfolojisini değiştirirse, hücre büyümesini olumsuz etkilerse veya hücre ölümüne sebep olursa “sitotoksik” olarak değerlendirilmektedir.^{139, 140} Canlılık ve sitotoksisite çalışmalarında yaşayan hücre sayısını tespit için farklı yöntemlerden (rn. boyama, metabolik aktivite ölümüne dayalı testler vb.) faydalanılmaktadır. Ancak, bu yöntemlerin çoğu yüksek verimli tarama (high-throughout screening; HTS) için uygun olmayan, zaman alıcı, zahmetli ve hassasiyeti düşük yöntemlerdir.¹⁴⁰

Tim Mossman,¹⁴¹ hücre canlılığı tayini için kolorimetrik bir yöntem olan MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür] testini geliştirmiştir. MTT, yaşayan hücrelerin mitokondrilerinde (metabolik olarak aktif) bulunan dehidrojenazlar

tarafından mor renkli formazan (oluşumu canlı hücre sayısı ile doğru orantılı) bileşiğine dönüştürülür (Şekil 2.4). Daha sonra, formazan kristallerinin çözünmesini takiben standart plaka okuyucu kullanılarak kolorimetrik tayin gerçekleştirilir.¹⁴⁰ Bu yöntem, hücre canlılığını/sitotoksiteyi, hücre aktivasyonunu ve proliferasyonunu da tayin etmek için kullanılmaktadır.^{142, 143}



Şekil 2.4. MTT'nin formazana dönüşümü.¹⁴⁴

2.11. U-87 MG (American Type Culture Collection; ATCC® HTB-14™)

Hücre Hattı

Hücrelerin % 48'inde karakteristik 44 kromozom görülen hipodiploid hücre hattı olan U-87 MG'ye ait bazı özellikler aşağıda sıralanmıştır.¹⁴⁵

- ✓ Organizma: *Homo sapiens*, İnsan
- ✓ Doku: Beyin
- ✓ Hastalık: Glioblastoma; Astrositom; Derece IV
- ✓ Morfoloji: Epitelyal
- ✓ Kültür Özelliği: Adherent
- ✓ Biogüvenlik: Seviye 1
- ✓ Yaş: 44

- ✓ Cinsiyet: Erkek
- ✓ Irk: Kafkasyalı
- ✓ Saklama Koşulları: Sıvı Azot
- ✓ Kültür Koşulları: % 5 CO₂, 37 °C

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasal Maddeler	Firma
Absolü Alkol	Sigma-Aldrich [®] , ABD
Antibiyotik	Sigma-Aldrich [®] , ABD
B-27 [®] Supplement	Gibco [®] by Life Technologies, ABD
Daidzein	LC Laboratories [®] , Massachusetts, ABD
DCM	Sigma-Aldrich [®] , ABD
DMEM	Sigma-Aldrich [®] , ABD
DMSO	Alfa Aesar [®] , Almanya
DMSO	Merck [®] , Almanya
EA	Merck [®] , Almanya
FBS	Sigma-Aldrich [®] , ABD
Gelucire [®] 44/14	Gattefossé, Fransa
HBSS	Sigma-Aldrich [®] , ABD
HCl	Riedel-de Haën, Almanya
KH ₂ PO ₄	Merck [®] , Almanya
MTT	Sigma-Aldrich [®] , ABD
NaOH	Merck [®] , Almanya
NBM	Gibco [®] by Life Technologies, ABD
PLGA 50:50	Sigma-Aldrich [®] , ABD
PLGA 75:25	Sigma-Aldrich [®] , ABD
Polivinilpirolidon-İyot Kompleksi İçeren Çözelti	Poviiodeks, KİM-PA İlaç, Türkiye
PVA	Sigma-Aldrich [®] , ABD
RPMI 1940	Sigma-Aldrich [®] , ABD
Tripsin	Sigma-Aldrich [®] , ABD
Biyolojik Materyal	
U-87 MG Glioblastoma Hücre Hattı	ATCC [®] , HTB 14 [™] , ABD

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar.

Cihazlar	Firma
Çok Noktalı Manyetik Karıştırıcı	2mag, MIX 15 eco, Almanya
Distilasyon Cihazı	Gessellschaft für Labortechnik, GFL 2004, Almanya
Distilasyon Cihazı	MH943SBS, Megahome Corporation, Tayvan
DSC	Netzsch, STA 409 PC, Luxx [®] , Almanya
FT-IR Spektroskopisi	Perkin-Elmer, Spectrum One, ABD
Hassas Terazi	Shimadzu, AUW220D, Japonya
İnkübatör	NuAire, ABD
İnvert Mikroskop	Leica, ebq 100-04, İsviçre
Laminar Kabin	Class II, HEPA Filtreli, Tek Kişilik Kabin
Liyofilizatör	Martin Christ, Alpha 1-2 LD Plus, Almanya
Manyetik Karıştırıcı	Wisd Lab Instruments, Almanya
Mekanik Karıştırıcı	TH-02, Omni International, ABD
Mikroplak Okuyucu	μQuant [™] , BioTek [®] Ins., ABD
Mikrosantrifüj	Hettich, Micro 200, Almanya
Otoklav	Lisa 300, W&H, İtalya
pH Metre	Orion 3 Star [™] , ABD
Plak Çalkalayıcı	Titramax 100, Heidolph, Almanya
Rotavapor	Heidolph, 4001, Almanya
Santrifüj	Beckman Coulter [®] , Allegra X-30R, ABD
SEM	LEO 440, İngiltere
Soğutmalı Santrifüj	Kubota, 3780, Japonya
Ultra Saf Su Cihazı	Barnstead [™] , Thermo Scientific [™] , ABD
UV-VIS Spektrofotometre	Beckman Coulter [®] , DU 730, ABD
Vorteks	IKA [®] , MS 3 Basic, Almanya
Yatay Çalkalamalı Su Banyosu	Memmert, Almanya
Zetasizer	Malvern, 3000HS, İngiltere

3.2. Metot

3.2.1. Daidzeinin UV-VIS Spektrofotometre ile Miktar Tayini

DMSO:PB (pH 7.4, USP 30/NF 25), (1:1, h/h) karışımı içerisinde daidzeinin 100 µg/mL konsantrasyona sahip stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden hareketle 1, 5, 10 ve 20 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan seyreltik çözeltilerin spektrumları UV-VIS spektrofotometre kullanılarak 200-400 nm dalga boyu aralığında alınmıştır. Maksimum absorbansın elde edildiği dalga boyu (λ_{maks}) tespit edilmiştir. Deneyler süresince karanlık ortamda çalışılmıştır.

3.2.2. Daidzeine Ait Kalibrasyon Doğrusunun Elde Edilmesi

Daidzeinin DMSO:PB (1:1, h/h) karışımı içinde 100 µg/mL konsantrasyona sahip stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden hareketle uygun seyreltmeler yapılarak 2-6.5 µg/mL konsantrasyon aralığında 6 farklı konsantrasyonda standart çözeltiler hazırlanmış ve tespit edilen λ_{maks} 'da absorbans değerleri elde edilmiştir (n=6). Her bir konsantrasyon ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri grafiğe geçirilerek regresyon analizi yardımıyla kalibrasyon doğrusu ve yapılan tüm analizlerde kullanılmak üzere doğru denklemi elde edilmiştir.

3.2.3. Daidzein için Geliştirilen Analitik Yöntemin Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, geliştirilen miktar tayini yönteminin performans karakteristiğinin uygunluğunu ve güvenilirliğini ortaya koyan/garanti eden temel bir işlemdir.¹⁴⁶ Analitik yöntem validasyonu, verilerin kabul edilebilirliğini sağlar ve analizi yapılacak olan analit için seçilen yöntemin belirlenen koşullarda özgün, doğru, tekrarlanabilir olduğunun gösterir.^{146, 147}

Miktar tayini yönteminin validasyonu için incelenmesi öngörülen analitik parametreler şunlardır:¹⁴⁸

- ✓ Doğrusallık

- ✓ Doğruluk
- ✓ Kesinlik
 - Tekrarlanabilirlik
 - Tekrar Elde Edilebilirlik
- ✓ Saptama Sınırı (Limit of Detection, LOD)
- ✓ Miktar Tayini Sınırı (Limit of Quantification, LOQ)
- ✓ Özgünlük

Doğrusallık

Analitik bir yöntemin doğrusallığı, verilen bir aralıkta test sonuçlarının örnek içindeki analiz edilen madde konsantrasyonu ile doğrudan orantılı olmasıdır.¹⁴⁹ Doğrusallığın tespiti için etkin maddenin stok çözeltisinden hareketle 6 farklı konsantrasyonda ve her bir konsantrasyondan 6'şar adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve absorbensleri ölçülmüştür (259 nm). Doğrusallık bulunurken, her bir konsantrasyon ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen absorbens değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi (regresyon analizi kullanılarak) elde edilmiştir. Elde edilen veriler doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü yapılarak değerlendirilmiştir.

Doğruluk

Analitik bir yöntemin doğruluğu, elde edilen test sonuçlarının gerçek değerlere yakınlık derecesinin bir göstergesidir.¹⁵⁰ Doğruluk, analitik yöntemin hatasızlığının bir ölçüsüdür. Gün içi (intra-assay) doğruluk tespiti için 3 farklı konsantrasyondaki (kalibrasyon doğrusu aralığında bulunan) etkin madde çözeltileri hazırlanarak (n=6/konsantrasyon) absorbensleri aynı gün içerisinde ölçülmüştür. Aynı şekilde, günler arası (inter-assay) doğruluk tespiti için de 3 farklı konsantrasyondaki standart çözeltiler (n=6/konsantrasyon) hazırlanmış birbirini takip eden 3 gün boyunca absorbensleri

ölçülmüştür (259 nm). Başlangıçta hazırlanan konsantrasyon (a; µg/mL) ve deney sonucu tespit edilen ortalama konsantrasyon (b; µg/mL) değerleri kullanılarak % bağıl hata (% BH) hesaplanmış ve yöntemin gün içi ve günler arası doğruluğu değerlendirilmiştir (Şekil 3.1’de).^{151, 152}

$$\% BH = \frac{b - a}{a} \times 100$$

Şekil 3.1. % BH hesaplanmasında kullanılan eşitlik.^{151, 152}

Kesinlik

Analitik bir yöntemin kesinliği, normal deney koşulları altında yöntemin tekrarlanabilirliğinin, tekrar elde edilebilirliğinin bir ölçüsüdür ve birbirini izleyen ölçümler arasındaki yakınlığın derecesini ifade eden bir parametredir. Kesinlik, genellikle ölçümlerin bağıl standart sapması (BSS) ve varyasyon katsayısı (VK) ile ifade edilir.¹⁵³ Gün içi kesinlik (tekrarlanabilirlik) tespiti için 3 farklı konsantrasyon seçilerek standart çözeltileri hazırlanmış (n=6/konsantrasyon) ve absorbanları ölçülmüştür (259 nm). Günler arası kesinlik (tekrar elde edilebilirlik) tespiti için aynı şekilde standart çözeltiler hazırlanmış (n=6/konsantrasyon) ve birbirini takip eden 3 gün boyunca absorbanları ölçülmüştür. VK Şekil 3.2’de verilen eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$VK = \frac{\text{Standart Sapma (SS)}}{\text{Ortalama}} \times 100$$

Şekil 3.2. Varyasyon katsayısının hesaplanmasında kullanılan eşitlik.

LOD

LOD, var olan deneysel koşullar altında örnekteki maddenin saptanabilecek en

küçük miktardır.¹⁵⁴ LOD, Şekil 3.3’de verilen eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır (n=6).

$$\text{LOD} = \frac{\text{Regresyon Doğrularının Aynı Konsantrasyon Noktasında Elde Edilen} \\ y - \text{Kesişim Değerlerinin Standart Sapması}}{\text{Kalibrasyon Doğrusunun Eğimi}} \times 3.3$$

Şekil 3.3. LOD hesaplanmasında kullanılan eşitlik.

LOQ

LOQ, var olan deneysel koşullar altında örnekteki maddenin kabul edilebilir kesinlik ve doğrulukla tayin edilebildiği en küçük miktardır.¹⁵⁴ LOQ, Şekil 3.4’de verilen eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır (n=6).

$$\text{LOQ} = \frac{\text{Regresyon Doğrularının Aynı Konsantrasyon Noktasında Elde Edilen} \\ y - \text{Kesişim Değerlerinin Standart Sapması}}{\text{Kalibrasyon Doğrusunun Eğimi}} \times 10$$

Şekil 3.4. LOQ hesaplanmasında kullanılan eşitlik

Özgünlük

Özgünlük, bir analitik yöntemin sadece amaçlanan etkin maddeyi tayin edebilme yeteneğini gösterir.¹⁵⁵ Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında kullanılan maddelerin (PLGA, Gelucire® 44/14, PVA) ve ortamların içerdiği diğer yardımcı maddelerin ilgili dalga boyunda daidzeinin absorbansını etkileyip etkilemediğini ve analitik yöntemin etkin maddeye özgün olup olmadığını göstermek üzere daidzein içermeyen nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler uygun ortamlarda çözündürülerek süpernatantları elde edilmiştir. Süpernatantların UV spektrumları alınarak incelenmiştir.

3.2.4. Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanması

Çalışmamızda nanopartiküllerin hazırlanması için 2 farklı PLGA kopolimeri

kullanılmıştır. Bunlardan ilki PLGA Resomer® RG 756 S (D, L, PLA:PGA; 75:25)'dir. Amorf yapıda, Tg'si 49-55 °C ve ortalama molekül ağırlığı 76000-115000 Da aralığında olan ester sonlu bu kopolimerin, % 0.1'lik (a/h) CF içerisindeki çözeltisinin viskozitesi 0.71-1.0 dL/g (Ubbelohde kılcal viskozimetresi, 25 °C) olarak bildirilmiştir.^{156, 157}

Çalışmamızda kullanılan diğer PLGA olan Resomer® RG 502 (D, L, PLA:PGA; 50:50) de amorf yapıda, Tg'si 42-46 °C ve ortalama molekül ağırlığı 7000-17000 Da aralığında olan ester sonlu bir kopolimerdir. Bu polimerin % 0.1'lik (a/h) CF içerisindeki çözeltisinin viskozitesi ise 0.16-0.24 dL/g olarak raporlanmıştır (Ubbelohde kılcal viskozimetresi, 25 °C).^{158, 159}

Bu tez çalışmasında nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, modifiye edilmiş EO-ÇD (M-EO-ÇD) yöntemi^{160, 161} ve EO-ÇD yöntemi^{162, 163} kullanılarak hazırlanmıştır.

3.2.4.1. PLGA (75:25) Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin M-EO-ÇD Yöntemi Kullanılarak Hazırlanması

Boş PLGA (75:25) nanopartiküllerinin hazırlanması için; 50 mg PLGA'nın, 2.5 mL DCM:EA (1.5:1, h/h) içerisindeki çözeltisi çok noktalı manyetik karıştırıcı üzerinde 750 rpm'de, 1 saat karıştırılmış ve daha sonra bu karışıma 300 µL DMSO eklenerek organik faz hazırlanmıştır. Hazırlanan bu organik faz, çok noktalı manyetik karıştırıcı üzerinde % 1'lik (a/h) PVA'nın PB (pH 7.4) içerisindeki çözeltisine (5 mL) 26-Gauge (G) enjektör kullanılarak damlatılmış (1000 rpm) ve nanopartiküllerin oluşması için 3 saat karıştırılmıştır (1000 rpm). Daha sonra hazırlanan bu dispersiyon, yüksek hızlı mekanik karıştırıcı kullanılarak 15000 rpm'de, 10 dakika boyunca homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sonrasında elde edilen süspansiyon üzerine 5 mL ultra saf su ilave edilmiş ve 1000 rpm'de, 10 dakika karıştırıldıktan sonra sulu faza kısmi difüzyonu sağlanan DCM:EA, rotavapor kullanılarak ortamdan uzaklaştırılmıştır (40 °C, 5 dakika). Elde edilen nanopartikül süspansiyonuna ön santrifüj uygulanmış (15 °C, 500 rpm, 5

dakika) ve daha sonra hazırlanan nanopartikülleri toplamak üzere süpernatant alınarak 15 °C’de, 12500 rpm’de, 40 dakika santrifüj edilmiştir. Ultra saf su içerisinde süspande edilip -20 °C’de dondurulan nanopartiküller 0.021 mbar basınç altında ve -55 °C’de 24 saat liyofilize edilerek kurutulmuştur (F1-B, Tablo 3.3).

Daidzein-yüklü PLGA (75:25) nanopartikülleri için ise, sadece 5 mg daidzein, öncelikle 300 µL DMSO içerisinde çözündürülmüş ve daha sonra organik faza ilave edilmiştir (Şekil 3.5). Her bir formülasyon en az 3 kez hazırlanmıştır (F2-D, Tablo 3.3).

3.2.4.2. PLGA (75:25)-Gelucire® 44/14 Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin M-EO-ÇD Yöntemi Kullanılarak Hazırlanması

Boş PLGA (75:25)-Gelucire® 44/14 nanopartiküllerinin hazırlanmasında yukarıdaki protokolün aynısı uygulanmıştır. Sadece 50 mg PLGA (75:25) ve 50 mg Gelucire® 44/14, 5 mL DCM:EA (1.5:1) içerisinde çözündürülmüş ve % 1’lik PVA çözeltisinin miktarı da 10 mL olarak değiştirilmiştir. Her bir formülasyon en az 3 kez hazırlanmıştır (F3-BG, Tablo 3.3).

Daidzein-yüklü PLGA (75:25)-Gelucire® 44/14 nanopartikülleri için ise, sadece 5 mg daidzein öncelikle 300 µL DMSO içerisinde çözündürülmüş ve sonrasında organik faza ilave edilmiştir. Her bir formülasyon en az 3 kez hazırlanmıştır (Şekil 3.5, F4-DG, Tablo 3.3).

3.2.4.3. PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin EO-ÇD Yöntemi Kullanılarak Hazırlanması

Boş PLGA (75:25) (F5-B) veya boş PLGA (50:50) (F9-B) nanopartiküllerinin hazırlanması için; 50 mg PLGA (75:25) veya PLGA (50:50) 5 mL EA içerisinde çözündürülmüş (750 rpm, 30 dakika) ve daha sonra bu çözeltiye 300 µL DMSO eklenerek karıştırılmıştır (750 rpm). Hazırlanan bu organik faz, yüksek hızlı mekanik karıştırıcı kullanılarak 15000 rpm’de karıştırılan % 3’lük (a/h) PVA’nın PB (pH 7.4) içerisindeki

çözeltilisine (10 mL) 26-G enjektör kullanılarak damlatılmış ve homojenizasyonu (15 dakika) sağlanmıştır. Daha sonra, hazırlanan nanopartikül süspansiyonu alınarak çok noktalı manyetik karıştırıcı üzerinde 1000 rpm’de karıştır durumda olan 100 mL ultra saf su üzerine yavaşça ilave edilmiş ve 30 dakika karıştırıldıktan sonra hız 750 rpm’e düşürülerek karıştırma işlemi devam ettirilmiştir (5 saat). Bu sürenin sonunda, EA kalıntısı rotavapor kullanılarak (35 °C, 10 dakika) uzaklaştırılmış ve ön santrifüje (15 °C, 1000 rpm, 5 dakika) tabi tutulmuştur. Daha sonra süpernatant alınarak santrifüj edilmiş (15 °C, 12500 rpm, 40 dakika) ve çöken nanopartiküller ultra saf su içerisinde süspande edilip -20 °C’de dondurulduktan sonra liyofilize (0.021 mbar, -55 °C, 24 saat) edilmiştir (Tablo 3.3).

Daidzein-yüklü PLGA (75:25) (F6-D) ve PLGA (50:50) (F10-D) nanopartikülleri için ise, sadece 5 mg daidzein, öncelikle 300 µL DMSO içerisinde çözünmesi sağlandıktan sonra organik faza eklenmiştir (Şekil 3.6). Her bir formülasyon en az 3 kez hazırlanmıştır (Tablo 3.3).

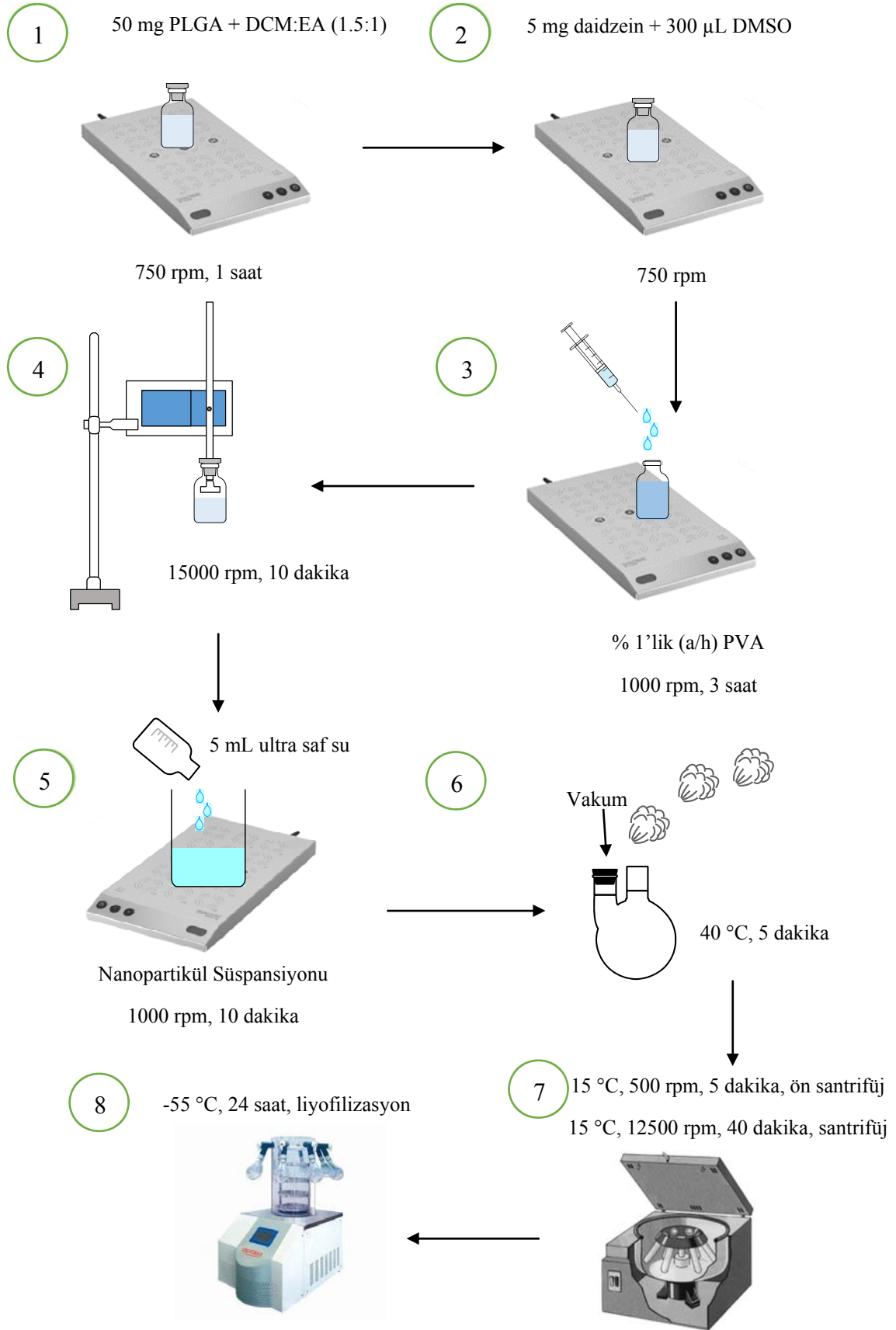
3.2.4.4. PLGA (75:25)-Gelucire® 44/14 ve PLGA (50:50)-Gelucire® 44/14 Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin EO-ÇD Yöntemi Kullanılarak Hazırlanması

Boş PLGA (75:25)-Gelucire® 44/14 (F7-BG) ve PLGA (50:50)-Gelucire® 44/14 (F11-BG) nanopartiküllerinin hazırlanmasında yukarıdaki protokolün aynısı uygulanmıştır. Sadece 25 mg Gelucire® 44/14 organik faza eklenmiştir. Her bir formülasyon en az 3 kez hazırlanmıştır (Tablo 3.3).

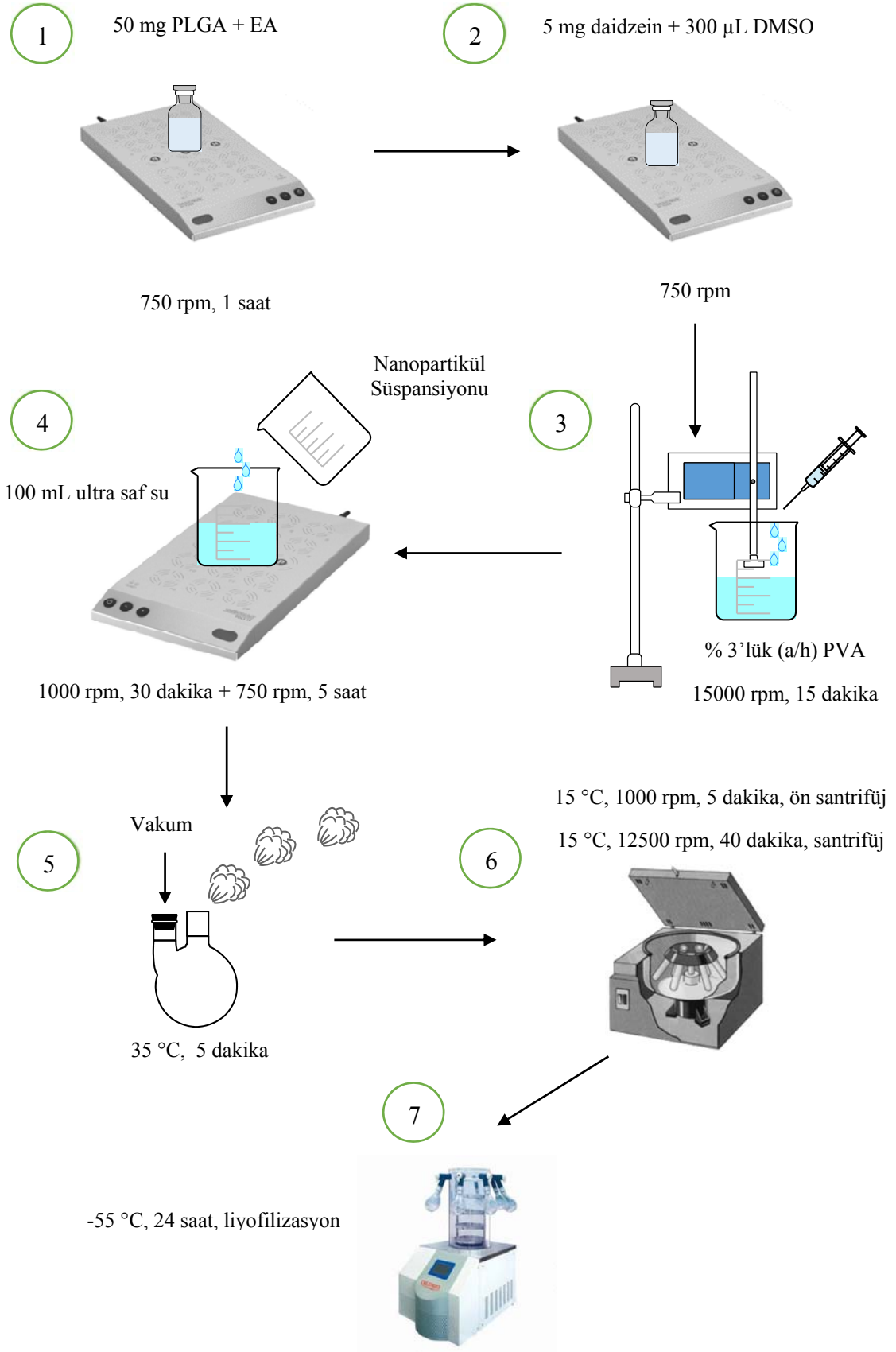
Daidzein-yüklü PLGA (75:25)-Gelucire® 44/14 (F8-DG) ve PLGA (50:50)-Gelucire® 44/14 (F12-DG) nanopartikülleri için ise, sadece 5 mg daidzein, öncelikle 300 µL DMSO içerisinde çözünmesi sağlandıktan sonra organik faza eklenmiştir. Her bir formülasyon en az 3 kez hazırlanmıştır. (Şekil 3.6, Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Hazırlanan PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartikül formülasyonları.

Formülasyon Kodu	PLGA	Organik Çözücü Hacmi (mL)	Gelucire® 44/14 Miktarı (mg)	Daidzein Miktarı (mg)	Sulu Faz Hacmi (mL)	Organik Faz/Su Fazı
DCM:EA (1.5:1, h/h)			% 1 PVA			
F1-B	75:25	2.5	-	-	5	1/2
F2-D	75:25	2.5	-	5	5	1/2
F3-BG	75:25	5	50	-	10	1/2
F4-DG	75:25	5	50	5	10	1/2
EA			% 3 PVA			
F5-B	75:25	5	-	-	10	1/2
F6-D	75:25	5	-	5	10	1/2
F7-BG	75:25	5	25	-	10	1/2
F8-DG	75:25	5	25	5	10	1/2
F9-B	50:50	5	-	-	10	1/2
F10-D	50:50	5	-	5	10	1/2
F11-BG	50:50	5	25	-	10	1/2
F12-DG	50:50	5	25	5	10	1/2



Şekil 3.5. Nanopartiküllerin M-EO-ÇD yöntemi ile hazırlanmasının şematik gösterimi.



Şekil 3.6. Nanopartiküllerin EO-ÇD yöntemi ile hazırlanmasının şematik gösterimi.

3.2.5. Hazırlanan Nanopartiküler Sistemlerin Karakterizasyonu

3.2.5.1. Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi

Hazırlanan daidzein-yüklü PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartiküllerin yüzey özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak tespit edilmiştir. Nanopartiküller, iki tarafı yapışkan bant aracılığı ile metal levhalar üzerine sabitlenmiş ve kaplama cihazı kullanılarak 100 Å kalınlıkta altın ile kaplanmıştır. Daha sonra nanopartiküllerin görüntüleri alınmıştır.

3.2.5.2. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel (ZP) Ölçümü

Taze hazırlanmış boş ve daidzein-yüklü PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartiküllerin partikül boyutu ve ZP ölçümü, Zetasizer 3000 HS cihazı kullanılarak yapılmıştır. Ölçümler, formülasyonların ultra saf su ile seyreltilmeleri (% 25 oranında) sonrası 25 °C’de gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.3. Hazırlama Verimi

Bu çalışma, nanopartikül hazırlama yöntemlerinin etkinliğini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Daidzein-yüklü nanopartikül formülasyonlarına ait hazırlama verimleri Şekil 3.7’de verilen eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır (n=3). Boş nanopartiküllerin hazırlama verimi değerleri ise hazırlanan boş nanopartikül miktarlarının sadece PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 toplam miktarına oranlanmasıyla hesaplanmıştır (Şekil 3.7, n=3).

$$\% \text{ Verim} = \frac{\text{Elde Edilen Nanopartikül Miktarı (mg)}}{\text{PLGA + Daidzein Miktarı (mg)}} \times 100$$

$$\% \text{ Verim} = \frac{\text{Elde Edilen Nanopartikül Miktarı (mg)}}{\text{PLGA + Gelucire® 44/14 + Daidzein Miktarı (mg)}} \times 100$$

Şekil 3.7. Hazırlama veriminin hesaplanmasında kullanılan eşitlikler.

3.2.5.4. Enkapsülasyon Etkinliği ve Yükleme Kapasitesinin (YK) Saptanması

Nanopartiküllere yüklenen daidzein miktarını tayin etmek için liyofilize boş ve daidzein-yüklü PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartikül formülasyonlarının her birinden 10'ar mg tartılmıştır (n=3). Her bir örneğe 5 mL EA ilave edilerek 2 dakika vortekslenmiştir. Ardından çok noktalı manyetik karıştırıcı üzerinde 750 rpm'de, 1 saat karıştırılmıştır. Daha sonra, bu karışım üzerine 10 mL DMSO:PB (1:1, h/h) karışımı ilave edilmiş, 1 dakika vortekslenmiş ve çoklu manyetik karıştırıcıya alınarak karıştırılmasının ardından rotavapor kullanılarak EA ortamdan uzaklaştırılmıştır (45 °C'de, 4 dakika). Daha sonra, örnekler 12500 rpm'de, 10 dakika santrifüjlenmiş ve UV-VIS spektrofotometre (259 nm) kullanılarak elde edilen süpernatantlardaki daidzein miktarı tayin edilmiştir. Kör olarak aynı şekilde hazırlanmış boş PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartiküler sistemlerin süpernatantları kullanılmıştır. Daidzein-yüklü formülasyonlar için % EE ve % YK değerleri hesaplanmıştır.

3.2.5.5. *In Vitro* Salım Çalışması

Salım çalışmasını yapmak üzere liyolize boş ve daidzein-yüklü PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartikül formülasyonlarının her birinden 10'ar mg tartılmıştır (n=3). Renkli şişelerde bulunan her bir örneğe 20'şer mL PB (pH 7.4) (37 °C) ilave edilmiş ve yatay çalkalayıcılı su banyosuna yerleştirilmiştir (37±0.5 °C; 50 rpm). Belirlenen zaman aralıklarında (0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72. saat ve devam eden saatlerde olmak üzere) 3'er mL örnek alınmış ve yerine eşit hacimde taze salım ortamı (37 °C) ilave edilmiştir. Alınan örnekler, 12500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantları alınarak UV-VIS spektrofotometre (259 nm) kullanılarak analiz edilmiştir. Kör olarak boş PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartiküler sistemlerin salım örnekleri kullanılmıştır. % Kümülatif salım değerleri hesaplanmış ve veriler grafikler halinde sunulmuştur.

3.2.5.6. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

DSC yöntemi maddelerin termal özelliklerinin ve stabilitelerinin incelenmesi amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır.¹⁶⁴ Genellikle saf haldeki etkin maddenin başta polimer olmak üzere formülasyonda bulunan çeşitli yardımcı maddelerle olan etkileşimi hakkında bilgi edinilebilmesi amacıyla kullanılması yanı sıra özellikle etkin maddenin nanopartikül formülasyonundan önceki ve sonraki durumunun termal özelliklerini belirlemek amacıyla yararlanılmaktadır.^{165, 166} Tez çalışması kapsamında saf etkin maddeye, PLGA (75:25)'ye, PLGA (50:50)'ye, Gelucire® 44/14'e, kopolimer-etkin madde/kopolimer-Gelucire® 44/14-etkin madde fiziksel karışımlarına ve hazırlanan tüm nanopartikül formülasyonlarına ait DSC analizleri yapılmıştır.

Kullanılan DSC analiz şartları aşağıda verilmiştir:

- Atmosfer: Azot (60 mL/dakika).
- Sıcaklık aralığı: 20-400 °C.
- Sıcaklık yükseltme hızı: 10 °C/dakika.
- Referans: Alumina
- Standart (In, Sn, Pb, Al, Pd, Ni, Au, Zn)

3.2.5.7. Fourier Dönüşümlü-Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi Analizi

FT-IR spektroskopisi, yapıdaki kimyasal bileşimi ve bağ düzenlemelerini aydınlatmak için kullanılan önemli tekniktir. Yapıda var olan çeşitli bağların titreşim frekansları bu teknikle ölçülür ve yapıdaki fonksiyonel gruplar hakkında bilgi edinilir.¹⁶⁷ Tez çalışması kapsamında saf etkin maddenin, PLGA (75:25)'nin, PLGA (50:50)'nin, Gelucire® 44/14'ün, kopolimer-etkin madde/kopolimer-Gelucire® 44/14-etkin madde fiziksel karışımlarının ve hazırlanan tüm nanopartikül formülasyonlarının KBr diskleri hazırlanmış ve FT-IR kullanılarak IR spektrumları 4000-400 cm⁻¹ aralığında alınmıştır.

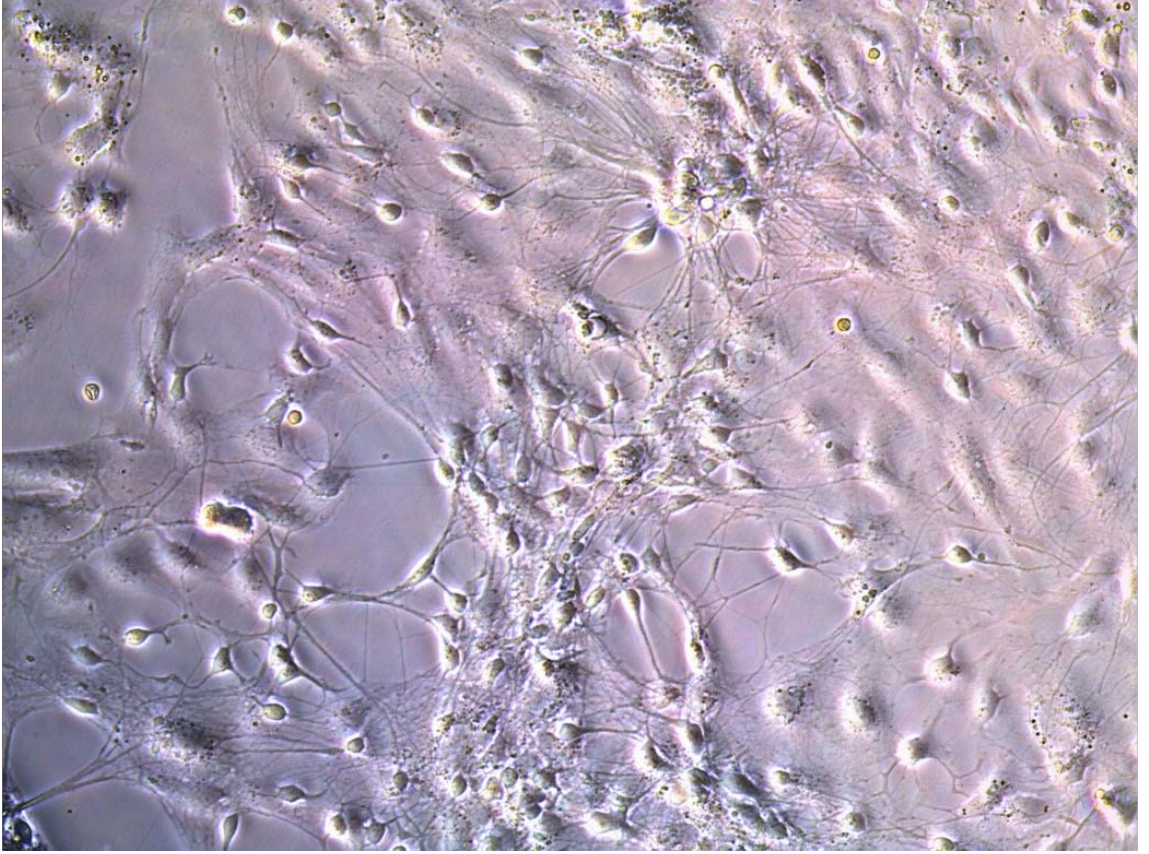
3.2.6. Hücre Kültürü Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında hücre kültürü çalışmaları Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji AD'nda gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.1. Nörotoksisite Testi

Nöron hücreleri üzerinde yapılan nörotoksisite testi için, öncelikle yeni doğmuş (birkaç saatlik) 9 adet Sprague-Dawley cinsi sıçan kullanılmıştır.^{168, 169} Sıçanlar öncelikle polivinilpirolidon-iyot kompleksi içeren çözelti (% 10, a/h) ile yıkandıktan sonra steril laminar kabin içerisinde dekapite edilmiştir. Kafa kısmının derisi ve kafatası çıkarıldıktan sonra beyin korteksi dikkatli bir şekilde ayrılmıştır. Ayrılan korteksler önce nörobazal ortama (NBM: Neurobasal Medium) konmuştur. Tüm cerrahi işlemler bittikten sonra NBM'den arındırılmış korteksler bir petri kabına konarak makro parçalama yapılmıştır. Parçalanan kortekslerin mikro parçalanmasını sağlamak için 1/3 oranında tripsin eklenmiş ve 37 °C ile % 5 CO₂ şartlarını sağlayan inkübatörde 15 dakika bekletilmiştir. Ardından, 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant atılmış ve üzerine Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) eklenmiştir. Tekrar santrifüj edildikten sonra süpernatant atılıp kültür ortamı [fetal sıgır serumu (FBS; 1/10, h/h), antibiyotik (10000 IU Penisilin/mL, 10 mg Streptomisin/mL, 25 µg Amfoterisin B/mL; 1/1000, h/h) ve B-27 katkılı NBM (1/50, h/h)] hücrelerin üzerine eklenmiştir (Şekil 3.8). Hazırlanan ve hemositometre ile sayılan nöron hücreleri 1x10⁵ hücre/kuyucuk (300 µl) olacak şekilde dibinde polilizin olan 48 kuyucuklu plaklara ilave edilmiş ve inkübatöre yerleştirilmiştir (37 °C, % 5 CO₂). 3 günde bir olmak üzere 3 kez kuyucuklardaki kültür ortamı, 2/3 oranında taze yaşam ortamıyla değiştirilmiştir. 10. gün sonrasında kuyucuklardaki nöronlar kuyucukların tabanını kaplayacak kadar yeterli sayıda uzantılara sahip olduğu zaman, kültür ortamı içerisinde hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki saf daidzein çözeltisi, EO-ÇD yöntemi ile hazırlanan boş ve daidzein-yüklü PLGA ve PLGA-

Gelucire® 44/14 nanopartikül süspansiyonları (Tablo 3.4) 50 µL olacak şekilde kuyucuklara ilave edilmiştir (n=7). Plaklar 48 saat inkübe (37 °C, % 5 CO₂) edildikten sonra her bir kuyucuktan 260 µL ortam alınmış, kuyucuklara 10'ar µL MTT çözeltisi eklenmiş ve 4 saat inkübe (37 °C, % 5 CO₂) edildikten sonra 100 µL DMSO eklenmiştir. 20 dakika sonra ise 570 nm'de standart plak okuyucuda absorbanları ölçülmüştür. Uygulama yapılmayan kontrol grubu hücreleri kör olarak kullanılmıştır. % Hücre canlılığı, Şekil 3.9'da verilen eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.8. Nöron hücrelerine ait mikroskopik görüntü.

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = \frac{\text{Her Bir Gruba Ait Optik Dansite (OD) Değeri}}{\text{Kontrol Grubuna Ait OD Değeri}} \times 100$$

Şekil 3.9. % Hücre canlılığının hesaplanmasında kullanılan eşitlik.

Tablo 3.4. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan gruplar.

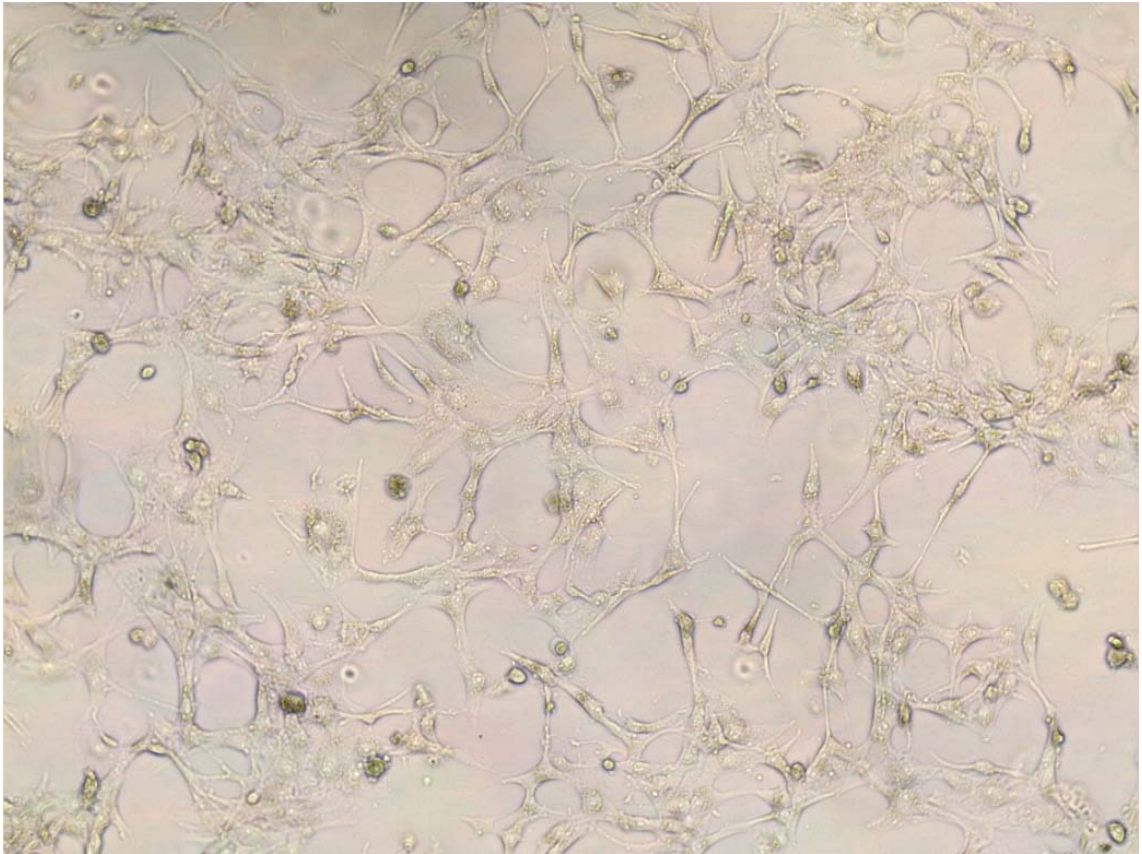
Kodlar	Açıklamaları
K	Kontrol; Uygulama yapılmamış
D-200	200 µM Daidzein
D-300	300 µM Daidzein
B-200	Boş PLGA NP ^a
B-300	Boş PLGA NP ^b
BG-200	Boş PLGA-Gelucire [®] 44/14 NP ^a
BG-300	Boş PLGA-Gelucire [®] 44/14 NP ^b
F6-D-200	Daidzein-yüklü PLGA (75:25) NP ^c
F6-D-300	Daidzein-yüklü PLGA (75:25) NP ^d
F8-DG-200	Daidzein-yüklü PLGA (75:25)-Gelucire [®] 44/14 NP ^c
F8-DG-300	Daidzein-yüklü PLGA (75:25)-Gelucire [®] 44/14 NP ^d
F10-D-200	Daidzein-yüklü PLGA (50:50) NP ^c
F10-D-300	Daidzein-yüklü PLGA (50:50) NP ^d
F12-DG-200	Daidzein-yüklü PLGA (50:50)-Gelucire [®] 44/14 NP ^c
F12-DG-300	Daidzein-yüklü PLGA (50:50)-Gelucire [®] 44/14 NP ^d

NP: Nanopartikül; a: 200 µM için kullanılan dolu NP'e eşdeğer miktarda; b: 300 µM için kullanılan dolu NP'e eşdeğer miktarda; c: 200 µM saf daidzeine eşdeğer miktarda; d: 300 µM saf daidzeine eşdeğer miktarda.

3.2.6.2. Sitotoksosite Testi

Kanser hücreleri (U-87 MG GBM, ATCC[®], ABD), sitotoksosite çalışması için sıvı nitrojen tankından alınarak hava akımlı kültür kabini içerisinde kültür ortamı [FBS (1/10, h/h), L-glutamat (1/100, h/h), antibiyotik (10000 IU Penisilin/mL, 10 mg Streptomisin/mL, 25 µg Amfoterisin B/mL; 1/100, h/h) ve RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 ortamı] bulunan 25 cm²'lik flasklara alınmış ve sonrasında inkübatöre (37 °C, % 5 CO₂) yerleştirilerek çoğaltılmışlardır (her 3 günde bir kültür ortamı değiştirilmiştir). % 70 doygunluğa ulaşan hücrelere pasaj işlemleri (pasaj sayısı 7) yapılmıştır. Daha sonra, kültür ortamı içinde süspande edilen tümör hücreleri (Şekil 3.10) 48 kuyucuklu plakların her bir kuyucuğuna hemositometre ile sayılmış hücrelerden 2x10⁵

hücre/kuyu (300 µL) olacak şekilde ilave edilmiş, inkübatöre (37 °C, % 5 CO₂) alınmış ve 3. günde kuyucuklardaki ortam taze kültür ortamıyla değiştirilerek çoğalmaları sağlanmıştır. 5. Gün sonrasında tümör hücreleri üzerine kültür ortamı içerisinde hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki saf daidzein çözeltisi, EO-ÇD yöntemi ile hazırlanan boş ve daidzein-yüklü PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartikül süspansiyonları (Tablo 3.4; n=7) 50 µL olacak şekilde uygulanmıştır. Plaklar 48 saat inkübe (37 °C, % 5 CO₂) edildikten sonra MTT uygulaması ve sonrasındaki işlemler Bölüm 3.2.6.1’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Uygulama yapılmayan kontrol grubu hücreleri kör olarak kullanılmıştır. % Hücre canlılığı, Şekil 3.9’da verilen eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.10. U-87 MG hücre hattına ait mikroskopik görüntü.

3.2.7. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS Statistics 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, ABD) paket programı ile yapılmıştır. One-Way ANOVA testi kullanılarak hücre kültürü çalışmalarına ait veriler değerlendirilirken, Mann-Whitney U testi kullanılarak da nanopartikül karakterizasyonuna ait veriler arasında farklılığın anlamlı olup olmadığı saptanmıştır ($p < 0.05$ olduğunda fark anlamlı kabul edilmiştir).

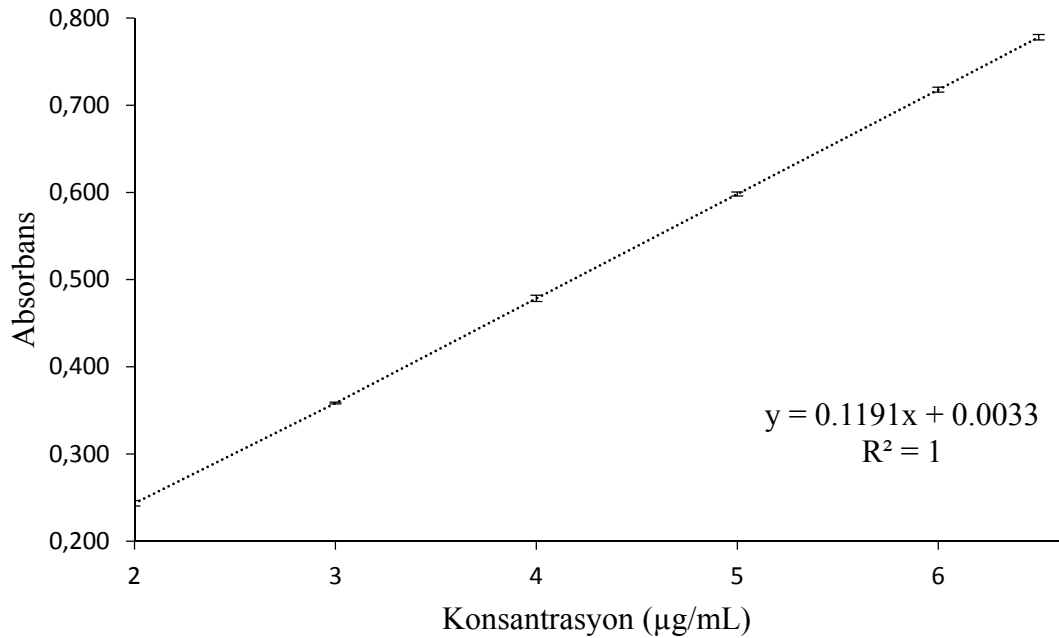
4. BULGULAR

4.1. Daidzeinin UV-VIS Spektrofotometre ile Miktar Tayini

Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı şekilde daidzeinin DMSO:PB (1:1, h/h) karışımı içerisinde hazırlanan çözeltilerinin UV spektrumları (200-400 nm dalga boyu aralığında) alınmış ve λ_{maks} 259 nm olarak tespit edilmiştir.

4.2. Daidzeine Ait Kalibrasyon Doğrusunun Elde Edilmesi

Daidzeine ait kalibrasyon doğrusu, Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı şekilde elde edilmiştir. Çalışma 6 seri üzerinden gerçekleştirilmiştir. Ölçülen absorbans değerleri ilgili konsantrasyon değerlerine karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğruları ve lineer regresyon ile doğru denklemleri elde edilmiştir. Her seri için elde edilen kalibrasyon doğrusuna ait eğimler karşılaştırılmış, VK değeri $< \% 1$ olarak bulunmuştur. Daidzeine ait kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Daidzeine ait kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi.

4.3. Daidzein İçin Geliştirilen Analitik Yöntemin Validasyonu

Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı şekilde analitik yöntem için gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerlerini tespit etmek üzere kalibrasyon doğrusu aralığında yer alan 2.5, 4.5 ve 5.5 µg/mL konsantrasyonları seçilerek standart çözeltileri hazırlanmış (n=6/konsantrasyon) ve aynı gün içinde arka arkaya ölçümleri gerçekleştirilerek gün içi değerler saptanmıştır. Daha sonra, aynı konsantrasyonlarda yine çözeltiler hazırlanarak (n=6/konsantrasyon) birbirini takip eden 3 gün içinde absorbansları ölçülmüş ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri saptanmıştır. Gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Analitik yönteme ait gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri.

	Hazırlanan Konsantrasyon (µg/mL)	Saptanan Konsantrasyon (µg/mL)^c	Doğruluk % BH	Kesinlik VK
Gün İçi^a	2.5	2.529±0.030	1.159	1.202
	4.5	4.501±0.017	0.016	0.367
	5.5	5.540±0.022	0.735	0.400
Günler Arası^b	2.5	2.496±0.016	-0.166	0.651
	4.5	4.441±0.026	-1.322	0.593
	5.5	5.471±0.026	-0.528	0.467

a: Her bir konsantrasyon için n=6; b: Her bir konsantrasyon için n=6/gün; c: Ortalama±SS.

Analitik yöntem için duyarlılık çalışması, Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı şekilde SS ve eğime göre değerlendirilerek saptama sınırı 0.104 µg/mL ve miktar tayini sınırı ise 0.316 µg/mL olarak tespit edilmiştir.

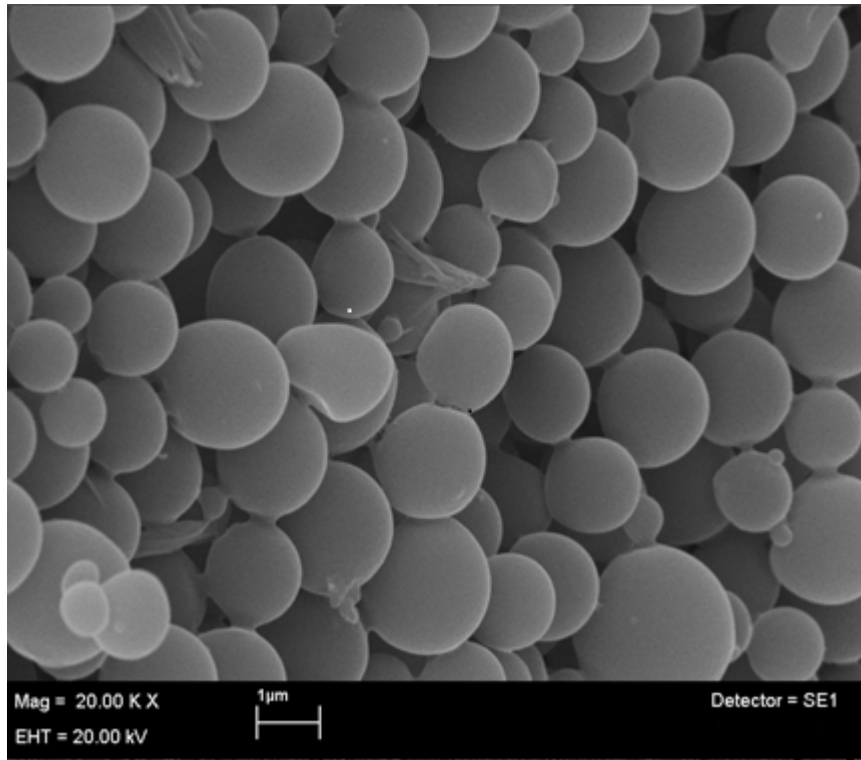
Analitik yöntemin özgünlüğü ise hazırlanan formülasyonlarda ve çalışma ortamlarında bulunan maddelerin etkin madde ile aynı şartlarda absorbans verip vermediğinin belirlenmesi amacıyla UV spektrumları alınmış ve daidzeinin maksimum

absorbans verdiği dalga boyunda ortam bileşenleri ve formülasyona giren yardımcı maddelerin absorbans vermedikleri saptanarak değerlendirilmiştir.

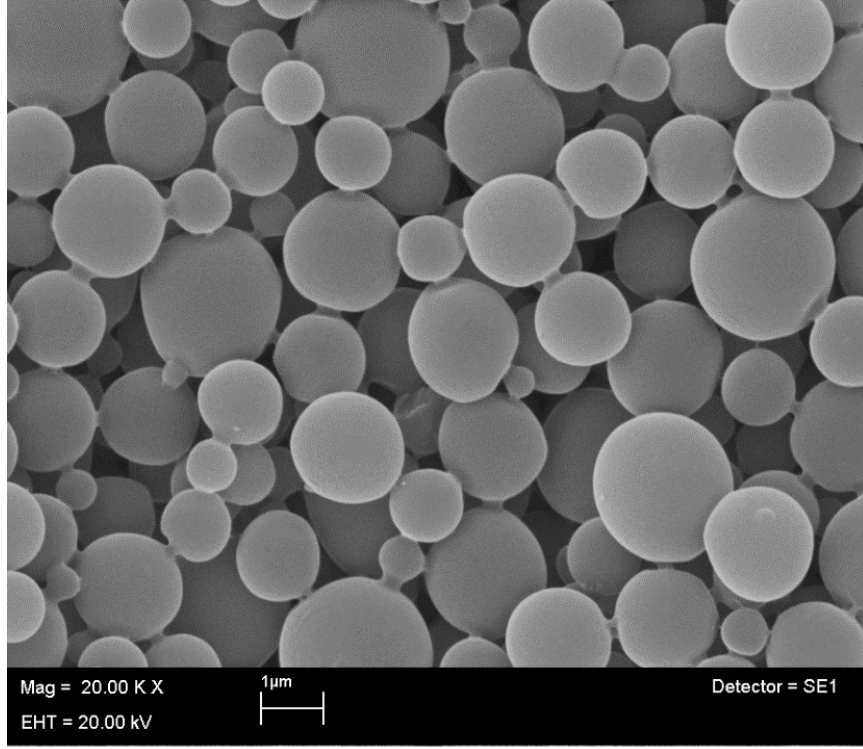
4.4. Hazırlanan Nanopartiküler Sistemlerin Karakterizasyonu

4.4.1. Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi

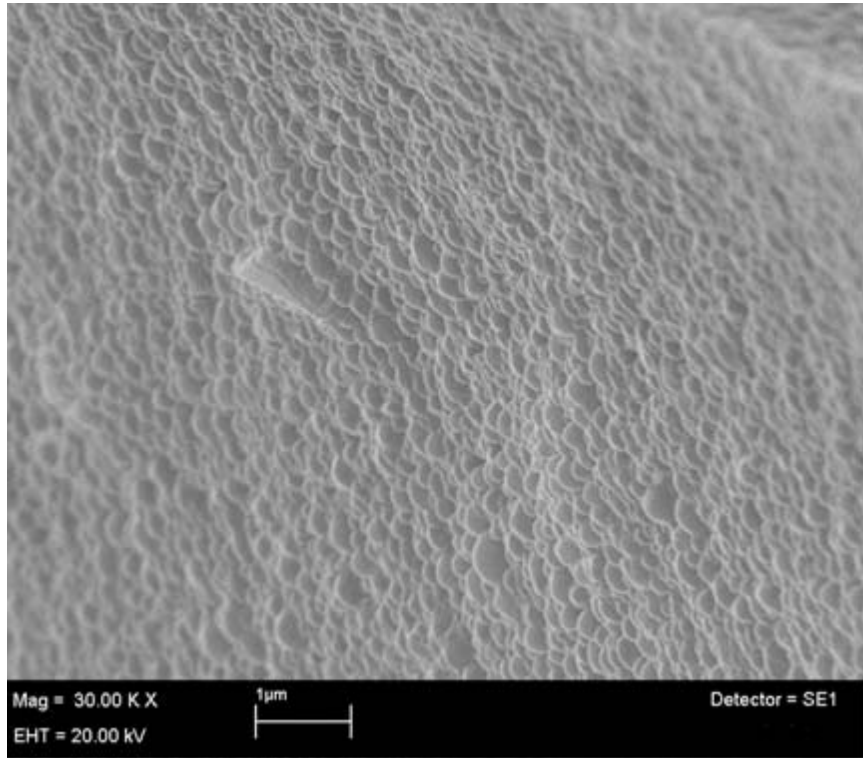
M-EO-ÇD ve EO-ÇD yöntemleri kullanılarak hazırlanan daidzein-yüklü PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartiküllerinin yüzey özelliklerinin incelenmesi Bölüm 3.2.5.1’de anlatıldığı şekilde SEM kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlgili SEM görüntüleri Şekil 4.2-Şekil 4.7’de verilmiş ve nano-boyutlu, yaklaşık küresel yapı ve M-EO-ÇD yönteminden farklı olarak EO-ÇD yöntemi ile agregasyona uğramış nanopartiküllerin elde edildiği görülmüştür.



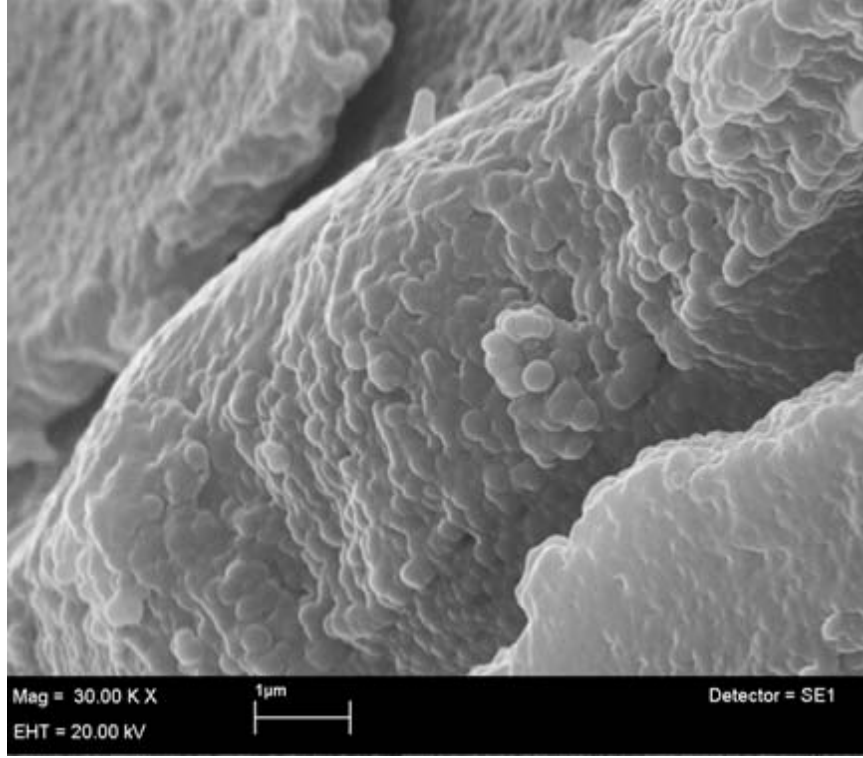
Şekil 4.2. F2-D kodlu nanopartiküllere ait SEM görüntüsü.



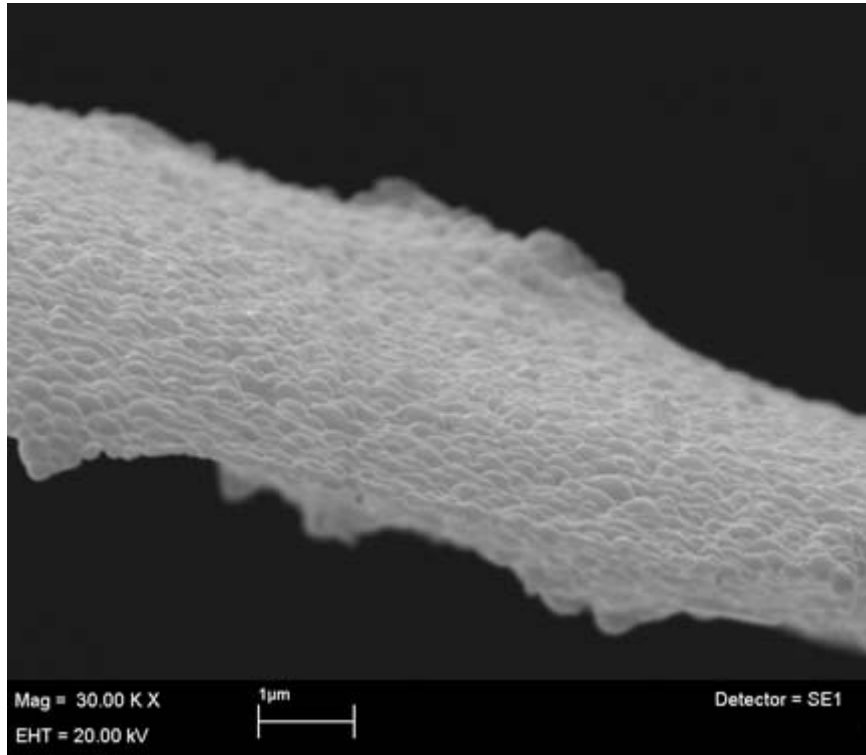
Şekil 4.3. F4-DG kodlu nanopartiküllere ait SEM görüntüsü.



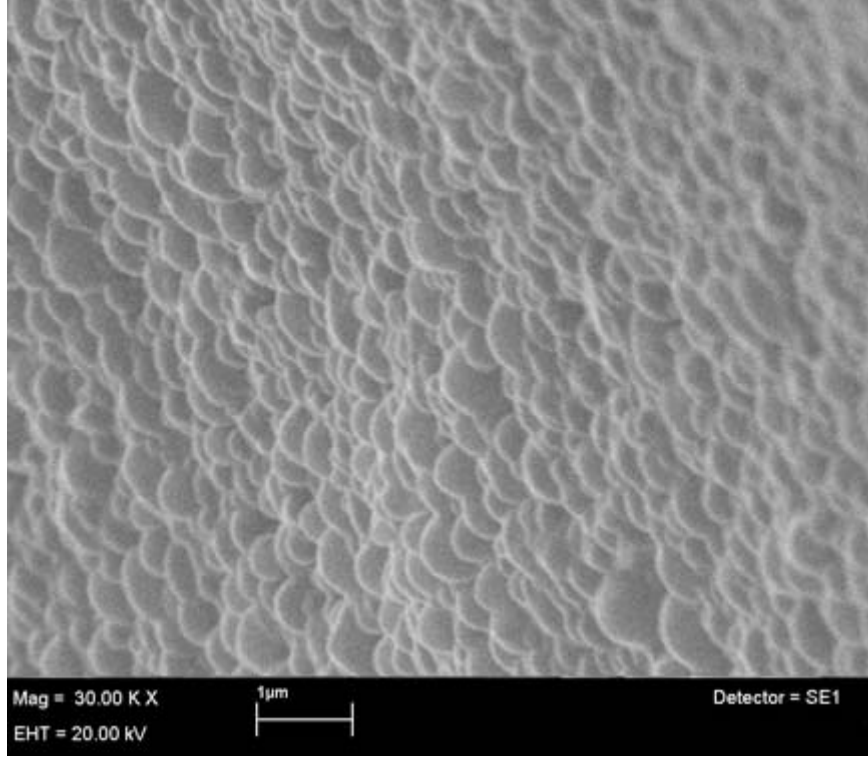
Şekil 4.4. F6-D kodlu nanopartiküllere ait SEM görüntüsü.



Şekil 4.5. F8-DG kodlu nanopartiküllere ait SEM görüntüsü.



Şekil 4.6. F10-D kodlu nanopartiküllere ait SEM görüntüsü.



Şekil 4.7. F12-DG kodlu nanopartiküllere ait SEM görüntüsü.

4.4.2. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümü

Taze hazırlanmış PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartikül formülasyonlarına ait partikül boyutu ve ZP verileri, Bölüm 3.2.5.2’de anlatıldığı şekilde tespit edilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Hazırlanan PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartiküllerine ait partikül boyutu ve ZP verileri (ortalama±SS).

Kodlar	Partikül Boyutu (nm) ^a	ZP (mV) ^b
F1-B	398.57±55.98	-0.55±0.61
F2-D	672.78±70.95	-3.83±0.28
F3-BG	228.13±14.72	-3.22±0.88
F4-DG	409.12±51.69	-14.70±0.36
F5-B	291.42±9.04	-0.50±0.34
F6-D	306.65±5.67	-1.92±0.13
F7-BG	198.52±7.04	-4.92±0.53
F8-DG	220.65±3.43	-5.21±0.49
F9-B	259.90±7.44	-0.88±0.32
F10-D	270.40±10.11	-14.57±1.91
F11-BG	234.85±8.16	-0.56±0.34
F12-DG	276.37±13.72	-12.13±1.53

a: n=6; b: n=3.

4.4.3. Hazırlama Verimi, Enkapsülasyon Etkinliği ve Yükleme Kapasitesinin Saptanması

Hazırlanan tüm PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartikül formülasyonlarına ait % hazırlama verimi bulguları Bölüm 3.2.5.3'te anlatıldığı şekilde saptanmıştır (Tablo 4.3).

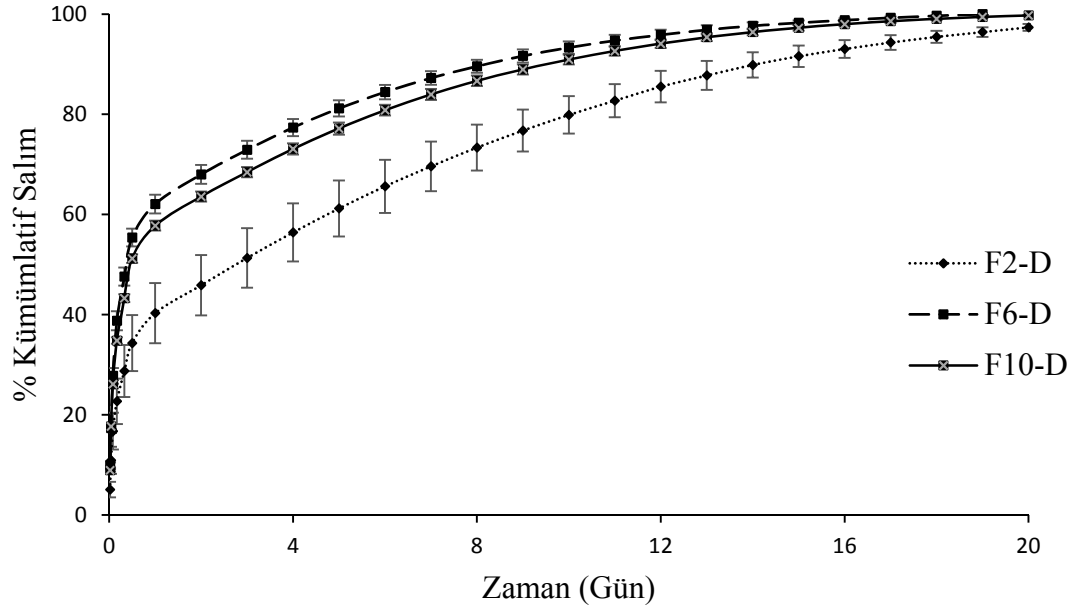
Daidzein-yüklü PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartikül formülasyonlarının % EE ve % YK verileri ise Bölüm 3.2.5.4'te anlatıldığı şekilde elde edilmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Hazırlanan PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartikül formülasyonlarına ait % hazırlama verimi, % EE ve % YK verileri (n=3; ortalama±SS).

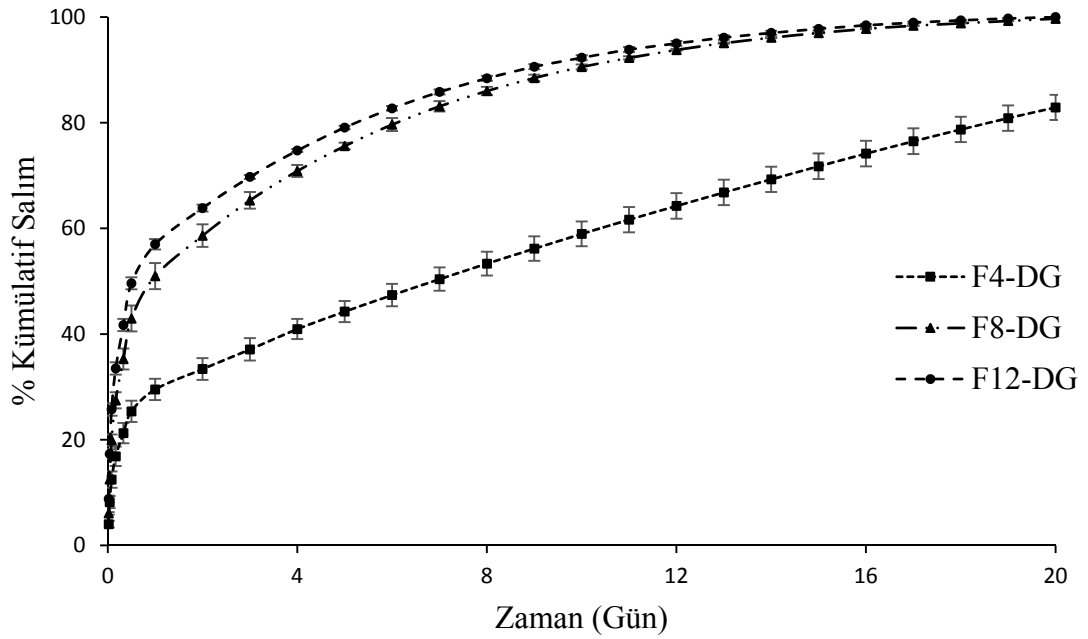
Kodlar	% Verim	% EE	% YK
F1-B	95.92±4.41	-	-
F2-D	96.79±0.19	45.00±0.19	4.23±0.01
F3-BG	95.05±3.17	-	-
F4-DG	96.21±2.19	84.85±2.20	4.20±0.12
F5-B	95.11±2.90	-	-
F6-D	97.48±1.02	41.94±0.88	3.91±0.11
F7-BG	63.52±2.14	-	-
F8-DG	65.79±2.25	35.79±3.43	3.41±0.41
F9-B	96.54±1.70	-	-
F10-D	87.11±0.48	44.01±1.92	4.59±0.19
F11-BG	69.69±2.93	-	-
F12-DG	62.78±4.55	40.00±2.38	4.00±0.46

4.4.4. *In Vitro* Salım Çalışması

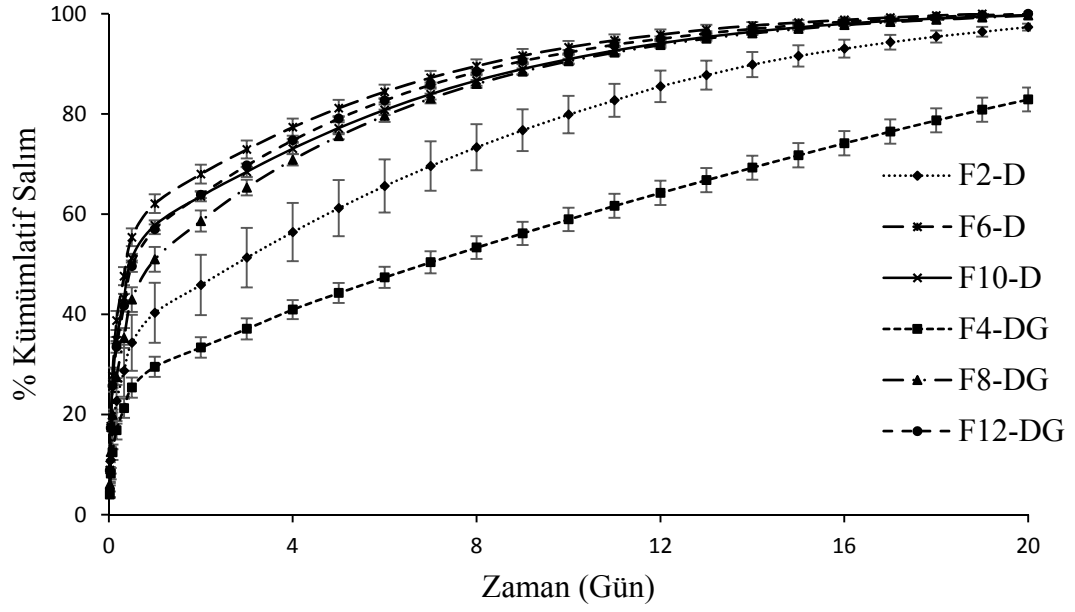
In vitro salım çalışmaları, Bölüm 3.2.5.5'te anlatıldığı şekilde PB (pH 7.4) içerisinde gerçekleştirilmiş, PLGA, PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartiküllerine ve tüm formülasyonlara ait salım grafikleri sırasıyla, Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verilmiştir. İlk 1 saatte F2-D, F6-D ve F10-D formülasyonlarından sırasıyla % 10.92±2.70, % 17.35±0.99 ve % 17.70±0.56, F4-DG, F8-DG ve F12-DG formülasyonlarından ise % 8.19±1.14, % 12.50±0.61 ve % 17.33±0.89 daidzein salımı gerçekleşmiştir. Tüm formülasyonlardan ~% 90 daidzein salımı ise salımın 15. (F2-D), 9. (F6-D), 10. (F10-D), 25. (F4-DG), 10. (F8-DG) ve 9. (F12-DG) günlerinde elde edilmiştir.



Şekil 4.8. Daidzein-yüklü PLGA nanopartiküllerine ait salım grafikleri (n=3; ortalama±SS).



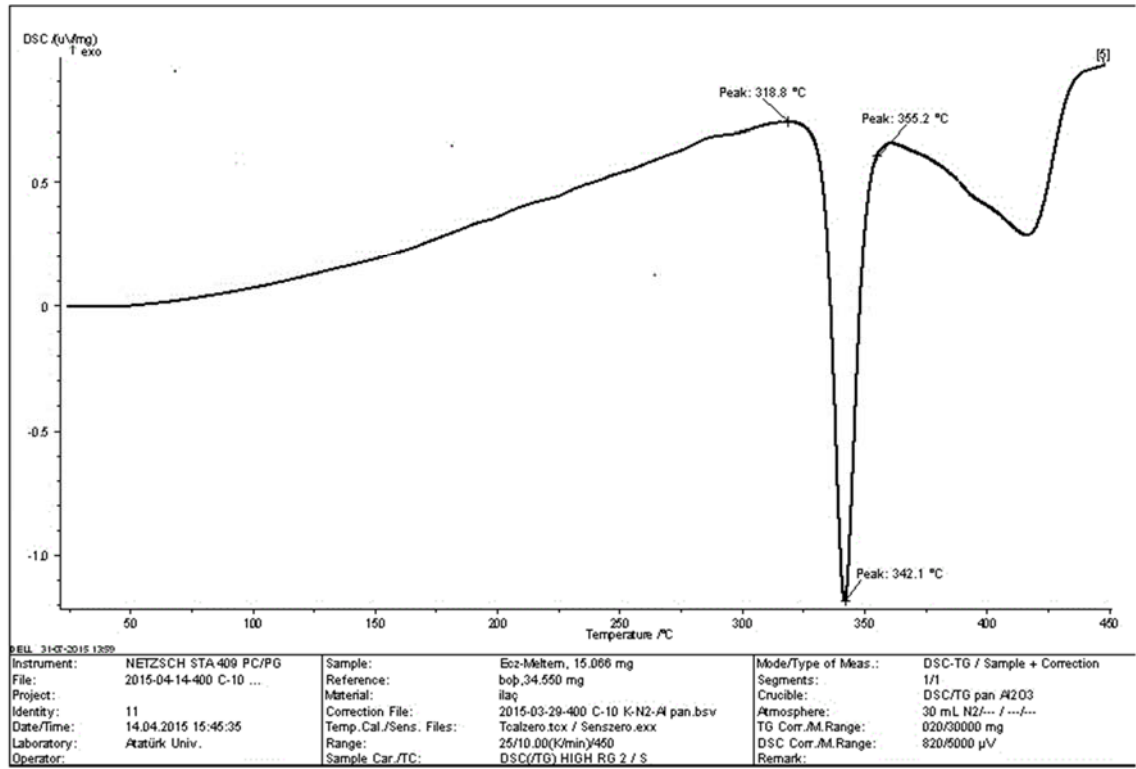
Şekil 4.9. Daidzein-yüklü PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartiküllerine ait salım grafikleri (n=3; ortalama±SS).



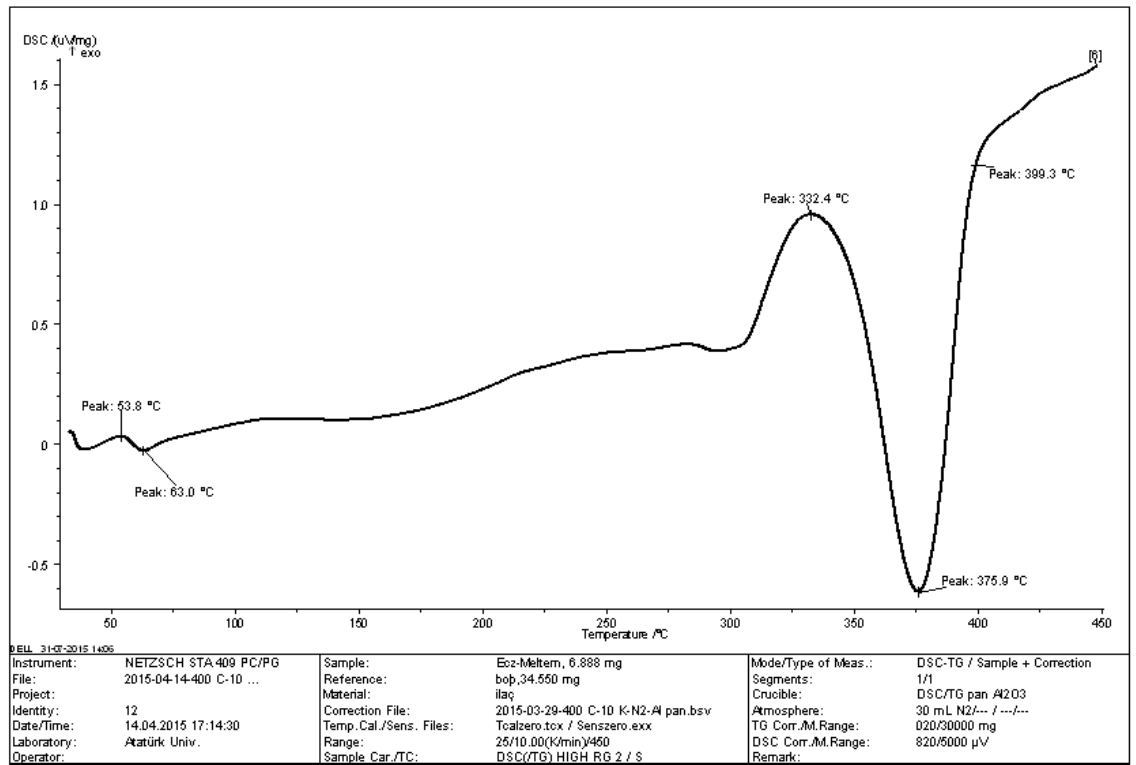
Şekil 4.10. Daidzein-yüklü PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartiküllerine ait salım grafikleri (n=3; ortalama±SS).

4.3.5. DSC Analizi

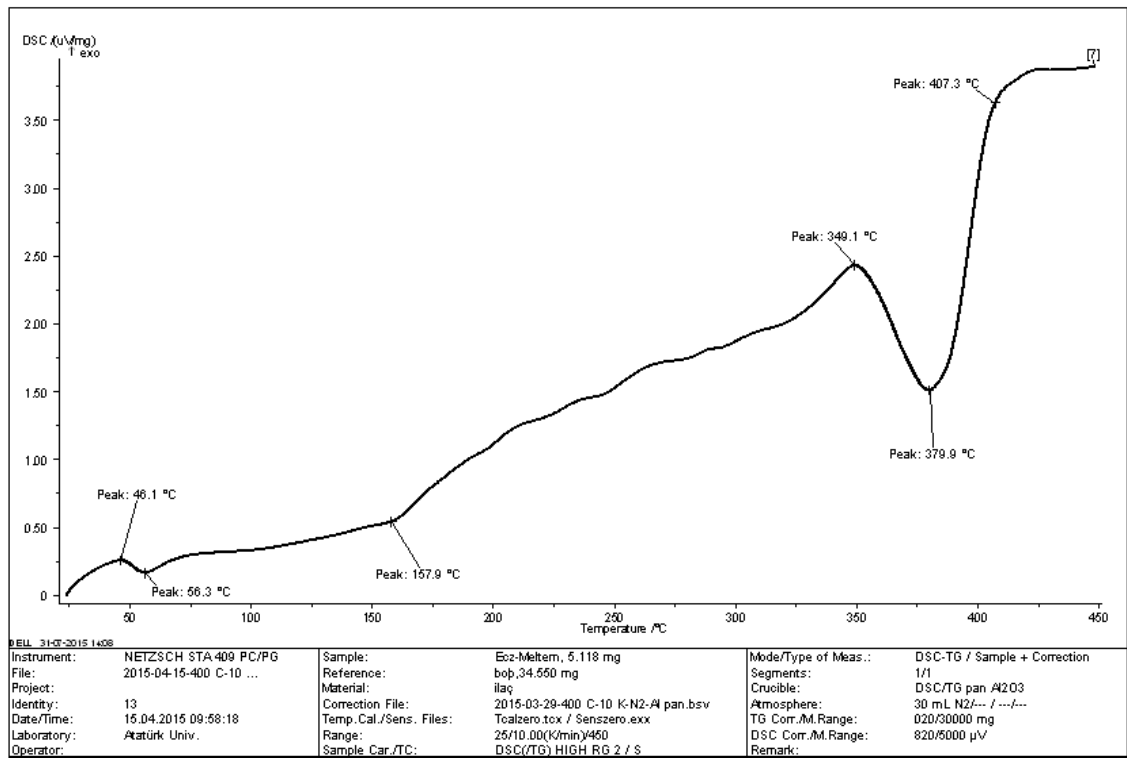
Daidzeine, kopolimerlere, Gelucire® 44/14'e, kopolimer-daidzein/kopolimer-Gelucire® 44/14-daidzein fiziksel karışımlarına ve tüm nanopartikül formülasyonlarına ait DSC termogramları, Bölüm 3.2.5.6'da anlatıldığı şekilde elde edilmiştir. Termogramlar Şekil 4.11-Şekil 4.33'te verilmiştir.



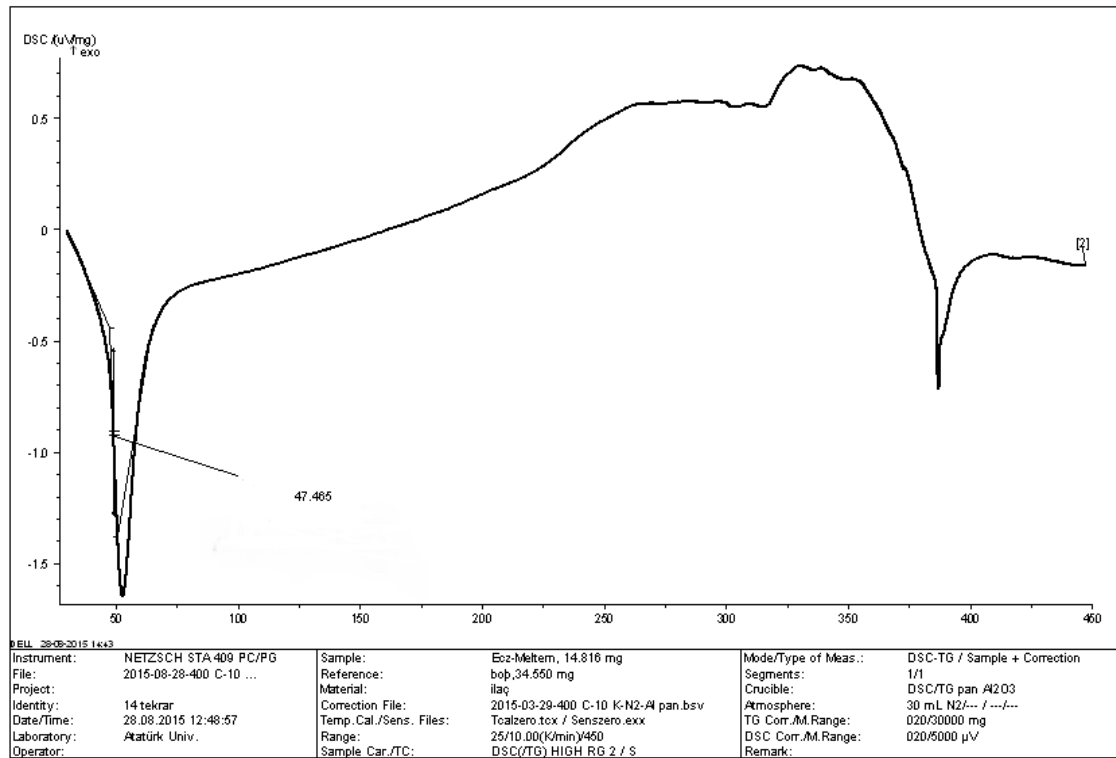
Şekil 4.11. Daidzeine ait DSC termogramı.



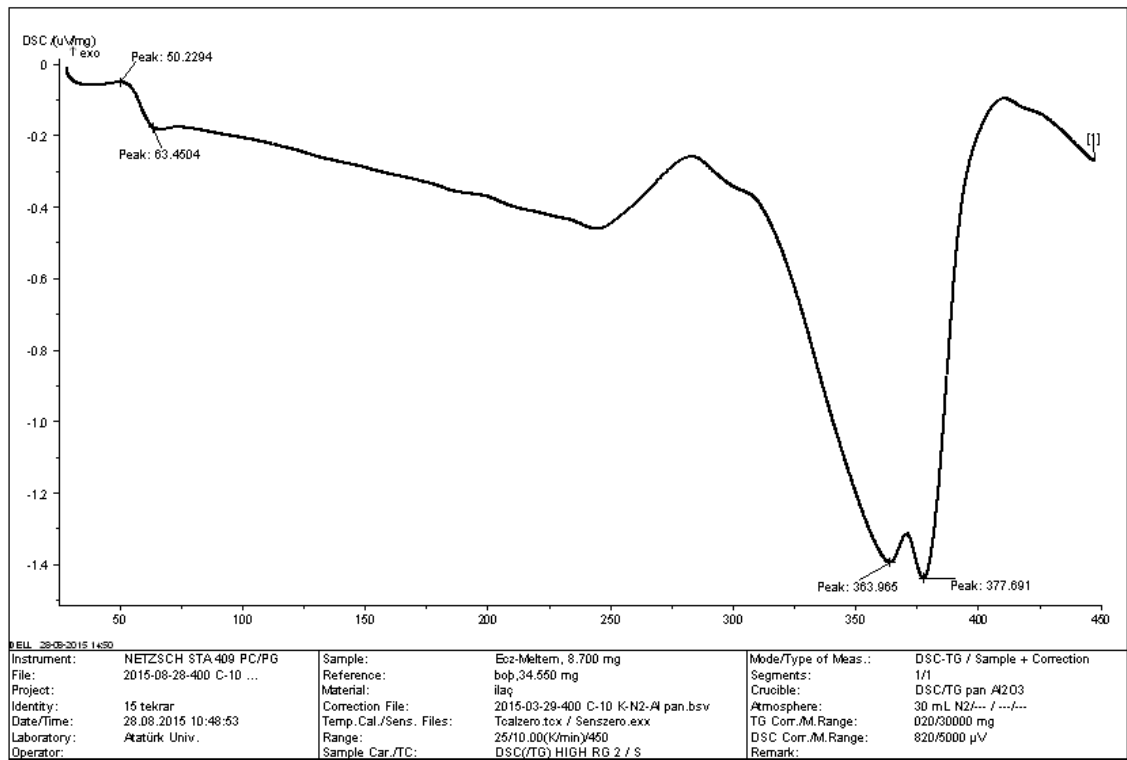
Şekil 4.12. PLGA (75:25) kopolimerine ait DSC termogramı.



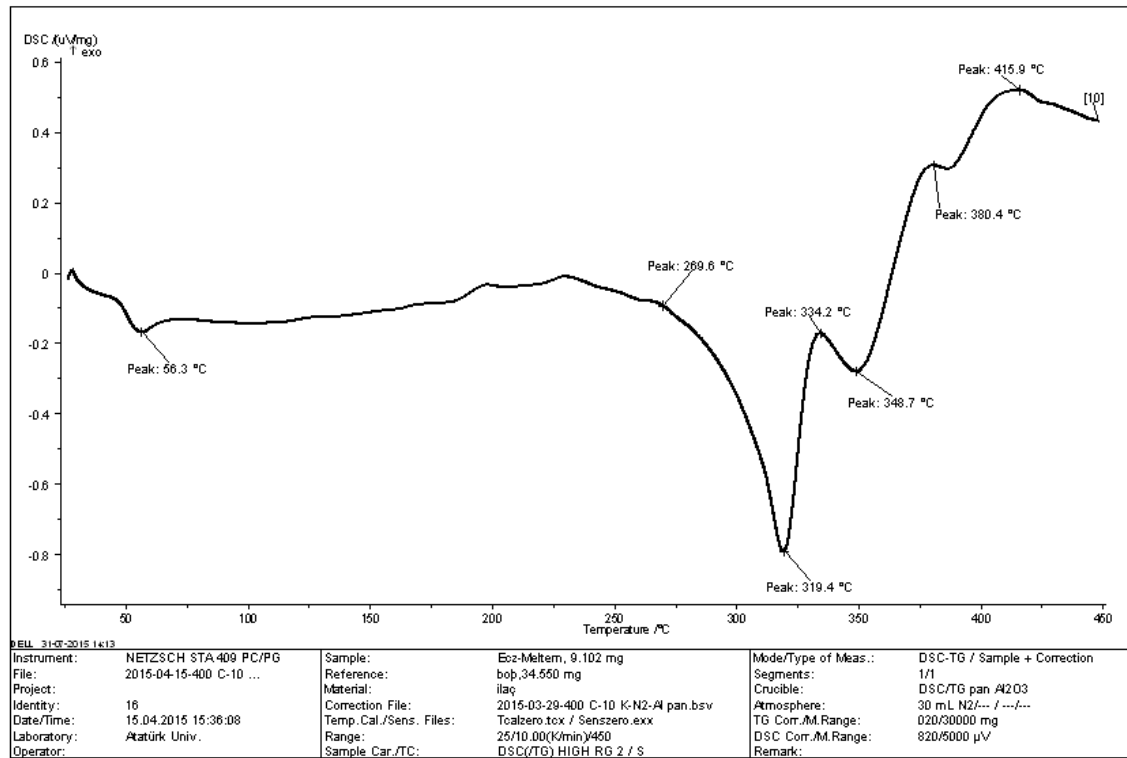
Şekil 4.13. PLGA (50:50) kopolimerine ait DSC termogramı.



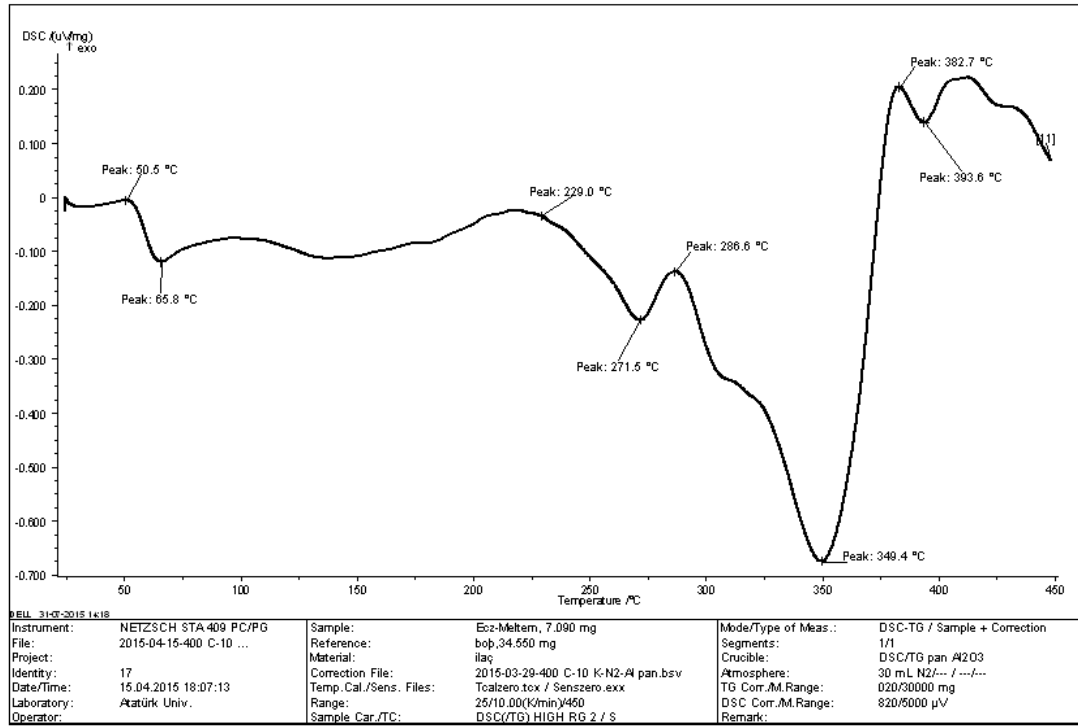
Şekil 4.14. Gelucire® 44/14'e ait DSC termogramı.



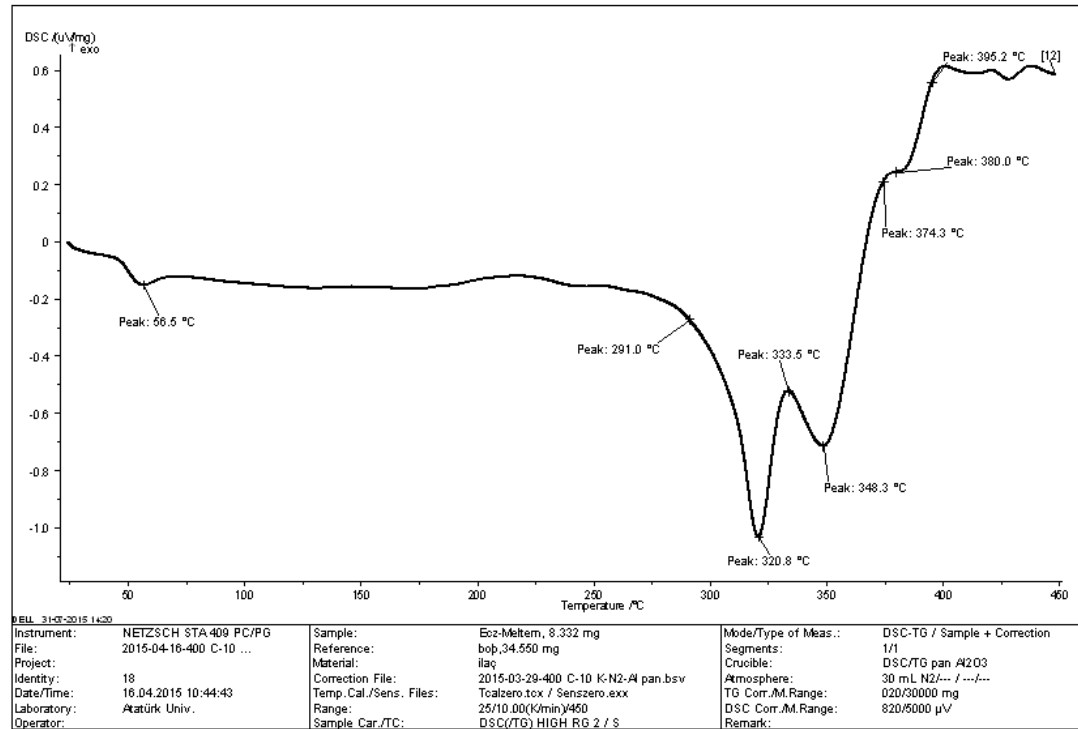
Şekil 4.15. PLGA (75:25)-daidzein fiziksel karışımına ait DSC termogramı.



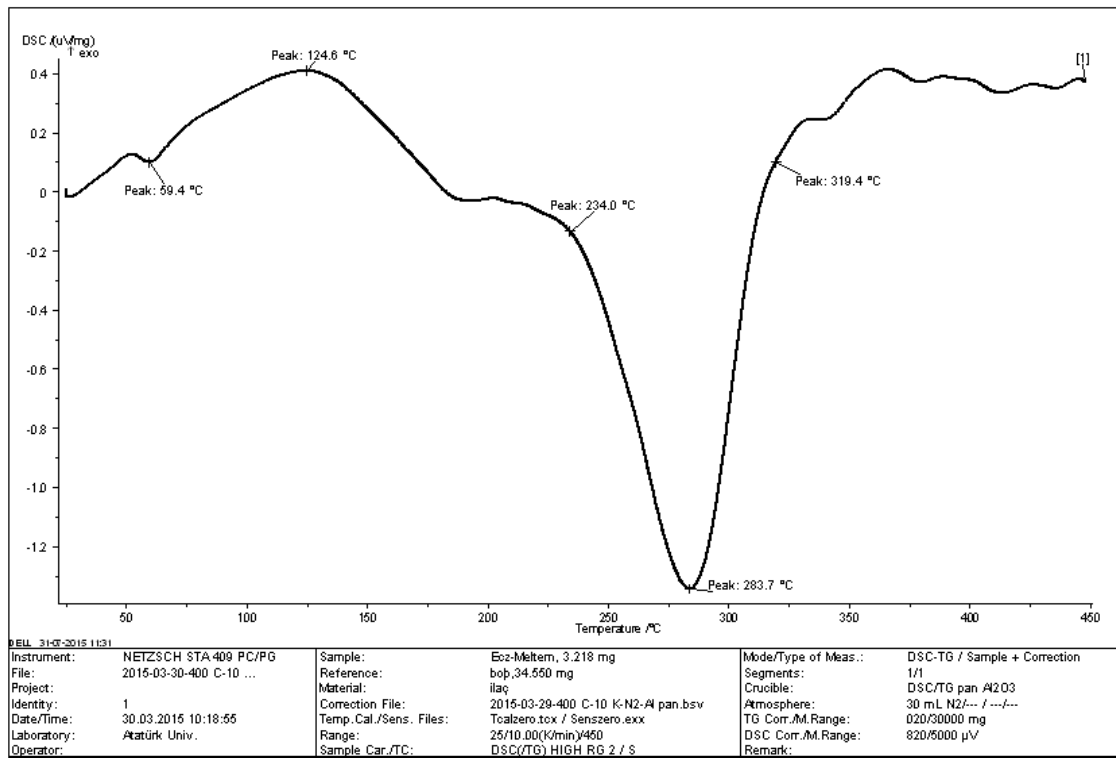
Şekil 4.16. PLGA (50:50)-daidzein fiziksel karışımına ait DSC termogramı.



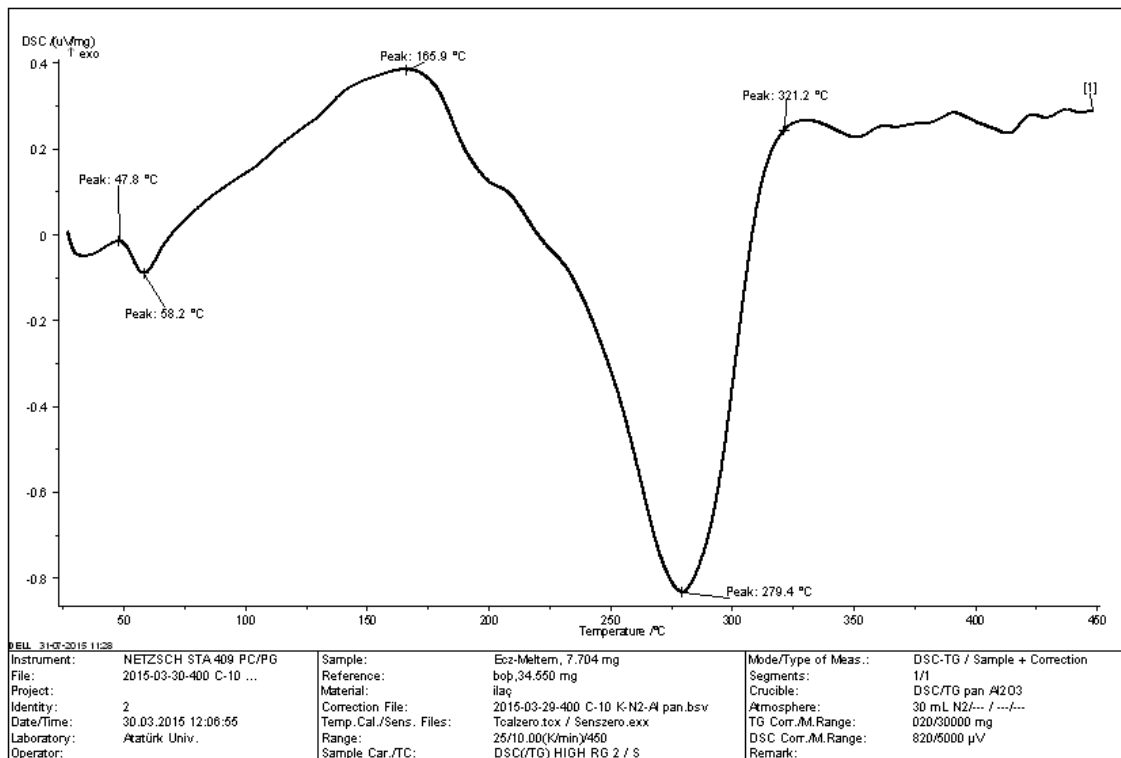
Şekil 4.17. PLGA (75:25)-Gelucire® 44/14-daidzein fiziksel karışımına ait DSC termogramı.



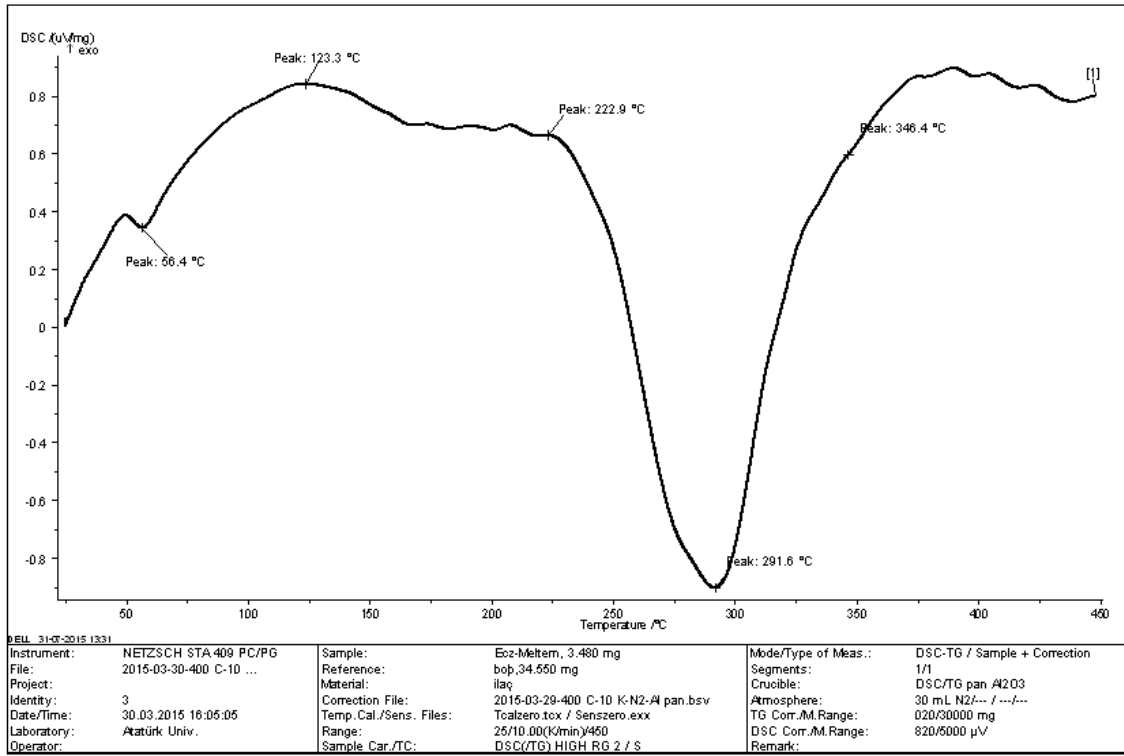
Şekil 4.18. PLGA (50:50)-Gelucire® 44/14-daidzein fiziksel karışımına ait DSC termogramı.



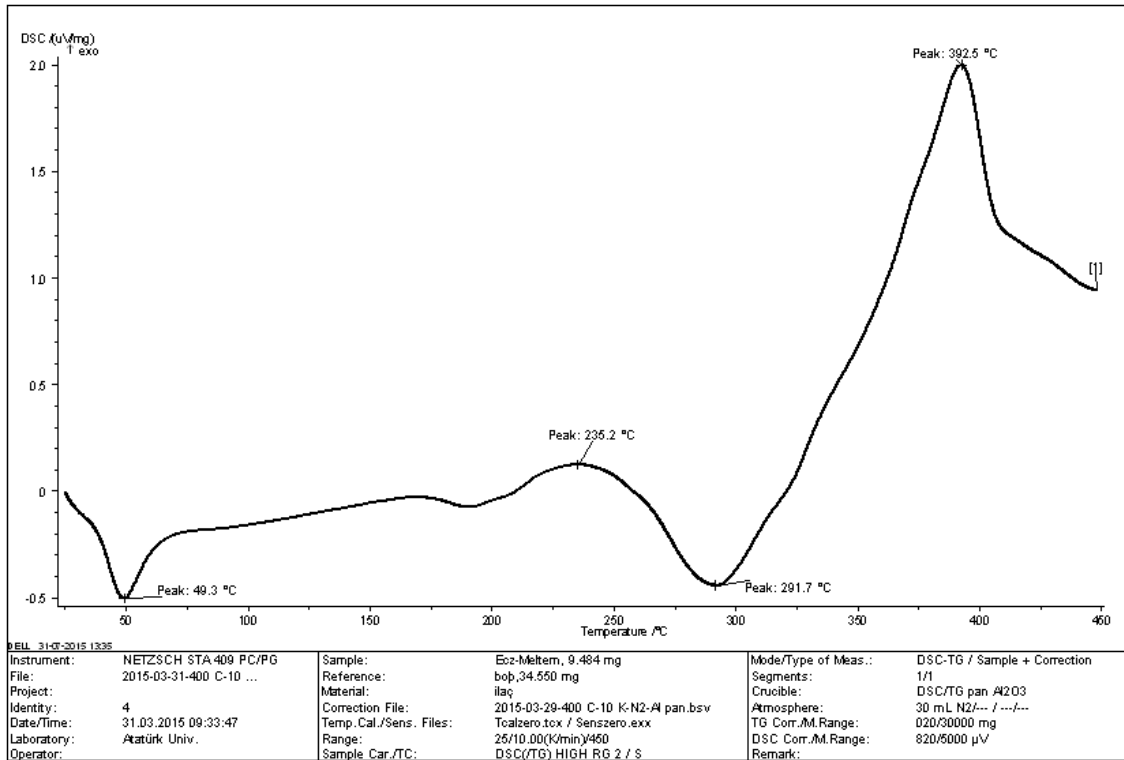
Şekil 4.19. F1-B formülasyonuna ait DSC termogramı.



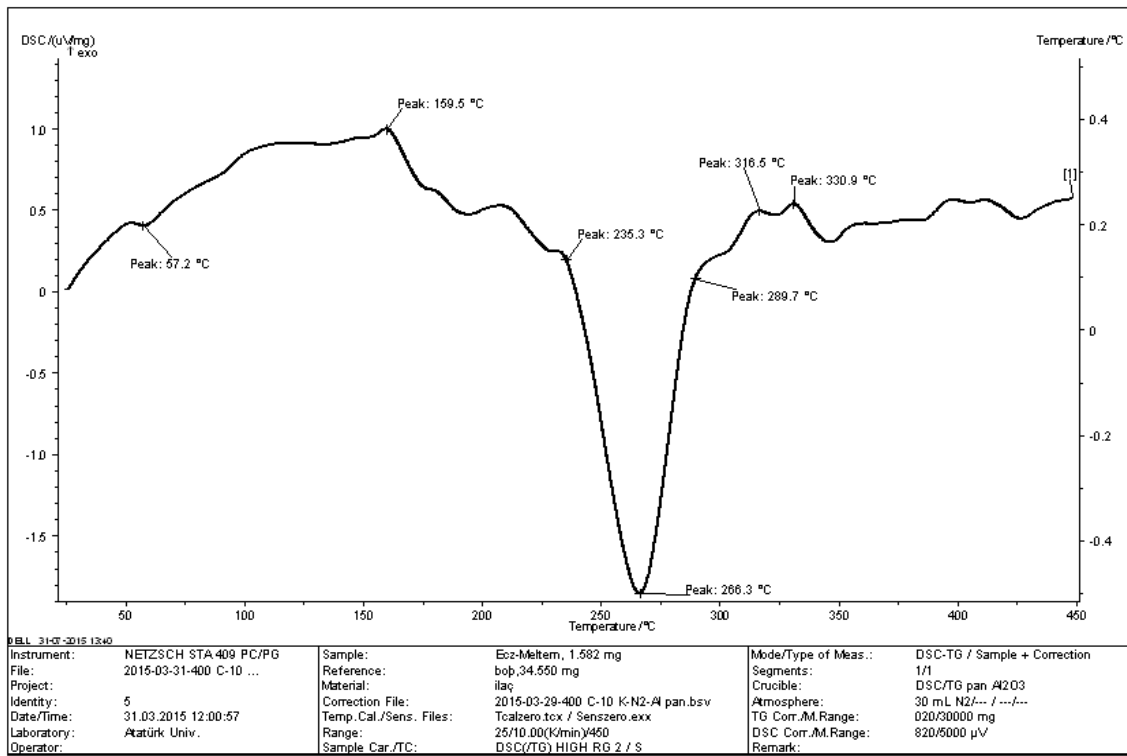
Şekil 4.20. F2-D formülasyonuna ait DSC termogramı.



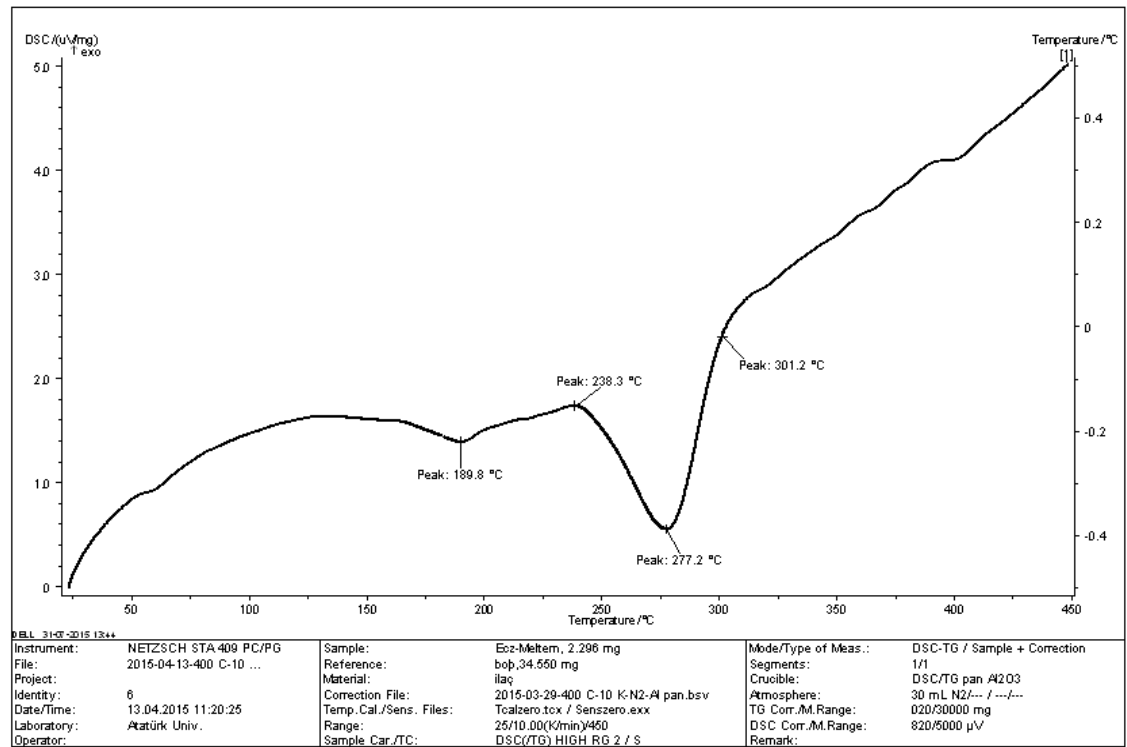
Şekil 4.21. F3-BG formülasyonuna ait DSC termogramı.



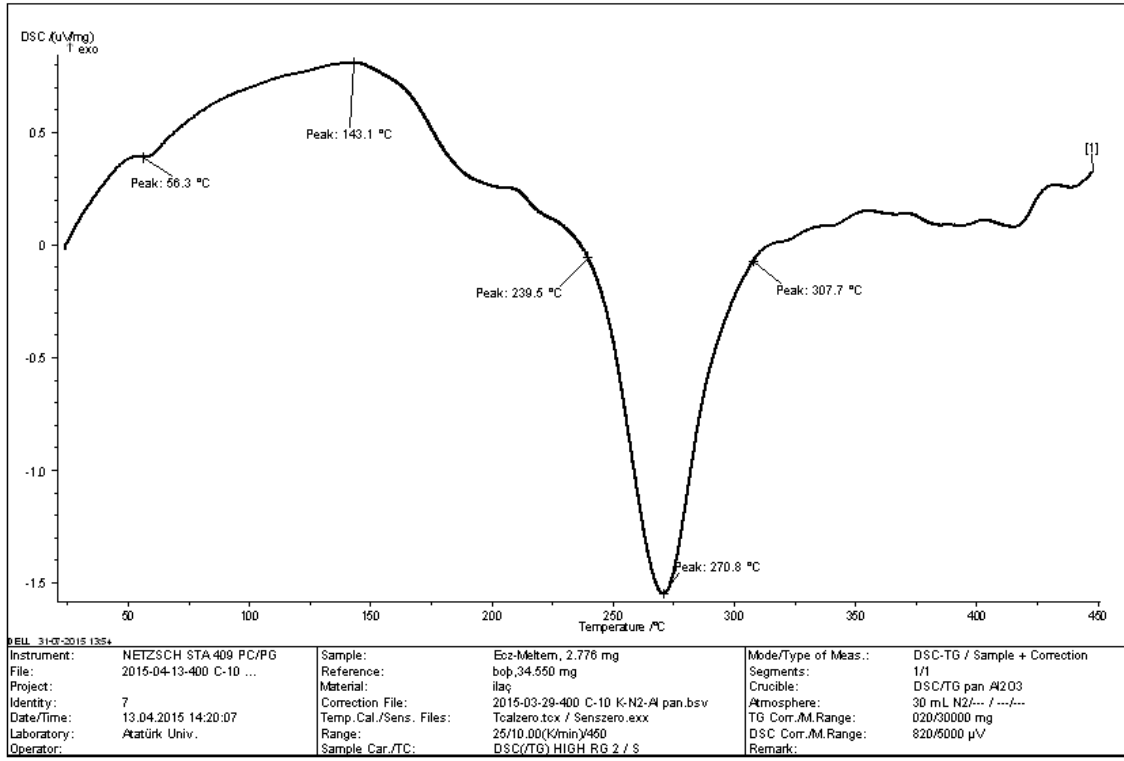
Şekil 4.22. F4-DG formülasyonuna ait DSC termogramı.



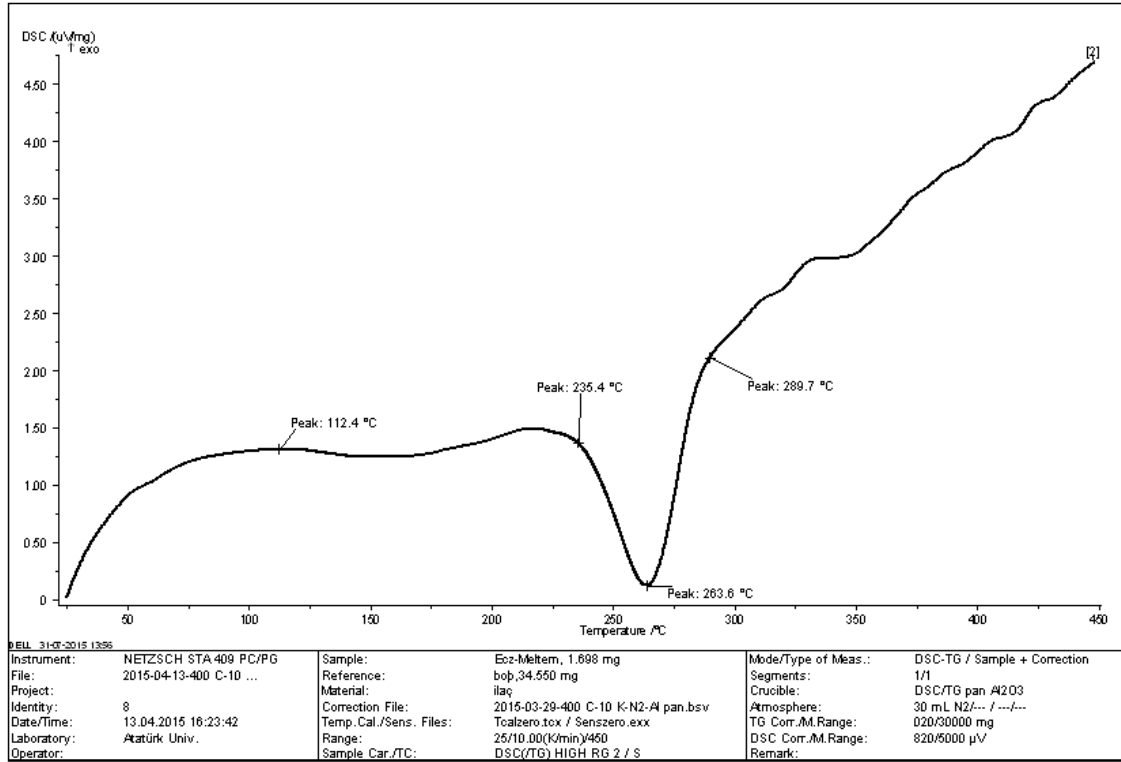
Şekil 4.23. F5-B formülasyonuna ait DSC termogramı.



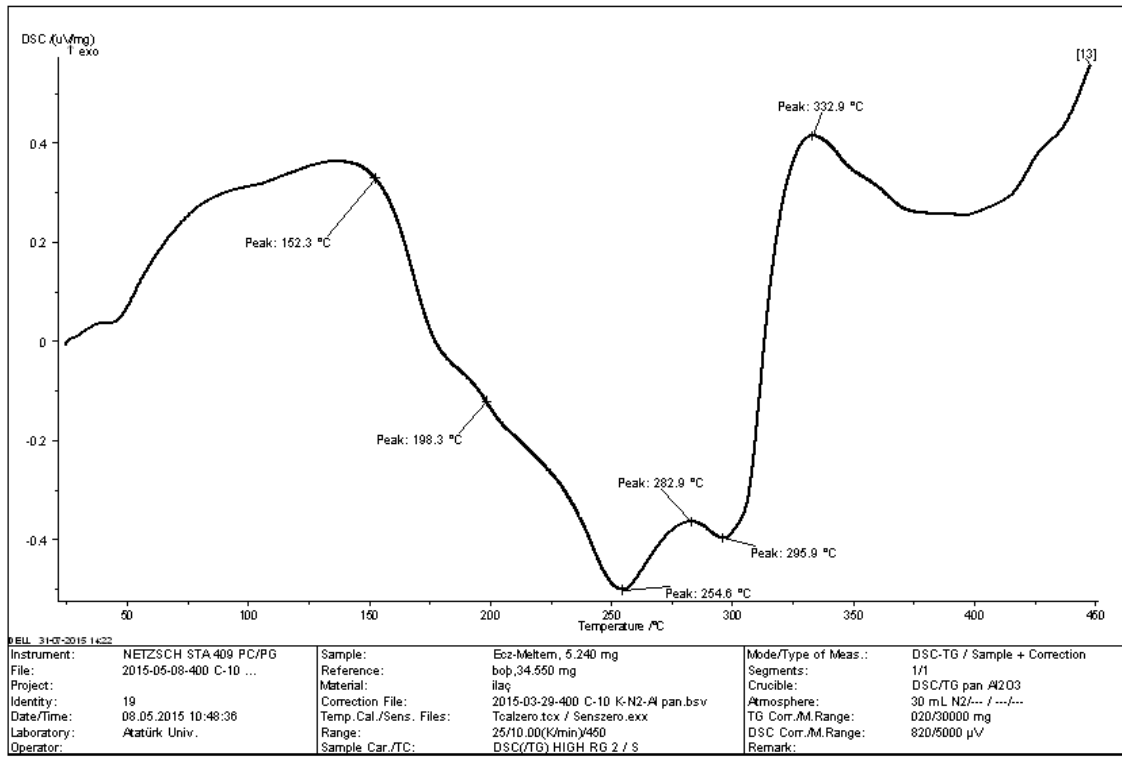
Şekil 4.24. F6-D formülasyonuna ait DSC termogramı.



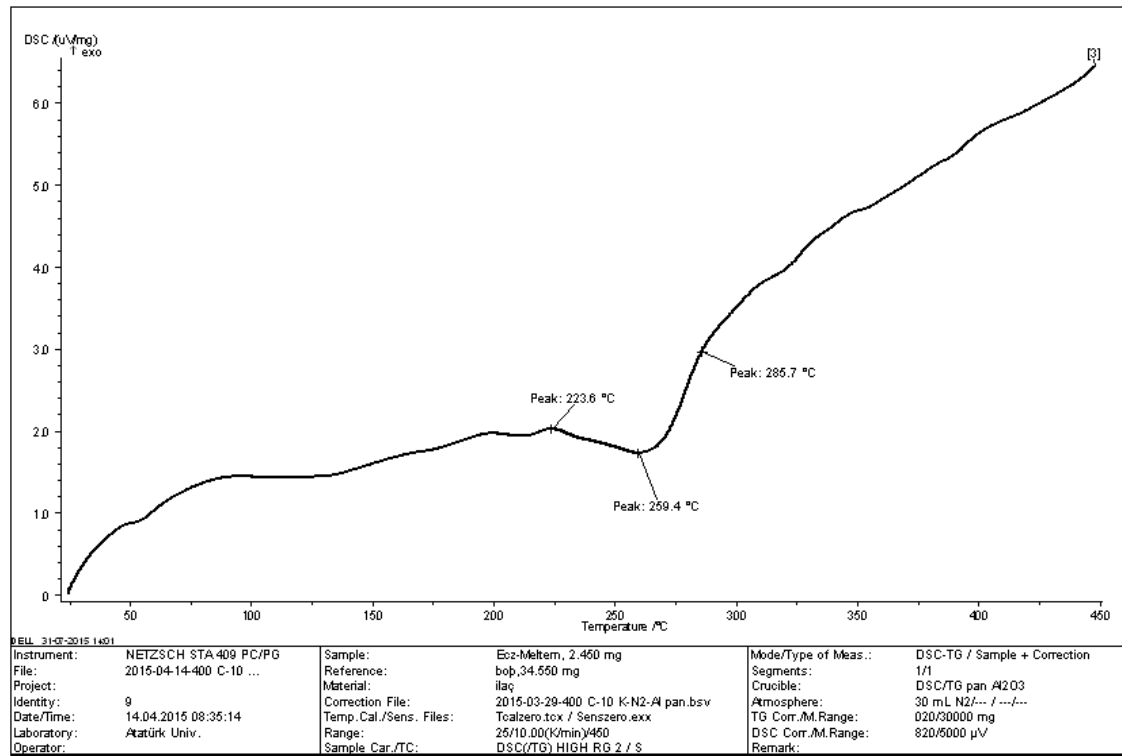
Şekil 4.25. F7-BG formülasyonuna ait DSC termogramı.



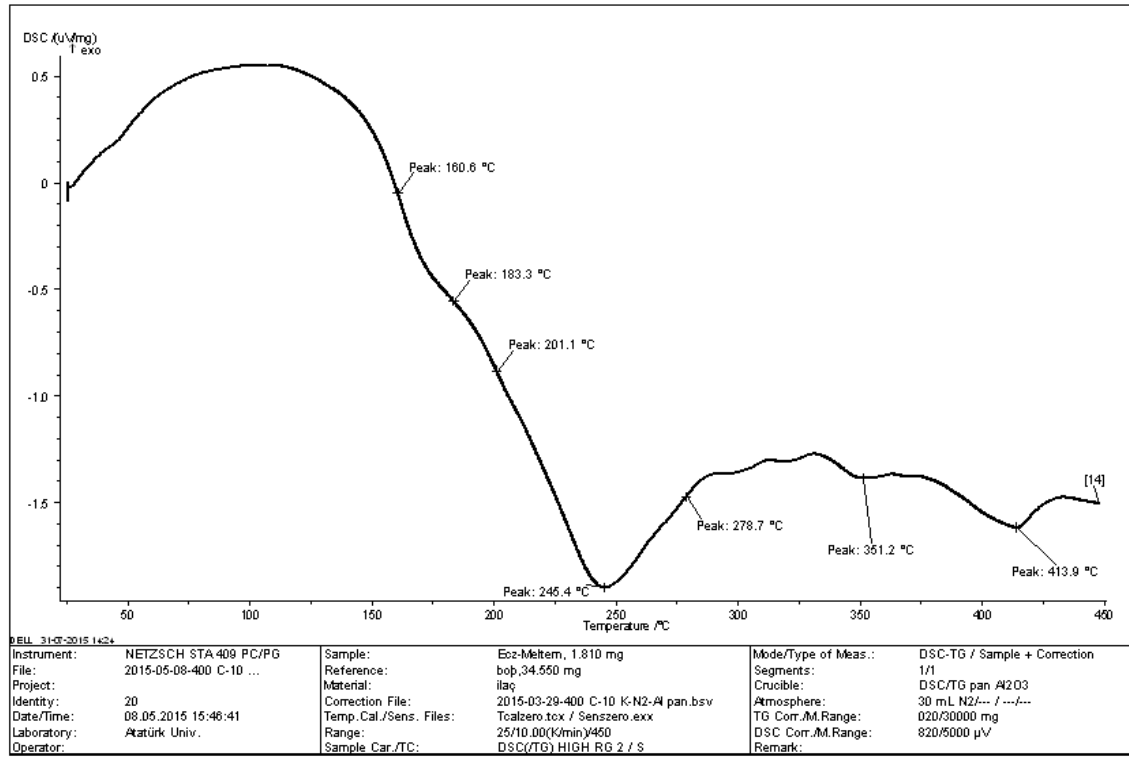
Şekil 4.26. F8-DG formülasyonuna ait DSC termogramı.



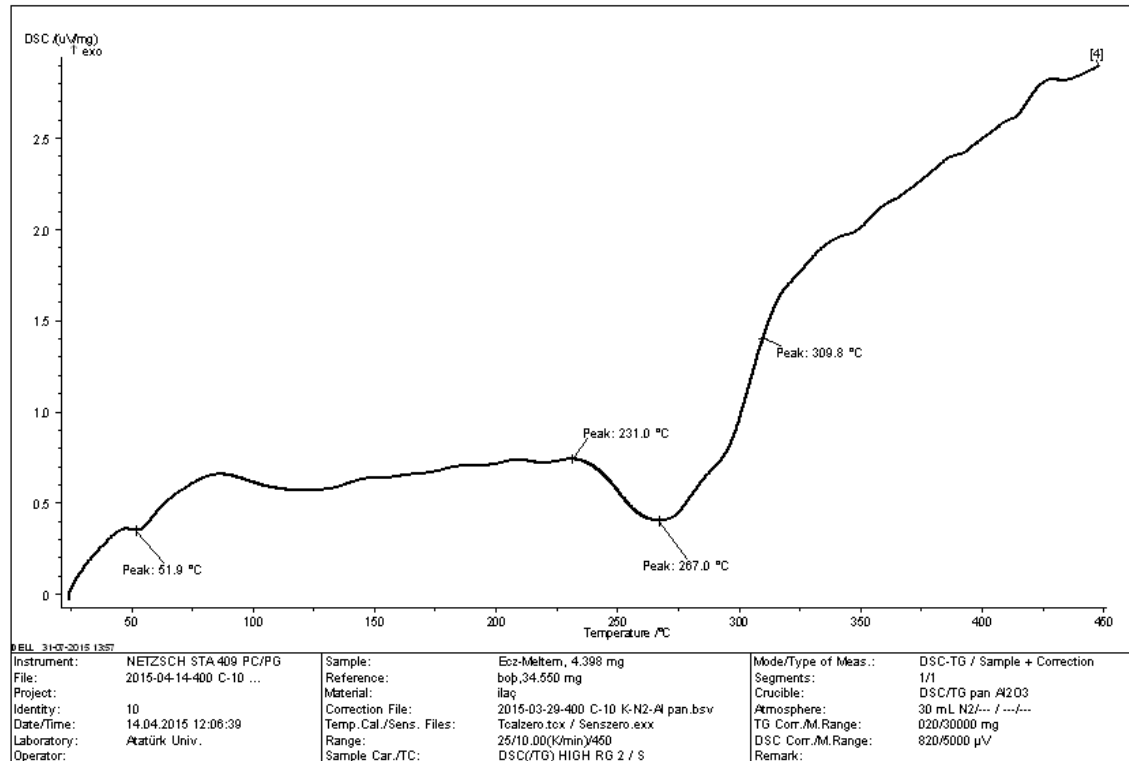
Şekil 4.27. F9-B formülasyonuna ait DSC termogramı.



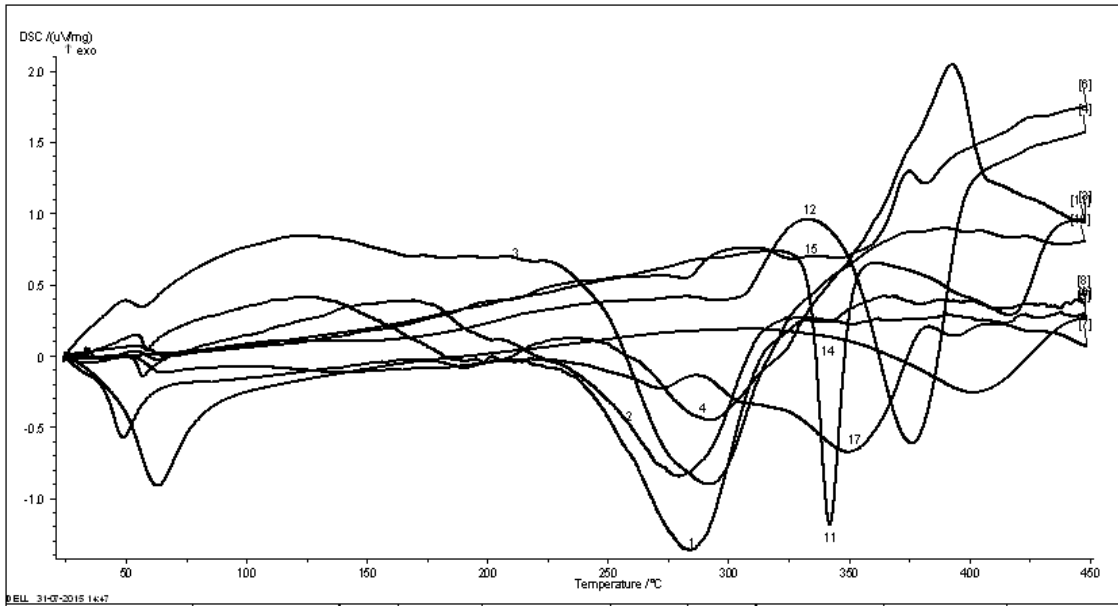
Şekil 4.28. F10-D formülasyonuna ait DSC termogramı.



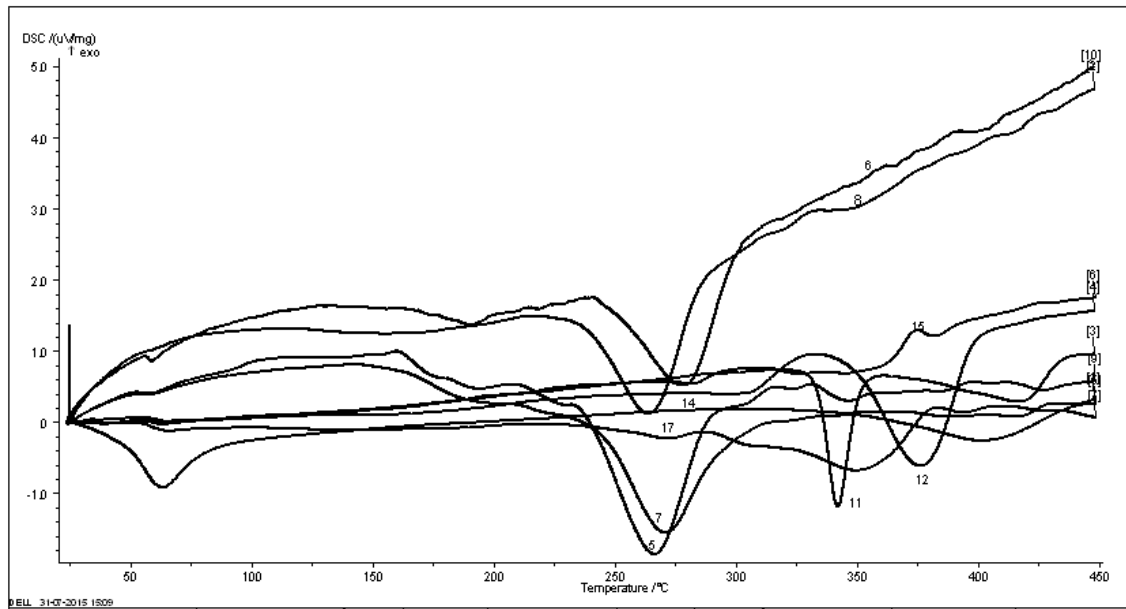
Şekil 4.29. F11-BG formülasyonuna ait DSC termogramı.



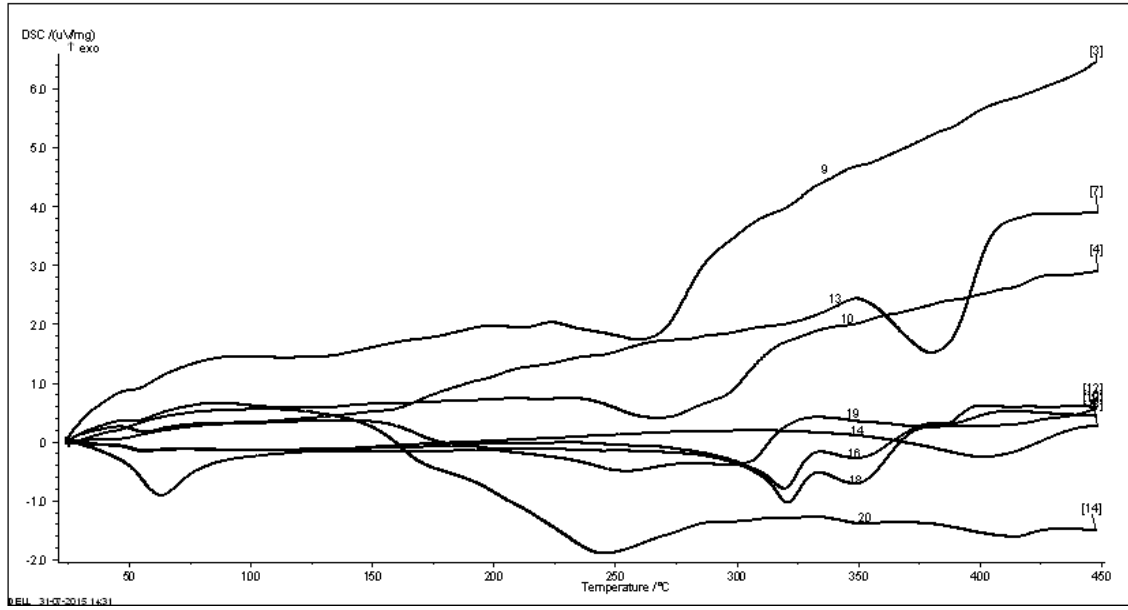
Şekil 4.30. F12-DG formülasyonuna ait DSC termogramı.



Şekil 4.31. Daidzeine (11), PLGA (75:25) kopolimerine (12), Gelucire[®] 44/14'e (14), PLGA (75:25)-daidzein fiziksel karışımına (15), PLGA (75:25)-Gelucire[®] 44/14-daidzein fiziksel karışımına (17), F1-B (1), F2-D (2), F3-BG (3) ve F4-DG (4) formülasyonlarına ait DSC termogramları.



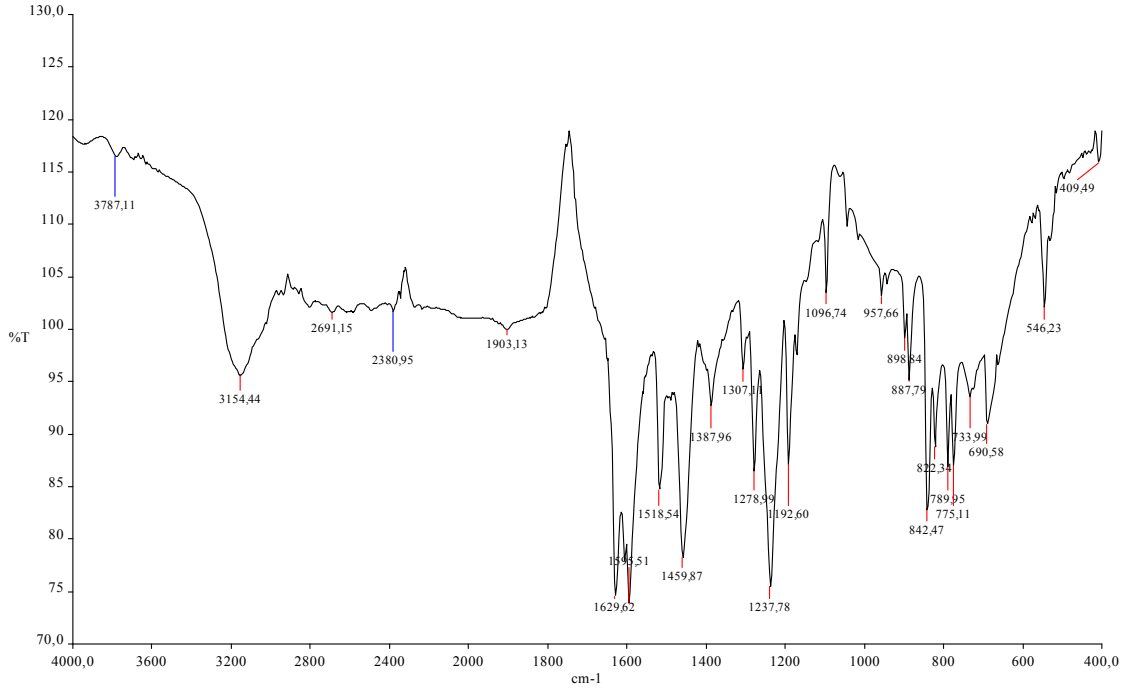
Şekil 4.32. Daidzeine (11), PLGA (75:25) kopolimerine (12), Gelucire[®] 44/14'e (14), PLGA (75:25)-daidzein fiziksel karışımına (15), PLGA (75:25)-Gelucire[®] 44/14-daidzein fiziksel karışımına (17), F5-B (5), F6-D (6), F7-BG (7) ve F8-DG (8) formülasyonlarına ait DSC termogramları.



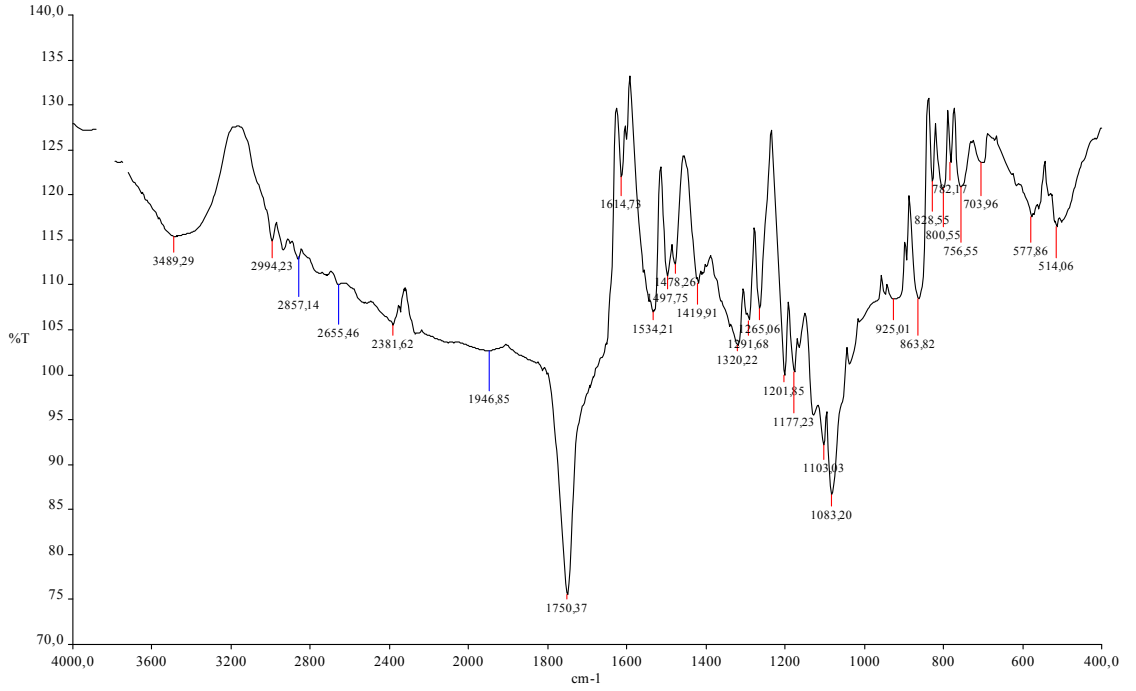
Şekil 4.33. PLGA (50:50) kopolimerine (13), Gelucire® 44/14'e (14), PLGA (50:50)-daidzein fiziksel karışımına (16), PLGA (50:50)-Gelucire® 44/14-daidzein fiziksel karışımına (18), F9-B (19), F10-D (9), F11-BG (20) ve F12-DG (10) formülasyonlarına ait DSC termogramları.

4.3.6. FT-IR Analizi

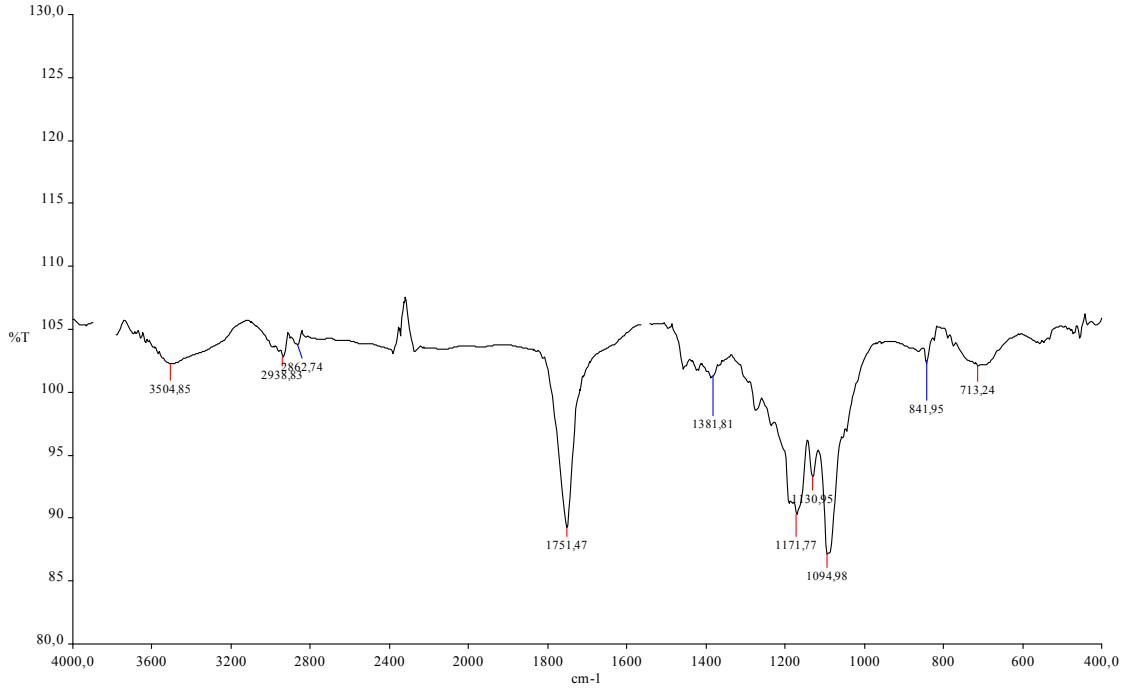
Daidzeine, kopolimerlere, Gelucire® 44/14'e, kopolimer-daidzein/kopolimer-Gelucire® 44/14-daidzein fiziksel karışımlarına ve tüm nanopartikül formülasyonlarına ait FT-IR spektrumları, Bölüm 3.2.5.7'de anlatıldığı şekilde elde edilmiştir. FT-IR spektrumları Şekil 4.34-Şekil 4.53'te verilmiştir.



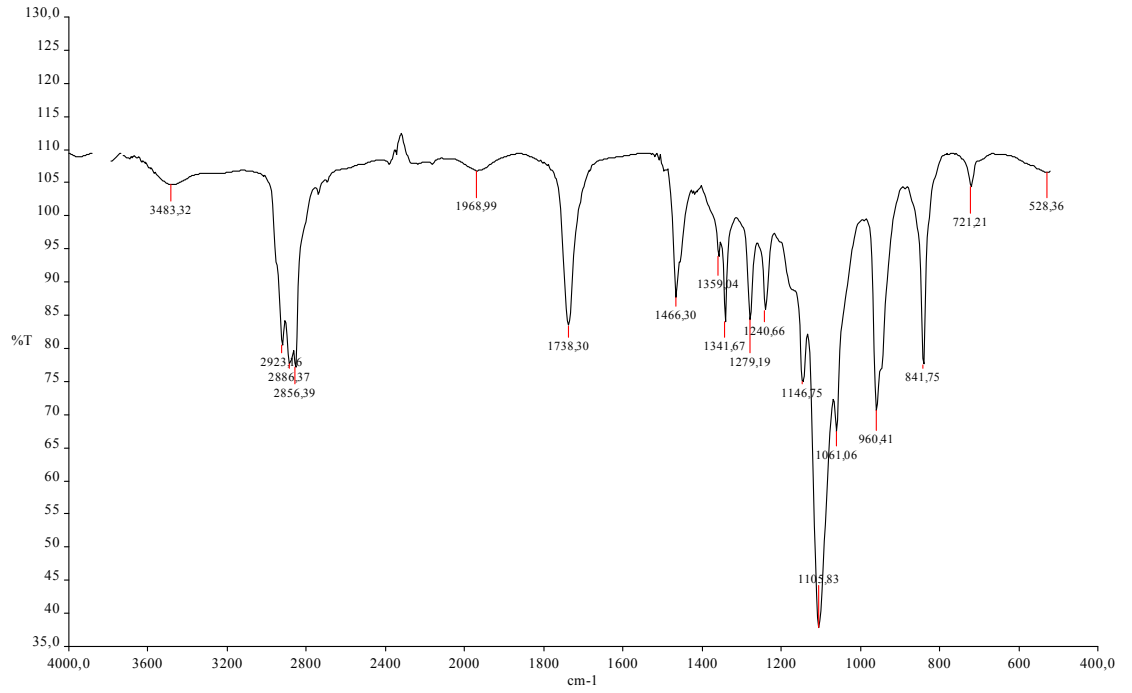
Şekil 4.34. Daidzeine ait FT-IR spektrumu.



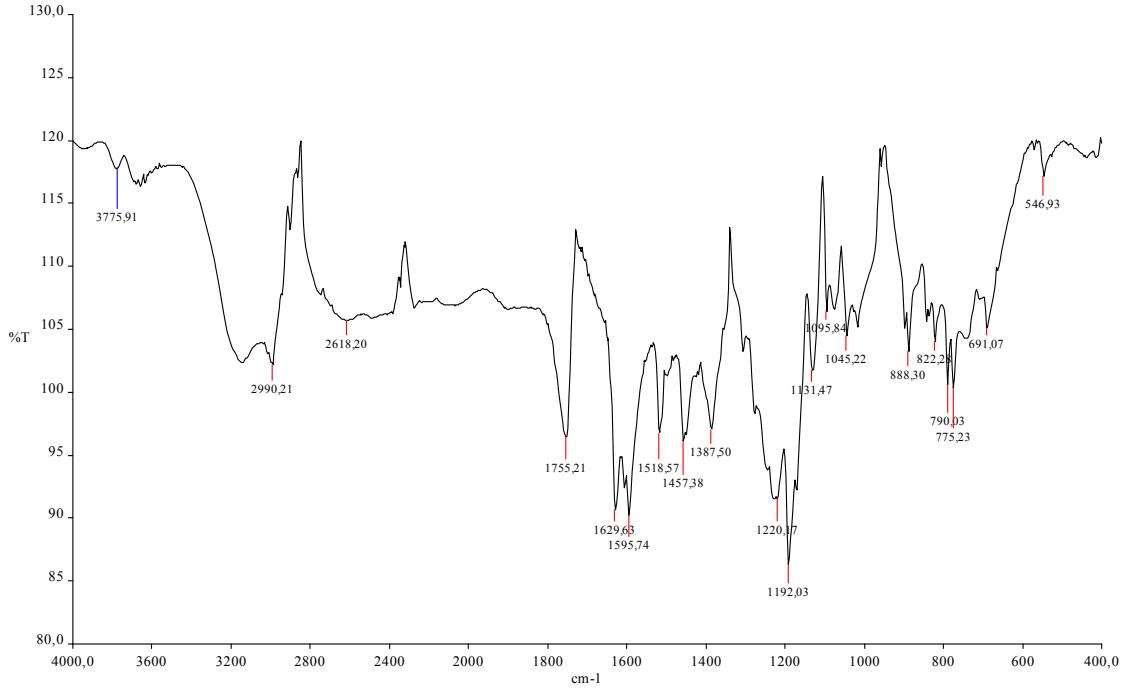
Şekil 4.35. PLGA (75:25) kopolimerine ait FT-IR spektrumu.



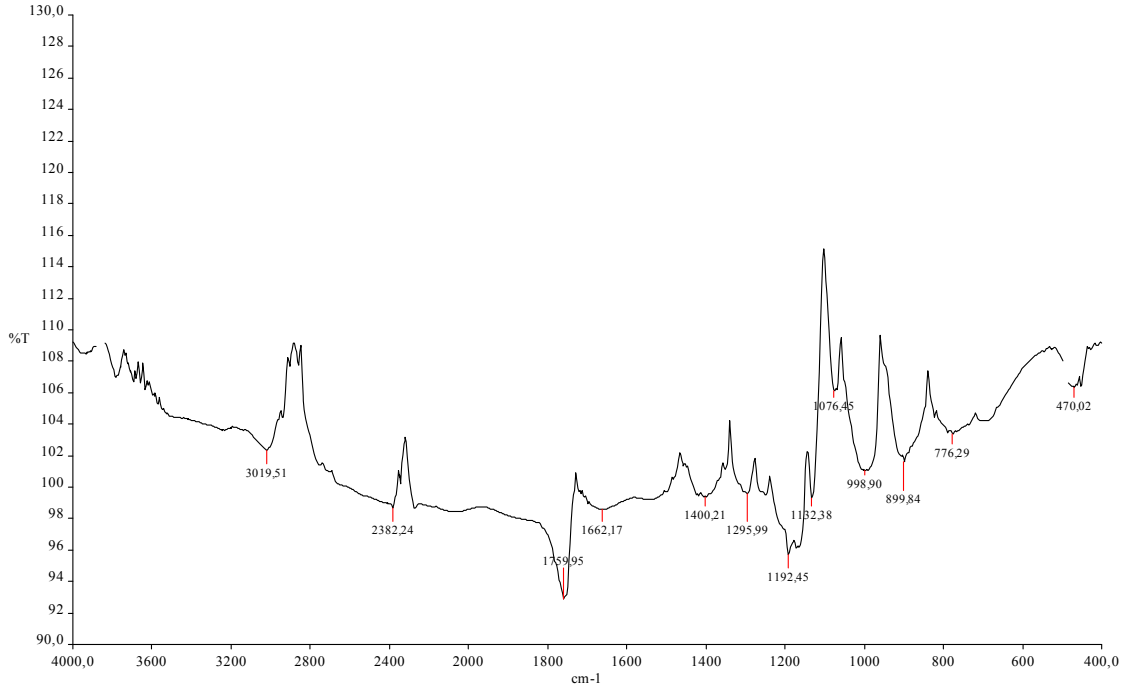
Şekil 4.36. PLGA (50:50) kopolimerine ait FT-IR spektrumu.



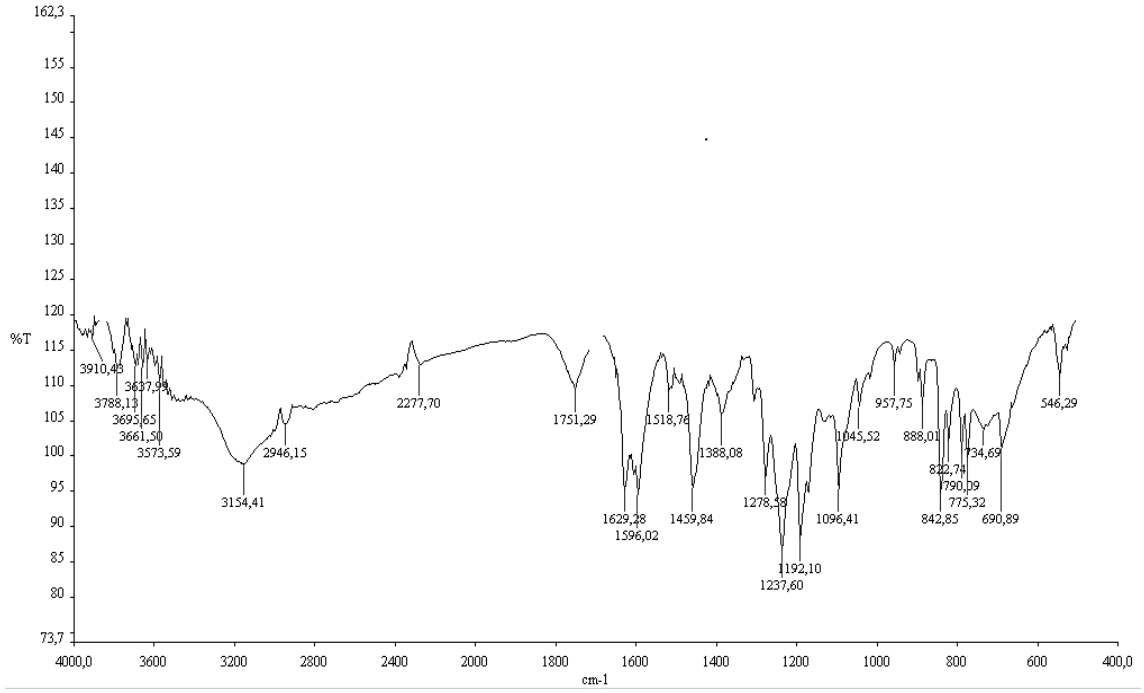
Şekil 4.37. Gelucire® 44/14'e ait FT-IR spektrumu.



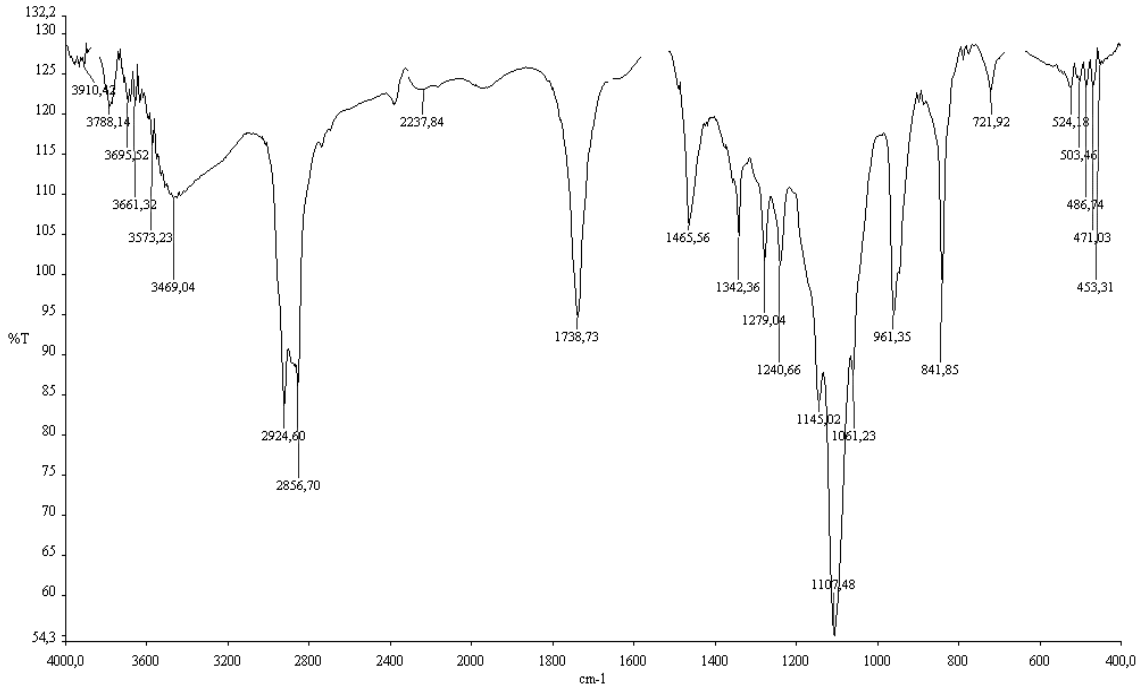
Şekil 4.38. PLGA (75:25)-daidzein fiziksel karışımına ait FT-IR spektrumu.



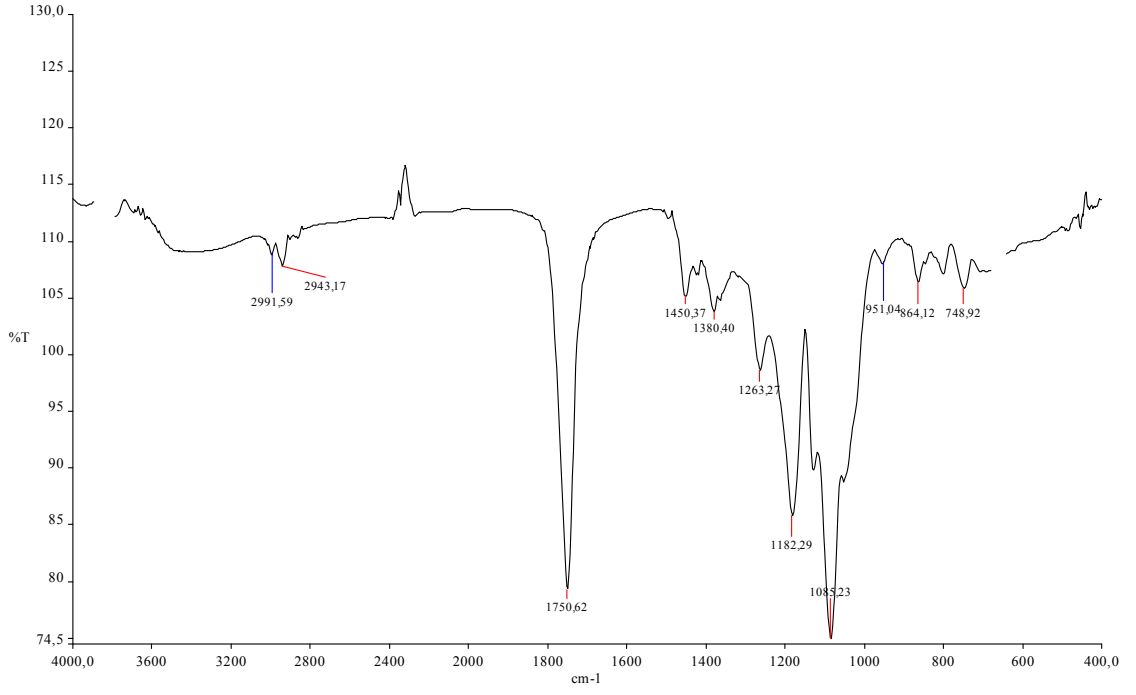
Şekil 4.39. PLGA (50:50)-daidzein fiziksel karışımına ait FT-IR spektrumu.



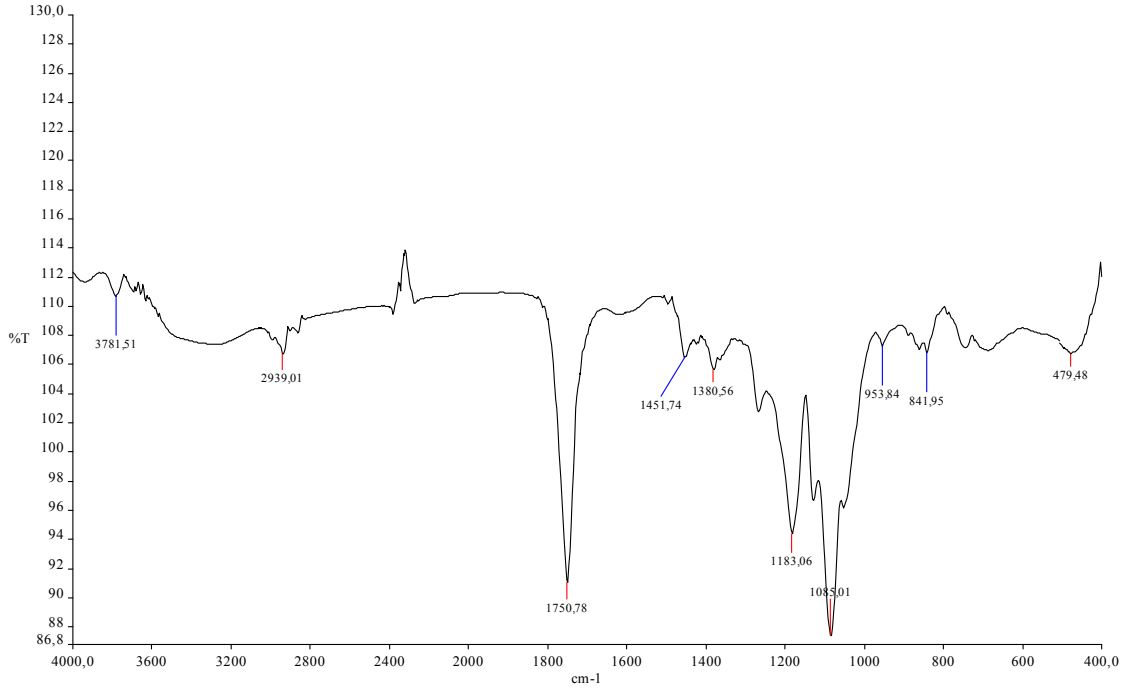
Şekil 4.40. PLGA (75:25)-Gelucire® 44/14-daidzein fiziksel karışımına ait FT-IR spektrumu.



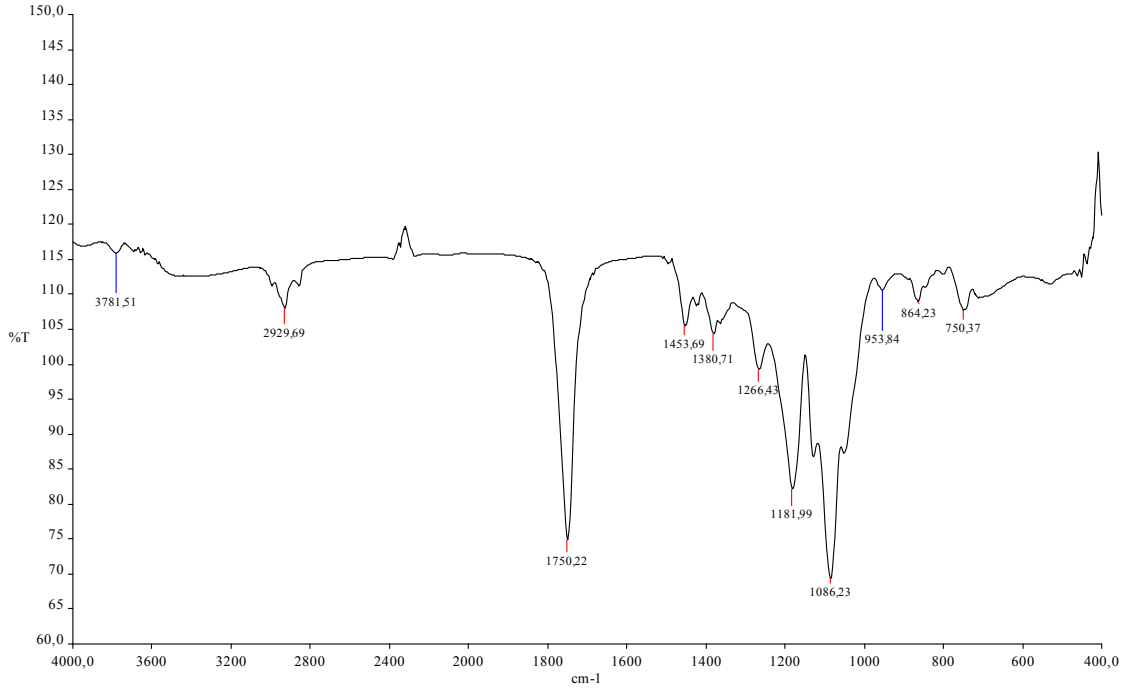
Şekil 4.41. PLGA (50:50)-Gelucire® 44/14-daidzein fiziksel karışımına ait FT-IR spektrumu.



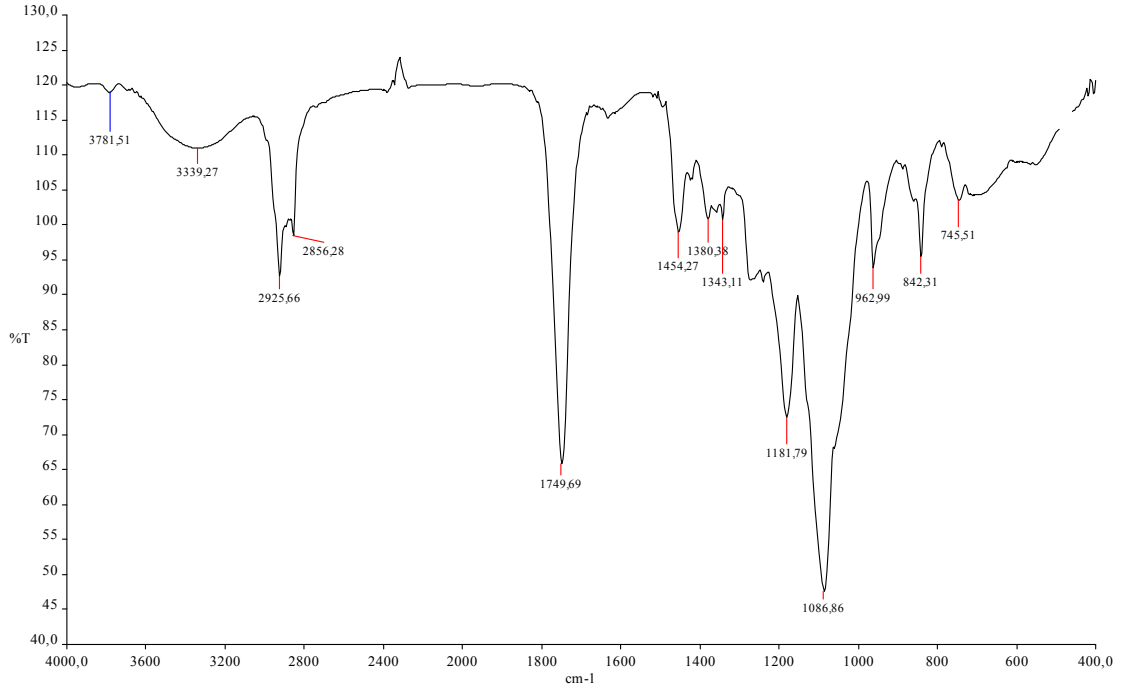
Şekil 4.42. F1-B formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.



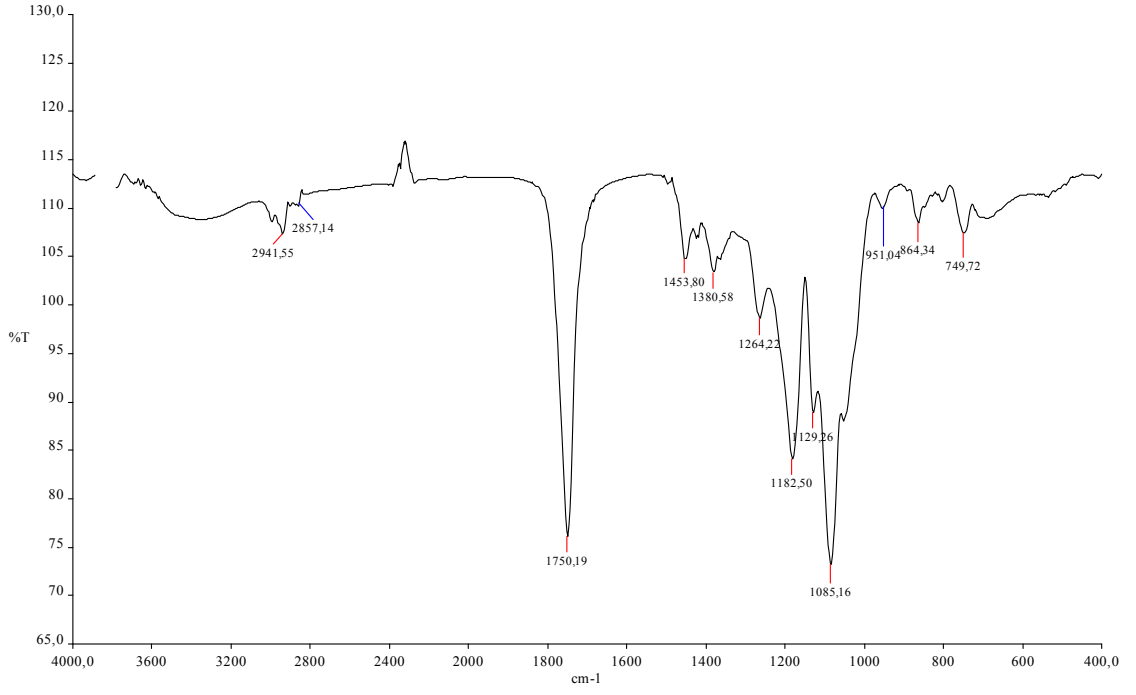
Şekil 4.43. F2-D formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.



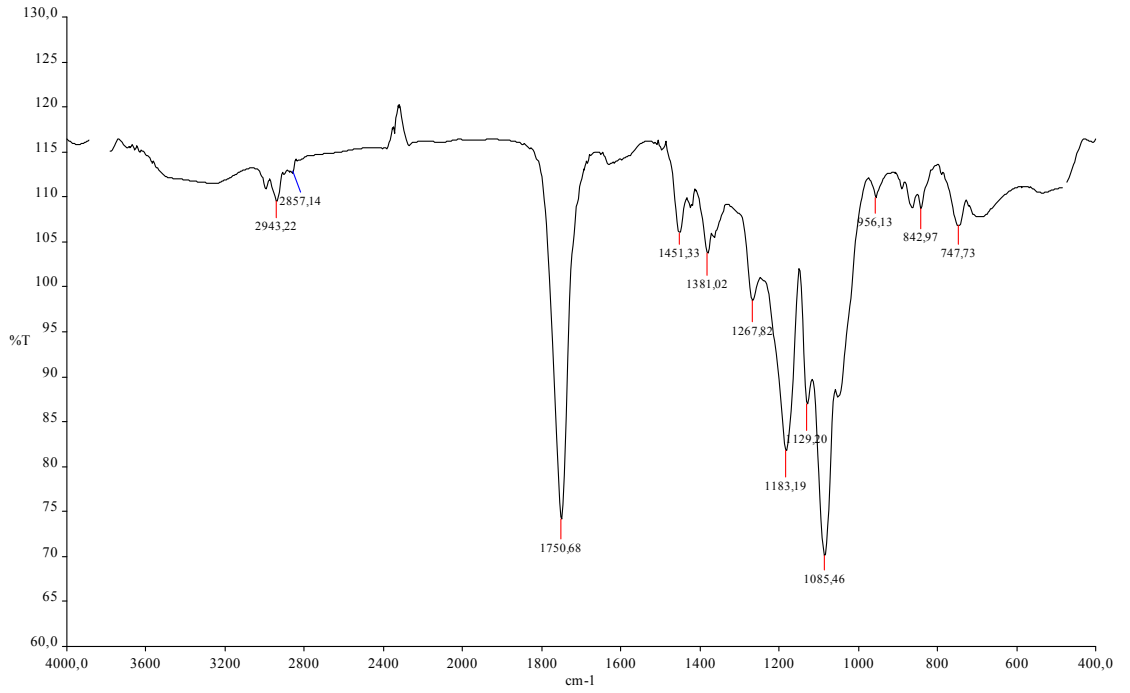
Şekil 4.44. F3-BG formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.



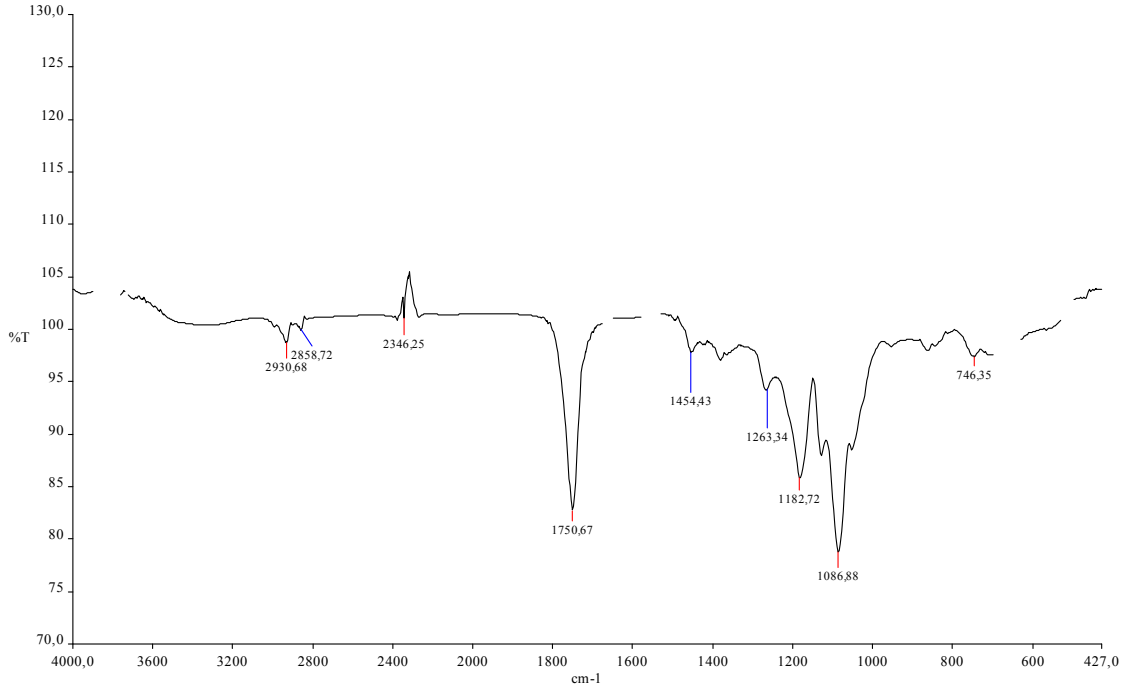
Şekil 4.45. F4-DG formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.



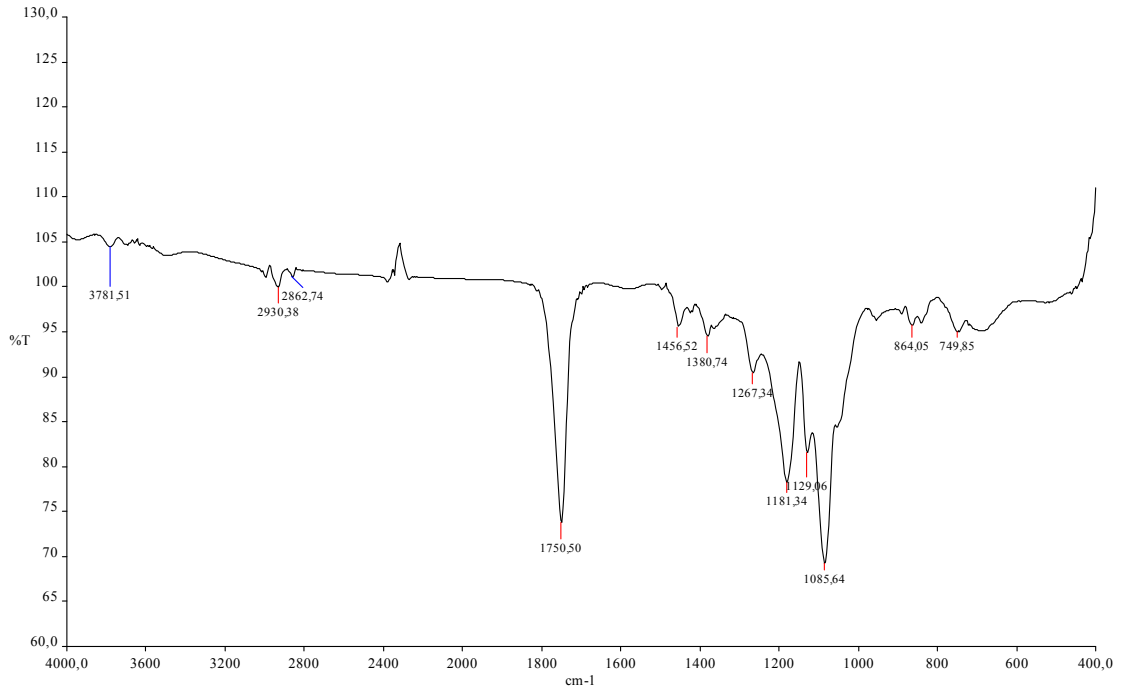
Şekil 4.46. F5-B formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.



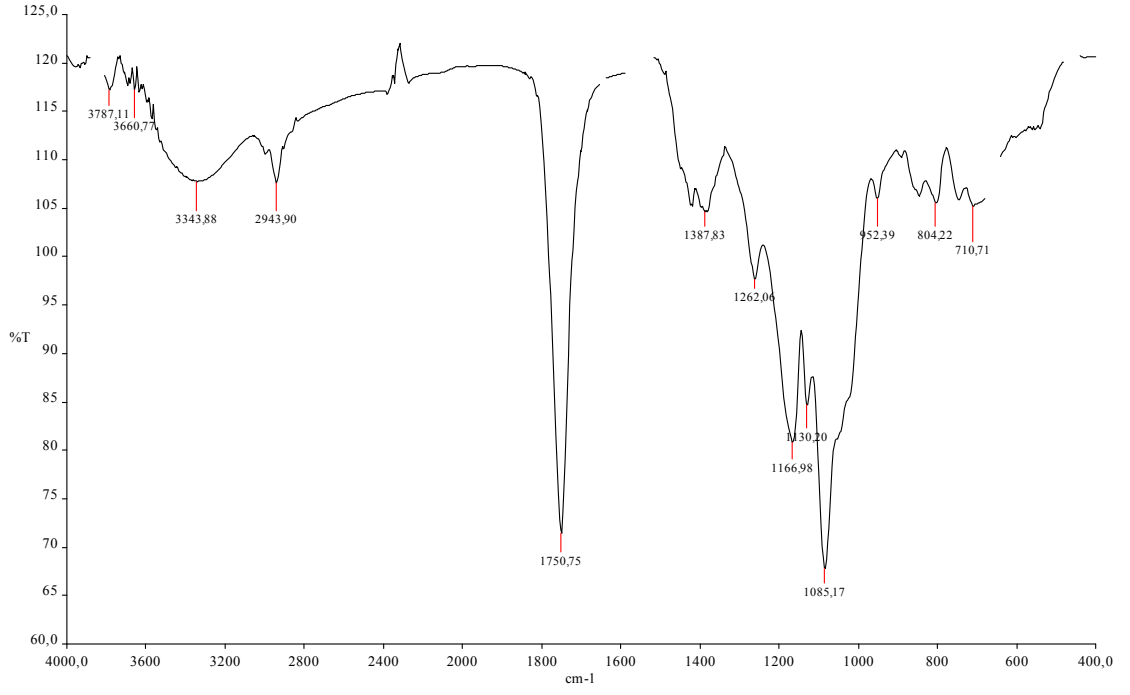
Şekil 4.47. F6-D formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.



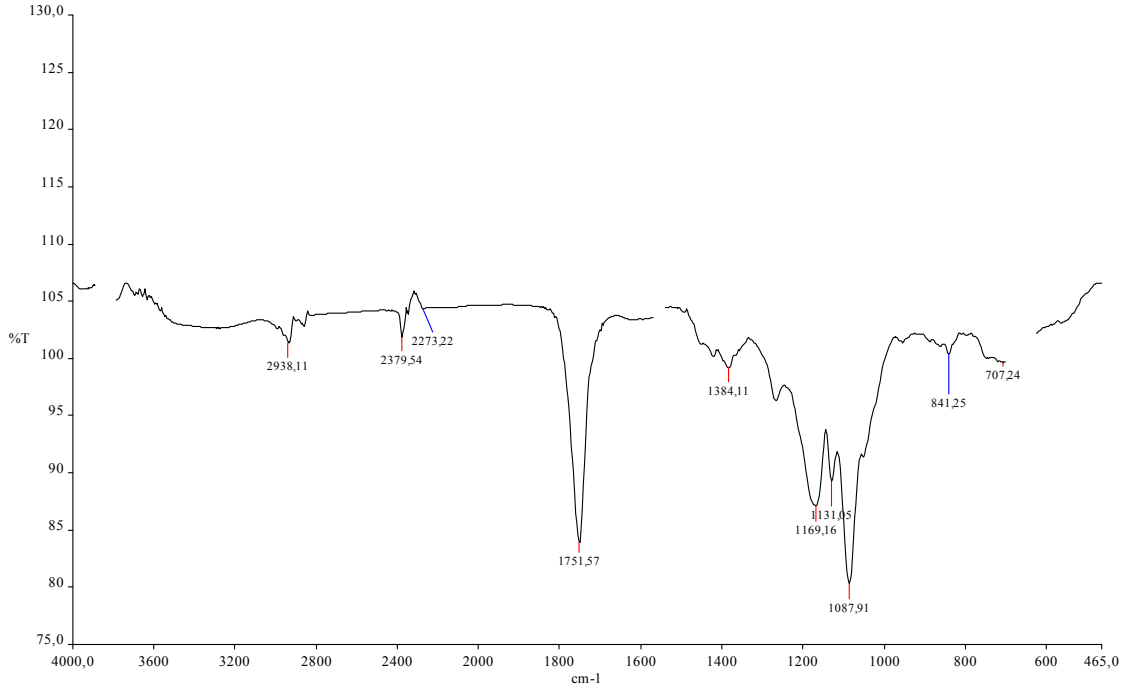
Şekil 4.48. F7-BG formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.



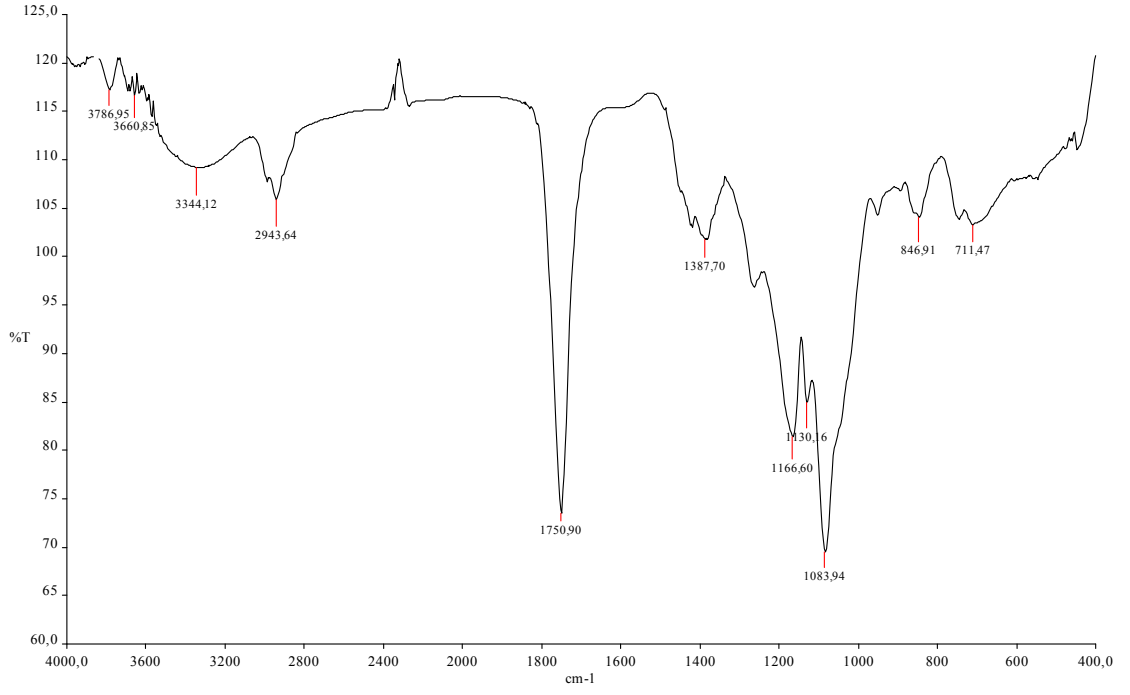
Şekil 4.49. F8-DG formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.



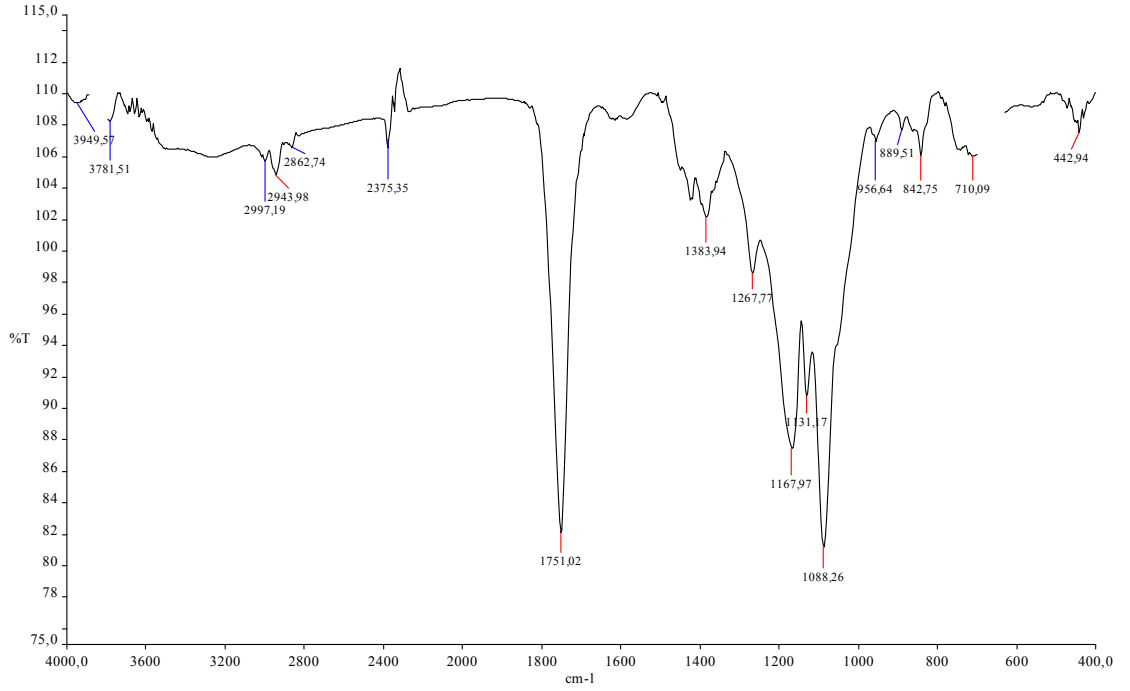
Şekil 4.50. F9-B formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.



Şekil 4.51. F10-D formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.



Şekil 4.52. F11-BG formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.

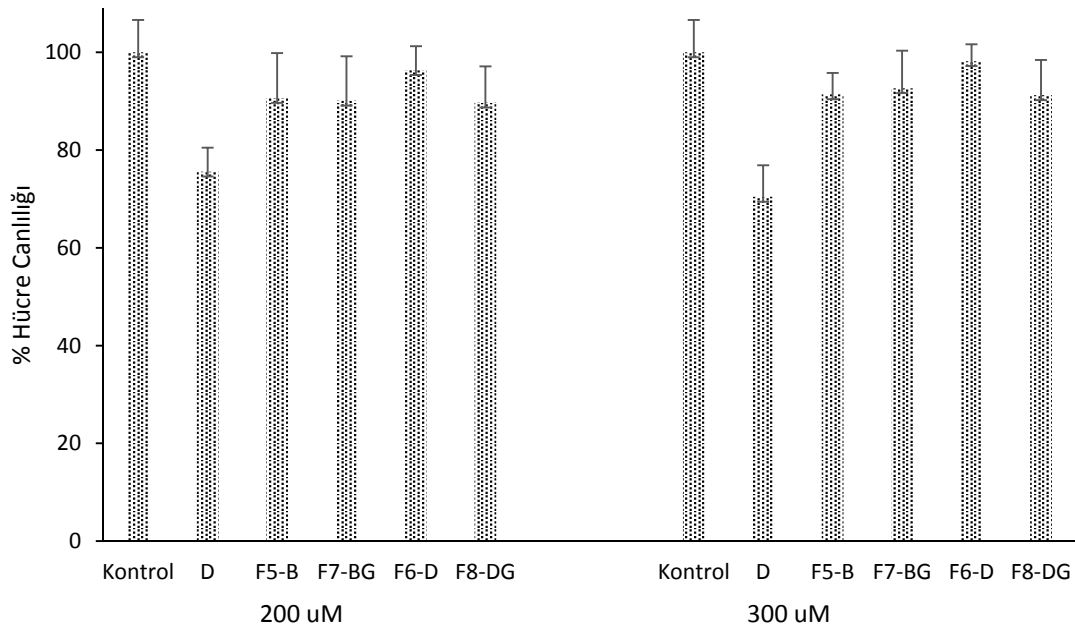


Şekil 4.53. F12-DG formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.

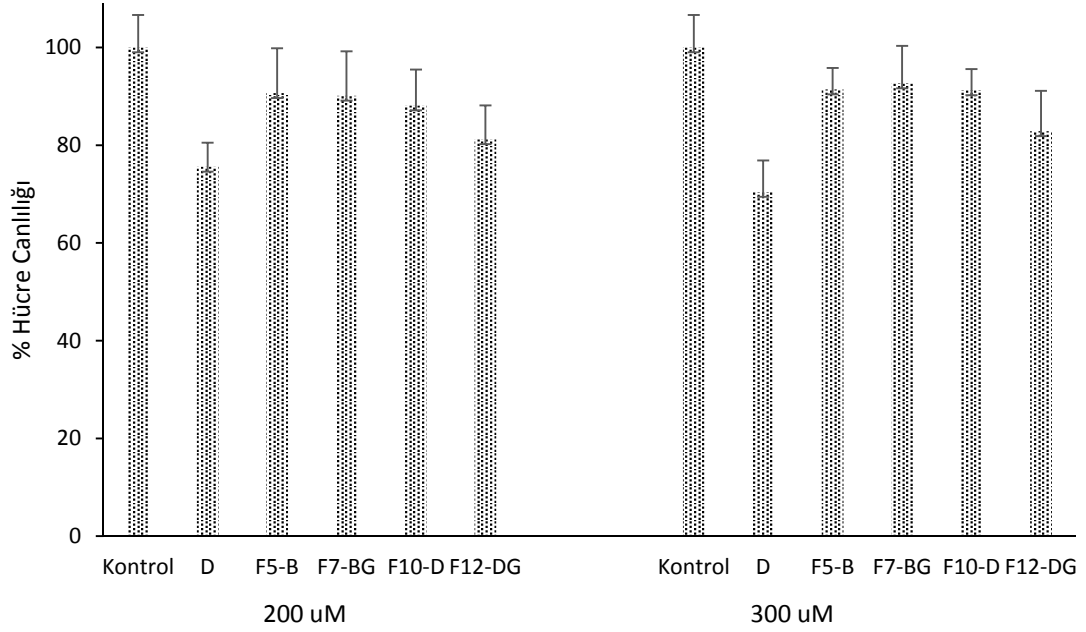
4.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

4.4.1. Nöron Hücreleri Kullanılarak Gerçekleştirilen MTT Test Sonuçları

Daidzein, EO-ÇD yöntemi ile hazırlanmış boş ve daidzein-yüklü PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartikül formülasyonlarının nöron hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen MTT testi, Bölüm 3.2.6.1’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiş ve deney sonucunda tespit edilen % hücre canlılığı verileri Şekil 4.54 ve Şekil 4.55’te ve tüm verilere ait grafik ise Şekil 4.58’de verilmiştir.



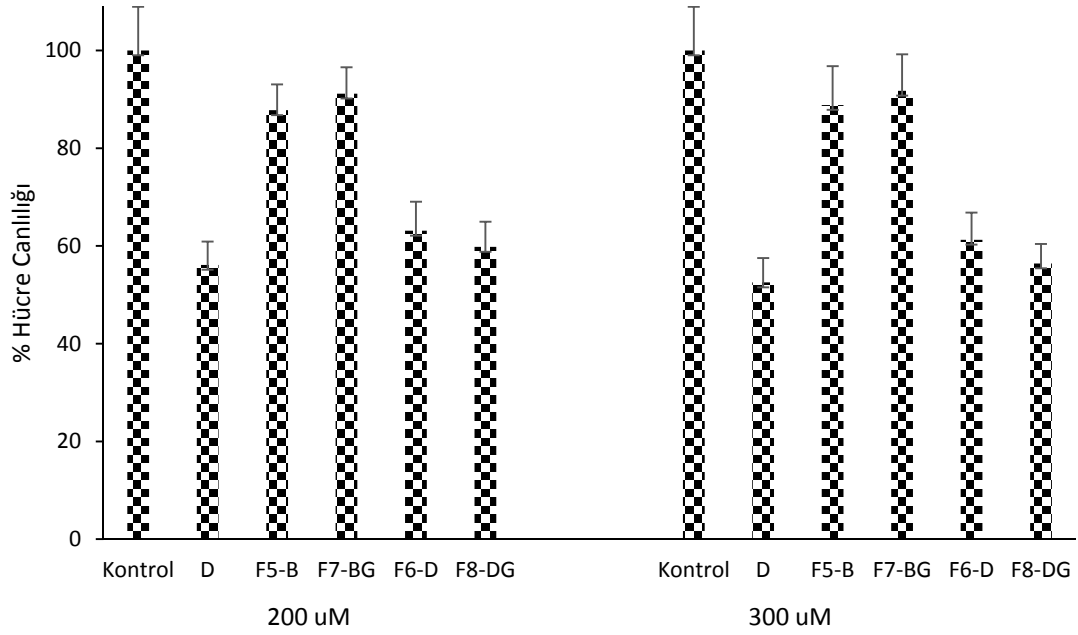
Şekil 4.54. Daidzein, PLGA (75:25) ve PLGA (75:25)-Gelucire® 44/14 nanopartikül formülasyonlarının nöron hücreleri üzerindeki nörotoksik etkileri.



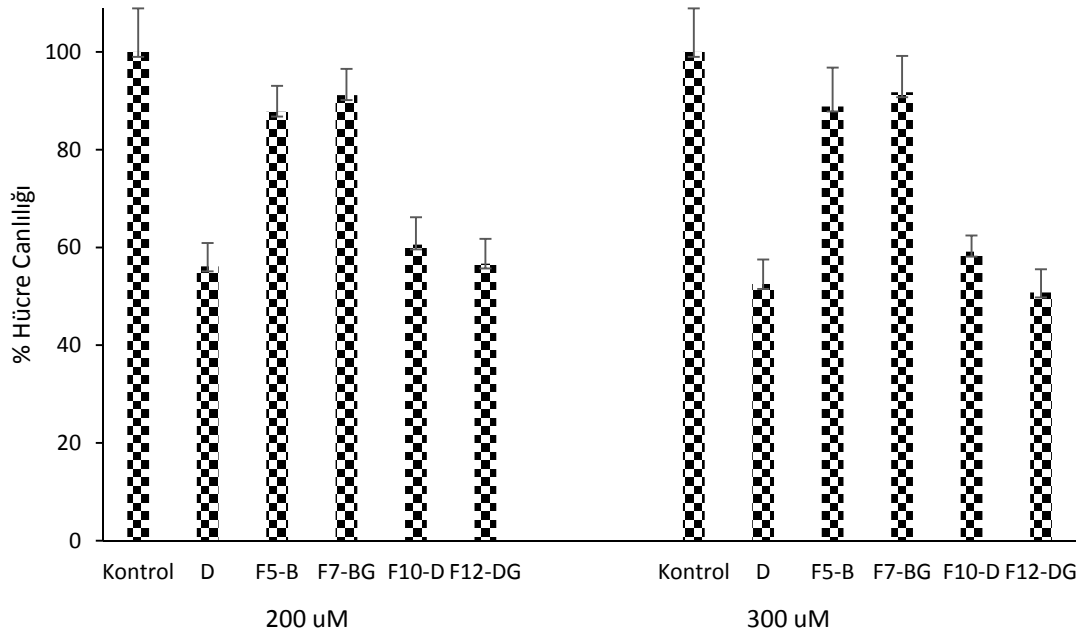
Şekil 4.55. Daidzein, PLGA (50:50) ve PLGA (50:50)-Gelucire® 44/14 nanopartikül formülasyonlarının nöron hücreleri üzerindeki nörotoksik etkileri.

4.4.2. U-87 MG Hücreleri Kullanılarak Gerçekleştirilen MTT Test Sonuçları

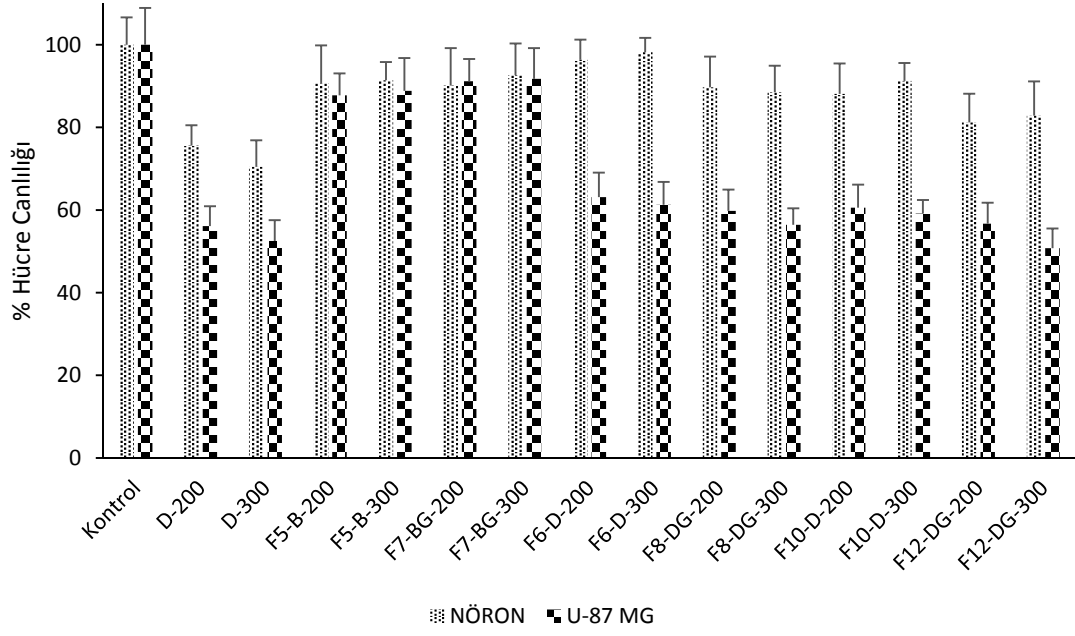
Daidzein, EO-ÇD yöntemi ile hazırlanmış boş ve daidzein-yüklü PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartikül formülasyonlarının U-87 MG hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen MTT testi, Bölüm 3.2.6.2’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiş ve deney sonucunda tespit edilen % hücre canlılığı verileri Şekil 4.56 ve Şekil 4.57’de, tüm verilere ait grafik ise Şekil 4.58’de verilmiştir.



Şekil 4.56. Daidzein, PLGA (75:25) ve PLGA (75:25)-Gelucire® 44/14 nanopartikül formülasyonlarının U-87 MG hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri.



Şekil 4.57. Daidzein, PLGA (50:50) ve PLGA (50:50)-Gelucire® 44/14 nanopartikül formülasyonlarının U-87 MG hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri.



Şekil 4.58. Nöron ve U-87 MG hücreleri üzerindeki nörotoksisite ve sitotoksisite testine ait tüm veriler.

5. TARTIŞMA

Sağlıklı vücut ve organlarda anormal veya hastalıklı hücrelerin oluşumu ile gelişen belli hastalıklara yönelik ilaç ve diğer terapötik ajanların kullanımı modern tıbbın esas stratejisini oluşturmaktadır. İlaçların hastalıklı/anormal olan bu organlara/hücrelere etki edebilmesi için öncelikle fizyolojik bariyerleri aşması ve hedef dokuya/hücreye ulaşması gerekmektedir. Ancak, tüm ilaçlar potansiyel bir toksisiteye sahiptir ve bu durum ilaçların güvenli kullanım dozunu ve bundan dolayı da terapötik etkinliğini sınırlandırır.¹⁷⁰

Konvansiyonel ilaç tedavisinde etkin madde plazma düzeyini terapötik pencere aralığında tutmak için periyodik dozlama (gün içinde birkaç kez etkin madde dozunun tekrarı) gerekmektedir. Birçok etkin madde için konvansiyonel dozaj şekilleri oldukça etkindir. Ancak, bazı durumlarda, terapötik plazma konsantrasyonunun devam ettirilebilmesi için devamlı ilaç kullanım gerekliliği, plazma konsantrasyon-zaman grafiğinde dalgalanmaların oluşması, istenmeyen yan etkilerin görülmesi, hasta uyuncunun düşmesi ve terapötik etkinliğin azalması gibi konvansiyonel dozaj şekilleri ile ilgili bazı sakıncalar ortaya çıkmaktadır. Konvansiyonel dozaj şekillerinin bu sakıncalarını ortadan kaldırmak/azaltmak üzere değiştirilmiş salım sistemleri geliştirilmiştir.^{1, 171} Dolayısıyla, bu sistemler, etkin madde çözünürlüğünün artırılması, etkin madde dozunun düşürülmesi, etkin madde salım hızının/yerinin kontrol edilmesi, etkin madde biyoyararlanımının artırılması, yan/istenmeyen etkilerin azaltılması, dozlama sıklığının düşürülmesi, hasta uyuncunun ve terapötik etkinliğin artırılması olarak sıralayabileceğimiz pek çok üstünlüğe sahiptirler.^{170, 171}

Beyin tümörleri hızlı gelişimi ve kötü prognozu nedeniyle hala aşılması gereken önemli bir sağlık sorunudur. Glioma en sık görülen beyin tümörüdür (tüm primer beyin ve merkezi sinir sistemi tümörlerinin % 29'unu oluşturur) ve tedavi olmayan hastalar 3 aydan daha az yaşarken, kombinasyon halinde (cerrahi müdahale, radyoterapi ve

kemoterapi) tedavi alan hastalar için ise ortalama yaşam süresi 20 aydan azdır.^{118, 119}

Nanoterapötik yaklaşımlar kanser teşhis ve tedavisi için muazzam bir potansiyele sahiptir. Örneğin, nanotaşıyıcılar kanser direncinin aşılmasında, antikansorejenlerin toksik ve istenmeyen etkilerinin engellenmesinde/azaltılmasında, tedavi etkinliğinin düzeltilmesinde, KBB'nin aşılmasında (hedeflendirilmiş/modifiye nanopartiküler sistemlerle veya lokal olarak doğrudan beyin içine uygulanan nanopartiküllerle) ve hasta yaşam süresinin/kalitesinin artırılmasında önemli faydalar sağlayabilmektedir. KBB ve beyin dokusunun zayıf penetrasyonu güncel ilaç uygulama yöntemlerini sınırlandırmaktadır. Lokal kemoterapiyle (özellikle biyoparçalanabilir polimerik nanopartiküler sistemler) KBB aşılmakta, beyin dokularına dağılım iyileştirilmekte, sistemik toksisite ve dozlama sıklığı azaltılırken, tümör bölgesinde sürekli etkin madde salımı ve daha yüksek etkin madde konsantrasyonu sağlanmaktadır.^{118, 132, 172} Nanopartiküler sistemler ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır ve yapılmaya da devam edilmektedir. Polimerik partiküller, çok farklı yollarla (intravasküler, oral, pulmoner, subkütan vb.) çok yönlü kullanıma imkân sağlayan, her uygulama yolu için farklı tasarımlar gerektiren sistemlerdir.¹⁷³ Nanopartiküler taşıyıcı sistemlerde, etkin maddeler hapsedilmiş ve/veya yüzeye adsorbe olmuş halde bulunurlar.¹⁷⁴⁻¹⁷⁶

Günümüzde biyoparçalanabilir sentetik polimerler yaygın bir şekilde ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması amacıyla kullanılmaktadır. Sentetik bir polimer olan PLGA özellikle nanopartiküler sistemlerin hazırlanmasında ve doku mühendisliği alanında çok başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. FDA ve EMA tarafından onaylı olması, çok farklı yapılara sahip etkin maddeleri içeren ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında kullanılabilmesi, uzun süreli klinik deneyimin kazanılmış olması, degradasyon özelliklerinin sürekli salım sistemlerinin hazırlanması için uygun olması, biyouyumlu ve biyoparçalanabilir olması PLGA'nın önemli üstünlüklerindendir.^{11, 35} PLGA

nanopartiküllerinin hazırlanması amacıyla, emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi, nanopresipitasyon yöntemi ve EO-ÇD yöntemi yoğun bir şekilde kullanılmaktadır.¹⁷⁴

Daidzein antienflamatuar, antioksidan ve enzim inhibitörü özelliklerine sahiptir. Ayrıca, LDL düzeyini düşürür, sitokinleri, hücre adezyon proteinlerini ve platelet agregasyonunu inhibe eder ve nitrik oksit üretimini ise indükler. Bundan dolayı, yapılan çalışmalarda daidzeinin insan sağlığı açısından çok çeşitli faydalarının olduğu raporlanmıştır. Bunlar arasında; kardiyovasküler hastalıkların tedavisi, kanserin önlenmesi/tedavisi, östrojen takviyesi için bir alternatif olması, osteoporozun (menopoz sonrası kemik kaybı olan kadınlarda) önlenmesi/tedavisi ve diyabetin önlenmesi sayılabilir. Bazı çalışmalarda, daidzeinin kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği ve osteoblast hücrelerinin çoğalmasını sağladığı belirtilmiştir. Daidzeinin hiyaluronik asit üretimini uyardığı ve topikal uygulandığında ise cildi oksidatif hasarlardan (UV ışınlarından) koruduğu gösterilmiştir. Daidzein özellikle postmenopozal bayanlarda yaşlanmayı önlemek üzere umut verici bir ajan olarak görülmektedir.^{82-84, 92, 95, 97, 112, 177} Prostat, meme, rahim ağzı ve kolon kanseri hücrelerinde daidzeinle ilgili çalışmalar yapılmış ve antikanserojen özellikleri gösterilmiştir. Daidzeinin hücre döngüsü ilerlemesini kontrol eden genlerin modülasyonu yoluyla kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği raporlanmıştır.⁹⁸

Lo ve ark.¹⁰¹ daidzeinin nöroblastoma (çocuklarda sıklıkla görülen periferik sempatik sinir sistemi tümörü) hücrelerindeki antitümör etkilerini incelemişler ve daidzeinin hücre döngüsü ilerlemesini (G₂/M fazına) önleyerek hücre çoğalmasını inhibe ettiğini saptamışlardır. Başka bir çalışmada ise, daidzeinin Bcl-2/Bax apoptotik yolak yoluyla apoptozisi indükleyen D-galaktozu inhibe edebildiği ve nörodejenerasyon tedavilerinde kullanılmak üzere potansiyeli olduğu raporlanmıştır.¹¹⁰ Siegelin ve ark.¹¹¹

tarafından ise daidzeinin glioblastoma hücrelerinde apoptotik yolları inhibe ettiği ve malign glioma hücre ölümünde TRAIL ile birlikte kullanıldığında ise Bcl-2'nin anahtar faktör olduğu ifade edilmiştir.

Daidzein, genellikle oral yolla kullanılmaktadır. Daidzein süspansiyonunun sıçanlara oral olarak uygulanması sonrası mutlak biyoyararlanımının % 6.1 olduğu saptanmıştır.^{82, 91} Daidzenin, düşük çözünürlüğü ve düşük partision katsayısı gibi fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra bağırsak ve karaciğerde uğradığı yoğun metabolizasyondan dolayı düşük oral biyoyararlanıma sahiptir. Bu nedenle, parenteral preparatlarının geliştirilmesi yönünde çalışmalar yapılmaktadır.^{83, 84} Bununla birlikte, daidzeinin hastalıkların önlenmesine/tedavisine yönelik uygulanabilmesi, biyoyararlanımının artırılması ve sürekli salımının sağlanabilmesi amacıyla daidzein-yüklü modern ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi düşünülmüş ve bununla ilgili çalışmalar yapılmıştır.^{66, 82, 112, 177, 178} Nanotaşıyıcılar, flavonoidlerin düşük çözünürlük, kısa yarı ömür ve düşük biyoyararlanım gibi problemlerinin üstesinden gelinmesi için uygun sistemlerdir. Bu nanotaşıyıcılar arasında lipozomlar, SLN'ler, PEG-SLN'ler, PEG-lipozomlar, PLGA ve CS nanopartiküller/mikropartiküller, SMEDDS'ler ve nanoemülsiyonlar yer almaktadır.^{61, 66, 72, 82-84, 95, 112, 177, 178}

Daidzein-yüklü PLGA nanopartikülleri ile ilgili yapılmış 3 çalışma bulunmuştur.^{82, 177, 178} Aynı grup tarafından gerçekleştirilen bu çalışmalardan ilki, sıçanlara enjekte edilen daidzein-yüklü nanopartiküllerin farmakokinetik özelliklerinin incelenmesini kapsamaktadır. Bu amaçla, sıçanlara daidzein içeren PLGA nanopartikül ve saf daidzein süspansiyonları i.v. olarak uygulanmış ve elde edilen plazmalarda daidzein tayini için HPLC yöntemi geliştirilmiş ve farmakokinetik parametreler açısından nanopartiküllerle saf daidzein arasında önemli farklar olduğu saptanmıştır.¹⁷⁸ İkinci çalışmada ise, sıçan plazmasında daidzein tayini için UPLC/Q-TOF-MS (ultra

performans sıvı kromatografisi/kuadropol-zaman-yol bağımlı kütle spektroskopisi) kullanılarak analitik bir yöntem geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Saf daidzein, daidzein-yüklü PLGA nanopartikülleri ve sodyum kaprat (absorpsiyon artırıcı)-daidzein-yüklü nanopartikül süspansiyonları sıçanlara oral olarak uygulanmıştır. Sodyum kapratın kullanılmasıyla daidzeinin oral absorpsiyonunda önemli bir artışın sağlandığı ifade edilmiştir.¹⁷⁷ Son çalışmada ise, daidzeinin oral biyoyararlanımını artırmak üzere, daidzein-fosfolipid kompleksi-yüklü PLGA nanopartikülleri (DF-PLGA-NP) ve daidzein-siklodekstrin inklüzyon kompleksi-yüklü PLGA nanopartikülleri (DS-PLGA-NP) sırasıyla emülsiyon oluşturma (Y/S)-çözücü buharlaştırma yöntemi ve çoklu emülsiyon yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Organik çözücü olarak DCM ve sulu faz olarak ise PVA'nın sulu çözeltisi (% 1, a/h) kullanılmıştır. PLGA konsantrasyonunun ve molekül ağırlığının, hazırlanan nanopartiküllerin boyutu ve % EE değerleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu, PLGA molekül ağırlığının 5000 Da'dan 15000 Da'a çıkarılması sonucu, partikül boyutu ve % EE değerlerinde önemli bir artış olduğu saptanmıştır. Aynı şekilde, polimer konsantrasyonunun 30 mg/mL'den 40 mg/mL'ye çıkarılmasıyla partikül boyutunda anlamlı bir artış sağlanırken, % EE açısından ise anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Dolayısıyla, polimer molekül ağırlığı 15000 Da ve polimer çözeltisi konsantrasyonu ise 30 mg/mL olarak seçilmiştir. PVA'nın stabilize edici ajan olarak seçilerek diğer yüzey aktif maddelerle karşılaştırılması sonucu ise PVA'nın partikül yüzeyinde ince bir film oluşturarak partikül boyutunu kontrol altında tuttuğu, daidzein kaçışını önlediği ve sonuç olarak da daha yüksek % EE değerine sahip küçük partiküllerin hazırlanabildiği bildirilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları sonucu elde edilen % EE, % YK, partikül boyutu ve ZP değerleri sırasıyla ~% 83, % 1.75, 309 nm ile -18.7 mV (DS-PLGA-NP için) ve ~% 82, % 1.27, 323 nm ile -32 mV (DF-PLGA-NP için) olarak tespit edilmiştir. PB (pH 7.4) ortamında gerçekleştirilen *in vitro* salım

çalışmalarında saf daidzein, DF-PLGA-NP ve DS-PLGA-NP formülasyonlarından 72. saatteki kümülatif salım %'leri, sırasıyla ~% 27, % 80.9 ve % 90 olarak saptanmıştır. Hazırlanan bu formülasyonlar sıçanlara oral olarak (10 mg/kg daidzeine eşdeğer) uygulanmış ve farmakokinetik parametreler saptanmıştır. Daidzein süspansiyonu ile karşılaştırıldığında DF-PLGA-NP ve DS-PLGA-NP'nin, daidzeinin bağıl biyoyararlanımını sırasıyla 5.57 ve 8.85 kat artırdığı raporlanmıştır.⁸² Bu tez çalışması kapsamında, daidzein-yüklü PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartikülleri EO-ÇD ve M-EO-ÇD yöntemleri kullanılarak hazırlanmış ve *in vitro* olarak karakterize edilmiştir. EO-ÇD yöntemi ile hazırlanmış nanopartiküllerin sitotoksik etkileri U-87 MG GBM hücreleri kullanılarak test edilmiştir. Aynı zamanda, söz konusu nanopartiküllerin nörotoksik etkileri de nöron hücreleri üzerinde incelenmiştir.

Bu çalışmada, nanopartiküllerin hazırlanması için, polimer olarak PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) ve stabilize edici ajan olarak ise PVA [damlacık yüzeyine adsorbe olarak damlacıkların birbirine yapışmasını engellediği ve partikül stabilitesini artırdığı (tekrarlayan yıkamalar sonrası bile ara yüzeyde kalıp yüzeyde polimer ile bağlantılı bir ağ yapısı oluşturur) için] seçilerek kullanılmıştır.¹⁷⁹ Ayrıca, amfifilik özellikte bir yardımcı madde olan Gelucire® 44/14 de etkin maddelerin sudaki çözünürlüğünü artırıcı özelliği ve stabilize edici ajan olarak da kullanılabilmesi dolayısıyla seçilmiş ve daha küçük boyutlara sahip daidzein-yüklü PLGA nanopartiküllerinin hazırlanması amacıyla bu tez çalışmasında kullanılmıştır.

Emülsiyon oluşturma temeline dayanan farklı nanoenkapsülasyon teknikleri mevcuttur (örn: tekli/çoklu emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma/ekstraksiyon yöntemleri, nanopresipitasyon, membran emülsifikasyon yöntemi gibi). Her bir tekniğin kendine ait üstünlükleri ve sakıncaları mevcuttur. Konvansiyonel emülsifikasyon tekniklerinde polimer içeren organik faz, sulu faz (organik fazdan daha fazla miktarda

olan) içerisinde disperse edilir. Bu işlem, homojen emülsiyon damlacıklarının hazırlanmasını ve PLGA çökme hızının kontrolünü güçleştirir. Sonuç olarak, partikül boyutu dağılım aralığının genişlemesi, seriler arası tekrarlanabilirliğin ve % EE'nin düşmesi gibi aksaklıklar ortaya çıkabilmektedir.¹⁶³ Klasik Y/S emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yönteminde polimer çözeltisi (organik faz) stabilize edici ajan içeren sulu faz içerisinde homojenize edilir ve daha sonra organik çözücü ortamdan ya oda sıcaklığında devamlı karıştırılarak ya da alçak basınç/sıcaklık/vakum uygulanarak (daha hızlı bir şekilde) uzaklaştırılır. Özellikle, hidrofobik etkin maddelerin enkapsülasyonu için uygun olan bu yöntemde çoğunlukla kullanılan DCM, düşük kaynama noktasına sahip (39.8-40 °C), su ile karışmayan ve yoğunluğu 1.320-1.332 g/mL olan bir çözücüdür.^{67 (2021), 180} EO-ÇD yönteminde ise su ile kısmen karışan, yoğunluğu 0.898-0.902 g/mL ve kaynama noktası 76.5-77.5 °C olan EA çoğunlukla tercih edilerek kullanılmaktadır.^{67 (2023), 181} Bu yöntemde yeterli miktarda su, Y/S emülsiyonuna ilave edilerek ve oda sıcaklığında karıştırılarak organik çözücünün sulu faza difüzyonu gerçekleştirilir. Farmasötik alanda düşük toksisite potansiyeline sahip (Sınıf 3) organik çözücüler (örn: EA, ACE) tercih edilerek kullanılmaktadır. Bundan dolayı, EA tercih edilen bir organik çözücüdür, ancak, emülsiyon oluşumu, çözücünün uzaklaştırılması ve hazırlama verimi açısından EA'nın kısmen su ile karışabilirliği ve düşük uçuculuk özellikleri gibi sınırlamalar söz konusudur.¹⁶³ PLGA nanopartiküllerinin hazırlanması için tek tek çözücülerle ilgili sınırlamaları aşmak üzere organik çözücü karışımları (örn: DCM:EA, DCM:ACE gibi) da sıklıkla kullanılmaktadır.^{160, 182}

Bu bilgiler ışığı altında, M-EO-ÇD ve EO-ÇD yöntemleri kullanılarak hazırlanan daidzein-yüklü nanopartiküllerin boyutu; nanopartiküllerin stabilitesini, hücresel alımını, biyodağılımını ve etkin madde salımını etkileyen önemli bir parametre olarak karşımıza çıkmaktadır.¹⁶⁰ PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartiküllerinin yüzey özellikleri

SEM görüntüleri (Şekil 4.2-Şekil 4.7) alınarak incelenmiş ve nano-boyutlu, yaklaşık küresel yapılar elde edildiği görülmüştür. M-EO-ÇD yöntemi ile hazırlanan nanopartiküllerde herhangi bir agregasyon görülmezken, EO-ÇD yöntemi ile hazırlanan nanopartiküllerin agregasyona uğradığı görülmüştür. Partikül boyutu düşüşüne bağlı olarak gelişen termodinamik stabilite problemi, bu agregasyonun nedeni olarak gösterilebilir. De ve Robinson¹⁸³ tarafından yapılan bir çalışmada, emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak PLGA (50:50) nanopartikülleri hazırlanmış ve partikül boyutu artışı ile nanopartikül agregasyonunun azaldığı, saklama sıcaklığı artışıyla (4 °C'den 50 °C'ye) ise arttığı saptanmıştır. Cooper ve Harirforoosh¹⁸⁴ tarafından yapılan bir çalışmada da % 1 (a/h) PVA çözeltisi kullanılarak hazırlanan PLGA nanopartikülleri 8800 rpm ve 12000 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatantlar kullanılmıştır. Partikül boyutu ve ZP değerleri (8800 rpm ve 12000 rpm) sırasıyla ~130 nm, ~121 nm, -4.2 mV ve -11 mV olarak tespit edilmiştir. Saptanan düşük ZP ve partikül boyutu değerleri sonucu, nanopartiküller arasında agregasyonun görüldüğü raporlanmıştır.

PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartikül formülasyonlarına ait partikül boyutu verileri değerlendirildiğinde, boş ve daidzein-yüklü nanopartikül grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde, istatistiksel bir fark olmadığı ($p \geq 0.05$), yani yüklenen daidzeinin partikül boyutu üzerinde etkisi olmadığı saptanmıştır (Tablo 4.2). Bununla birlikte, M-EO-ÇD yöntemi ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları (F1-B, F2-D, F3-BG, F4-DG) değerlendirildiğinde, Gelucire® 44/14 ilavesi sonrası daha küçük partiküllerin hazırlandığı görülmüş, ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p = 0.05$; Tablo 4.2). M-EO-ÇD (F1-B, F2-D, F3-BG, F4-DG) ve EO-ÇD (F5-B, F6-D, F7-BG, F8-DG, F9-B, F10-D, F11-BG, F12-DG) yöntemleri ile hazırlanan formülasyonlar değerlendirildiğinde ise EO-ÇD yöntemi ile hazırlanan

nanopartiküllerin partikül boyutunun daha küçük olduğu saptanmıştır. İstatistiksel değerlendirme yapıldığında ise $p \geq 0.05$ olarak saptanmış ve anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Polimer tipinin de partikül boyutu üzerinde anlamlı bir fark yaratmadığı saptanmıştır ($p \geq 0.05$; Tablo 4.2). EO-ÇD yönteminde kullanılan polimerin konsantrasyonu/molekül ağırlığı, çözücü özellikleri, stabilize edici ajanın tipi, fazların viskozitesi, organik faz:sulu faz oranları, sıcaklık ve suyun ilave edilme hızı, hazırlanan nanopartiküllerin özelliklerini belirleyen önemli faktörlerdir.¹⁸⁵ Polimer konsantrasyon artışı partikül boyutunun artmasına neden olurken, karıştırma hızı ve stabilize edici ajan konsantrasyonu artışı ise tam tersi etki yaparak daha küçük partiküller elde edilmesini sağlamaktadır. Diğer taraftan, viskozite, dış fazın pH'sı, organik faz:sulu faz hacim oranlarının değiştirilmesi bu yöntemde partikül boyutu üzerinde sınırlı etkilere sahiptir.⁴²

Sahana ve ark.¹⁶⁰ estradiol maddesini model ilaç olarak kullanarak hidrofobik ilaçların oral taşınmasına yönelik PLGA (50:50) nanopartiküllerini hazırlamışlar ve kullanılan organik çözücünün nanopartikül oluşumu üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Nanopartikülleri hazırlamak için emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemini kullanmışlardır. Hazırlama aşamasında EA, DCM, ACE ve CF organik çözücü olarak kullanılmış ve iki farklı stabilize edici ajan [PVA ve didodesildimetil amonyum bromür (DMAB)] seçilerek etkinlikleri incelenmiştir. Organik çözücünün fiziksel özelliklerinin, etkin madde ve polimeri çözme kabiliyetinin doğrudan partikül boyutu ve % EE'ni etkilediğini ifade etmişlerdir. EA tek kullanıldığında, düşük ara-yüzey geriliminden dolayı % 1 (a/h) DMAB veya PVA kullanıldığında bile primer emülsiyon stabilitesinin sağlandığı ve daha küçük partiküllerin elde edildiği vurgulanmıştır. Bununla birlikte, DCM veya CF tek kullanıldığında ise daha yüksek yüzey gerilimi ve yüksek viskoziteden dolayı primer emülsiyon stabilitesinin sağlanamadığı ifade edilmiştir. Stabilize edici ajan olarak

PVA'nın sulu çözeltisi (% 1, a/h) ve organik çözücü olarak da DCM:EA karışımı (50:50 ve 60:40 oranlarında) kullanıldığında ise EA'nın tek kullanıldığı duruma göre daha büyük partiküller hazırlanmıştır. Elde edilen partikül boyutları sırasıyla ~414 nm (DCM:EA, 50:50; boş NP), ~493 nm (DCM:EA, 50:50; etkin madde yüklü NP), ~452 nm (DCM:EA, 60:40; boş NP), ~583 nm (DCM:EA, 60:40; etkin madde yüklü NP) ve ~257 nm (EA; boş NP), ~279 nm (EA; etkin madde yüklü NP) olarak tespit edilmiştir. Çözücü kombinasyonunda DCM miktarının artmasıyla viskozite ve ara-yüzey geriliminin arttığı ve primer emülsiyon stabilitesinin sağlanmasının zorlaştığı ve partikül boyutu artışı ile sonlandığı bildirilmiştir. Bu sonuçlar, bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla örtüşmektedir (Tablo 4.2). Ayrıca, Gelucire® 44/14 ilavesiyle ara-yüzey geriliminin düştüğü ve partikül boyutlarında düşüşün sağlandığı çalışmamızda tespit edilmiş, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p \geq 0.05$; Tablo 4.2). Literatür taramasında PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartikülleri ile ilgili yapılmış bir çalışma bulunamamıştır.

Zeta potansiyel, nanosistemlerin farmakokinetik özelliklerini veya bu sistemlerin fagositoza uğramasını etkileyebilir.¹⁸⁶ Sıfıra yakın ZP değerlerine sahip nanopartiküller yüklü nanopartiküllerle karşılaştırıldığında azalmış fagositik alıma uğrarlar. Nanopartiküller pH'sı 9 olan PVA çözeltisi ile hazırlandığında, karboksil grupları (PLGA'dan) ve hidroksil grupları (PVA'dan) nanopartikül yüzeyine yakın yerleşir ve yüksek ZP değeri (-24.97 mV) ölçülür. Ancak, PVA çözeltisinin pH değeri düştükçe (pH 7 civarında) ZP değeri de düşerek sıfıra yaklaşır.¹⁸⁷ Bizim çalışmamızda, hazırlanan PLGA nanopartikül formülasyonlarının ZP değerleri sıfıra yakın (-14.70 ± 0.36 -- 0.50 ± 0.34) olarak belirlenmiştir (Tablo 4.2). Gelucire® 44/14 ilavesiyle zeta potansiyelde hafif bir artış sağlanmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirmede ise tüm formülasyonların ZP değerleri açısından aralarında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır

($p \geq 0.05$; Tablo 4.2). ZP üzerinde hazırlama yönteminin etkili olmadığı saptanmıştır ($p \geq 0.05$). Bizim çalışmamızda elde edilen ZP değerleri literatürle uyumlu sonuçlar göstermiştir.^{160, 184, 188}

Sahana ve ark.¹⁶⁰ stabilize edici ajan olarak PVA'nın sulu çözeltisi (% 1, a/h) ve organik çözücü olarak da DCM:EA karışımı (50:50 ve 60:40 oranlarında) ve sadece EA kullanarak hazırladıkları PLGA nanopartikülleri için saptadıkları ZP değerlerinin -2.1 mV ile -7.2 mV aralığında olduğunu bildirmişlerdir.

Chitkara ve ark.¹⁸⁸ tarafından yapılan bir çalışmada, EA ve % 1 (a/h) PVA kullanılarak M-EO-ÇD yöntemi ile PLGA (75:25) nanopartikülleri hazırlanmıştır. Hazırlanan nanopartiküllerin ZP değerleri -6 mV civarında saptanmış, % EE değerlerindeki değişimin ZP üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığı, nanopartikül süspansiyonlarının stabilitesi açısından bu durumun sakıncalı olduğu (agregasyon oluşumu açısından), böyle durumlarda, hazırlanan nanopartiküllerin liyofilize halde saklanması stabilite açısından en doğru yol olacağı vurgulanmıştır.

Tüm formülasyonlar için hazırlama verimi değerleri % 60'ın üzerinde elde edilmiştir. M-EO-ÇD yöntemi ile hazırlanmış tüm formülasyonların hazırlama verimi değerleri % 95.05 $\pm$ 3.17-% 96.79 $\pm$ 0.19 aralığında saptanmış ve Gelucire® 44/14 ilavesinin hazırlama verimi üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür ($p > 0.05$; Tablo 4.3). EO-ÇD yöntemi ile hazırlanan PLGA nanopartikülleri için hazırlama verimi değerleri % 87.11 $\pm$ 0.48-% 97.48 $\pm$ 1.02 ($p \geq 0.05$; Tablo 4.3) iken PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartikül formülasyonları için ise Gelucire® 44/14 ilavesi sonucu hazırlama verimi düşerek % 62.78 $\pm$ 4.55-% 69.69 $\pm$ 2.93 ($p \geq 0.05$; Tablo 4.3) aralığında elde edilmiştir. Ancak, PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartikül formülasyonlarının hazırlama verimi değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p \geq 0.05$). McCall ve Sirianni,¹⁸⁹ hidrofobik ve hidrofilik etkin maddeleri içeren PLGA

nanopartiküllerini hazırlamak üzere tekli ve çoklu emülsiyon oluşturma-çözücü (DCM) buharlaştırma ve çözücü (EA) difüzyonu yöntemlerini kullanmışlardır. Hazırlama verimi değerlerinin % 74-% 98 aralığında elde edildiğini, santrifüj sırasında tam olarak toplanamayan daha küçük boyutlu nanopartiküller (<150 nm) için daha düşük hazırlama verimi değerlerinin elde edildiği bildirilmiştir. EA kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerin DCM kullanılarak hazırlanan nanopartiküllere göre daha küçük ve daha homojen boyutlara sahip olduğu da vurgulanmıştır. Benzer sonuçlar Xin-yu ve ark.¹⁹⁰ tarafından da raporlanmıştır.

Nanopartiküler taşıyıcı sistemlere yüklenen etkin madde miktarının tayin edilmesi amacıyla UV-VIS spektrofotometre kullanılarak miktar tayini yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Doğrusallık çalışmalarında, DMSO:PB (pH 7.4; 1:1, h/h) ortamı için 2-6.5 µg/mL aralığında çalışılmıştır (n=6) (Şekil 4.1). Her seri için elde edilen kalibrasyon doğrusuna ait eğimler karşılaştırılmış ve karşılaştırma sonucunda genel kurala uygun olarak VK değeri <% 1 olarak saptanmıştır.¹⁴⁷

Analitik yöntemin gün içi doğruluk ve kesinliğini tespit etmek üzere kalibrasyon doğrusu aralığında yer alan 3 farklı konsantrasyonda (2.5, 4.5 ve 5.5 µg/mL; n=6/konsantrasyon) standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı gün içinde arka arkaya ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Günler arası doğruluk ve kesinliğin tespiti için de aynı konsantrasyonlar seçilerek hazırlanmış standart çözeltilerin (n=6/konsantrasyon) absorbansları birbirini takip eden 3 gün içinde ölçülmüştür. Gün içi ve günler arası doğruluk için % BH değerleri hesaplanmış ve sırasıyla, 0.016-1.159 ve -1.322--0.166 aralıklarında oldukları saptanmıştır (Tablo 4.1). Gün içi ve günler arası kesinlik için VK değerleri hesaplanmış ve sırasıyla, 0.367-1.202 ve 0.467-0.651 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.1). Hesaplanan değerler % 2'nin altında olduğu için sistemin kesinliği ve doğruluğu kanıtlanmıştır. Analitik yöntem için LOD (0.104 µg/mL) ve LOQ (0.316

$\mu\text{g/mL}$) değerleri hesaplanmış ve ayrıca yöntemin özğünlüğü de değerlendirilerek daidzeinin maksimum absorbans verdiği dalga boyunda formülasýona giren yardımcı maddelerin ve ortam bileşenlerinin absorbans vermediği belirlenmiştir. Sonuç olarak, etkin madde miktar tayini için analitik yöntem geliştirilmiş ve valide edilmiştir.

M-EO-ÇD yöntemiyle hazırlanan PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartikül formülasyonları için elde edilen % EE değerleri sırasıyla % 45.00 ± 0.19 ve % 84.85 ± 2.20 olarak bulunmuştur (Tablo 4.3). Gelucire® 44/14 ilavesi ile % EE değerinde bir artışın sağlandığı tespit edilmiştir ($p=0.05$). DCM'ye bağlı viskozite artışı Gelucire® 44/14 ilavesi ile daha da artmış ve bu durumda % EE değerinde değişime neden olmuş olabilir.¹⁶⁰ EO-ÇD yöntemi ile hazırlanan PLGA nanopartikül formülasyonları için elde edilen % EE değerleri ise % 35.79 ± 3.43 -% 44.01 ± 1.92 aralığında bulunmuştur ($p \geq 0.05$; Tablo 4.3). EO-ÇD yöntemiyle hazırlanan nanopartiküller için kullanılan polimerin (PLA:PGA oranının) ve formülasýona Gelucire® 44/14 ilavesinin (hafif bir düşüş olmasına rağmen) % EE üzerinde önemli/istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sahip olmadığı saptanmıştır. Tüm formülasyonlar için % 3.41 ± 0.41 -% 4.59 ± 0.19 aralığında % YK değerleri elde edilmiştir ($p \geq 0.05$). Sahana ve ark.¹⁶⁰ tarafından M-EO-ÇD ve EO-ÇD yöntemleri ve % 1 (a/h) PVA çözeltisi kullanılarak estradiol-yüklü PLGA nanopartiküllerinin hazırlandığı çalışmada % EE değerleri sırasıyla ~% 90 (DCM:EA, 50:50 kullanıldığında), ~% 96 (DCM:EA, 60:40 kullanıldığında) ve ~% 49 (sadece EA kullanıldığında) olarak saptanmıştır. Başarılı bir enkapsülasyon etkinliği açısından su fazında etkin maddenin düşük çözünürlüğe sahip olması ve polimerin hızlı bir şekilde çökmesi/katılaşması gibi faktörlerin ve özellikle kullanılan çözücülerin fiziksel özelliklerinin çok önemli olduğu belirtilmiştir. EA kısmen su ile karışabilir olmasına rağmen, düşük buhar basıncı nedeniyle yavaş bir polimer çökmesi ve daha düşük oranda bir etkin madde enkapsülasyonu gerçekleşmiştir. DCM:EA karışımları ise DCM oranı

arttıkça daha yüksek % EE değerlerine sahip nanopartiküllerin hazırlanmasını sağlamıştır. Su ile karışmayan DCM'nin ise daha yüksek buhar basıncı nedeniyle su fazına hızlı difüzyonu ve polimer çökmesinin daha hızlı gerçekleşmesi sonucu yüksek % EE değerlerinin elde edildiği vurgulanmıştır.

Daidzein-yüklü PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartikülleri için salım çalışmaları PB (pH 7.4) ortamında gerçekleştirilmiş, F2-D, F6-D ve F10-D kodlu formülasyonlardan % 50 daidzein salımının sırasıyla salımın 3. gününde ve diğer iki formülasyon için de salımın ~12. saatinde gerçekleştiği saptanmıştır. Aynı formülasyonlar için % 100 daidzein salımı sırasıyla salımın 25., 19. ve 21. günlerinde gerçekleşmiştir. Gelucire® 44/14 kullanılarak hazırlanan F4-DG, F8-DG ve F12-DG kodlu formülasyonlardan ise % 50 daidzein salımı sırasıyla salımın 7., 1. günlerinde ve 12. saatinde; % 100 daidzein salımı ise sırasıyla salımın 37., 21. ve 20. günlerinde gerçekleşmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz salım verilerinin literatürlerle uyumlu olduğu görülmüş, polimer molekül ağırlığının, PLA:PGA oranının ve nanopartikül boyutunun etkin madde salımı üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. PLA:PGA oranı hazırlanan taşıyıcı sistemin hidrofilik özelliğini, degradasyonunu etkiler ve sonuç olarak salım hızında değişime neden olur. Polimer yapısında PGA oranı arttıkça polimer daha hidrofilik özellik kazanır, daha fazla su absorpsiyonu gerçekleşir ve sonuç olarak daha hızlı bir degradasyon gerçekleşir [degradasyon hızı: PLGA (50:50)>PLGA (75:25)].^{35, 191, 192} Bununla birlikte, PLGA molekül ağırlığının artmasıyla polimer zincir uzunluğu artmakta ve zincir uzunluğundan dolayı degradasyon daha yavaş gerçekleşmektedir. Ayrıca, hazırlanan nanopartiküllerin boyutu, etkin madde tipi ve konsantrasyonu, polimer-etkin madde matriksinin fiziksel özellikleri, salım ortamının pH'sı gibi faktörler de taşıyıcı sistemden etkin maddenin salımı üzerinde etkilidir.³⁵ Nanopartiküllerin şekli ve partikül boyutu açısından bakıldığında ise salım ortamında, daha küçük boyuttaki

nanopartiküler sistemlerin (artan yüzey alanından dolayı) içerisine daha yüksek hızda su girişi sonucu hızlı bir etkin madde difüzyonu ve daha hızlı bir etkin madde salımı gerçekleşir. Dolayısıyla, yüzey alanı/hacim oranı yüksek olan PLGA nanopartiküllerinden etkin madde salımı daha hızlı gerçekleşir.^{35, 193} PLGA polimerinin degradasyon hızı üzerinde ortam pH'sı da etkilidir. Hafif asidik veya nötral ortamlarda daha yavaş bir degradasyon gerçekleşirken, alkali ve güçlü asidik ortamlarda degradasyon hızı ise artar.³⁵

Mittal ve ark.¹⁹² estradiol-yüklü PLGA nanopartiküllerini hazırlayarak polimer molekül ağırlığının ve PLA:PGA oranlarının *in vitro* salım üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Farklı molekül ağırlığına ve bileşimine sahip PLGA (50:50, MA: 85000 Da; 65:35, MA: 97000 Da ve 85:15, MA: 87000 Da) polimerleri nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılmıştır. PLA oranı artışıyla salım hızı düşmüş, PLGA (50:50); (65:35), ve (85:15) kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerden total etkin madde salımı sırasıyla ~% 55, % 37 ve % 30 oranlarında salımın 27., 21. ve 18. günlerinde gerçekleşmiştir. Ayrıca, farklı molekül ağırlığına sahip PLGA (50:50) kopolimerleri ile hazırlanan nanopartiküllerden ise molekül ağırlığı artışı ve matriks yapı içinde etkin madde difüzyon hızının yavaşlaması nedeniyle etkin madde salım hızının azaldığı ve sürekli bir salım elde edildiği raporlanmıştır.

DSC, etkin madde-polimer etkileşimlerinin incelenmesinde ve polimer analizlerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.¹⁹⁴⁻¹⁹⁶ Dubernet¹⁹⁷ polimerik matriks ve etkin madde arasındaki olası etkileşimleri ve bu etkileşimlerin mikrokürelerin termal özellikleri üzerindeki etkilerini incelemiş ve takip eden hususları vurgulamıştır. Bunlar, a. Mikroküre hazırlanması sırasında, eğer etkin madde başlangıçta ortam içinde dağıtılır ve işlem sırasında da bu şekilde devam ettirilirse, o zaman etkin madde polimer matriksi içerisinde fiziksel olarak süspande olur. Bundan dolayı polimere ait Tg ve etkin maddenin

T_m (erime derecesi) değerleri termogramda yer alır. b. Eğer etkin madde ilk olarak çözündürülürse, bu durumda, katı çözelti, metastabil moleküler dispersiyon ve kristal yapıda dispersiyon olmak üzere 3 olasılıktan bahsedilebilir. Katı çözelti durumunda polimer T_g değerinde düşüş görülürken, etkin maddeye ait T_m ise termogramda görülmez. Metastabil moleküler dispersiyon durumunda polimer T_g değeri aynen korunurken, etkin maddeye ait T_m ise termogramda görülmez. Kristal yapıda dispersiyonda ise hem polimer T_g değeri hem de etkin madde T_m değeri korunur.

Kopolimer bileşimi, T_g değerini ve kristaliniteyi etkilemektedir. Polimerin molekül ağırlığı ve bileşimindeki PLA oranı azaldıkça polimerin T_g değeri düşer.^{156, 198} T_g, sert ve camsı polimerin yumuşak ve kauçuğumsu durumdaki haliyle dengede olduğu sıcaklığa denir.¹⁹⁹ Şekil 4.12’de yer alan PLGA (75:25) kopolimerine ait termogram incelendiğinde, T_g değerinin ~55-60 °C civarında olduğu görülmüştür. PLGA (75:25) için T_g değeri 49-55 °C aralığında değişmektedir.^{156, 200-202} Termogramda görülen ikinci pik ise polimerin termal bozunma sıcaklığı ile ilgili olan keskin endotermik piktir (T_{pik}=375.9 °C). Yapılan çalışmalarda, PLGA (75:25) kopolimerinin 360-371 °C’de termal bozunmasının gerçekleştiği rapor edilmiştir.²⁰¹ PLGA (50:50) kopolimerine ait termogramda ise (Şekil 4.13), ~45-55 °C civarında T_g değerine ait pik ve ~380 °C (T_{pik}=379.9 °C) bozunma sıcaklığı ile ilgili endotermik pik görülmüştür. PLGA (50:50) için T_g değeri 42-50 °C aralığında değişmektedir.²⁰³⁻²⁰⁵ PLGA (50:50) kopolimerinin 250 °C’ye kadar termal stabilitesini koruduğu, ~355 °C’de ise termal bozunmanın gerçekleştiği rapor edilmiştir.²⁰⁶ Başka bir çalışmada ise, kopolimerin termal bozunması ile ilgili olarak 303 °C ve 360 °C’de olmak üzere 2 pik elde edildiği bildirilmiştir.²⁰⁷

Daidzeine ait DSC termogramı incelendiğinde ise erime derecesi ile ilgili olan endotermik pik (T_{pik}=342.1 °C) görülmüştür (Şekil 4.11). Daidzein için belirtilen erime derecesi aralığı 330-340 °C’dir.^{68, 82, 208}

Şekil 4.14’de yer alan termogramda ise Gelucire® 44/14’ün erime derecesi ile ilgili olarak ~50 °C civarında bir pik elde edilmiştir. Bu sonuç literatür sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.^{209, 210} Karataş ve Bekmezci,²¹⁰ Gelucire® 44/14’ün DSC analizini gerçekleştirdiklerinde erime derecesi ile ilgili olan piki 50 °C civarında (Tpik=48.21 °C) tespit etmişlerdir. PLGA (75:25)-daidzein fiziksel karışımına, PLGA (50:50)-daidzein fiziksel karışımına, PLGA (75:25)-Gelucire® 44/14-daidzein fiziksel karışımına ve PLGA (50:50)-Gelucire® 44/14-daidzein fiziksel karışımına ait termogramlarda polimerlere ait Tg ve bozunma sıcaklıkları, etkin maddenin ve Gelucire® 44/14’ün erime dereceleri ile ilgili pikler hafif kayma ve çakışmalarla birlikte tespit edilmiştir (Şekil 4.15-Şekil 4.18).

Boş nanopartikül formülasyonları (Şekil 4.19, Şekil 4.21, Şekil 4.23, Şekil 4.25, Şekil 4.27 ve Şekil 4.29), ilgili etkin madde yüklü nanopartikül formülasyonları (Şekil 4.20, Şekil 4.22, Şekil 4.24, Şekil 4.26, Şekil 4.28 ve Şekil 4.30) ile karşılaştırıldığında PLGA kopolimerlerine ve Gelucire® 44/14’e ait pikler görülürken, etkin maddenin erime derecesine ait pik görülememiştir. Bu durumun, daidzeinin polimerik matriks içerisinde moleküler düzeyde dağılmasının sonucu olduğu söylenebilir.¹⁹⁷

FT-IR analizi ile yapıda var olan çeşitli bağların titreşim frekansları ölçülerek yapıdaki fonksiyonel gruplar hakkında bilgi edinilebilir.¹⁶⁷ Daidzeine ait spesifik bantlar -OH, -C=O, -C=C, -C-O, -C-H gruplarından kaynaklanmaktadır.²¹¹⁻²¹³ -OH gerilme titreşimleri ile ilgili karakteristik pikler 3600-3200 cm⁻¹ (intermoleküler -OH) ve 3700-3500 cm⁻¹ (serbest -OH) aralığında görülmektedir. -C=O gerilme titreşimleri 1820-1670 cm⁻¹, -C=C gerilme titreşimleri 1400-1600 cm⁻¹, aromatik -C-H titreşimleri 3010-3100 cm⁻¹ ve 690-900 cm⁻¹ aralıklarında gözlenir. Daidzeine ait FT-IR spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.34), -OH grubuna ait gerilme titreşimleri 3787.1 cm⁻¹ (serbest -OH) ve 3154.44 cm⁻¹ (intermoleküler -OH)’de, -C=O grubuna ait gerilme titreşimi

1629.62 cm^{-1} 'de, aromatik $-\text{C}=\text{C}$ grubuna ait gerilme titreşimleri 1595.51-1459.87 cm^{-1} aralığında, $-\text{C}-\text{O}$ grubuna ait gerilme titreşimleri 1278.99-1096.74 cm^{-1} aralığında, aromatik $-\text{C}-\text{H}$ eğilme titreşimleri 842.47 cm^{-1} 'de görülmüştür. Bu veriler, literatür sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur.²¹¹⁻²¹³

PLGA kopolimerlerinin FT-IR spektrumlarında karbonil gruplarına (LA ve GA yapılarında yer alan) ait gerilme titreşimleri ile ilgili bantlar 1770-1750 cm^{-1} aralığında, asimetrik ve simetrik $-\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}$ gerilmeleri ile ilgili orta şiddette bantlar 1300-1150 cm^{-1} aralığında (bantlar ester yapılarının karakterizasyonu açısından önemli) görülür. 3500-3450 cm^{-1} aralığında $-\text{OH}$ grubuna ait gerilme titreşimleri, 3010-2885 cm^{-1} ve 1186-1089 cm^{-1} aralıklarında sırasıyla $-\text{C}-\text{H}$ ve $-\text{C}-\text{O}$ gerilme titreşimleri, 1450-850 cm^{-1} aralığında $-\text{C}-\text{H}$ eğilme titreşimleri gözlenmektedir.^{198, 200, 201, 214-216} PLGA (75:25) kopolimerine ait IR spektrumunda (Şekil 4.35), $-\text{C}=\text{O}$ grubuna ait gerilme titreşimi 1750.37 cm^{-1} 'de, asimetrik ve simetrik $-\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}$ grubuna ait gerilme titreşimleri 1320.22-1177.23 cm^{-1} aralığında, $-\text{C}-\text{H}$ grubuna ait gerilme titreşimleri 2994.23-2857.14 cm^{-1} aralığında, $-\text{C}-\text{O}$ grubuna ait gerilme titreşimleri 1103.03-1083.20 cm^{-1} aralığında, $-\text{C}-\text{H}$ eğilme titreşimleri 1419.91-863.82 cm^{-1} aralığında saptanmıştır.

PLGA (50:50)'ye ait spektrum incelendiğinde (Şekil 4.36) ise, $-\text{C}=\text{O}$ gerilme titreşimi 1751.47 cm^{-1} 'de, asimetrik ve simetrik $-\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}$ gerilme titreşimleri 1381.81-1171.77 cm^{-1} aralığında, $-\text{C}-\text{H}$ gerilme titreşimleri 2938.83-2862.74 cm^{-1} aralığında, $-\text{C}-\text{O}$ gerilme titreşimleri 1130.95-1094.98 cm^{-1} aralığında, $-\text{C}-\text{H}$ grubuna ait eğilme titreşimleri 1381.81-841.95 cm^{-1} aralığında tespit edilmiştir.

Şekil 4.37'de verilen Gelucire® 44/14'e ait spektrum incelendiğinde, karakteristik pikler görülmüştür. $-\text{C}=\text{O}$ grubuna (ester) ait gerilme titreşimi 1738.30 cm^{-1} 'de, $-\text{C}-\text{H}$ grubuna ait gerilme titreşimleri 2923.16-2856.39 cm^{-1} aralığında, $-\text{C}-\text{O}$ grubuna ait gerilme titreşimleri ise 1146.75-1061.06 cm^{-1} aralığında saptanmıştır.^{55, 209, 210}

Fiziksel karışımlara ait FT-IR spektrumları incelendiğinde ise etkin maddeye, PLGA kopolimerlerine ve Gelucire® 44/14'e ait karakteristik piklerin genel olarak (sadece 1629.62 cm⁻¹'deki etkin maddeye ait karakteristik pik PLGA (50:50)-Gelucire® 44/14-daidzein fiziksel karışımı için saptanamamıştır) korunduğu görülmüştür (Şekil 4.38-Şekil 4.41).

F1-B ve F2-D formülasyonlarına ait spektrumlar incelendiğinde (Şekil 4.42 ve Şekil 4.43), boş nanopartikül formülasyonuna (F1-B) ait spektrumdan farklı olarak F2-D'ye ait spektrumda daidzeinle ilgili olduğu düşünülen 3781.51 cm⁻¹ ve 479.48 cm⁻¹'deki titreşimlerde artış olduğu görülmüştür. Şekil 4.44 ve Şekil 4.45'te verilen F3-BG ve F4-DG formülasyonlarına ait spektrumlar incelendiğinde, F3-BG spektrumundan farklı olarak F4-DG spektrumunda daidzein varlığından dolayı -OH gerilme titreşimlerine ait pik 3339.27 cm⁻¹'de görülmüştür. Ayrıca, yine etkin madde varlığından dolayı, boş formülasyona ait spektruma göre F4-DG spektrumundaki piklerin (1454.27 cm⁻¹'de, 962.99-745.51 cm⁻¹ aralığında görülen) şiddetinde artış olduğu saptanmıştır. F5-B ve F6-D formülasyonlarına ait spektrumlar (Şekil 4.46 ve Şekil 4.47) karşılaştırıldığında ise F6-D'ye ait spektrumda 1600-1500 cm⁻¹ ve 550-400 cm⁻¹ aralığında daidzeinden kaynaklandığı düşünülen pikler görülmüştür. F7-BG ve F8-DG'ye ait spektrumlar arasındaki farklılık ise F8-DG spektrumunda daidzeinle ilgili olduğu düşünülen 3781.51 cm⁻¹ (-OH gerilme titreşimleri) ve 749.85 cm⁻¹'deki piklerin şiddetinde artışın görülmesidir (Şekil 4.48 ve Şekil 4.49). F10-D spektrumunda ise F9-B FT-IR spektrumundan farklı olarak daidzeinle ilgili olarak 2379.54 cm⁻¹ ve 2273.22 cm⁻¹, 841.25 cm⁻¹'de pikler olduğu saptanmıştır (Şekil 4.50 ve Şekil 4.51). F11-B ve F12-D formülasyonlarına ait spektrumları karşılaştırıldığında ise F12-D spektrumunda 2375.35 cm⁻¹, 1267.77 cm⁻¹, 956.64 cm⁻¹ ve 842.75 cm⁻¹'de daidzeinle ilgili pikler görülmüştür (Şekil 4.52 ve Şekil 4.53). Sonuç olarak, hazırlanan nanopartiküler sistemlere etkin

maddenin yüklendiği sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda hücre canlılığını değerlendirmek amacıyla MTT yöntemi kullanılmıştır. Nöron ve U-87 MG hücreleri kullanılarak etkin madde çözeltileri (200 μ M ve 300 μ M) ile nanopartikül süspansiyonlarının (200 μ M ve 300 μ M daidzeine eşdeğer dozda) nörotoksik ve sitotoksik etkileri incelenmiştir.

Nörotoksik etkinin incelendiği çalışmada, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında saf daidzeinin (200 μ M ve 300 μ M) ve F12-DG formülasyonunun (200 μ M ve 300 μ M) istatistiksel olarak önemli oranda nörotoksik etki gösterdikleri saptanmıştır ($p<0.05$). Diğer, nanopartikül formülasyonları (boş ve etkin madde yüklü) ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir nörotoksik etki göstermemişlerdir ($p>0.05$). Saf daidzein dozlarının (200 μ M ve 300 μ M) nörotoksik etkileri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında da aralarında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p>0.05$) (Şekil 4.54, Şekil 4.55).

Literatürde daidzeinin nöron hücreleri üzerindeki etkisini inceleyen az sayıda çalışma bulunmaktadır.²¹⁷⁻²²⁰ Bu çalışmaların çoğunluğunda düşük dozlarda daidzeinin nöroprotektif etkili olduğu ifade edilmiştir. Östrojen- veya flavonoid-aracılı nöroprotektif etkide östrojen reseptörlerinin de etkili olduğu, ancak daidzeinin nöroprotektif etki mekanizmasının tam olarak anlaşılamadığı raporlanmıştır.^{217, 219} Choi ve ark.²¹⁷ tarafından daidzein (50 μ M dozda) ve baicalein (10 μ M dozda)'ın birlikte kullanımının PC12 nöronal hücreler üzerinde nöroprotektif etki sağladığı gösterilmiştir. Kajta ve ark.²¹⁸ tarafından daidzeinin glutamat-aracılı toksisite üzerindeki etkileri incelenmiş ve daidzeinin düşük dozlarda (0.1-10 μ M) glutamat-aracılı nörotoksisiteyi önlediği tespit edilmiştir. Hurtado ve ark.²¹⁹ tarafından yapılan bir çalışmada ise, daidzeinin (0.05-5 μ M) nöron hücre kültüründe peroksizom proliferatör-aktif reseptör- γ (PPAR- γ)'yı aktive ederek nöroprotektif etki sağladığı raporlanmıştır.

Linford ve ark.²²⁰ daidzeinin 50 μ M ve 100 μ M dozlarında nörotoksik etki

göstermediğini ancak, daidzeinin yapısal analogu olan genisteinin 50 µM dozda dahi nörotoksik etki gösterdiğini raporlamışlardır.

Jin ve ark.²²¹ ise primer sıçan nöron kültürlerinde yüksek konsantrasyonlarda genistein ve daidzein kullanımının etkilerini incelemişler ve hücre hasarını tayin etmek içinde laktat dehidrojenaz (LDH) testini kullanmışlardır. 50 µM dozda daidzein ve genistein kullanıldığında 24 saatte LDH salımında (sırasıyla % 90 ve % 67) artış olduğu ve önemli oranda hücre hasarı meydana geldiği saptanmıştır. Aynı şekilde, 100 µM doz için de çalışma yapılmış ve LDH salımının 30 dakika içerisinde 2.6 (genistein için) ve 3 (daidzein için) kat arttığı belirtilmiştir. Daidzeinin GABA_A (γ-aminobutirik asit A) reseptörlerini inhibe ederek glutamat uyarımında artışa ve hücre hasara yol açabileceği de vurgulanmıştır

Daidzeinin lipit peroksidasyonu ve glutatyon konsantrasyonu üzerindeki etkileri sıçan beyninde incelenmiş, yüksek dozlarda kronik daidzein kullanımının beyin üzerinde zararlı etkilerinin olabileceği, glutatyon konsantrasyonunda önemli oranda azalmanın görüldüğü, daidzeinin sadece antioksidan olarak değil aynı zamanda pro-oksidan olarak da etki edebileceği belirtilmiştir.²²²

Kanser tedavisinde sağlıklı hücrelerin korunarak hastalıklı hücrelerin ortadan kaldırılması en önemli gereksinimlerden birisidir. Konvansiyonel dozaj şekillerine göre etkin maddelerin yan etkilerinin/toksisitelerinin ortadan kaldırılabilmesi/azaltılabilmesi nanopartiküler sistemlerin önemli bir üstünlüğüdür. Çalışmamızda elde edilen verilere göre daidzein-yüklü PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) nanopartikül formülasyonlarının (F12-DG-200 ve F12-DG-300 hariç) nöron hücrelerini saf daidzeinin toksik etkilerine karşı korudukları saptanmıştır. Deney sonuçlarına göre, PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) nanopartikülleri nörotoksik etki açısından kendi aralarında değerlendirildiğinde ise PLGA (50:50) nanopartiküllerinin PLGA (75:25) nanopartiküllerine göre daha

nörotoksik etkili olduğu görülmekle birlikte formülasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p>0.05$; Şekil 4.54 ve Şekil 4.55). Bu durum, kopolimer bileşiminden ve etkin madde salım hızındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. Kobayashi ve ark.²²³ tavşan korneasında PLA ve PGA'nın toksisitesini değerlendirmişler, sonuç olarak da PLA'nın PGA'ya göre daha güvenli olduğunu ve PGA'nın PLA'ya göre daha toksik etki gösterdiğini raporlamışlardır. PGA'nın hidrolitik olarak PLA'ya göre daha hızlı parçalandığı, böylece daha hızlı GA oluştuğu, oluşan GA'nın ise uygulama bölgesinde fiziksel stres oluşturduğu vurgulanmıştır. Ayrıca GA'nın, LA'ya göre daha fazla asidik etki göstererek kornea bölgesinde inflamasyona sebep olduğu da ifade edilmiştir. Ayrıca, doz açısından da etkin madde yüklü nanopartikül formülasyonları (200 μ M ve 300 μ M daidzeine eşdeğer) istatistiksel olarak karşılaştırıldığında da sitotoksik etki açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$; Şekil 4.54 ve Şekil 4.55).

Nanopartikül formülasyonlarına (boş ve etkin madde yüklü) Gelucire® 44/14 ilavesinin nörotoksik etkiyi artırdığı görülmüş ancak istatistiksel değerlendirme yapıldığında Gelucire®'li ve Gelucire®'siz formülasyonlar arasındaki bu farkın anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). Sadece, F12-DG (200 μ M ve 300 μ M daidzeine eşdeğer) formülasyonu kontrol grubuna göre anlamlı bir nörotoksositeye neden olmuştur ($p<0.05$). F12-DG formülasyonunda, PLGA (50:50) ve Gelucire® 44/14'ün bir arada olması nörotoksik etkiye katkı sağlamış olabilir. Yapılan literatür araştırmasında Gelucire® 44/14'ün nöronlar üzerindeki toksik etkisiyle ilgili bir çalışma saptanamamıştır. Sethia ve ark.²²⁴ tarafından yapılan bir çalışmada, Gelucire® 44/14'ün farklı konsantrasyonlarının (% 0.001, 0.0025, 0.005, 0.1, a/h) Caco-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi incelemiş, konsantrasyon artışıyla sitotoksik etkinin arttığı saptanmıştır.

U-87 MG hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen sitotoksikite test sonuçları ise

Şekil 4.56 ve Şekil 4.57’de verilmiştir. Daidzeinin (200 µM ve 300 µM) ve daidzein-yüklü-tüm nanopartikül formülasyonlarının (200 µM ve 300 µM daidzeine eşdeğer dozda) kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde sitotoksik etki oluşturdıkları saptanmıştır ($p<0.05$). Her iki doz bakımından da saf daidzein tüm daidzein-yüklü nanopartikül formülasyonlarından biraz daha yüksek sitotoksik etki göstermiş, ancak istatistiksel analizde anlamlı fark saptanamamıştır ($p>0.05$). Saf etkin madde ile etkin madde yüklü nanopartikül formülasyonları arasında hücreye alım mekanizmalarının farklı olması, etkin madde çözünürlüğünü artırıcı faktörler ve etkin maddenin öncelikle nanopartiküllerden salımının gerçekleşmesi gerekliliği gibi faktörlerden dolayı etkinlik açısından farklılıklar oluşabilmektedir.²²⁵⁻²²⁸ Boş nanopartikül formülasyonları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Daidzeinin farklı dozları açısından gerek saf madde gerekse nanopartikül formülasyonları arasında sitotoksik etkide anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). Polimer yapısının [PLGA (50:50) olduğunda] ve Gelucire® 44/14 ilavesinin sitotoksik etki üzerinde pozitif yönde hafif bir etki yaptığı görülmüş, ancak istatistiksel karşılaştırma yapıldığında bu iki faktörün sitotoksikite açısından anlamlı bir fark oluşturmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$; Şekil 4.56 ve Şekil 4.57).

Yapılan araştırmada, U-87 MG hücreleri kullanılarak daidzeinin sitotoksik etkilerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Daidzeinin farklı glioblastoma hücre hatlarında sitotoksik etkinliğinin incelendiği bir çalışma tespit edilmiştir.¹¹¹

Siegelin ve ark.¹¹¹ tarafından yapılan bir çalışmada, daidzeinin (50, 100 ve 200 µM) insan glioblastoma hücre hatları (human glioblastoma cell line; LN229 ve human short-term glioblastoma cell line; NCH89) üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiş, 50 ve 100 µM daidzein dozlarının LN229 ve NCH89 hücrelerinde apoptozisi anlamlı bir şekilde artırmadığı (ancak, 100 µM daidzeinin sitotoksik etkisi TRAIL ile birlikte

kullanıldığında yükseldiği) bildirilmiştir. Bununla birlikte, sadece 200 μ M dozda daidzein uygulandığında her iki hücre hattında da hücre ölümünün (~% 30) anlamlı bir şekilde yükseldiği raporlanmış ve daidzeinin glioblastoma hücrelerinde apoptotik yolları inhibe ettiği ve TRAIL ile birlikte kullanımında ise malign glioma hücre ölümü açısından Bcl-2'nin anahtar faktör olduğu ifade edilmiştir.

Daidzeinin yapısal analogu olan genisteinin (4 μ M) karmustin (0-50 μ M) ile birlikte kullanılması sonucu glioma hücrelerinin büyümesi üzerindeki inhibitör etkisi U-87 MG glioblastoma hücre hattı kullanılarak incelenmiş, genistein varlığında karmustinin sitotoksik etkinliğinin önemli derecede arttığı saptanmıştır.²²⁹

Lo ve ark.¹⁰¹ daidzeinin nöroblastoma (çocuklarda sıklıkla görülen periferik sempatik sinir sistemi tümörü) hücrelerindeki antitümör etkilerini incelemişler ve daidzeinin hücre döngüsü ilerlemesini (G₂/M fazına) önleyerek hücre çoğalmasını inhibe ettiğini saptamışlardır.

Daidzein için sürekli bir salım elde edilmesi ve yüksek dozlarda (200 μ M ve 300 μ M) daidzeinin nörotoksik etkilerinin önlenmesi ancak kanser hücrelerine karşı ise sitotoksik etkisinin korunması açısından PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 nanopartiküllerinin faydalı olabileceği saptanmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- ✓ Söz konusu çalışmada; daidzein-yüklü nanopartiküler sistemler, PLGA ve PLGA-Gelucire® 44/14 kullanılarak başarıyla hazırlanmış ve *in vitro* olarak karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.
- ✓ Daidzein miktar tayini için UV-spektrofotometrik yöntem geliştirilmiş ve analitik yöntem validasyonu gerçekleştirilmiştir.
- ✓ Nano-boyutlu, yaklaşık küresel şekilli, uygun salım özelliklerine sahip taşıyıcı sistemler elde edilmiştir.
- ✓ Hazırlanan tüm nanopartiküllerin ortalama partikül boyutu ve ZP değerleri sırasıyla 198.52 ± 7.04 - 672.78 ± 70.95 nm ($p \geq 0.05$) ve -14.70 ± 0.36 -- -0.50 ± 0.34 mV ($p \geq 0.05$) aralığında saptanmıştır.
- ✓ Hazırlanan nanopartiküllerin % EE değerleri sırasıyla, % 35.79 ± 3.43 - 84.85 ± 2.20 ($p \geq 0.05$)'dir.
- ✓ FT-IR, DSC analizleri kullanılarak etkin maddenin nanopartiküler sistemlere yüklendiği saptanmıştır.
- ✓ Hazırlanan nanopartiküler sistemlerin daidzeinin nörotoksik etkilerini azalttığı ve daidzeine benzer sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır ($p > 0.05$).
- ✓ Devam çalışmalarında, hazırlanan nanopartiküler sistemlerin *in vivo* etkinliğinin saptanması planlanabilir.

KAYNAKLAR

1. Ravivarapu H, Mahalingam R, Jasti BR. Biodegradable Polymeric Delivery Systems. In: Li X, Jasti BR (eds). *Design of Controlled Release Drug Delivery Systems*, 1st ed. The United States of America, The McGraw-Hill Companies, 2006: 272-273.
2. Felice B, Prabhakaran MP, Rodriguez AP, Ramakrishna S. Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2014, 41: 178-195.
3. Kumar MNVR. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2000, 3: 234-258.
4. Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, 64: 61-71.
5. Mirakabad FST, Nejati-Koshki K, Akbarzadeh A, Yamchi MR, Milani M, Zarghami N, Zeighamian V, Rahimzadeh A, Alimohammadi S, Hanifehpour Y, Joo SW. PLGA-Based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2014, 15: 517-535.
6. Manmode A, Sakarkar DM, Mahajan NM. Nanoparticles-tremendous therapeutic potential: A review. *International Journal of PharmTech Research*, 2009, 1: 1020-1027.
7. Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles – A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2006, 5: 561-573.
8. Neha B, Ganesh B, Preeti K. Drug delivery to the brain using polymeric nanoparticles: A review. *International Journal of Pharmaceutical and Life Sciences*, 2013, 2: 107-132.
9. Medina C, Santos-Martinez MJ, Radomski A, Corrigan OI, Radomski MW. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *British Journal of Pharmacology*, 2007, 150: 552-558.
10. Cooper DL, Conder CM, Harirforoosh S. Nanoparticles in drug delivery: mechanism of

- action, formulation and clinical application towards reduction in drug-associated nephrotoxicity. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2014, 11: 1661-1680.
11. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Preat V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, 2012, 161: 505-522.
 12. Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, 64: 24-36.
 13. Gelperina S, Kisich K, Iseman MD, Heifets L. The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2005, 172: 1487-1490.
 14. Hans ML, Lowman AM. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, 2002, 6: 319-327.
 15. Sahoo SK, Labhasetwar V. Nanotech approaches to delivery and imaging drug. *Drug Discovery Today*, 2003, 8: 1112-1120.
 16. Garcia-Garcia E, Andrieux K, Gil S, Couvreur P. Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: A way to deliver drugs to the brain? *International Journal of Pharmaceutics*, 2005, 298: 274-292.
 17. Memisoglu-Bilensoy E, Hincal AA. Sterile, injectable cyclodextrin nanoparticles: Effects of gamma irradiation and autoclaving. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006, 311: 203-208.
 18. Liu G, Garrett MR, Men P, Zhu XW, Perry G, Smith MA. Nanoparticle and other metal chelation therapeutics in Alzheimer disease. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 2005, 1741: 246-252.
 19. Athar M, Das AJ. Therapeutic nanoparticles: State-of-the-art of nanomedicine. *Advanced Materials Reviews*, 2014, 1: 25-37.

20. Kim S, Kim JH, Jeon O, Kwon IC, Park K. Engineered polymers for advanced drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2009, 71: 420-430.
21. Jawahar N, Meyyanathan SN. Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting: A comprehensive review. *International Journal of Health & Allied Sciences*, 2012, 1: 217-223.
22. Pillai O, Panchagnula R. Polymers in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2001, 5: 447-451.
23. Fung LK, Saltzman WM. Polymeric implants for cancer chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1997, 26: 209-230.
24. Lee SS, Hughes P, Ross AD, Robinson MR. Biodegradable implants for sustained drug release in the eye. *Pharmaceutical Research*, 2010, 27: 2043-2053.
25. Joshi JR, Patel RP. Role of biodegradable polymers in drug delivery. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 2012, 4: 74-81.
26. Kanellakopoulou K, Giamarellos-Bourboulis EJ. Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections. *Drugs*, 2000, 59: 1223-1232.
27. Gandhi KJ, Deshmane SV, Biyani KR. Polymers in pharmaceutical drug delivery system: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Reviews and Research*, 2012, 14: 57-66.
28. Lu JM, Wang XW, Marin-Muller C, Wang H, Lin PH, Yao QZ, Chen CY. Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2009, 9: 325-341.
29. Halder KK, Mandal B, Debnath MC, Bera H, Ghosh LK, Gupta BK. Chloramphenicol-incorporated poly lactide-co-glycolide (PLGA) nanoparticles: Formulation, characterization, technetium-99m labeling and biodistribution studies. *Journal of Drug Targeting*, 2008, 16: 311-320.

30. Ishihara T, Mizushima T. Techniques for efficient entrapment of pharmaceuticals in biodegradable solid micro/nanoparticles. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2010, 7: 565-575.
31. Stevanovic M, Uskokovic D. Poly(lactide-co-glycolide)-based micro and nanoparticles for the controlled drug delivery of vitamins. *Current Nanoscience*, 2009, 5: 1-14.
32. Vilar G, Tulla-Puche J, Albericio F. Polymers and drug delivery systems. *Current Drug Delivery*, 2012, 9: 367-394.
33. Ansary RH, Awang MB, Rahman MM. Biodegradable poly(d,l-lactic-co-glycolic acid)-based micro/nanoparticles for sustained release of protein drugs - A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2014, 13: 1179-1190.
34. Jamshidi K, Hyon SH, Ikada Y. Thermal characterization of polylactides. *Polymer*, 1988, 29: 2229-2234.
35. Makadia HK, Siegel SJ. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, 2011, 3: 1377-1397.
36. Pal SL, Jana U, Manna PK, Mohanta GP, Manavalan R. Nanoparticle: An overview of preparation and characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2011, 1: 228-234.
37. Quintanar-Guerrero D, Allémann E, Fessi H, Doelker E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 1998, 24: 1113-1128.
38. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, 2001, 70: 1-20.
39. Rao JP, Geckeler KE. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 2011, 36: 887-913.
40. Zafar N, Fessi H, Elaissari A. Cyclodextrin containing biodegradable particles: From

- preparation to drug delivery applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, 461: 351-366.
41. Pinto Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*, 2006, 2: 8-21.
 42. Vauthier C, Bouchemal K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 2009, 26: 1025-1058.
 43. Nagavarma BVN, Hemant KSY, Ayaz A, Vasudha LS, Shivakumar HG. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles- A review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2012, 5: 16-23.
 44. Astete CE, Sabliov CM. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, 2006, 17: 247-289.
 45. Vetten MA, Yah CS, Singh T, Gulumian M. Challenges facing sterilization and depyrogenation of nanoparticles: Effects on structural stability and biomedical applications'. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 2014, 10: 1391-1399.
 46. Breitzkreitz MC, Sabin GP, Polla G, Poppi RJ. Characterization of semi-solid Self-Emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS) of atorvastatin calcium by Raman image spectroscopy and chemometrics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013, 73: 3-12.
 47. Tashtoush BM, Al-Qashi ZS, Najib NM. In vitro and in vivo evaluation of glibenclamide in solid dispersion systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2004, 30: 601-607.
 48. Chambin O, Jannin V. Interest of multifunctional lipid excipients: Case of Gelucire (R) 44/14. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2005, 31: 527-534.
 49. Hurtado PP, Lam PY, Kilgour D, Bristow A, McBride E, O'Connor PB. Use of high

- resolution mass spectrometry for analysis of polymeric excipients in drug delivery formulations. *Analytical Chemistry*, 2012, 84: 8579-8586.
50. Sachs-Barrable K, Thamboo A, Lee SD, Wasan KM. Lipid Excipients Peceol and Gelucire 44/14 decrease P-glycoprotein mediated efflux of Rhodamine 123 partially due to modifying P-glycoprotein protein expression within Caco-2 Cells. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2007, 10: 319-331.
 51. Pillay V, Fassihi R. A new method for dissolution studies of lipid-filled capsules employing nifedipine as a model drug. *Pharmaceutical Research*, 1999, 16: 333-337.
 52. Chambin O, Karbowiak T, Djebili L, Jannin V, Champion D, Pourcelot Y, Cayot P. Influence of drug polarity upon the solid-state structure and release properties of self-emulsifying drug delivery systems in relation with water affinity. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2009, 71: 73-78.
 53. Barker SA, Yap SP, Yuen KH, McCoy CP, Murphy JR, Craig DQM. An investigation into the structure and bioavailability of alpha-tocopherol dispersions in Gelucire 44/14. *Journal of Controlled Release*, 2003, 91: 477-488.
 54. Barakat NS. Etodolac-liquid-filled dispersion into hard gelatin capsules: An approach to improve dissolution and stability of etodolac formulation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2006, 32: 865-876.
 55. Wehrung D, Geldenhuys WJ, Oyewumi MO. Effects of gelucire content on stability, macrophage interaction and blood circulation of nanoparticles engineered from nanoemulsions. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2012, 94: 259-265.
 56. Bothiraja C, Pawar AP, Dama GY, Joshi PP, Shaikh KS. Novel solvent-free gelucire extract of *Plumbago zeylanica* using non-everted rat intestinal sac method for improved therapeutic efficacy of plumbagin. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2012, 66: 35-42.

57. Yao LH, Jiang YM, Shi J, Tomas-Barberan FA, Datta N, Singanusong R, Chen SS. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2004, 59: 113-122.
58. Choi EJ. Hesperetin induced G1-phase cell cycle arrest in human breast cancer MCF-7 cells: Involvement of CDK4 and p21. *Nutrition and Cancer-An International Journal*, 2007, 59: 115-119.
59. Romagnolo DF, Selmin OI. Flavonoids and cancer prevention: A review of the evidence. *Journal of Nutrition in Gerontology and Geriatrics*, 2012, 31: 206-238.
60. Ben Sghaier M, Skandrani I, Nasr N, Franca MGD, Chekir-Ghedira L, Ghedira K. Flavonoids and sesquiterpenes from *Tecurium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: A structure-activity relationship study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2011, 32: 336-348.
61. Leonarduzzi G, Testa G, Sottero B, Gamba P, Poli G. Design and development of nanovehicle-based delivery systems for preventive or therapeutic supplementation with flavonoids. *Current Medicinal Chemistry*, 2010, 17: 74-95.
62. Büyüktuncer Z, Başaran AA. Fitoöstrojenler ve sağlıklı yaşamdaki önemleri. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 2005, 25: 79-94.
63. İnanç N, Tuna Ş. Fitoöstrojenler ve sağlıktaki etkileri. *Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 2005, 2: 91-95.
64. Zhao C, Wang Y, Su Y, Zhang H, Ding L, Yan X, Zhao D, Shao N, Ye X, Cheng Y. Inclusion complexes of isoflavones with two commercially available dendrimers: Solubility, stability, structures, release behaviors, cytotoxicity, and anti-oxidant activities. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 421: 301-309.
65. Cassidy A, Hanley B, Lamuela-Raventos RM. Isoflavones, lignans and stilbenes - origins, metabolism and potential importance to human health. *Journal of the Science of Food*

- and Agriculture*, 2000, 80: 1044-1062.
66. Zhang N, She DD, Hu LD, Liu HF. Preparation and evaluation of daidzein loaded self-microemulsifying drug delivery system. *Medical Materials and Engineering*, 2012, 140: 200-205.
 67. Sweetman, SC (ed). *Martindale: The Complete Drug Reference*, 36th ed. London, The Pharmaceutical Press, 2009.
 68. LC Laboratories. Product Name Index, Daidzein. <http://www.lclabs.com/products/d-2946-daidzein>. 31 Ekim 2015.
 69. Cayman Chemical Company. Research Products Overview, Daidzein. <https://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/10005166>. 31 Ekim 2015.
 70. Sigma-Aldrich Co. Products, Daidzein. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d7802?lang=en®ion=US>. 31 Ekim 2015.
 71. Yang GD, Huang YR, Nan GJ, Chen HJ, Zeng AG, Bian XL. Solubility of daidzein in the binary system of ethanol and water. *Journal of Molecular Liquids*, 2013, 180: 160-163.
 72. Shen Q, Li X, Yuan D, Jia W. Enhanced oral bioavailability of daidzein by self-microemulsifying drug delivery system. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2010, 58: 639-643.
 73. Xiao YM, Yang LR, Mao P, Yuan JW, Deng YX, Qu LB. Inclusion complexes of phosphorylated daidzein derivatives with beta-cyclodextrin: Preparation and inclusion behavior study. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2012, 85: 298-302.
 74. Pahari B, Sengupta B, Chakraborty S, Thomas B, McGowan D, Sengupta PK. Contrasting

- binding of fisetin and daidzein in γ -cyclodextrin nanocavity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 2013, 118: 33-41.
75. Zou JH, Shi WF, Wang J, Jun B. Encapsulation and controlled release of a hydrophobic drug using a novel nanoparticle-forming hyperbranched polyester. *Macromolecular Bioscience*, 2005, 5: 662-668.
76. Minghetti P, Cilurzo F, Casiraghi A, Montanari L. Evaluation of ex vivo human skin permeation of genistein and daidzein. *Drug Delivery*, 2006, 13: 411-415.
77. Pongkitwitoon B, Sakamoto S, Tanaka H, Tsuchihashi R, Kinjo J, Morimoto S, Putalun W. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to determine puerarin and its aglycone daidzein. *Journal of Natural Medicines*, 2011, 65: 31-36.
78. Lee SH, Kim YH, Yu HJ, Cho NS, Kim TH, Kim DC, Chung CB, Hwang YI, Kim KH. Enhanced bioavailability of soy isoflavones by complexation with β -cyclodextrin in rats. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2007, 71: 2927-2933.
79. Parker DL, Rybak ME, Pfeiffer CM. Phytoestrogen biomonitoring: an extractionless LC-MS/MS method for measuring urinary isoflavones and lignans by use of atmospheric pressure photoionization (APPI). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 402: 1123-1136.
80. Meng QH, Wahala K, Adlercreutz H, Tikkanen MJ. Antiproliferative efficacy of lipophilic soy isoflavone phytoestrogens delivered by low density lipoprotein particles into cultured U937 cells. *Life Sciences*, 1999, 65: 1695-1705.
81. Suzuki Y, Hisada A, Yoshinaga J. Inter- and intra-individual variation in urinary excretion of daidzein and equol in female Japanese. *Biomarkers*, 2014, 19: 407-410.
82. Ma Y, Zhao XY, Li J, Shen Q. The comparison of different daidzein-PLGA nanoparticles in increasing its oral bioavailability. *International Journal of Nanomedicine*, 2012, 7: 559-570.

83. Gao Y, Gu WW, Chen LL, Xu ZH, Li YP. The role of daidzein-loaded sterically stabilized solid lipid nanoparticles in therapy for cardio-cerebrovascular diseases. *Biomaterials*, 2008, 29: 4129-4136.
84. Ge YB, Chen DW, Xie LP, Zhang RQ. Optimized preparation of daidzein-loaded chitosan microspheres and in vivo evaluation after intramuscular injection in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, 338: 142-151.
85. Larkin T, Price WE, Astheimer L. The key importance of soy isoflavone bioavailability to understanding health benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2008, 48: 538-552.
86. Shor D, Sathyapalan T, Atkin SL, Thatcher NJ. Does equol production determine soy endocrine effects? *European Journal of Nutrition*, 2012, 51: 389-398.
87. Bhathena SJ, Velasquez MT. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2002, 76: 1191-1201.
88. Yuan JP, Wang JH, Liu X. Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora - Implications for health. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2007, 51: 765-781.
89. Tamura M. Effects of intestinal flora on the metabolism and absorption of isoflavones. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 2006, 40: 45-50.
90. Setchell KD, Faughnan MS, Avades T, Zimmer-Nechemias L, Brown NM, Wolfe BE, Brashear WT, Desai P, Oldfield MF, Botting NP, Cassidy A. Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of ¹³C-labeled tracers in premenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2003, 77: 411-419.
91. Qiu F, Chen XY, Song B, Zhong DF, Liu CX. Influence of dosage forms on pharmacokinetics of daidzein and its main metabolite daidzein-7-O-glucuronide in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2005, 26: 1145-1152.

92. Dwiecki K, Neunert G, Polewski P, Polewski K. Antioxidant activity of daidzein, a natural antioxidant, and its spectroscopic properties in organic solvents and phosphatidylcholine liposomes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2009, 96: 242-248.
93. Cho HY, Park CM, Kim MJ, Chinzorig R, Cho CW, Song YS. Comparative effect of genistein and daidzein on the expression of MCP-1, eNOS, and cell adhesion molecules in TNF-alpha-stimulated HUVECs. *Nutrition Research and Practice*, 2011, 5: 381-388.
94. Dong X, Xu W, Sikes RA, Wu C. Combination of low dose of genistein and daidzein has synergistic preventive effects on isogenic human prostate cancer cells when compared with individual soy isoflavone. *Food Chemistry*, 2013, 141: 1923-1933.
95. Ge Y, Mei Z, Liu X. Evaluation of daidzein-loaded chitosan microspheres in vivo after intramuscular injection in rats. *Yakugaku Zasshi*, 2011, 131: 1807-1812.
96. Waqas MK, Akhtar N, Mustafa R, Jamshaid M, Khan HM, Murtaza G. Dermatological and cosmeceutical benefits of Glycine max (soybean) and its active components. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 2015, 72: 3-11.
97. Borghetti GS, Pinto AP, Lula IS, Sinisterra RD, Teixeira HF, Bassani VL. Daidzein/cyclodextrin/hydrophilic polymer ternary systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2011, 37: 886-893.
98. Adjakly M, Ngollo M, Boiteux JP, Bignon YJ, Guy L, Bernard-Gallon D. Genistein and daidzein: Different molecular effects on prostate cancer. *Anticancer Research - International Journal of Cancer Research and Treatment*, 2013, 33: 39-44.
99. He J, Wang S, Zhou M, Yu W, Zhang Y, He X. Phytoestrogens and risk of prostate cancer: A meta-analysis of observational studies. *World Journal of Surgical Oncology*, 2015, 13: 231-241.
100. Wang HZ, Zhang Y, Xie LP, Yu XY, Zhang RQ. Effects of genistein and daidzein on the

- cell growth, cell cycle, and differentiation of human and murine melanoma cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2002, 13: 421-426.
101. Lo FH, Mak NK, Leung KN. Studies on the anti-tumor activities of the soy isoflavone daidzein on murine neuroblastoma cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2007, 61: 591-595.
 102. Bao C, Namgung H, Lee J, Park HC, Ko J, Moon H, Ko HW, Lee HJ. Daidzein suppresses tumor necrosis factor-alpha induced migration and invasion by inhibiting hedgehog/Gli1 signaling in human breast cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62: 3759-3767.
 103. Xiao JX, Huang GQ, Geng X, Qiu HW. Soy-derived isoflavones inhibit HeLa cell growth by inducing apoptosis. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2011, 66: 122-128.
 104. Guo JM, Xiao BX, Liu DH, Grant M, Zhang S, Lai YF, Guo YB, Liu Q. Biphasic effect of daidzein on cell growth of human colon cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 2004, 42: 1641-1646.
 105. Guo JM, Kang GZ, Xiao BX, Liu DH, Zhang S. Effect of daidzein on cell growth, cell cycle, and telomerase activity of human cervical cancer in vitro. *International Journal of Gynecological Cancer*, 2004, 14: 882-888.
 106. Lin YJ, Hou YC, Lin CH, Hsu YA, Sheu JJC, Lai CH, Chen BH, Chao PDL, Wan L, Tsai FJ. Puerariae radix isoflavones and their metabolites inhibit growth and induce apoptosis in breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 378: 683-688.
 107. Yashar CM, Spanos WJ, Taylor DD, Gercel-Taylor C. Potentiation of the radiation effect with genistein in cervical cancer cells. *Gynecologic Oncology*, 2005, 99: 199-205.
 108. Ruiz-Larrea MB, Mohan AR, Paganga G, Miller NJ, Bolwell GP, Rice-Evans CA. Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Radical Research*, 1997, 26:

63-70.

109. Pugalendhi P, Manoharan S, Suresh K, Baskaran N. Genistein and daidzein, in combination, protect cellular integrity during 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) induced mammary carcinogenesis in Sprague-Dawley rats. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 2011, 8: 91-97.
110. Mao Z, Zheng YL, Zhang YQ, Han BP, Zhu XW, Chang Q, Hu XB. The anti-apoptosis effects of daidzein in the brain of D-galactose treated mice. *Molecules*, 2007, 12: 1455-1470.
111. Siegelin MD, Gaiser T, Habel A, Siegelin Y. Daidzein overcomes TRAIL-resistance in malignant glioma cells by modulating the expression of the intrinsic apoptotic inhibitor, bcl-2. *Neuroscience Letters*, 2009, 454: 223-228.
112. Zhang Z, Huang Y, Gao F, Bu H, Gu W, Li Y. Daidzein-phospholipid complex loaded lipid nanocarriers improved oral absorption: In vitro characteristics and in vivo behavior in rats. *Nanoscale*, 2011, 3: 1780-1787.
113. Rostagno MA, Palma M, Barroso CG. Short-term stability of soy isoflavones extracts: Sample conservation aspects. *Food Chemistry*, 2005, 93: 557-564.
114. Huang H, Liang H, Kwok KC. Effect of thermal processing on genistein, daidzein and glycitein content in soymilk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006, 86: 1110-1114.
115. Grün IU, Adhikari K, Li C, Li J, Lin B, Zhang J, Fernando LN. Changes in the profile of genistein, daidzein, and their conjugates during thermal processing of tofu. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49: 2839–2843.
116. Ungar Y, Osundahunsi OF, Shimoni E. Thermal stability of genistein and daidzein and its effect on their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51: 4394-4399.

117. Nemitz MC, Yatsu FK, Bidone J, Koester LS, Bassani VL, Garcia CV, Mendez AS, von Poser GL, Teixeira HF. A versatile, stability-indicating and high-throughput ultra-fast liquid chromatography method for the determination of isoflavone aglycones in soybeans, topical formulations, and permeation assays. *Talanta*, 2015, 134: 183-193.
118. Nance E, Zhang C, Shih TY, Xu Q, Schuster BS, Hanes J. Brain-penetrating nanoparticles improve paclitaxel efficacy in malignant glioma following local administration. *ACS Nano*, 2014, 8: 10655-10664.
119. Wei X, Chen X, Ying M, Lu W. Brain tumor-targeted drug delivery strategies. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2014, 4: 193-201.
120. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 2015, 136: E359-386.
121. *American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2015*. 1st ed. Atlanta, American Cancer Society; 2015.
<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@editorial/documents/document/acspc-044552.pdf>. 31 Ekim 2015.
122. Bozdağ Pehlivan S. Beyin Tümörlerinin Tedavisine Yönelik Mitoksantron İçeren Mikropartiküler Sistemlerin Tasarımı ve Değerlendirilmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 2003.
123. Laquintana V, Trapani A, Denora N, Wang F, Gallo JM, Trapani G. New strategies to deliver anticancer drugs to brain tumors. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2009, 6: 1017-1032.
124. Germano I, Swiss V, Casaccia P. Primary brain tumors, neural stem cell, and brain tumor cancer cells: Where is the link? *Neuropharmacology*, 2010, 58: 903-910.

125. Mangiola A, Anile C, Pompucci A, Capone G, Rigante L, De Bonis P. Glioblastoma therapy: Going beyond Hercules Columns. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 2010, 10: 507-514.
126. Walbert T, Mikkelsen T. Recurrent high-grade glioma: A diagnostic and therapeutic challenge. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 2011, 11: 509-518.
127. Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, Di C, Lin N, Mattox AK, Bigner DD. Glioblastoma multiforme: A review of where we have been and where we are going. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2009, 18: 1061-1083.
128. Atik AF, Şeker A, Kılıç T. Dev hücreli glioblastoma multiforme: Çok erken dönem konus medullaris metastazı. *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 2013, 23: 73-76.
129. Yılmaz A, Altuğ F, Düz E, Çırak B. Glioblastoma multiformede tedavi seçenekleri ve yaşam sürelerine etkileri. *Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi*, 2012, 23: 25-29.
130. Daga A, Bottino C, Castriconi R, Gangemi R, Ferrini S. New perspectives in glioma immunotherapy. *Current Pharmaceutical Design*, 2011, 17: 2439-2467.
131. DeAngelis LM. Brain tumors. *The New England Journal of Medicine*, 2001, 344: 114-123.
132. del Burgo LS, Hernandez RM, Orive G, Pedraz JL. Nanotherapeutic approaches for brain cancer management. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2014, 10: 905-919.
133. Çakır FB, Kebudi R. Çocukluk çağında karşılaşılan santral sinir sistemi yüksek dereceli glial tümörlerinde tedavi. *Türk Onkoloji Dergisi*, 2013, 28: 44-50.
134. Akçalı A. Araştırmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanılmasının önemi. *Türk Onkoloji Dergisi*, 2010, 25: 119-123.
135. Nema R, Khare S. An animal cell culture: Advance technology for modern research.

- Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2012, 3: 219-226.
136. *Cell Culture Basics Handbook*, 1st ed. Thermo Fisher Scientific Inc. 2015: 2.
 137. Audus KL, Bartel RL, Hidalgo JJ, Borchardt RT. The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism studies. *Pharmaceutical Research*, 1990, 7: 435-451.
 138. Freshney, RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 6th ed. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc., 2010: 6-8
 139. Horvath S. Cytotoxicity of drugs and diverse chemical agents to cell cultures. *Toxicology*, 1980, 16: 59-66.
 140. Niles AL, Moravec RA, Riss TL. Update on in vitro cytotoxicity assays for drug development. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2008, 3: 655-669.
 141. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 1983, 65: 55-63.
 142. Stockert JC, Blazquez-Castro A, Canete M, Horobin RW, Villanueva A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, 2012, 114: 785-796.
 143. Blockhuys S, Vanhoecke B, Smet J, De Paepe B, Van Coster R, Bracke M, De Wager C. Unraveling the mechanisms behind the enhanced MTT conversion by irradiated breast cancer cells. *Radiation Research*, 2013, 179: 433-443.
 144. Modern Steroid Science.
http://modernsteroid.blogspot.com.tr/2012_03_01_archive.html. 31 Ekim 2015.
 145. ATCC. Products, Cell Lines, U-87 MG. http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-14.aspx?geo_country=tr. 31 Ekim 2015
 146. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*, 1st ed. Rockville, Food and

Drug Administration, 2013: 2.

147. Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, 2003, 987: 57-66.
148. Behera S, Ghanty S, Ahmad F, Santra S, Banerjee S. UV-visible spectrophotometric method development and validation of assay of paracetamol tablet formulation. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, 2012, 3: 1-6.
149. *ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. 1st ed. International Conference On Harmonisation, 2005: 5.
150. Huber L. *Validation of Analytical Methods*, 1st ed. Germany, Agilent Technologies, 2010: 19.
151. Tomiyama N, Tsuji H, Watanabe M, Takeda M, Harada T, Kobayashi H. High-performance liquid chromatographic method for determination of DDT and its degradation products in rat plasma, liver and brain: Validation and application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2000, 748: 361-368.
152. DeSilva B, Smith W, Weiner R, Kelley M, Smolec J, Lee B, Khan M, Tacey R, Hill H, Celniker A. Recommendations for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules. *Pharmaceutical Research*, 2003, 20: 1885-1900.
153. Araujo P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2009, 877: 2224-2234.

154. Friedrich RB, Ravanello A, Cichota LC, Rolim CMB, Beck RCR. Validation of a simple and rapid UV spectrophotometric method for dexamethasone assay in tablets. *Quimica Nova*, 2009, 32: 1052-1054.
155. Lambropoulos J, Spanos GA, Lazaridis NV, Ingallinera TS, Rodriguez VK. Development and validation of an HPLC assay for fentanyl and related substances in fentanyl citrate injection, USP. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1999, 20: 705-716.
156. Sigma Aldrich Co. Products, Resomer RG 756 S. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/719927?lang=en®ion=TR>. 31 Ekim 2015.
157. Evonik Nutrition & Care GmbH. Applications & Products, Controlled Release, Resomer RG 756 S. [http://www.resomer.com/product/biodegradable-polymers/en/pharmapolymers/products/pages/bioresorbable-polymer.aspx#Controlled release](http://www.resomer.com/product/biodegradable-polymers/en/pharmapolymers/products/pages/bioresorbable-polymer.aspx#Controlled_release). 31 Ekim 2015.
158. Evonik Nutrition & Care GmbH. Applications & Products, Controlled Release, Resomer RG 502. [http://www.resomer.com/product/biodegradable-polymers/en/pharmapolymers/products/pages/bioresorbable-polymer.aspx#Controlled release](http://www.resomer.com/product/biodegradable-polymers/en/pharmapolymers/products/pages/bioresorbable-polymer.aspx#Controlled_release). 31 Ekim 2015.
159. Sigma Aldrich Co. Products, Resomer RG 502. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/719897?lang=en®ion=TR>. 31 Ekim 2015.
160. Sahana DK, Mittal G, Bhardwaj V, Kumar MN. PLGA nanoparticles for oral delivery of hydrophobic drugs: Influence of organic solvent on nanoparticle formation and release behavior in vitro and in vivo using estradiol as a model drug. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008, 97: 1530-1542.
161. Hariharan S, Bhardwaj V, Bala I, Sitterberg J, Bakowsky U, Ravi Kumar MN. Design of

- estradiol loaded PLGA nanoparticulate formulations: A potential oral delivery system for hormone therapy. *Pharmaceutical Research*, 2006, 23: 184-195.
162. Bhardwaj V, Ankola DD, Gupta SC, Schneider M, Lehr CM, Kumar MN. PLGA nanoparticles stabilized with cationic surfactant: Safety studies and application in oral delivery of paclitaxel to treat chemical-induced breast cancer in rat. *Pharmaceutical Research*, 2009, 26: 2495-2503.
 163. Sah E, Sah H. Recent trends in preparation of poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles by mixing polymeric organic solution with antisolvent. *Journal of Nanomaterials*, 2015, 2015: 1-22.
 164. Bruylants G, Wouters J, Michaux C. Differential scanning calorimetry in life science: Thermodynamics, stability, molecular recognition and application in drug design. *Current Medicinal Chemistry*, 2005, 12: 2011-2020.
 165. Feng SS. New-concept chemotherapy by nanoparticles of biodegradable polymers: Where are we now? *Nanomedicine*, 2006, 1: 297-309.
 166. Feng SS. Nanoparticles of biodegradable polymers for new-concept chemotherapy. *Expert Review of Medical Devices*, 2004, 1: 115-125.
 167. Movasaghi Z, Rehman S, Rehman IU. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2008, 43: 134-179.
 168. Gepdiremen A, Düzenli S, Hacimüftüoğlu A, Süleyman H, Öztaş S. The effects of dantrolene alone or in combination with nimodipine in glutamate-induced neurotoxicity in cerebellar granular cell cultures of rat pups. *Pharmacological Research*, 2001, 43: 241-244.
 169. Büyükokuroğlu ME, Gepdiremen A, Hacimüftüoğlu A, Oktay M. The effects of aqueous extract of *Lavandula angustifolia* flowers in glutamate-induced neurotoxicity of cerebellar granular cell culture of rat pups. *Journal of Ethnopharmacology*, 2003, 84: 91-

170. Matoba T, Egashira K. Nanoparticle-mediated drug delivery system for cardiovascular disease. *International Heart Journal*, 2014, 55: 281-286.
171. Gürsoy AZ. Giriş. İçinde: Gürsoy AZ (editör). *Kontrollü Salım Sistemleri*, 1. Baskı. İstanbul, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği, 2002: 3-6.
172. Meyers JD, Doane T, Burda C, Basilion JP. Nanoparticles for imaging and treating brain cancer. *Nanomedicine (Lond)*, 2013, 8: 123-143.
173. Champion JA, Katare YK, Mitragotri S. Particle shape: A new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers. *Journal of Controlled Release*, 2007, 121: 3-9.
174. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, 75: 1-18.
175. Bala I, Hariharan S, Kumar MNVR. PLGA nanoparticles in drug delivery: The state of the art. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2004, 21: 387-422.
176. Bejjani R, BenEzra D, Cohen H, Rieger J, Andrieu C, Jeanny JC, Gollomb G, Behar-Cohen F. Nanoparticles for gene delivery to retinal pigment epithelial cells. *Molecular Vision*, 2005, 11: 124-132.
177. Ma Y, Zhang L, Zhao X, Shen Q. Analysis of daidzein in nanoparticles after oral co-administration with sodium caprate to rats by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2012, 907: 21-26.
178. Zhao XY, Shen Q, Ma YR. An HPLC method for the pharmacokinetic study of daidzein-loaded nanoparticle formulations after injection to rats. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2011, 879: 113-116.
179. Niwa T, Takeuchi H, Hino T, Kunou N, Kawashima Y. Preparations of Biodegradable

- Nanospheres of Water-Soluble and Insoluble Drugs with D,L-Lactide Glycolide Copolymer by a Novel Spontaneous Emulsification Solvent Diffusion Method, and the Drug Release Behavior. *Journal of Controlled Release*, 1993, 25: 89-98.
180. Sigma Aldrich Co. Products, Dichloromethane. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/270997?lang=en®ion=US>. 31 Ekim 2015.
181. Sigma Aldrich Co. Products, Ethyl Acetate. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/270989?lang=en®ion=TR>. 31 Ekim 2015.
182. Murakami H, Kobayashi M, Takeuchi H, Kawashima Y. Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *International Journal of Pharmaceutics*, 1999, 187: 143-152.
183. De S, Robinson DH. Particle size and temperature effect on the physical stability of PLGA nanospheres and microspheres containing Bodipy. *Aaps Pharmscitech*, 2004, 5: 18-24.
184. Cooper DL, Harirforoosh S. Design and Optimization of PLGA-Based Diclofenac Loaded Nanoparticles. *Plos One*, 2014, 9.
185. Talegaonkar S, Tariq M, Iqbal Z. Formulations of Nanoparticles in Drug Delivery. In: Kumar A, Mansour HM, Friedman A, Blough ER (eds). *Nanomedicine in Drug Delivery*, 1st ed. Florida, CRC Press, 2013: 255
186. Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A Review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2013, 12: 255-264.
187. Feng SS, Huang GF. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol[®]) from nanospheres of biodegradable polymers. *Journal of Controlled Release*, 2001, 71: 53-69.

188. Chitkara D, Nikalaje SK, Mittal A, Chand M, Kumar N. Development of quercetin nanoformulation and in vivo evaluation using streptozotocin induced diabetic rat model. *Drug Delivery and Translational Research*, 2012, 2: 112-123.
189. McCall RL, Sirianni RW. PLGA nanoparticles formed by single- or double-emulsion with vitamin E-TPGS. *Jove-Journal of Visualized Experiments*, 2013: 1-8.
190. Jiang XY, Zhou CS, Tang KW. Preparation of PLA and PLGA nanoparticles by binary organic solvent diffusion method. *Journal of Central South University of Technology*, 2003, 10: 202-206.
191. Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, 2000, 21: 2475-2490.
192. Mittal G, Sahana DK, Bhardwaj V, Kumar MNVR. Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Controlled Release*, 2007, 119: 77-85.
193. Dawes GJS, Fratila-Apachitei LE, Mulia K, Apachitei I, Witkamp GJ, Duszczyk J. Size effect of PLGA spheres on drug loading efficiency and release profiles. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 2009, 20: 1089-1094.
194. Calvo P, VilaJato JL, Alonso MJ. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1996, 85: 530-536.
195. Gamisans F, Lacoulonche F, Chauvet A, Espina M, Garcia ML, Egea MA. Flurbiprofen-loaded nanospheres: Analysis of the matrix structure by thermal methods. *International Journal of Pharmaceutics*, 1999, 179: 37-48.
196. Mainardes RM, Gremiao MPD, Evangelista RC. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006, 42: 523-530.

197. Dubernet C. Thermoanalysis of Microspheres. *Thermochimica Acta*, 1995, 248: 259-269.
198. Singh G, Kaur T, Kaur R, Kaur A. Recent biomedical applications and patents on biodegradable polymer-PLGA. *International Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences*, 2014, 1: 30-42.
199. Hancock BC, Zografi G. The relationship between the glass-transition temperature and the water-content of amorphous pharmaceutical solids. *Pharmaceutical Research*, 1994, 11: 471-477.
200. Khalil KA, Fouad H, Elsarnagawy T, Almajhdi FN. Preparation and characterization of electrospun PLGA/silver composite nanofibers for biomedical applications. *International Journal of Electrochemical Science*, 2013, 8: 3483-3493.
201. Fouad H, Elsarnagawy T, Almajhdi FN, Khalil KA. Preparation and in vitro thermo-mechanical characterization of electrospun PLGA nanofibers for soft and hard tissue replacement. *International Journal of Electrochemical Science*, 2013, 8: 2293-2304.
202. Ro AJ, Falotico R, Dave V. Morphological study of porous sirolimus-containing poly(lactide-co-glycolide) discs for biomedical applications. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 2010, 240.
203. Islam S. Lipophilic and hydrophilic drug loaded pla/plga in situ implants: Studies on thermal behavior of drug & polymer and observation of parameters influencing drug burst release with corresponding effects on loading efficiency & morphology of implants. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2011, 3: 181-188.
204. Mi FL, Shyu SS, Lin YM, Wu YB, Peng CK, Tsai YH. Chitin/PLGA blend microspheres as a biodegradable drug delivery system: A new delivery system for protein. *Biomaterials*, 2003, 24: 5023-5036.
205. Said SS, Aloufy AK, El-Halfawy OM, Boraei NA, El-Khordagui LK. Antimicrobial PLGA ultrafine fibers: Interaction with wound bacteria. *European Journal of*

- Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2011, 79: 108-118.
206. Mahmoodi M, Khosroshahi ME, Atyabi F. Early experimental results of thrombolysis using controlled release of tissue plasminogen activator encapsulated by PLGA/CS nanoparticles delivered by pulse 532 nm laser. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 2011, 6: 889-905.
 207. Mukerjee A, Vishwanatha JK. Formulation, characterization and evaluation of curcumin-loaded plga nanospheres for cancer therapy. *Anticancer Research*, 2009, 29: 3867-3875.
 208. Scheithauer EC, Li W, Ding YP, Harhaus L, Roether JA, Boocaccini AR. Preparation and characterization of electrosprayed daidzein-loaded PHBV microspheres. *Materials Letters*, 2015, 158: 66-69.
 209. Siripuram PK, Bandari S, Jukanti R, Veerareddy PR. Formulation and characterization of floating gelucire matrices of metoprolol succinate. *Dissolution Technologies*, 2010, 17: 34-39.
 210. Karatas A, Bekmezci S. Evaluation and enhancement of physical stability of semi-solid dispersions containing piroxicam into hard gelatin capsules. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 2013, 70: 883-897.
 211. Zhang ZW, Huang Y, Gao F, Gao ZW, Bu HH, Gu WW, Li YP. A self-assembled nanodelivery system enhances the oral bioavailability of daidzein: In vitro characteristics and in vivo performance. *Nanomedicine*, 2011, 6: 1365-1379.
 212. Singh H, Singh S, Srivastava A, Tandon P, Bharti P, Kumar S, Maurya R. Conformational analysis and vibrational study of daidzein by using FT-IR and FT-Raman spectroscopies and DFT calculations. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, 120: 405-415.
 213. Wang H, Xu HX, Zhang N, Hu LD. Enhancement of dissolution rate of daidzein in ternary solid dispersions. *Advanced Materials Researchs*, 2012, 550-553: 1000-1004.

214. Tong WK, Wang LJ, D'Souza MJ. Evaluation of PLGA microspheres as delivery system for antitumor agent-camptothecin. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2003, 29: 745-756.
215. Kiremitci-Gumusderelioglu M, Deniz G. Synthesis, characterization and in vitro degradation of poly(dl-lactide)/poly(dl-lactide-co-glycolide) films. *Turkish Journal of Chemistry*, 1999, 23: 153-161.
216. Marques DR, dos Santos LA, Schopf LF, de Fraga JCS. Analysis of poly(lactic-co-glycolic acid)/poly(isoprene) polymeric blend for application as biomaterial. *Polimeros-Ciencia E Tecnologia*, 2013, 23: 579-584.
217. Choi RCY, Zhu JTT, Yung AWY, Lee PSC, Xu SL, Guo AJY, Zhu KY, Dong TTX, Tsim KWK. Synergistic action of flavonoids, baicalein, and daidzein in estrogenic and neuroprotective effects: A development of potential health products and therapeutic drugs against alzheimer's disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 2013: 1-11.
218. Kajta M, Rzemieniec J, Litwa E, Lason W, Lenartowicz M, Krzeptowski W, Wojtowicz AK. The key involvement of estrogen receptor beta and G-protein-coupled receptor 30 in the neuroprotective action of daidzein. *Neuroscience*, 2013, 238: 345-360.
219. Hurtado O, Ballesteros I, Cuartero MI, Moraga A, Pradillo JM, Ramirez-Franco J, Bartolome-Martin D, Pascual D, Torres M, Sanchez-Prieto J, Salom JB, Lizasoain I, Moro MA. Daidzein has neuroprotective effects through ligand-binding-independent PPAR- γ activation. *Neurochemistry International*, 2012, 61: 119-127.
220. Linford NJ, Yang Y, Cook DG, Dorsa DM. Neuronal apoptosis resulting from high doses of the isoflavone genistein: Role for calcium and p42/44 mitogen-activated protein kinase. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2001, 299: 67-75.
221. Jin Y, Wu H, Cohen EM, Wei JN, Jin H, Prentice H, Wu JY. Genistein and daidzein

- induce neurotoxicity at high concentrations in primary rat neuronal cultures. *Journal of Biomedical Science*, 2007, 14: 275-284.
222. Choi EJ. The prooxidant, rather than antioxidant, acts of daidzein in vivo and in vitro: Daidzein suppresses glutathione metabolism. *European Journal of Pharmacology*, 2006, 542: 162-169.
 223. Kobayashi H, Shiraki K, Ikada Y. Toxicity test of biodegradable polymers by implantation in rabbit cornea. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1992, 26: 1463-1476.
 224. Sethia S, Squillante E. Physicochemical characterization of solid dispersions of carbamazepine formulated by supercritical carbon dioxide and conventional solvent evaporation method. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2002, 91: 1948-1957.
 225. Yoon IS, Park JH, Kang HJ, Choe JH, Goh MS, Kim DD, Cho HJ. Poly(D,L-lactic acid)-glycerol-based nanoparticles for curcumin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, 488: 70-77.
 226. Nguyen HT, Tran TH, Kim JO, Yong CS, Nguyen CN. Enhancing the in vitro anti-cancer efficacy of artesunate by loading into poly-D,L-lactide-co-glycolide (PLGA) nanoparticles. *Archives of Pharmacol Research*, 2015, 38: 716-724.
 227. Koo OM, Rubinstein I, Onyuksel H. Camptothecin in sterically stabilized phospholipid micelles: A novel nanomedicine. *Nanomedicine*, 2005, 1: 77-84.
 228. Ranganath SH, Wang CH. Biodegradable microfiber implants delivering paclitaxel for post-surgical chemotherapy against malignant glioma. *Biomaterials*, 2008, 29: 2996-3003.
 229. Khoshyomn S, Nathan D, Manske GC, Osler TM, Penar PL. Synergistic effect of genistein and BCNU on growth inhibition and cytotoxicity of glioblastoma cells. *Journal of Neuro-Oncology*, 2002, 57: 193-200.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Rukiye SEVİNÇ ÖZAKAR Doğum tarihi: 01.08.1983 Doğum yeri: Kayseri Medeni hali: Evli, 1 çocuk Uyruğu: T.C. Adres: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 25240 ERZURUM Tel: 0442 231 52 38 Faks: 0449 231 52 01 E-mail: rukiyeso@atauni.edu.tr
Eğitim
Lise: Talas Fatma-Kemal Timuçin Anadolu Lisesi (2001) Lisans: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2002-2006) Yüksek lisans: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı (2008-2010) Doktora: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı (2010-2015)
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: Orta derecede (ÜDS 66.25, Mart 2007) Almanca: Rusça:
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
Erzurum Eczacı Odası (2007) Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği (2010)
İlgi Alanları ve Hobiler
Farmasötik Teknoloji Majistral İlaçlar

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 36643897-121

Konu : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.

29.08.2013
ERZURUM

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
ECZACILIK FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

25240 – Kampus / ERZURUM

İlgi : 21.08.2013 tarih ve 93722986.03-681 sayılı yazı.

İlgide kayıtlı yazıda belirtildiği üzere, Fakülteniz Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Meltem ÇETİN'in yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezinde yürütülecek olan **"Daidzein Yüklü Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanması, İn Vitro ve İn Vivo Olarak Değerlendirilmesi"** başlıklı araştırma çalışması, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 29.08.2013 tarih ve 3 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 103 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna mevcudun oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

İlgili Öğr.-Öğretmen
2.9.2013

Lutlu S

Prof. Dr. Derviş ÖZDEMİR
Başkan Vekili

Toplantı Tarihi : 29.08.2013

Toplantı Sayısı : 3

KARA6R N0 : 103- Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanlığı, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Meltem ÇETİN'in yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezinde yürütülecek olan **"Daidzein Yüklü Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanması, İn Vitro ve İn Vivo Olarak Değerlendirilmesi"** başlıklı araştırma çalışması ile ilgili Eczacılık Fakültesi Dekanlığının 21.08.2013 tarih ve 93722986.03-681 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Adres : Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı. 25240 – Yakutiye / ERZURUM
Telefon : 0-442-236 08 80 Fax : 0-442-236 08 81 e-mail: hadyek@atauni.edu.tr