



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

**DOKTORA
TEZİ**

**LİPİT POLİMER HİBRİT NANOPARTİKÜLER
İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ
VE DEĞERLENDİRİLMESİ**

TAHİR EMRE YALÇIN

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

EYLÜL 2017



**LİPİT POLİMER HİBRİT NANOPARTİKÜLER İLAÇ TAŞIYICI
SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Tahir Emre YALÇIN

**DOKTORA TEZİ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

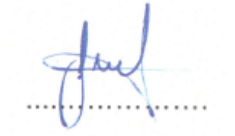
EYLÜL 2017

Tahir Emre YALÇIN tarafından hazırlanan “Lipit Polimer Hibrit Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve Değerlendirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Sevgi TAKKA

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Başkan : Prof. Dr. Nevin ÇELEBİ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

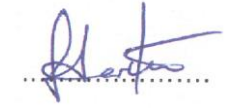
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Prof. Dr. Füsün ACARTÜRK

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

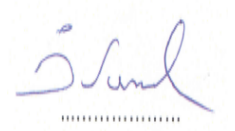
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Prof. Dr. İmran VURAL

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Doç. Dr. Canan HASÇİÇEK

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Tez Savunma Tarihi: 12 / 09 / 2017

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Tahir Emre YALÇIN

12 / 09 / 2017

LİPİT POLİMER HİBRİT NANOPARTİKÜLER İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ

(Doktora Tezi)

Tahir Emre YALÇIN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Eylül 2017

ÖZET

Gemsitabin hidroklorür, meme kanseri tedavisinde kullanılan bir ön ilaç olup Türkiye ilaç piyasasında intravenöz çözelti formülasyonu (Gemko®) bulunmaktadır. Gemsitabin hidroklorür intravenöz uygulama sonrası hızla enzimatik bozulmaya uğrayarak inaktif metabolitine dönüşmekte bu durum da etkili bir tedavinin görülebilmesi için yüksek doz veya diğer kemoterapötik ajanlarla kombine halde uygulanmasını gerektirmektedir. Nano boyuttaki ilaç taşıyıcı sistemler küçük boyutları ve hedefleme gibi özellikleriyle kanser tedavisinde daha etkin tedavi sağlamaları açısından önem taşımaktadırlar. Lipozom ve polimerik nanopartiküller nano boyuttaki ilaç taşıyıcı sistemlerin önemli iki sınıfıdır. Bu sistemlerin ayrı ayrı gösterdikleri sorunlar yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesini ihtiyaç haline getirmiştir. Lipit polimer hibrit nanopartiküller (LPHNP) çekirdek-kabuk yapısında olup, polimerik çekirdek ve lipit/lipit-PEG kabuktan oluşmaktadır, özellikle fiziksel stabilite ve biyouyumluluk açısından polimerik nanopartikül ve lipozomların karakteristik özelliklerini göstermektedirler. Çalışmada gemsitabin hidroklorür yüklü nanopartikül, lipozom ve LPHNP taşıyıcı sistemler hazırlanarak karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. LPHNP formülasyonlarını hazırlamak için tespit edilen parametrelerin uygun oranlarının belirlenmesi amacıyla deney tasarımı uygulanmıştır. Formülasyonların in vitro ortamlarda salım çalışmaları yapılmış ve stabiliteleri incelenmiştir. Hazırlanan formülasyonların MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri kullanılarak sitotoksikite çalışmaları yapılmıştır ve IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Her iki hücre tipinde de ticari ürün Gemko®'ya göre daha düşük IC₅₀ değeri elde edilmiştir. Sprague Dawley cinsi dişi sıçanlarda meme tümörü oluşturulmuştur. Gemsitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonu ve Gemko® sıçanlara uygulanmış ve 30 günlük tedavi süresince tümör hacmi değişimi incelenmiştir. Gemsitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonu uygulanan sıçanlarda tümör hacimleri aynı dozda ticari preparat Gemko® uygulanan hayvanlara göre belirgin şekilde küçülmüştür. Gemsitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonu ve Gemko® kullanılarak in vivo farmakokinetik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmada ticari preparatına kıyasla daha düşük dozla etkili bir tedavi sağlayan LPHNP formülasyonu geliştirilmiş, etkinliği in vitro ve in vivo olarak kanıtlanmıştır.

Bilim Kodu : 1020

Anahtar Kelimeler : Nanopartikül, lipozom, lipit polimer hibrit nanopartikül, gemsitabin, meme kanseri

Sayfa Adedi : 284

Danışman : Prof. Dr. Sevgi TAKKA

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF LIPID POLYMER HYBRID NANOPARTICLES DRUG DELIVERY SYSTEMS

(Ph. D. Thesis)

Tahir Emre YALÇIN

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

September 2017

ABSTRACT

Gemcitabine hydrochloride is widely used for the treatment of breast cancer and is available as a intravenous solution (Gemko®) in the Turkish drug market. Gemcitabine hydrochloride is rapidly metabolized into the inactive metabolite after intravenous application thus requires high-dose or co-administration with other chemotherapeutic agents to be applied for an effective treatment. Nano-sized drug carrier systems are able to provide a more effective treatment in the cancer treatment in terms of their small size and targeting specifications. Liposomes and polymeric nanoparticles are two important classes of the nano-sized drug carrier systems. To address the limitations of polymeric nanoparticles and liposomes, a new generation delivery vehicle of therapeutics has been developed. Lipid polymer hybrid nanoparticles (LPHNP) are core-shell nanoparticle structures comprising polymer cores and lipid/lipid-PEG shells, which exhibit complementary characteristics of both polymeric nanoparticles and liposomes, particularly in terms of their physical stability and biocompatibility. In this study, gemcitabine hydrochloride loaded nanoparticle, liposome and LPHNP systems were prepared and characteristic properties were determined. In order to determine the appropriate proportions of the detected parameters, design of experiment was used to prepare LPHNP formulations. In vitro release and stability studies of the formulations have been carried out. Cytotoxicity studies were performed using the MCF-7 and MDA-MB-231 cells of the prepared formulations and IC₅₀ values were calculated. In both cell types, lower IC₅₀ values were obtained than in the market product Gemko®. Breast tumors were formed in female Sprague Dawley rats. Gemcitabine hydrochloride loaded LPHNP formulation and Gemko® were administered to rats for 30 days and the tumor volume was examined. Tumor was significantly reduced in rats treated with gemcitabine hydrochloride loaded LPHNP formulation compared to commercial product Gemko® at the same dose. In vivo pharmacokinetic studies were performed using gemcitabine hydrochloride loaded LPHNP formulation and Gemko®. In this study, a formulation of LPHNP, which provides an effective treatment with low doses compared to commercial preparation, has been developed and its efficacy proved in vitro and in vivo.

Science Code : 1020

Key Words : Nanoparticle, liposome, lipid polymer hybrid nanoparticle,
gemcitabine, breast cancer

Page Number : 284

Advisor : Prof. Dr. Sevgi TAKKA

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın her aşamasında bilimsel bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, karşılaştığım tüm sorunların çözümlenmesinde yardımcı olan, özgür bilimsel bir ortamda çalışmamı sağlayan değerli hocam Sn. Prof. Dr. Sevgi TAKKA'ya, Çalışmam boyunca tecrübe ve bilgileriyle beni yönlendiren, içten ve anlayışlı tavırlarıyla zorlandığım her konuda desteklerini esirgemeyen Sn. Prof. Dr. Füsün ACARTÜRK'e ve Sn. Prof. Dr. Nevin ÇELEBİ'ye,

Beni Farmasötik Teknoloji camiasına kazandıran, bilimsel katkılarını ve desteklerini her zaman hissettiğim Sn. Prof. Dr. Tuncer DEĞİM ve Sn. Prof. Dr. Zelihağül DEĞİM'e, Güler yüzleri ve moral verici yaklaşımlarıyla çalışmalarına yüksek adaptasyon göstermeme yardımcı olan Sn. Prof. Dr. Figen TIRNAKSIZ'a, Sn. Doç. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN'e ve Yrd. Doç. Dr. Fatmanur TUĞCU DEMİRÖZ'e

Çalışmalarımın her anında bana yol gösteren, destek olan, hoş sohbetiyle beni motive eden Dr. Ecz. Sibel İLBASMIŞ TAMER'e

İn vivo çalışmalarına katkılarından dolayı Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

HPLC'de yaşadığım tüm sorunlarda çözüm üreten Sn. Prof. Dr. Uğur TAMER'e,

Yoğun çalışma programı içerisinde bana her zaman vakit ayıran, hücre kültürü çalışmalarımda destek olan Sn. Prof. Dr. Mustafa ARK'a,

Çalışmalarım boyunca verdikleri bilimsel destekler ve öneriler için doktora tez izleme komitemde yer alan Sn. Prof. Dr. İmran VURAL'a,

Her zaman desteklerini hissettiğim Dr. Ecz. Serdar TORT'a, Dr. Ecz. Tuba İNCEÇAYIR'a, Dr. Ecz. Başaran MUTLU AĞARDAN'a,

Deney tasarımı çalışmalarımındaki katkılarından dolayı Uzm. Ecz. Mehtap SAYDAM'a

İhtiyacım olduğu her an yanımda olan Gülen Melike DEMİRPOLAT, Mert İLHAN, Özlem ÇOBAN ve Yasin TURANLI başta olmak üzere tüm fakülte ve bölüm arkadaşlarıma ve Fatma ÇELİK'e,

2211-A Yurt İçi Doktora Burs Programı çerçevesinde doktora eğitimimi ve 113S841 kodlu proje ile tez çalışmalarımı destekleyen TÜBİTAK'a,

Yaşamım boyunca aldığım her karar ve attığım her adımda yanımda olan, sevgi ve hoşgörülerıyla tüm zorlukları aşmama yardımcı olan, bana her zaman dünyanın en şanslı evladı olduğumu hissettiren sevgili annem Selma YALÇIN'a ve babam Yüksel YALÇIN'a, varlığıyla huzur ve mutluluk veren, bana şans getiren, her zaman yanımda olan sevgili yol arkadaşım Türkan İrem YALÇIN'a teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xviii
RESİMLERİN LİSTESİ	xxiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xxvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.1.1. Meme kanseri	3
2.1.2. Meme kanseri tedavi yöntemleri	4
2.2. Nano Boyutlu İlaç Taşıyıcı Sistemler	7
2.2.1. Polimerik nanopartiküller	11
2.2.2. Lipozomlar	20
2.2.3. Lipit polimer hibrit nanopartiküller (LPHNP)	30
2.3. Gempitabin Hidroklorür	44
2.3.1. Gempitabin hidroklorürün yapısı ve özellikleri	44
2.3.2. Gempitabin hidroklorürün farmakolojisi ve etki mekanizması	45
2.3.3. Gempitabinin hidroklorürün metabolizması	47
2.3.4. Gempitabin hidroklorürün uygulama dozu	47
2.3.5. Gempitabin hidroklorürün farmakokinetik özellikleri	48
2.4. Hücre Kültürü Çalışmaları	48

	Sayfa
2.4.1. Hücre proliferasyon ve sitotoksisite testleri	50
2.5. Deney Tasarımı	50
2.5.1. Yanıt yüzey tasarımları.....	51
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	55
3.1. Gereç	55
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	55
3.1.2. Kullanılan alet ve malzemeler	56
3.2. Yöntem.....	57
3.2.1. Etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri üzerine yapılan çalışmalar.....	57
3.2.2. Gemsitabin hidroklorürün miktar tayini yöntemlerinin geliştirilmesi.....	59
3.3. Formülasyon Çalışmaları	65
3.3.1. Etkin madde yardımcı madde etkileşimleri	65
3.3.2. Gemsitabin hidroklorür içeren nanopartikül hazırlama yöntemi.	66
3.3.3. Gemsitabin hidroklorür içeren nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesi üzerine çalışmalar	67
3.3.4. Gemsitabin hidroklorür içeren lipozom formülasyonlarının geliştirilmesi üzerine çalışmalar.....	76
3.3.5. Gemsitabin hidroklorür içeren LPHNP formülasyonlarının geliştirilmesi üzerine çalışmalar.....	80
3.4. Geliştirilen Nanopartikül, Lipozom ve LPHNP Formülasyonları Üzerinde Yapılan İn Vitro Kontroller	89
3.4.1. Partikül büyüklüğü ve dağılımı	89
3.4.2. Zeta potansiyeli ölçümleri.....	89
3.4.3. Yüzde enkapsülasyon etkinliği	90
3.4.4. Yüzde ilaç yüklenmesi	90
3.4.5. İn vitro salım çalışmaları.....	91

	Sayfa
3.4.6. Stabilité çalışmaları	93
3.4.7. Formülasyonların morfolojik özelliklerinin belirlenmesi	94
3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları	95
3.5.1. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde gempitabinin hidroklorürün sitotoksik etkilerinin MTT testi ile değerlendirilmesi	95
3.5.2. Formülasyonların hücre içine geçiş deneyleri	96
3.6. Ticari Ürün Gemko® ve Gempitabin Hidroklorür Yüklü LPHNP Formülasyonları ile Yapılan İn Vivo Çalışmalar	99
3.7. Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	103
4. BULGULAR	105
4.1. Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Yapılan Çalışmalar	105
4.1.1. Gempitabin hidroklorürün erime derecesi tayini	105
4.1.2. Gempitabin hidroklorürün FTIR analizi	105
4.1.3. Gempitabin hidroklorürün ortalama partikül boyutunun ve zeta potansiyelinin ölçülmesi	106
4.1.4. Gempitabin hidroklorürün UV spektrofotometredeki dalga boyu taraması	107
4.2. Gempitabin Hidroklorürün Miktar Tayini Yöntemlerinin Geliştirilmesi	109
4.2.1. Miktar tayini yöntemi (Yöntem 1) validasyonu	109
4.2.2. Miktar tayini yöntemi (Yöntem 2) validasyonu	116
4.3. Formülasyon Çalışmaları	121
4.3.1. Etkin madde yardımcı madde etkileşimleri	121
4.3.2. Geliştirilen nanopartikül formülasyonlarına ait sonuçlar	125
4.3.3. Geliştirilen lipozom formülasyonlarına ait sonuçlar	132
4.3.4. Gempitabin hidroklorür içeren LPHNP formülasyonlarına ait sonuçlar	136
4.3.5. Nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarına ait in vitro salım çalışmaları	147

	Sayfa
4.3.6. Stabilité çalışmaları	159
4.3.7. Formülasyonların morfolojik özelliklerinin belirlenmesi	182
4.4. Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Sonuçlar	198
4.4.1. Sitotoksikite testi (MTT)	198
4.4.2. Formülasyonların hücre içine geçiş deneyleri	207
4.5. Ticari Ürün Gemko® ve Gemsitabin Hidroklorür Yüklü LPHNP Formülasyonları ile Yapılan İn Vivo Çalışmalar	211
4.5.1. Hayvanların ağırlıklarının değişimi	211
4.5.2. Tümör hacimlerinin değişimi	212
4.5.3. Histopatolojik çalışmalar	215
4.5.4. Farmakokinetik çalışmalar	219
5. TARTIŞMA	223
5.1. Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Yapılan Çalışmalar	223
5.1.1. Gemsitabin hidroklorürün erime derecesi tayini	223
5.1.2. Gemsitabin hidroklorürün FTIR analizi	223
5.1.3. Gemsitabin hidroklorürün ortalama partikül boyutunun ve zeta potansiyelinin ölçülmesi	224
5.1.4. Gemsitabin hidroklorürün UV spektrofotometredeki dalga boyu taraması	224
5.2. Gemsitabin Hidroklorürün Miktar Tayini Yöntemlerinin Geliştirilmesi	224
5.2.1. Miktar tayini yöntemi (Yöntem 1) validasyonu	225
5.2.2. Miktar tayini yöntemi (Yöntem 2) validasyonu	226
5.3. Formülasyon Çalışmaları	227
5.3.1. Etkin madde yardımcı madde etkileşimleri	227
5.3.2. Geliştirilen nanopartikül formülasyonlarına ait sonuçların değerlendirilmesi	228
5.3.3. Geliştirilen lipozom formülasyonlarına ait sonuçların değerlendirilmesi	234

Sayfa

5.3.4. Gempitabin hidroklorür içeren LPHNP formülasyonlarına ait sonuçların değerlendirilmesi.....	237
5.3.5. Nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarına ait in vitro salım çalışmalarının değerlendirilmesi.....	240
5.3.6. Stabilité çalışmaları	245
5.3.7. Formülasyonların morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesi.....	247
5.4. Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Sonuçlar.....	249
5.4.1. Sitotoksité testi (MTT) sonuçlarının değerlendirilmesi	249
5.4.2. Formülasyonların hücre içine geçiş deneyleri	251
5.5. Ticari Ürün Gemko® ve Gempitabin Hidroklorür Yüklü LPHNP Formülasyonları ile Yapılan İn Vivo Çalışmalar.....	252
5.5.1. Hayvanların ağırlıklarının değişimi	252
5.5.2. Tümör hacimlerinin değişimi.....	253
5.5.3. Histopatolojik çalışmalar.....	253
5.5.4. Farmakokinetik çalışmalar.....	254
6. SONUÇ	257
KAYNAKLAR	261
EKLER.....	281
EK-1. Etik Kurul Onayı	282
ÖZGEÇMİŞ	283

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Meme kanseri tedavisinde kullanılan etkin madde ve ticari ürünlerin listesi	6
Çizelge 2.2. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan doğal polimerler.....	15
Çizelge 2.3. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan sentetik polimerler.....	15
Çizelge 2.4. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan kopolimerler.....	15
Çizelge 2.5. Piyasadaki PLGA içeren ilaçlara örnekler.....	18
Çizelge 2.6. Piyasadaki lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlere örnekler	21
Çizelge 2.7. Farmasötik endüstride kullanılan fosfolipitler	22
Çizelge 2.8. MLV, SUV ve LUV hazırlamada kullanılan yöntemler	26
Çizelge 2.9. Lipozom ve polimerik nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemlerin karşılaştırılması	30
Çizelge 2.10. Farklı tiplerdeki LPHNP sistemler ve yapısal özellikleri	32
Çizelge 2.11. LPHNP karakterizasyonunda kullanılan parametreler ve yöntemler	39
Çizelge 2.12. Gemsitabin hidroklorür içeren bazı müstahzarlar ve üreten firmalar	46
Çizelge 2.13. Meme kanseri hücreleri ve sınıflandırılması	49
Çizelge 2.14. Faktör sayısına göre hesaplanan α değerleri	53
Çizelge 3.1. Gemsitabin hidroklorürün HPLC analiz yöntemi (Yöntem 1) parametreleri	59
Çizelge 3.2. Gemsitabin hidroklorürün biyoanalitik tayininde kullanılan HPLC yöntemi (Yöntem 2) parametreleri	62
Çizelge 3.3. PLGA polimerlerine ait fizikokimyasal özellikler.....	68
Çizelge 3.4. Gemsitabin hidroklorür içeren nanopartikül formülasyonlarında yapılan ön çalışmalar.....	69
Çizelge 3.5. Farklı PLGA miktarları kullanılarak hazırlanan formülasyonlar ...	70

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.6. Farklı miktarda etkin madde kullanılarak hazırlanan formülasyonlar.....	71
Çizelge 3.7. Farklı terminal fonksiyonel gruba sahip PLGA polimeri kullanılarak hazırlanan formülasyonlar.....	72
Çizelge 3.8. Organik çözücü/çözücü karışımlarının etkisi incelemeye yönelik hazırlanan formülasyonlar.....	73
Çizelge 3.9. Farklı molekül ağırlığına sahip PLGA'lar kullanılarak hazırlanan formülasyonlar.....	74
Çizelge 3.10. Farklı laktik asit/glikolik asit oranına sahip PLGA polimeri kullanılarak hazırlanan formülasyonlar.....	75
Çizelge 3.11. PLGA 50:50/PLGA 65:35 ve PLGA 50:50/PLGA 75:25 polimer karışımları kullanılarak hazırlanan formülasyonlara ait bilgiler ...	76
Çizelge 3.12. Kullanılan fosfotidilkolinlere ait fizikokimyasal özellikler	78
Çizelge 3.13. Lipozom formülasyonunda yapılan ön çalışmalara ait bilgiler	79
Çizelge 3.14. Farklı SPC:kolesterol molar oranları ile hazırlanan formülasyonlar	79
Çizelge 3.15. Farklı fosfotidilkolinler kullanılarak hazırlanan ve pegile edilen lipozom formülasyonları.....	80
Çizelge 3.16. Yöntem 1 kullanılarak hazırlanan LPHNP formülasyonları	84
Çizelge 3.17. Yöntem 2 kullanılarak hazırlanan LPHNP formülasyonları	84
Çizelge 3.18. Modifiye nanoçöktürme yöntemiyle hazırlanan LPHNP formülasyonları	84
Çizelge 3.19. PLGA 50:50/PLGA 65:35 ve PLGA 50:50/PLGA 75:25 karışımları ile hazırlanan LPHNP formülasyonları	85
Çizelge 3.20. LPHNP formülasyonlarında farklı liyoprotektanların etkisi	86
Çizelge 3.21. LPHNP formülasyonu hazırlanırken uygulanan deney tasarımıdaki bağımsız değişkenler ve kullanılan limitler	87
Çizelge 3.22. Merkezi birleşik deney tasarımına ait kodlanmış ve normal seviyeler	88
Çizelge 3.23. Salım kinetiklerinin belirlenmesinde kullanılan eşitlikler	93
Çizelge 3.24. Sıçanlara uygulanan gemitabin hidroklorür içeren LPHNP formülasyonları, ticari ürün Gemko® dozları ve deney grupları.....	101

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Gemsitabin hidroklorür yapısında bulunan bağlar	106
Çizelge 4.2. Gemsitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponundaki doğruluk ve geri elde sonuçları	110
Çizelge 4.3. Gemsitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponu içindeki deney içi kesinlik sonuçları.....	111
Çizelge 4.4. Gemsitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponundaki deneyler arası kesinlik sonuçları	112
Çizelge 4.5. Gemsitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponu içindeki çözeltisinin 4°C'deki stabilite sonuçları.....	115
Çizelge 4.6. Gemsitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponu içindeki çözeltisinin 25°C'deki stabilite sonuçları.....	115
Çizelge 4.7. Gemsitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponu içindeki çözeltisinin 37°C'deki stabilite sonuçları	115
Çizelge 4.8. Gemsitabin hidroklorürün plazma içindeki çözeltisinden ekstraksiyon etkinliği hesapları.....	117
Çizelge 4.9. Gemsitabin hidroklorürün plazma içindeki deney içi kesinlik sonuçları.....	118
Çizelge 4.10. Gemsitabin hidroklorürün plazma içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları	119
Çizelge 4.11. Plazmadaki 0,4 µg/mL derişimdeki gemsitabin hidroklorürün stabilitesi.....	120
Çizelge 4.12. Plazmadaki 1 µg/mL derişimdeki gemsitabin hidroklorürün stabilitesi.....	121
Çizelge 4.13. Plazmadaki 5 µg/mL derişimdeki gemsitabin hidroklorürün stabilitesi.....	121
Çizelge 4.14. Nanopartikül formülasyonlarında yapılan ön çalışmalara ait sonuçlar	125
Çizelge 4.15. Nanopartikül formülasyonlarında yapılan ön çalışmalarda liyofilizasyonun etkisi	126
Çizelge 4.16. Farklı PLGA miktarları kullanılarak hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar	127
Çizelge 4.17. Farklı miktarda etkin madde kullanılarak hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar.....	128

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.18. Farklı terminal fonksiyonel gruba sahip PLGA polimeri kullanılarak hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar	128
Çizelge 4.19. Organik çözücü/çözücü karışımlarının etkisi incelemeye yönelik hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar	129
Çizelge 4.20. Farklı molekül ağırlığına sahip PLGA'lar kullanılarak hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar	130
Çizelge 4.21. Farklı laktik asit/glikolik asit oranına sahip PLGA polimeri kullanılarak hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar	131
Çizelge 4.22. PLGA 50:50/PLGA 65:35 ve PLGA 50:50/PLGA 75:25 polimer karışımları kullanılarak hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar	132
Çizelge 4.23. Lipozom formülasyonunda yapılan ön çalışmalara ait sonuçlar..	133
Çizelge 4.24. Farklı SPC:kolesterol molar oranları ile hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar	133
Çizelge 4.25. Farklı fosfatidilkolinler kullanılarak hazırlanan lipozom formülasyonlarına ait sonuçlar	134
Çizelge 4.26. Gemsitabin hidroklorür içeren lipozom formülasyonlarında liyofilizasyon işleminin öncesi ve sonrasına ait sonuçlar	135
Çizelge 4.27. İki farklı çift emülsiyon çözücü uçurma ve nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar	136
Çizelge 4.28. PLGA 50:50/PLGA 65:35 ve PLGA 50:50/PLGA 75:25 polimerlerinin karışımıyla hazırlanan ön deneme LPHNP formülasyonlarına ait sonuçlar	137
Çizelge 4.29. Farklı liyoprotektanlar kullanılarak hazırlanan LPHNP formülasyonları	138
Çizelge 4.30. Deney tasarımı ile hazırlanmış LPHNP formülasyonlarına ait sonuçlar	139
Çizelge 4.31. Deney tasarımı ile elde edilen LPHNP formülasyonlarına ait faktör içerikleri ve cevaplar	140
Çizelge 4.32. Merkezi birleşik tasarımın % enkapsülasyon verimliliği cevabı için ANOVA sonuçları	141
Çizelge 4.33. Merkezi birleşik tasarımın partikül büyüklüğü cevabı için ANOVA sonuçları	144
Çizelge 4.34. Merkezi birleşik tasarımın % kümülatif salınan madde cevabı için ANOVA sonuçları	146

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.35. Pegile edilmiş nanopartikül, lipozom ve optimum LPHNP formülasyonlarının hesaplanan salım kinetiklerine ait r^2 , AIC ve MSC değerleri.....	158
Çizelge 4.36. Formülasyonların Weibull modeli için β değeri ve Korsmeyer-Peppas modeli için hesaplanan n değeri.....	159
Çizelge 4.37. Pegile nanopartikül formülasyonunun 4°C sıcaklıktaki stabilitesi.....	160
Çizelge 4.38. Pegile nanopartikül formülasyonunun 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamındaki stabilitesi	162
Çizelge 4.39. Pegile nanopartikül formülasyonunun 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamındaki stabilitesi	164
Çizelge 4.40. Pegile lipozom formülasyonunun 4°C sıcaklıktaki stabilitesi	166
Çizelge 4.41. Pegile lipozom formülasyonunun 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamındaki stabilitesi	168
Çizelge 4.42. Pegile lipozom formülasyonunun 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamındaki stabilitesi	170
Çizelge 4.43. LPHNP formülasyonunun 4°C sıcaklıktaki stabilitesi	172
Çizelge 4.44. LPHNP formülasyonunun 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamındaki stabilitesi	174
Çizelge 4.45. LPHNP formülasyonunun 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamındaki stabilitesi	176
Çizelge 4.46. Formülasyonların farklı saklama koşullarındaki raf ömürleri	177
Çizelge 4.47. %100 fosfat tamponu içerisindeki nanopartikül formülasyonu	178
Çizelge 4.48. %90 fosfat tamponu/%10 fetal bovin serum ortamı içerisindeki nanopartikül formülasyonu	179
Çizelge 4.49. %100 fetal bovin serum ortamı içerisindeki nanopartikül formülasyonu	179
Çizelge 4.50. %100 fosfat tamponu içerisindeki lipozom formülasyonu	180
Çizelge 4.51. %90 fosfat tamponu/%10 fetal bovin serum ortamı içerisindeki lipozom formülasyonu.....	180
Çizelge 4.52. %100 fetal bovin serum ortamı içerisindeki lipozom formülasyonu	180
Çizelge 4.53. %100 fosfat tamponu içerisindeki LPHNP formülasyonu.....	181

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.54. %90 fosfat tamponu/%10 fetal bovin serum ortamı içerisindeki LPHNP formülasyonu	181
Çizelge 4.55. %100 fetal bovin serum ortamı içerisindeki LPHNP formülasyonu	182
Çizelge 4.56. 10 mg/kg dozda gemitabin hidroklorür içeren LPHNP formülasyonu ve ticari ürün Gemko®'ya ait farmakokinetik parametreler	221

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Nanotaşıyıcı sistemlerin şematize gösterimi.....	8
Şekil 2.2. Nanotaşıyıcı sistemlerde EPR etkisinin şematize edilmesi.....	9
Şekil 2.3. Nanokapsül ve nanokürenin şematik gösterimi	12
Şekil 2.4. PLGA'nın yapısı	16
Şekil 2.5. PLGA'nın hidrolizi sonucu oluşan ürünler	16
Şekil 2.6. Lipozomların yapısının şematik gösterimi	20
Şekil 2.7. Çok tabakalı, büyük tek tabakalı ve küçük tek tabakalı lipozomların şematize gösterimi	25
Şekil 2.8. Lipit film hidrasyon yönteminin şematize gösterimi	27
Şekil 2.9. LPHNP ilaç taşıyıcı sistemlerin şematize gösterimi	31
Şekil 2.10. LPHNP ilaç taşıyıcı sistem hazırlanırken uygulanan iki basamaklı yöntemin şematize gösterimi	34
Şekil 2.11. Tek emülsiyon çözücü uçurma yönteminin şematize gösterimi	35
Şekil 2.12. Çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi kullanılarak LPHNP formülasyonlarının elde edilmesi	36
Şekil 2.13. Nanoçöktürme yöntemiyle LPHNP formülasyonların elde edilmesi	37
Şekil 2.14. Gemsitabin hidroklorürün moleküler yapısı.....	44
Şekil 2.15. Gemsitabinin etki mekanizması	45
Şekil 2.16. Gemsitabinin sitidin deaminazların etkisiyle deaminasyona uğrayıp inaktif metabolitine dönüşmesi.....	47
Şekil 2.17. Merkezi birleşik tasarımın şematize gösterimi	52
Şekil 3.1. Modifiye çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi ile nanopartiküllerin hazırlanması.....	67
Şekil 3.2. Lipit film hidrasyon yöntemi ile lipozomların hazırlanması	77
Şekil 3.3. DPPC, DOPC ve SPC'nin kimyasal yapısı	78
Şekil 3.4. Modifiye çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi (Yöntem 1)	81
Şekil 3.5. Modifiye çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi (Yöntem 2)	82

Şekil	Sayfa
Şekil 3.6. LPHNP'lerin nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanması.....	83
Şekil 3.7. Franz difüzyon hücresinin şematik gösterimi.....	91
Şekil 3.8. Diyaliz tüp yöntemi şematik gösterimi.....	92
Şekil 4.1. Gempitabin hidroklorürün erime derecesi tayini.....	105
Şekil 4.2. Gempitabin hidroklorüre ait FTIR spekturumu	106
Şekil 4.3. Gempitabin hidroklorüre ait partikül büyüklüğü ve dağılımı	107
Şekil 4.4. Gempitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponu çözeltisi içindeki spektrum grafiği	108
Şekil 4.5. Gempitabin hidroklorürün sıçan plazması içindeki çözeltisinin spektrum grafiği	108
Şekil 4.6. Gempitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponundaki kalibrasyon doğrusu	109
Şekil 4.7. Gempitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponundaki kromatogram	112
Şekil 4.8. Etkin madde içermeyen nanopartikül formülasyonuna ait kromatogram	113
Şekil 4.9. Etkin madde içermeyen lipozom formülasyonuna ait kromatogram	113
Şekil 4.10. Etkin madde içermeyen LPHNP formülasyonuna ait kromatogram	114
Şekil 4.11. Gempitabin hidroklorürün sıçan plazmasındaki kalibrasyon doğrusu	116
Şekil 4.12. Plazmadaki gempitabin hidroklorüre ait kromatogram	119
Şekil 4.13. Etkin madde içermeyen LPHNP formülasyonuna ait kromatogram	120
Şekil 4.14. Gempitabin hidroklorür, mannitol, PLGA, liyofilize nanopartikül formülasyonu ve PLGA-gempitabin hidroklorür fiziksel karışımına ait DSC termogramı.....	122
Şekil 4.15. Gempitabin hidroklorür, soya fosfotidilkolin, mannitol, kolesterol, liyofilize lipozom formülasyonu ve soya fosfotidilkolin-gempitabin hidroklorür fiziksel karışımına ait DSC termogramı	123
Şekil 4.16. Gempitabin hidroklorür, PLGA, soya fosfotidilkolin, DSPE-PEG, trehaloz, liyofilize LPHNP formülasyonuna ve soya fosfotidilkolin-PLGA-gempitabin hidroklorürün fiziksel karışımına ait DSC termogramı.....	124

Şekil	Sayfa
Şekil 4.17. % enkapsülasyon etkinliği cevabı için yüzey cevap grafikleri.....	143
Şekil 4.18. Partikül büyüklüğü cevabı için yüzey cevap grafikleri	145
Şekil 4.19. % kümülatif salınan madde cevabı için yüzey cevap grafiği	147
Şekil 4.20. Nanopartikül formülasyonunda Franz difüzyon hücresi yöntemi ve diyaliz tüp yöntemi kullanılarak elde edilen salım profilleri.....	148
Şekil 4.21. Farklı molekül ağırlıklarına sahip PLGA polimeriyle hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ait salım profilleri.....	149
Şekil 4.22. Farklı laktik asit/glikolik asit oranına sahip PLGA polimerleri kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ait salım profilleri.....	150
Şekil 4.23. PLGA 50:50 polimerinin PLGA 65:35 ve PLGA 75:25 polimeriyle 1/1 (a/a) oranında karışımları kullanılarak hazırlanan formülasyonlar ile pegile nanopartikül formülasyonuna ait salım profilleri.....	151
Şekil 4.24. SPC:kolesterol farklı molar oranları kullanılarak hazırlanan formülasyonlara ait salım profilleri	152
Şekil 4.25. Farklı yağlar kullanılarak hazırlanan ve pegile edilen lipozom formülasyonlarına ait salım profilleri	153
Şekil 4.26. Gemsitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonlarının merkez noktalara ait salım profilleri	154
Şekil 4.27. Gemsitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonlarının aksiyal noktalara ait salım profilleri	155
Şekil 4.28. Gemsitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonlarının faktöriyel noktalara ait salım profilleri.....	156
Şekil 4.29. Gemsitabin hidroklorür çözeltisi ile pegile nanopartikül, lipozom ve optimum LPHNP formülasyonlarına ait salım profilleri	157
Şekil 4.30. Gemsitabin hidroklorür yüklü nanopartikül formülasyonunun 4°C sıcaklıkta partikül büyüklüğü değişimleri.....	161
Şekil 4.31. Gemsitabin hidroklorür yüklü nanopartikül formülasyonunun 4°C sıcaklıkta % kalan ilaç oranları	161
Şekil 4.32. Gemsitabin hidroklorür yüklü nanopartikül formülasyonunun 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamındaki partikül büyüklüğü değişimleri	163

Şekil	Sayfa
Şekil 4.33. Gemsitabin hidroklorür yüklü nanopartikül formülasyonunun $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ bağıl nem ortamındaki % kalan ilaç oranları	163
Şekil 4.34. Gemsitabin hidroklorür yüklü nanopartikül formülasyonunun $40\pm 2^{\circ}\text{C}/\%75\pm 5$ bağıl nem ortamındaki partikül büyüklüğü değişimleri	165
Şekil 4.35. Gemsitabin hidroklorür yüklü nanopartikül formülasyonunun $40\pm 2^{\circ}\text{C}/\%75\pm 5$ bağıl nem ortamındaki % kalan ilaç oranları	165
Şekil 4.36. Gemsitabin hidroklorür yüklü lipozom formülasyonunun 4°C sıcaklıkta partikül büyüklüğü değişimleri.....	167
Şekil 4.37. Gemsitabin hidroklorür yüklü lipozom formülasyonunun 4°C sıcaklıkta % kalan ilaç oranları	167
Şekil 4.38. Gemsitabin hidroklorür yüklü lipozom formülasyonunun $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ bağıl nem ortamındaki partikül büyüklüğü değişimleri	169
Şekil 4.39. Gemsitabin hidroklorür yüklü lipozom formülasyonunun $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ bağıl nem ortamındaki % kalan ilaç oranları	169
Şekil 4.40. Gemsitabin hidroklorür yüklü lipozom formülasyonunun $40\pm 2^{\circ}\text{C}/\%75\pm 5$ bağıl nem ortamındaki partikül büyüklüğü değişimleri	171
Şekil 4.41. Gemsitabin hidroklorür yüklü lipozom formülasyonunun $40\pm 2^{\circ}\text{C}/\%75\pm 5$ bağıl nem ortamındaki % kalan ilaç oranları	171
Şekil 4.42. Gemsitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonunun 4°C sıcaklıktaki partikül büyüklüğü değişimleri	173
Şekil 4.43. Gemsitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonunun 4°C sıcaklıktaki % kalan ilaç oranları.....	173
Şekil 4.44. Gemsitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonunun $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ bağıl nem ortamındaki partikül büyüklüğü değişimleri	175
Şekil 4.45. Gemsitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonunun $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ ortamındaki % kalan ilaç oranları	175
Şekil 4.46. Gemsitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonunun $40\pm 2^{\circ}\text{C}/\%75\pm 5$ bağıl nem ortamındaki partikül büyüklüğü değişimleri	176
Şekil 4.47. Gemsitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonunun $40\pm 2^{\circ}\text{C}/\%75\pm 5$ bağıl nem ortamındaki % kalan ilaç oranları	177

Şekil	Sayfa
Şekil 4.48. Etkin madde içermeyen lipozom, nanopartikül ve LPHNP formülasyonları ile kontrol grubuna ait MTT testi sonucu elde edilen % canlılık grafikleri	203
Şekil 4.49. Gemsitabin hidroklorür çözeltisi, ticari ürün Gemko® çözeltisi, süspande haldeki gemsitabin hidroklorür yüklü nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanmaları sonucu elde edilen % canlılık bar grafikleri	204
Şekil 4.50. Gemsitabin hidroklorür çözeltisi, ticari ürün Gemko® çözeltisi, süspande haldeki gemsitabin hidroklorür yüklü nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarının MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanmaları sonucu elde edilen % canlılık bar grafikleri.....	205
Şekil 4.51. MCF-7 hücrelerinden elde edilen IC ₅₀ değerleri	206
Şekil 4.52. MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen IC ₅₀ değerleri	206
Şekil 4.53. Kumarin-6 yüklü nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarının gösterdikleri floresan şiddetleri	210
Şekil 4.54. Zamana karşı etkilenen % hücre oranı	210
Şekil 4.55. Hayvanların tedavi süresince ağırlıklarındaki değişimler	211
Şekil 4.56. Hayvan gruplarının tedavi öncesi ve sonrası ağırlık değişimlerinin bar grafikleri.....	212
Şekil 4.57. Hayvanların tedavi süresince tümör hacimlerinin değişimi	213
Şekil 4.58. Tedavi sonrası hayvan gruplarının tümör hacimlerinin istatistiksel değerlendirilmesi	214
Şekil 4.59. Tüm hayvan gruplarının uygulamalar sonrası tümör hacmi değerlerinin tedavi başlangıcına göre istatistiksel açıdan değerlendirilmesi.....	215
Şekil 4.60. Ticari ürün Gemko® uygulanan hayvanlardan elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri.....	219
Şekil 4.61. Gemsitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonu uygulanan hayvanlardan elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri.....	220
Şekil 4.62. Sağlıklı hayvanlardan elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri.....	220

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. MCF-7 hücrelerinin Leica mikroskoptaki faz kontrast görüntüleri ..	97
Resim 3.2. MDA-MB-231 hücrelerinin Leica mikroskoptaki faz kontrast görüntüleri	97
Resim 3.3. Tali Image-Based Cytometer cihazı	98
Resim 3.4. Meme tümörü gelişmiş bir sıçan	99
Resim 3.5. Dijital kumpas kullanarak tümör boyutlarının ölçülmesi	101
Resim 3.6. İntraperitoneal yoldan hayvanlara formülasyonların uygulanması...	102
Resim 3.7. Sıçanların kuyruk veninden kan alınması	103
Resim 4.1. Liyoprotektan içermeyen ve liyoprotektan içeren liyofilize lipozom formülasyonlarına ait görüntü	135
Resim 4.2. Ö-NP5 ve Ö-NP6 formülasyonlarının TEM görüntüleri	182
Resim 4.3. Pegile nanopartikül formülasyonunun stabilite deneyinin başlangıcındaki TEM görüntüleri	183
Resim 4.4. Nanopartikül formülasyonunun 4°C sıcaklıktaki 6 ay, 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamında 6 ay ve 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamında 3 ay saklandıktan sonra çekilen TEM görüntüleri .	184
Resim 4.5. Nanopartikül formülasyonunun 4°C sıcaklıktaki 12 ay, 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamında 12 ay ve 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamında 6 ay saklandıktan sonra çekilen TEM görüntüleri .	185
Resim 4.6. Pegile lipozom formülasyonunun stabilite deneyinin başlangıcındaki TEM görüntüleri	186
Resim 4.7. Lipozom formülasyonunun 4°C sıcaklıktaki 6 ay, 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamında 6 ay ve 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamında 3 ay saklandıktan sonra çekilen TEM görüntüleri	187
Resim 4.8. Lipozom formülasyonunun 4°C sıcaklıktaki 12 ay, 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamında 12 ay ve 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamında 6 ay saklandıktan sonra çekilen TEM görüntüleri	188

Resim	Sayfa
Resim 4.9. Soya fosfatidilkolinin yağlı faza ilavesiyle hazırlanan LPHNP formülasyonuna ve soya fosfatidilkolinin dış sulu faza ilave edilmesiyle hazırlanan LPHNP formülasyona ait TEM görüntüleri	189
Resim 4.10. LPHNP formülasyonunun stabilite deneyinin başlangıcındaki TEM görüntüleri.....	190
Resim 4.11. LPHNP formülasyonunun 4°C sıcaklıktaki 6 ay, 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamında 6 ay ve 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamında 3 ay saklandıktan sonra çekilen TEM görüntüleri	191
Resim 4.12. LPHNP formülasyonunun 4°C sıcaklıktaki 12 ay, 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamında 12 ay ve 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamında 6 ay saklandıktan sonra çekilen TEM görüntüleri.....	192
Resim 4.13. Formülasyonların 4°C sıcaklıktaki saklanmalarının 6 ay sonundaki halleri.....	193
Resim 4.14. Formülasyonların 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamında saklanmalarının 6 ay sonundaki halleri	194
Resim 4.15. Nanopartikül formülasyonuna ait SEM görüntüleri	195
Resim 4.16. Lipozom formülasyonuna ait SEM görüntüleri	196
Resim 4.17. LPHNP formülasyonuna ait SEM görüntüleri.....	197
Resim 4.18. Farklı konsantrasyonlardaki gempitabin hidroklorür çözeltisinin MCF-7 hücrelerine uygulanması sonucu elde edilen görüntüler ..	198
Resim 4.19. Farklı konsantrasyonlardaki Gemko® çözeltisinin MCF-7 hücrelerine uygulanması sonucu elde edilen görüntüler	199
Resim 4.20. Gempitabin hidroklorür içeren nanopartikül formülasyonunun farklı konsantrasyonlarda MCF-7 hücrelerine uygulanması sonucu elde edilen görüntüler	199
Resim 4.21. Gempitabin hidroklorür içeren lipozom formülasyonunun farklı konsantrasyonlarda MCF-7 hücrelerine uygulanması sonucu elde edilen görüntüler	200
Resim 4.22. Gempitabin hidroklorür içeren LPHNP formülasyonunun farklı konsantrasyonlarda MCF-7 hücrelerine uygulanması sonucu elde edilen görüntüler	200
Resim 4.23. Farklı konsantrasyonlardaki gempitabin hidroklorür çözeltisinin MDA-MB-231 hücrelerine uygulanması sonucu elde edilen görüntüler	201

Resim	Sayfa
Resim 4.24. Farklı konsantrasyonlardaki Gemko® çözeltisinin MDA-MB-231 hücrelerine uygulanması sonucu elde edilen görüntüler	201
Resim 4.25. Gemsitabin hidroklorür içeren nanopartikül formülasyonunun farklı konsantrasyonlarda MDA-MB-231 hücrelerine uygulanması sonucu elde edilen görüntüler	202
Resim 4.26. Gemsitabin hidroklorür içeren lipozom formülasyonunun farklı konsantrasyonlarda MDA-MB-231 hücrelerine uygulanması sonucu elde edilen görüntüler	202
Resim 4.27. Gemsitabin hidroklorür içeren LPHNP formülasyonunun farklı konsantrasyonlarda MDA-MB-231 hücrelerine uygulanması sonucu elde edilen görüntüler	203
Resim 4.28. Kumarin-6 çözeltisinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerindeki floresan mikroskobundaki görüntüsü	207
Resim 4.29. Kumarin-6 yüklü nanopartikül formülasyonunun MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerindeki floresan mikroskobundaki görüntüsü	208
Resim 4.30. Kumarin-6 yüklü lipozom formülasyonunun MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerindeki floresan mikroskobundaki görüntüsü	208
Resim 4.31. Kumarin-6 yüklü LPHNP formülasyonunun MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerindeki floresan mikroskobundaki görüntüsü	209
Resim 4.32. Kontrol grubundaki bir hayvanın 30. gün sonundaki görüntüsü....	213
Resim 4.33. Sağlıklı sıçan meme dokusu görüntüsü (x100)	216
Resim 4.34. Sağlıklı sıçan meme dokusu görüntüsü (x200)	216
Resim 4.35. Tedavi uygulanmamış sıçanlarda meme tümörü görüntüsü (x100)	217
Resim 4.36. Tedavi uygulanmamış sıçanlarda meme tümörü görüntüsü (x100)	217
Resim 4.37. LPHNP formülasyonu ile tedavi uygulanan sıçanın meme dokusu görüntüsü (x100).....	218
Resim 4.38. LPHNP formülasyonu ile tedavi uygulanan sıçanın meme dokusu görüntüsü (x40).....	218

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
a	Ağırlık
g	gram
h	Hacim
kDa	Kilodalton
L	Litre
m ²	Metrekare
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm ³	Milimetre küp
nm	Nanometre

Kısaltmalar

Açıklamalar

ACE	Aseton
AIC	Akaike bilgi kriteri
AUC	Eğri altında kalan alan
BSS	Bağıl standart sapma
C _{max}	Maksimum plazma konsantrasyonu
CO ₂	Karbondioksit
DCM	Diklorometan
dk	Dakika
DLS	Dinamik ışık saçılımı

Kısaltmalar**Açıklamalar**

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DoE	Deney tasarımı
DOPC	Dioleil fosfotidilkolin
DPPC	Dipalmitoil fosfotidilkolin
DSC	Diferansiyal taramalı kalorimetri
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EA	Etil asetat
EPR	Artmış geçirgenlik ve tutulum
FBS	Fetal bovin serumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
HER2	Epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
LOD	Duyarlılık sınırı
LOQ	Saptama sınırı
LPHNP	Lipit polimer hibrit nanopartikül
LUV	Tek tabakalı lipozom
MDR	Çoklu ilaç direnci
MLV	Çok tabakalı lipozom
MSC	Model seçme kriteri
NMU	Nitrozo metil üre
ORT	Ortalama
PBS	pH 7,4 fosfat tamponu
PCL	Polikaprolakton
PDI	Polidispersite indeksi
PEG	Polietilen glikol
PGA	Poliglikolik asit
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Poli (laktik-ko-glikolik asit)
PVA	Polivinil alkol
RES	Retiküloendotelyal sistem
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SPC	Soya fosfotidilkolin

Kısaltmalar**Açıklamalar****SS**

Standart sapma

SUV

Tek kabakalı lipozom

 $t_{1/2}$

Yarılanma ömrü

TEM

Transmisyon elektron mikroskobu

 T_m

Faz geçiş sıcaklığı

 t_{max}

Maksimum konsantrasyona ulaşma zamanı

UV

Ultraviyole

1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalması ve yayılmasıyla oluşan çağımızın en önemli hastalıklarından biridir. Meme kanseri dünya genelinde kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türüdür. Meme kanseri tedavisinde konvensiyonel kemoterapiye sıklıkla başvurulmaktadır. Fakat bu tedavi yöntemi beraberinde bazı problemleri de getirmektedir. Kullanılan antikanser ajanın kanserli hücreler ile beraber sağlıklı hücreleri de etkilemesi, etkin bir tedavi için yüksek dozda kemoterapötik ajanın uygulanmasının gerekmesi, bunun sonucunda yan etkilerin görülme şiddetini artırması ve gelişen çoklu ilaç direncine (MDR) karşı ilacın etkinliğinde azalma görülmesi konvensiyonel kemoterapi ile tedavideki başlıca sorunlardır. Kanser tedavisinde kullanılan bazı hidrofilik karakterdeki ilaçların vücuttaki enzimsel ataklara karşı dayanıksız olması ve kısa biyolojik yarı ömür göstermeleri bu ilaçlar ile yapılan tedavide sorun yaratmaktadır. Bu problemin önüne geçebilmek için hidrofilik etkin maddelerin nano boyuttaki ilaç taşıyıcı sistemlere yüklenmesi çalışmaları yapılmaktadır.

Nano boyuttaki ilaç taşıyıcı sistemlerin kanser tedavisinde konvensiyonel ilaçlara göre göstermiş oldukları üstünlüklerden en önemlisi artmış geçirgenlik ve tutulum (EPR) etkisidir. Nano boyuttaki ilaç taşıyıcı sistemler, boyutları sayesinde kanser gibi yeni oluşmakta olan dokuları yüksek oranda etkilerken, sağlıklı dokulara daha düşük oranda etki göstermektedir. Bu özellikleri sayesinde kanserli dokulara daha fazla ilaç molekülünün taşınabileceği, sonuçta düşük doz ile etkili bir tedavinin gerçekleşmesiyle yan etkilerin azalacağı düşünülmektedir. Lipozom ve polimerik nanopartiküller nano boyuttaki ilaç taşıyıcı sistemlerin önemli iki sınıfıdır. Lipozomlar polimerik nanopartiküllere göre yüksek biyoyumluluk gösterirken, polimerik nanopartiküller de lipozomlara göre yüksek fiziksel ve kimyasal stabilite göstermektedir. Polimerik nanopartiküller ve lipozomal sistemlerde görülen problemleri ortadan kaldırmak amacıyla polimerik nanopartikül ve lipozomların bir arada olduğu, her iki taşıyıcı sistemin avantajlarını gösteren yeni bir taşıyıcı sistem olan lipit polimer hibrit nanopartikül (LPHNP) ilaç taşıyıcı sistemler son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. LPHNP ilaç taşıyıcı sistemler, polimerik çekirdek ile lipit tabakanın elektrostatik etkileşim, hidrofobik etkileşim veya Van der Waals bağları

ile birleşmeleri sonucu oluşan sistemlerdir. LPHNP ilaç taşıyıcı sistemin en önemli avantajları yükleme kapasitesinin yüksek olması, raf ömrü ve dolaşım sistemindeki stabiliteyi artırması, kontrollü salım özelliği göstermesi, yüksek biyoyumluluk ve biyoyararlanım göstermesi ve partikül boyutuna bağlı olarak pasif hedeflemeye olanak sağlamasıdır.

Tez çalışmasında meme kanseri tedavisinde kullanılan bir etkin madde olan gemitabin hidroklorür kullanılmıştır. Gemitabin hidroklorür, suda çözünürlüğü yüksek olan bir ön ilaç olup Türkiye ilaç piyasasında intravenöz çözelti formülasyonu (Gemko®) bulunmaktadır. Gemitabin hidroklorür intravenöz uygulama sonrası yüksek oranda ve hızla enzimatik bozulmaya uğrayarak inaktif metabolitine dönüşmektedir. Bu durum etkili bir tedavinin görülebilmesi için yüksek dozda kullanılmasını veya diğer kemoterapötik ajanlarla kombine halde uygulanmasını gerektirmektedir. Günümüzde çalışmalar gemitabin hidroklorürün tedavideki bu problemlerini azaltabilecek ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi üzerine yapılmaktadır.

Bu kapsamda tez çalışmasında; hücre içine kadar girebilen, pasif hedeflemenin gerçekleşebilmesi için uygun boyutlara sahip, gemitabin hidroklorürün lipozom ve polimerik nanopartikül formülasyonuna göre yüksek oranda yüklenebildiği, fiziksel ve kimyasal açıdan stabil aynı zamanda in vivo etkinlik açısından meme kanseri tedavisinde kombine tedaviye gerek kalmadan ticari ürün Gemko®'ya göre düşük dozda etkin bir tedavinin görüldüğü, vücutta kalış süresi uzun ve antikanser etkinliği yüksek bir LPHNP formülasyonunun geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmayla beraber gemitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonunun meme kanseri tedavisi üzerindeki etkisi ilk kez incelenecek ve ticari ürünle karşılaştırılacaktır. Hidrofilik özellikteki gemitabin hidroklorür yüklü lipozom, polimerik nanopartikül ve LPHNP formülasyonlarının geliştirilmesinin ve enkapsülasyon etkinliği ve partikül büyüklüğü açısından optimize edilmesinin literatüre katkı sağlaması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Çağımızın en önemli hastalıklarından biri olan kanser, vücut hücrelerinin kontrolsüz şekilde çoğalması ve yayılmasıyla oluşmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün raporuna göre kanser vakalarının sayısı geçtiğimiz 30 yıl içerisinde iki kattan daha fazla artmıştır. 2012 yılında 14 milyon yeni kanser vakasının teşhis edildiği ve 2015 yılında kanserden kaynaklanan 8,8 milyon ölümün gerçekleştiği bildirilmektedir (Dünya Sağlık Örgütü, 2017). 2030 yılında 20,3 milyon yeni kanser vakası görülmesinin beklendiği ve bunların 13,2 milyonunun ölümle sonuçlanabileceği tahmin edilmektedir (Bray ve diğerleri, 2012). Kanser görülme sıklığının ve kansere bağlı ölümlerin her geçen gün artması, kanseri önemli bir halk sağlığı sorunu haline getirmektedir. Günümüzde yüze yakın kanser türü olduğu bilinmektedir. Kanser tedavisinde hormon tedavisi, immünoterapi, kemoterapi, cerrahi tedavi, radyoterapi gibi çeşitli yöntemler tek başlarına veya kombine halde kullanılmaktadır. Meme kanseri kadınlarda görülen kanser tipleri arasında birinci sırada yer almaktadır. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu verilerine göre ülkemizde erkeklerde görülen ilk üç kanser türü sırasıyla akciğer, prostat ve kolorektal kanseri iken, kadınlarda görülen ilk üç kanser türü sırasıyla meme, tiroid ve kolorektal kanseri olarak açıklanmıştır (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2016). Amerika Birleşik Devletleri'nde 2017 yılında yeni belirlenen kanser vakaları incelendiğinde en çok görülen kanser türlerinin erkeklerde prostat, akciğer ve kolorektal kanseri; kadınlarda ise meme, akciğer ve kolorektal kanseri olacağı tahmin edilmektedir (Siegel ve diğerleri, 2017).

2.1.1. Meme kanseri

Meme kanseri günümüzde kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. Kadınlarda kansere bağlı ölümler incelendiğinde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada gelmektedir. Ulusal Meme Kanseri Vakfı (NBCF)'nın verilerine göre her 8 kadından bir tanesine hayatının bir bölümünde meme kanseri teşhisi konulmaktadır (National Breast Cancer Foundation, 2017). Meme kanseri teşhisi genellikle mamogram ile röntgen çekilerek yapılmaktadır. Mamogram meme kanserinin erken teşhisinde

büyük önem taşımaktadır. Yaşları 50-69 arası olan kadınlara her yıl mamogram ile kontrol yapılmasının meme kanserinden meydana gelen ölümleri % 30 oranında azalttığı belirtilmektedir (Kerlikowske, 1997).

Meme kanserinden meydana gelen ölümlerin ana nedeni, kanserli hücrelerin metastaza uğrayıp başka doku ve organları etkilemesidir (Weigelt ve diğerleri, 2005). Erken teşhis metastazı engellemek ve meydana gelen ölümlerin önüne geçebilmek için çok önemlidir. Kanser hücreleri kan dolaşımı sistemi veya lenfatik yola katılarak başka doku ve organlara gidebilir (Scully ve diğerleri, 2012). Yayılma çoğunlukla kanser hücrelerinin torasik kanal gibi lenfatik yolların kan ile bulunduğu yerlerden dolaşıma geçmesiyle meydana gelmektedir (Wong ve Hynes, 2006). Başlangıçta süt aktaran kanal sistemi (duktus) içinde sınırlı olan kanser hücreleri, sonradan kendi bazal membranlarından ilerleyip bağ dokusu içine geçebilmektedir. Bu aşamada tümör hücreleri kan damarları ve lenfatiklerle karışarak metastaz yapma yeteneğine sahip olurlar (Aydıntuğ, 2004).

2.1.2. Meme kanseri tedavi yöntemleri

Günümüzde meme kanseri tedavisinde en çok uygulanan yöntemler cerrahi (memenin kısmen veya tamamının alınması), kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisi ve immünoterapidir.

Cerrahi tedavi

Meme kanserinde cerrahi en sık uygulanan tedavi yöntemi olup, hastalığın lokal olarak kontrol altına alınması amacıyla gerçekleştirilmektedir. Günümüzde meme kanserinin tedavisinde, daha az radikal işlemler uygulanmakta olup genellikle meme koruyucu cerrahi tercih edilmektedir. Meme koruyucu cerrahi radyoterapi ile birlikte uygulanmaktadır ve kanserin bulunduğu doku ile birlikte çevresinde yeterli miktarda sağlıklı dokunun alınması ile yapılan cerrahi girişimdir. Cerrahi tedavi sayesinde;

- Primer tümörün alınmasıyla yeni metastazlar önlenabilir,
- Nekrotik tümör dokusunun uzaklaştırılması ile kemoterapinin etkinliği artırılabilir (Kamalı Polat ve Soran, 2010).

Hormon tedavisi

Meme kanserinin oluşumunda, kadınlık hormonları östrojen ve progesteronun etkili olduğu bilinmektedir. Meme kanseri hastalarının bazılarında kanser hücreleri üzerinde östrojen ve progesteron hormonlarının reseptörleri bulunmaktadır. Meme dokusu hücrelerindeki reseptörlerine bağlanan hormonlar hücre proliferasyonunu hızlandırır, artmış proliferasyon hızı DNA onarımı için gerekli olan süreci kısaltarak karsinogenezin başlamasına neden olur. Tüm meme kanserlerinde hormon reseptör pozitiflik % 75 civarında görülmektedir. Hormon tedavisinde aromataz inhibitörleri ve reseptör antagonistleri kullanılmaktadır. Aromataz inhibitörleri (formestane, aminoglutelimid, letrozole) östrojen sentezini inhibe edip plazma östrojen seviyesinin düşük kalmasını sağlarken (Karahan ve Kelicen, 2011), tamoksifen, raloksifen gibi selektif östrojen reseptör modülatörleri östrojen reseptörlerine yarışmalı olarak bağlanarak östrojenin reseptörlere bağlanmasını engellemektedir (An, 2016).

İmmünoterapi

Kanser tedavisinde immünoterapi, immün sistemin çeşitli yöntemlerle aktive edilmesidir. Bu tedavideki amaç immün sistemin kanser hücrelerini hedef alarak yok etmesini sağlamaktır. Tedavi daha çok monoklonal antikorların kullanılmasıyla gerçekleştirilmektedir. HER2 (Epidermal büyüme faktörü reseptörü 2) bir büyüme faktörü olarak meme kanserlerinin %25-30'unda çok yüksek oranda eksprese edilmektedir. Bu tip hastalarda HER2 nin inhibisyonuna yönelik tedavi uygulanması oldukça uygun bir yaklaşımdır (Ladjemi ve diğerleri, 2010). Trastuzumab ve pertuzumab bu tedavi yönteminde kullanılan etkin maddelere örnektir.

Kemoterapi

Kanser tedavisinde kemoterapi hastanın normal hücrelerine zarar vermeden tümör hücrelerinin büyümesini, çoğalmasını ve yayılmasını engellemek için antikanser ilaçlar ile yapılan tedavidir. Kemoterapötik ilaçlar genellikle kanser hücreleri üzerine sitotoksik etki göstermektedir. Kemoterapötik ajanlar sitotoksik etkilerinin yanı sıra anjiogenezisin baskılanması ve programlı hücre ölümü (apoptozis) uyarılmasıyla da

etkinlik gösterebilirler (Salter ve Miller, 2007). Kemoterapi tedavisi tek başına uygulanabildiği gibi hormon tedavisi ve immunoterapi ile birlikte de uygulanabilir. Pek çok antikanser ilaç tek başına ya da kombine halde meme kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. Meme kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan etkin madde ve ticari ürünler Çizelge 2.1’de gösterilmiştir (Jahanzeb ve diğerleri, 1997; National Cancer Institute, 2017).

Çizelge 2.1. Meme kanseri tedavisinde kullanılan etkin madde ve ticari ürünlerin listesi

Etkin madde	Ürün
Kapesitabin	Xeloda®
Dosetaksel	Taxotere®
Doksorubisin	Myocet®
Mitomisin c	Mitem®
Paklitaksel	Taxol®
Vinkristin	Vincristine®
5-florourasil	Biosyn®
Gemsitabin	Gemzar®
Vinorelbin	Renovel®
Klorambusil	Leurekan®
Mitoksantron	Mitoxantrone®

Konvansiyonel kemoterapide görülen problemler

Konvensiyonel kemoterapötik ilaçlar kanser hücreleri gibi hızla büyüme özelliğine sahip hücreleri öldürebilme yeteneğine sahiptir. Bu ilaçların aynı zamanda sağlıklı hücreleri de etkilemesi tedavide sorun yaratmakta ve yan etkilerin görülmesine neden olmaktadır. Konvensiyonel kemoterapinin uygulanmasında görülen bazı problemler şunlardır (Brigger ve diğerleri, 2002; Giordano ve Jatoi, 2005; Mondal ve diğerleri, 2014):

- Vücutta kanser hücrelerine özgü olmayan dağılım göstermeleri sağlıklı dokularda da yüksek konsantrasyonlarda bulunmalarına sebep olur. Bu durum yan etkilerin fazla görülmesi ile sonuçlanmaktadır. İstenmeyen etkilerin başlıcaları immün sistemin baskılanması, mide bulantısı, saç dökülmesi ve kısırlıktır.
- Düşük molekül ağırlığına sahip kemoterapötik ajanlar vücutta yüksek dağılım göstermekte ve vücuttan hızla atılmaktadırlar. Bu durum terapötik etkinliğin sağlanabilmesi için ilacın yüksek dozlarda uygulanmasını gerektirmektedir. Bu tekrarlanan ve yüksek dozlar yan etkilerin görülme sıklığını ve şiddetini artırmaktadır (Kumari ve diğerleri, 2016).
- Çözünürlüğü düşük olan kemoterapötik ilaçlar agregate olmaya elverişlidir ve intravenöz uygulama sonrası kan dolaşımında emboliye neden olabilmektedir. Bu durum agregasyonun olduğu bölgede toksisitenin görülmesine neden olmaktadır.
- Tümör dokuları arasında görülen yüksek hidrostatik basınç kemoterapötik ajanın tümör dokusu dışına atılmasına neden olabilmektedir. İlaç başarılı bir şekilde tümör dokusuna ulaşsa da kanser hücreleri çoklu ilaç direnci (MDR) gösteriyorsa ilacın etkinliğinde azalma görülebilmektedir.

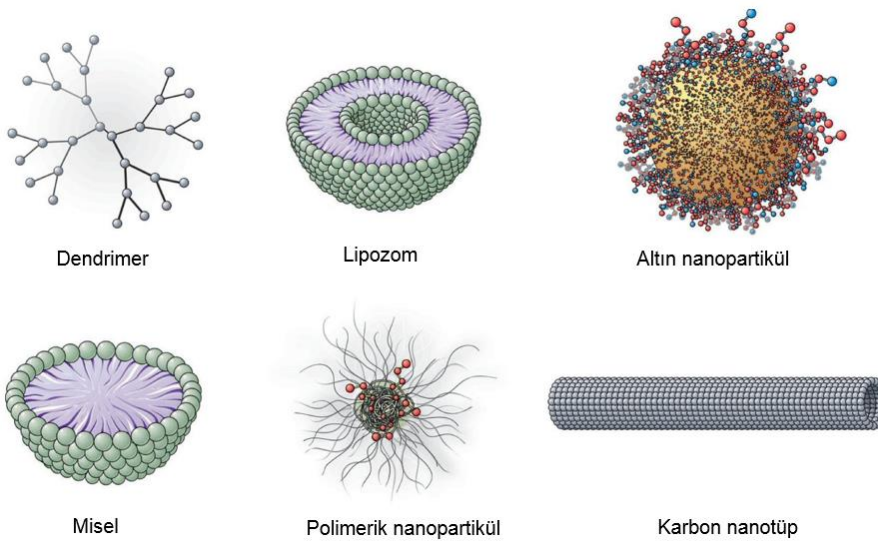
2.2. Nano Boyutlu İlaç Taşıyıcı Sistemler

Günümüzde nanoteknoloji uygulamaları sağlık alanında özellikle hastalıkların teşhis ve tedavisinde getirdiği avantajlarla hızla yaygınlaşmaktadır (Parveen ve diğerleri, 2012). Nanotaşıyıcı sistemler boyutları 10-1000 nm arasında değişen, farklı formları bulunan ve sahip oldukları özelliklerle ilaç taşıyıcı olarak kullanılabilen sistemlerdir. Son yıllarda nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ve uygulanması konusunda pek çok çalışma yapılmaktadır. Nano boyuttaki ilaç taşıyıcı sistemler hedef bölgeye özgü ilaç hedefleme ve taşınması, terapötik etki elde edilirken toksisitenin düşürülmesi ve yüzey modifikasyonuna elverişli olmaları gibi avantajlara sahiptir (De Jong ve Borm, 2008). Ayrıca nano boyuttaki ilaç taşıyıcı sistemler içerdikleri etkin maddeyi biyolojik ortamdaki enzimatik ataklardan korur ve etkin maddenin biyolojik bariyerlerden geçebilmesine yardımcı olur (Masareddy ve diğerleri, 2011). Nanotaşıyıcı sistemler antikanser ilaçlarının yanı sıra gen, peptit-protein ve hormon kökenli pek çok etkin maddenin vücuda verilmesinde de

kullanılmaktadır (Ganta ve diğerleri, 2008; Lim ve diğerleri, 2012). Sıkça kullanılan nano boyuttaki ilaç taşıyıcı sistemler aşağıda sıralanmıştır (Cho ve diğerleri, 2008; Panzarini ve diğerleri, 2013; Vaze, 2016);

- İlaç-polimer konjugatları,
- Polimerik nanopartiküller,
- Lipozomlar,
- Niozomlar,
- Katı lipid nanopartiküller,
- Dendrimerler,
- Miseller,
- Karbon nanotüpler,
- Kuantum noktacıkları,
- Altın nanopartiküller

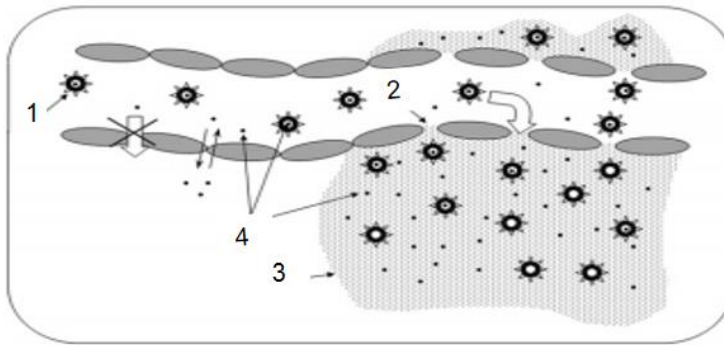
Nanotaşıyıcılar polimerik, lipid, metal ve inorganik nanotaşıyıcılar olmak üzere sınıflandırılır. Polimerik nanotaşıyıcılar polimerik nanopartiküller, polimerik miseller ve dendrimerler olmak üzere ayrılırken, lipozomlar ve katı lipid nanopartiküller lipid nanotaşıyıcılara örnektir. Altın nanopartiküller ve kuantum noktacıkları ise metal ve inorganik naopartikülere örnek olarak verilmektedir (Conniot ve diğerleri, 2014). Nano boyuttaki ilaç taşıyıcı sistemlerin bazıları şematik olarak Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Nanotaşıyıcı sistemlerin şematize gösterimi (van Rijt ve diğerleri, 2014)

Klinik incelemeler, onaylanmış ilaçlar ve literatürler incelendiğinde tüm taşıyıcı sistemler içinde lipozomların ve polimerik nanopartiküllerin en çok kullanılan iki sistem olduğu görülmektedir (Lian ve Ho, 2001; Panyam ve Labhasetwar, 2003; Anselmo ve Mitragotr, 2016).

Son yıllarda antikanser ilaçların lipozom, polimerik naopartikül, dendrimer, misel, altın nanopartikül, silikon nanopartikül, manyetik nanopartikül, fluren ve kohleat gibi nano boyuttaki ilaç taşıyıcı sistemlere yüklenmesiyle elde edilen formülasyonların kanser tedavisindeki etkinliklerinin araştırıldığı çalışmalar önem kazanmıştır. Tüm bu taşıyıcı sistemlerde tedavide başarı elde edebilmek için temel stratejiyi artmış geçirgenlik ve tutunma etkisinin (EPR-enhanced permeation and retention) sağlanması oluşturmaktadır. Tümör çevresinde damarlanma fazla olmakla birlikte zayıf lenfatik dolaşım görülmektedir. Bunun nedeni fonksiyonunu kaybetmiş lenf damarlanması ve çoğalan kanser hücrelerinin lenf damarlarına baskı uygulamasıdır. Bunun sonucunda sıkı bağlanma yerleri (tight junctions) ve endotelial hücrelerle çevrelenmiş normal dokulara kıyasla, kanserli dokularda nano boyuttaki ilaç taşıyıcı sistemler dokular arasındaki sıvılarda yüksek oranda birikebilir. Normal dokulardaki fonksiyonel lenfatik drenaj bu dokularda toksik etkinin çok daha az görülmesini sağlamaktadır (Torchilin, 2011). Şekil 2.2’de nanotaşıyıcı sistemlerde gözlenen EPR etkisi şematize edilmiştir.



Şekil 2.2. Nanotaşıyıcı sistemlerde EPR etkisinin şematize edilmesi (1-İlaç yüklü nanotaşıyıcı sistem 2- Damar yapısının bozulduğu yerden ilaç taşıyıcı sistemin penetre olması 3- Tümörlü bölge 4- Etkin maddenin tümörlü dokuda bölgesel olarak yüksek konsantrasyon oluşturması) (Torchilin, 2007)

Nanotaşıyıcı sistemlerin kanser tedavisinde sağladıkları avantajlar aşağıda belirtilmiştir (Torchilin, 2007; Pérez-Herrero ve Fernández-Medarde, 2015; Kumari ve diğerleri, 2016):

- Nano boyutlarından dolayı kanserli dokuda birikebilmeleri (EPR),
- Konvansiyonel kemoterapötik ilaçlara göre terapötik pencerelerinin daha geniş olması,
- Kontrollü salım göstermeleri sayesinde ilacın kan konsantrasyonunun uzun süre terapötik pencerede kalabilmesi,
- Farklı ilaçların tek bir taşıyıcı sisteme yüklenmesi sayesinde kombine etkinliğin oluşturulabilmesi,
- Yüzey modifikasyonlarına elverişli olmaları sayesinde aktif hedeflemeyi gerçekleştirebilecek ligantların (folat, monoklonal antikolar, transferrin gibi) taşıyıcı sistemlere bağlanabilmesi,
- Kanserli dokularda farklılık gösteren çevre şartlarına (yüzey potansiyeli, ısı ve pH) göre ilacı salan taşıyıcı sistemler hazırlanabilmesi,
- Hedef hücre içine kadar penetrasyon gösterebilmeleri sayesinde etkinliklerinin artması,
- Suda düşük çözünürlüğe sahip antikanser ilaçların nano boyuttaki ilaç taşıyıcı sistemlere yüklenmesiyle çözünürlüklerinin artması, ilacın enzimatik ataklardan korunması

Nanotaşıyıcı sistemlerin boyutunun kanser tedavisinde önemi

Antikanser ilaçların sitotoksik etkilerinden dolayı sağlıklı hücreleri de etkileyebilecekleri düşünüldüğünde kanserli hücelere nanotaşıyıcı sistemler sayesinde pasif hedeflemenin gerçekleştirilmesi oldukça önemlidir.

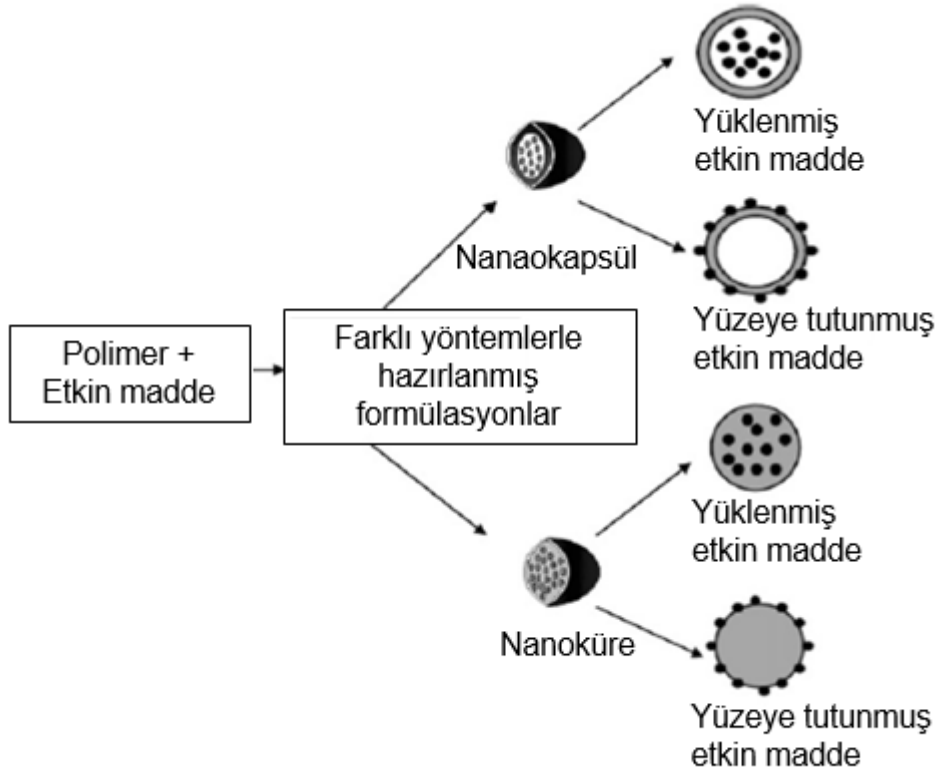
Fagositik hücreler retikuloendotelyal sistemin (RES) ana komponentleridir. Nanotaşıyıcı sistemler kan dolaşımına geçtikten sonra yüzeylerine RES tarafından algılanmalarını sağlayan proteinler non spesifik olarak bağlanabilir. Bu durum nanotaşıyıcı sistemleri fagosit hücreleri tarafından çok daha kolay algılanabilir hale getirir. Kolay algılanabilir hale gelmiş nanopartiküller özellikle karaciğer ve dalakta

bulunan fagosit sistem hücreleri tarafından uzaklaştırılır. Nanotaşıyıcıların boyutu fagosit hücreleri tarafından tanınmada, hepatik filtrasyon, dokulara difüzyon, böbreklerden atılım, dolaşımda kalış süresi ve dağılımı açısından önemli rol oynamaktadır.

Genellikle 20 nm'den küçük boyuta sahip tanecikler böbreklerden atılırken, 50 nm'den küçük tanecikler safra yoluyla klirens uğramaktadır (Sadat ve diğerleri, 2016). Daha büyük tanecikler ise fagosit sistem hücreleri tarafından daha yüksek oranda tutunurlar. Bu tutunmayı engellemek için nanotaşıyıcıların yüzeylerinin modifiye edilmesi önemlidir. Taşıyıcı sistemlerin yüzeylerinin pegile edilmesi ilk geçiş etkisini azalttığı ve dolaşımdaki yarılanma ömrünü uzattığı için sıklıkla tercih edilmektedir (Longmire ve diğerleri, 2008). Pegile edilmiş 100 nm' den küçük tanecikler kanda daha uzun süre kalabilirler ve hepatik filtrasyona daha az uğrarlar. Literatürlerde 100-200 nm boyutundaki nanotaşıyıcı sistemlerin RES'ten kaçmak için ideal oldukları belirlenmiştir (Sadat ve diğerleri, 2016). Kanseri tedavisinde 400 nm'den küçük taneciklerin EPR etkisi sayesinde tümörlü dokuda birikebileceği belirtilmiştir (Bae ve Park, 2011).

2.2.1. Polimerik nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller 10-1000 nm arasında boyutlara sahip (Nagavarma ve diğerleri, 2012) içerdikleri bileşenlere ve hazırlanma yöntemlerine göre nanokapsül ya da nanoküre olarak sınıflandırılan taşıyıcı sistemlerdir (Guterres ve diğerleri, 2007). Nanokapsül formülasyonlarında ilaç polimerik bir membranla çevrelenmişken, nanoküre formülasyonları etkin maddenin partikülün içinde dağıldığı matriks sistemlerdir. Şekil 2.3'de nanokapsül ve nanokürelerin şematize olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Nanokapsül ve nanokürenin şematik gösterimi (Kumari ve diğerleri, 2010)

Polimerik nanopartiküller;

- Vücut içerisinde yüksek stabilite göstermeleri,
- Dolaşım sisteminde kalış sürelerinin uzun olmaları,
- Dokuya yüksek penetrasyon göstermeleri,
- Yüzeylerinin modifikasyona uygun olmaları,
- Kontrol edilebilir salım profilleri gibi özellikleriyle pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmak üzere araştırmaların devam ettiği taşıyıcı sistemlerdir (Wang ve diğerleri, 2008; Natarajan ve Meyyanathan, 2012; Prabhu ve diğerleri, 2015).

Polimerik nanopartiküllere suda çözünürlüğü yüksek ilaçların yüklenmesi aşamasında etkin maddenin dış faza kaçması sonucu düşük enkapsülasyon etkinliği görülmesine neden olmaktadır ve bu durum formülasyon geliştirmede önemli bir problemi oluşturmaktadır (Cohen-Sela ve diğerleri, 2009; Cheow ve Hadinoto, 2011). Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması temelde iki ana sınıfa ayrılmaktadır, uygun olan yöntemin seçimini polimer ve etkin maddenin

fizikokimyasal özelliklerine dayanmaktadır. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında uygulanan yöntemler (Galindo-Rodriguez ve diğerleri, 2004; Rao ve Geckeler, 2011);

1-Monomerlerin polimerizasyonu

- Emülsiyon polimerizasyon
- Yüzeyler arası polimerizasyon
- Dispersiyon polimerizasyon

2-Polimerlerin dispersiyonu

- Tuzla çöktürme
- Çözücü uçurma
- Nanoçöktürme
- Diyaliz
- Süper kritik sıvı teknolojisi olarak sınıflandırılabilir.

Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında çözücü uçurma yöntemi ve nanoçöktürme yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır.

Çözücü uçurma yöntemi

Uygulanan en eski yöntemlerden biridir. Tek emülsiyon çözücü uçurma yöntemi ve çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

Tek emülsiyon çözücü uçurma yöntemi

Bu yöntemde etkin madde ve polimer öncelikle organik çözücü içerisinde çözünür. Etkin maddenin organik fazda çözünebildiği durumlarda tercih edilir dolayısıyla hidrofobik ilaçların hazırlanması için daha uygundur. Organik çözücü olarak diklorometan, kloroform gibi su ile karışmayan çözücüler kullanılabilir. İlaç ve polimerden oluşan organik faz yüzey etkin madde içeren sulu faz ile karıştırılarak emülsüfiye edilir. Organik fazın uzaklaşmasıyla nanopartiküller oluşmaktadır (Khan ve diğerleri, 2016; Kamaly ve diğerleri, 2016).

Çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi

Suda çözünürlüğü yüksek etkin maddeler ile çalışılırken en çok kullanılan yöntemdir (Liu ve diğerleri, 2010). Bu yöntemde etkin madde içeren sulu çözelti polimerin çözündüğü organik çözücüye ilave edilir, karıştırılarak emülsifiye edilir. Böylece yağ içinde su emülsiyonu (S_1/Y) meydana gelir. Oluşan bu primer emülsiyon yüzey etkin maddeyi içeren ikinci bir sulu faza (S_2) ilave edilir ve karıştırılır. Böylece su içinde yağ içinde su emülsiyonu ($S_1/Y/S_2$) oluşturulur. Son aşamada organik çözücü uzaklaştırılarak nanopartiküller elde edilir.

Nanoçöktürme yöntemi

Çözücü yer değiştirme yöntemi olarak da adlandırılır ve lipofilik etkin maddeler için çoğunlukla tercih edilmektedir. Bu yöntem polimerin içinde bulunduğu organik çözücünün sulu faza difüze olmasıyla polimerin çöktürülmesi esasına dayanmaktadır. Polimer ve etkin madde su ile karışabilen organik çözücüler (aseton, asetonitril, etanol) içerisinde çözülür. Bu çözelti manyetik karıştırma ile beraber sürfaktan içeren sulu faza yavaş yavaş ilave edilir. Su ile karışabilen organik çözücünün suya hızla difüze olmasıyla nanopartiküller kendiliğinden oluşur. Organik çözücü uzaklaştırılır (Pal ve diğerleri, 2011; Nagavarma ve diğerleri, 2012).

Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan polimerler

Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında vücut ile uyum gösteren ve toksik olmayan biyoparçalanabilir polimerler tercih edilir. Bu amaçla doğal veya sentetik polimerler kullanılmaktadır (Nagavarma ve diğerleri, 2012; Panta ve diğerleri, 2014; Singh, 2016). Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan doğal polimerler Çizelge 2.2’de (Muhamad ve diğerleri, 2014; Panta ve diğerleri, 2014), sentetik polimerler Çizelge 2.3’de (Nagavarma ve diğerleri, 2012) ve kopolimerler Çizelge 2.4’de (Kamaly ve diğerleri, 2016) gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan doğal polimerler

• Kitozan	• Selüloz
• Jelatin	• Karegen
• Sodyum aljinat	• Pektin
• Albümin	• Polisakkarit

Çizelge 2.3. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan sentetik polimerler

• Polilaktik asit (PLA)	• Polikaprolakton (PCL)
• Poliglikolik asit (PGA)	• Poli glutamik asit
• Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)	• Poli malik asit
• Polietilen glikol (PEG)	• Poli metil metakrilat
• Polianhidritler	• Polivinil alkol
• Poli etilen oksit	• Poli orto esterler

Çizelge 2.4. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan kopolimerler

• Polilaktik asit- polietilen glikol (PLA-PEG)
• Polilaktik-ko-glikolik asit-polietilen glikol (PLGA-PEG)
• Polikaprolakton-polietilen glikol (PCL-PEG)

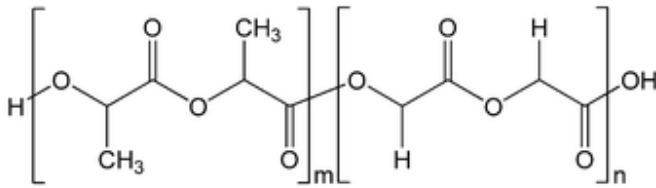
Doğal polimerler ve sentetik polimerler yüksek biyouyumluluk gösterirken, doğal polimerlerin biyoparçalanabilirliklerinin daha yüksek ve daha az toksik olduğu bilinmektedir (Muhamad ve diğerleri, 2014). Doğal polimerlerde elde edildiği kaynaklardaki farklılıklardan dolayı seriler arası fark gözlenebilirken, mikroorganizma üremesine de sentetik polimerlere göre daha uygundurlar (Singh, 2016).

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)'den onay alan polimerlere albümin, polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA), poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), polietilen glikol

(PEG) ve poli metil metakrilat örnek verilebilir (Marin ve diğerleri, 2013; Jiang ve Stenzel, 2016).

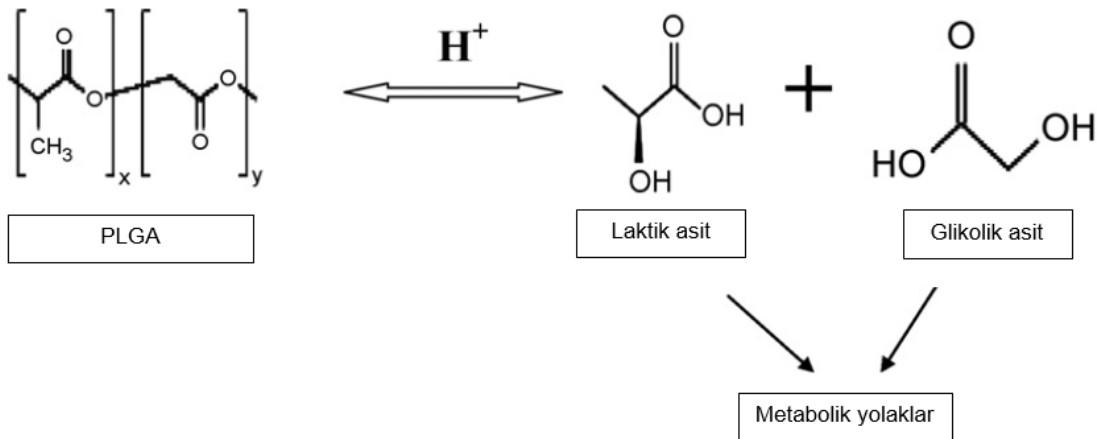
Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)

PLGA, polilaktik asit (PLA) ve poliglikolik asit (PGA) kopolimeri olan bir poliesterdir (Şekil 2.4). PLGA, genellikle eşit oranda D- ve L- laktik asit formlarını içeren poli D,L-laktik-ko-glikolik asit yapısındadır.



Şekil 2.4. PLGA'nın yapısı (m: laktik asit ünitelerinin sayısı, n: glikolik asit ünitelerinin sayısı) (Taluja ve diğerleri, 2007)

PLGA pek çok çalışmada küçük moleküllerin, hormonların, antienflamatuar ilaçların, antibiyotik, antikanser, peptit ve proteinlerin taşınmasında kullanılmaktadır (Hines ve Kaplan, 2013). Vücuda alındığında hidrolize uğrar ve biyoparçalanabilir özellik gösteren laktik asit ve glikolik asite dönüşür. PLGA bu dönüşümler sonucu metabolik yollarla vücuttan atılır. Şekil 2.5'de PLGA'nın hidrolizi sonucu oluşan ürünler gösterilmiştir.



Şekil 2.5. PLGA'nın hidrolizi sonucu oluşan ürünler (Kumari ve diğerleri, 2010)

PLA PGA'ya göre çok daha hidrofobik karakterdedir ve PLGA içerisinde PLA oranı arttıkça polimer daha hidrofobik hale gelir ve suyu daha az absorbe eder. Bu durum polimerin daha yavaş parçalanmasına ve etkin maddeyi daha yavaş salmasına neden olur. (Makadia ve Siegel, 2011).

PLGA'nın parçalanma ürünleri olan PLA ve PGA kan dolaşımında Krebs döngüsüyle kolayca metabolize olabilir. Laktik asit ve glikolik asit karbondioksit parçalanarak veya su ile beraber idrarla vücuttan atılır (Sinha ve Trehan, 2003). Bu durum PLGA'nın ilaç taşıyıcı olarak kullanılmasında minimum sistemik toksisite oluşturmasını sağlamaktadır.

PLGA polimeri yüzey modifikasyonuna elverişli olması, organ ya da hücrelere hedeflenmede kullanılması ve kontrollü salımın sağlanması gibi özelliklere sahiptir. PLGA'dan oluşan nanopartiküllerin hazırlanmasında emülsifikasyon difüzyon (Kwon ve diğerleri, 2001), emülsiyon çözücü uçurma yöntemi (Mainardes ve Evangelista, 2005) ve nanoçöktürme (Govender ve diğerleri, 1999) yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır.

Piyasada farklı molekül ağırlıklarında ve kopolimer bileşenlerinden oluşan PLGA çeşitleri bulunmaktadır. Kopolimer oranına ve molekül ağırlıklarına bağlı olarak polimerin parçalanma süresi birkaç aydan birkaç yıla kadar değişiklik göstermektedir. PLGA genellikle içerdiği laktik asit/glikolik asit oranlarına göre tanımlanmaktadır. Örneğin PLGA (50:50) kopolimer içeriğinin % 50'sini polilaktik asit % 50'sini poliglikolik asit oluşturmaktadır. Kopolimer oranı ve molekül ağırlığı elde edilecek taşıyıcı sistemin karakterizasyonu belirler. Molekül ağırlığı arttıkça elde edilecek partikülün boyutu da artmaktadır. Yüksek molekül ağırlığına sahip PLGA'ların yüksek vizkoziteye de sahip olmaları nedeniyle küçük partikül büyüklüğüne sahip emülsiyon damlacıklarının elde edilmesi zordur (Mittal ve diğerleri, 2007). PLGA'nın terminal grubunun asit veya ester olması da polimerin karakterini etkilemektedir. Asit terminal gruba sahip olanlar içerdikleri serbest karboksil grubundan dolayı daha hidrofilik karakter gösterirken, ester terminal gruba sahip olanlar daha hidrofobik özellik göstermektedir (Yerlikaya ve diğerleri, 2013). Bu durum polimerin parçalanmasını da etkilemektedir. Asit terminal gruba sahip olanlar sulu ortamda hızla şişer ve PLGA'nın parçalanması daha hızlı gerçekleşir

(Wischke ve Schwendeman, 2008). PLGA kullanılarak hazırlanan bazı ilaçlar ve içerdikleri etkin maddeler Çizelge 2.5’de gösterilmiştir (Mundargi ve diğerleri, 2008).

Çizelge 2.5. Piyasadaki PLGA içeren ilaçlara örnekler

Etkin madde	Ürün adı	Kullanım alanı
Leuprolit asetat	Lupron Depot®	Prostat kanseri
Somatropin	Nutropin Depot®	Büyüme hormonu eksikliği
Buserelin	Suprecur® MP	Prostat kanseri
Triptorelin asetat	Decapeptyl®	Prostat kanseri
Oktreotid	Sandostatin LAR® Depot	Akromegali
Risperidon	Risperidal® Consta™	Antipsikotik

Polimerik nanopartiküllerle yapılan çalışmalar

Yapılan bir çalışmada gemitabin hidroklorür yüklü PLGA nanopartikülleri oral yoldan uygulanmak üzere hazırlanmıştır. K562 lösemi hücreleri ile yapılan sitotoksisite çalışmalarında nanopartikül formülasyonunun tüm konsantrasyonlarda çözelti haline göre daha etkili olduğu belirlenmiştir. Sıçanlara oral yoldan uygulama sonucu yapılan farmakokinetik çalışmada ise nanopartikül formülasyonunun çözelti haline göre yarı ömrü 3 kat, eğri altında kalan alanlar incelendiğinde ise nanopatikül formülasyonun çözelti haline göre 21 kat daha yüksek biyoyararlanım gösterdiği bulunmuştur (Joshi ve diğerleri, 2014).

Ahmed ve ark.’nın yaptığı bir çalışmada atorvastatin yüklü kitozan nanopartikülleri hazırlanmıştır. Hazırlanan nanopartiküller tablet şeklindeki ticari ürün Atorva® ile etkinliklerini karşılaştırmak için aynı dozda tavşanlara oral yoldan verilmiştir. Ticari ürünün C_{max} değeri 103,3 µg/mL iken, kitozan nanopartikül formülasyonunun C_{max} değeri 219,78 µg/mL olarak bulunmuştur. Eğri altında kalan alanlar kıyaslandığında

kitozan nanopartikülü formülasyonu ticari ürüne göre yaklaşık 2,2 katlık bir artış meydana getirmiştir (Ahmed ve diğerleri, 2015).

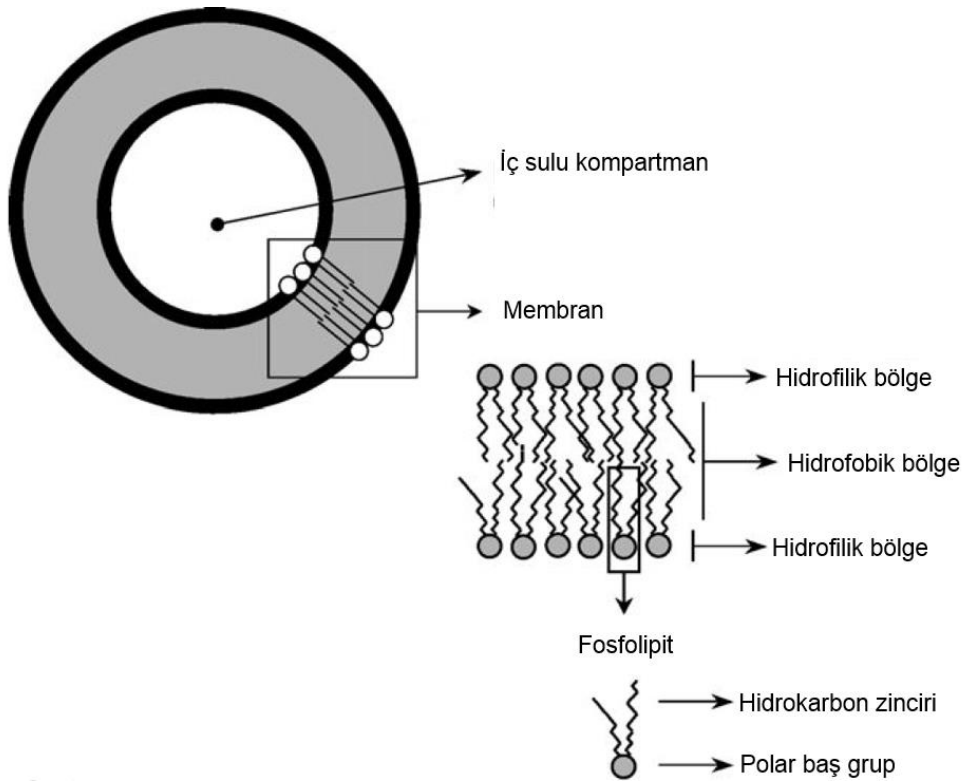
Bir diğer çalışmada Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan donepezil yüklü PLGA nanopartikülleri hazırlanarak donepezilin çözelti ve nanopartikül formülasyonu intravenöz yoldan sıçanlara uygulanmıştır. Sıçanların beyinlerinde çözelti hali ortalama 6,66 ng/mL C_{max} değerine ulaşırken, nanopartikül formülasyonu ortalama 121,68 ng/mL değere ulaşmıştır. Beyinde gözlemlenen konsantrasyondan hareketle hesaplanan eğri altında kalan alanlar (AUC) incelendiğinde çözelti hali 434,877 ng*saat/mL değere ulaşırken nanopartikül formülasyonu çok daha yüksek konsantrasyonlara ulaşarak 6583,36 ng*saat/mL değere ulaşmıştır. Benzer sonuçlar plazma verilerinden de elde edilmiş ve nanopartikül formülasyonunun çözelti haline göre daha yüksek C_{max} ve AUC değerleri oluşturduğu bulunmuştur (Md ve diğerleri, 2014).

Bir başka çalışmada hidrofobik karakterdeki östrodiol içeren PLGA nanopartikülleri hazırlanmıştır. Formülasyonların hazırlanmasında farklı molekül ağırlığına ve kopolimer içeriğine sahip PLGA'lar kullanılmıştır. Molekül ağırlığı arttıkça partikül boyutunun arttığı, laktik asit/glikolik asit oranının artmasının ise artan hidrofobik yapıya bağlı olarak daha yüksek enkapsülasyon etkinliği elde edilmesini sağladığı belirtilmiştir. Sprague Dawley cinsi sıçanlarla yapılan farmakokinetik çalışmalarda molekül ağırlığının ve laktik asit/glikolik asit oranının artmasıyla uzatılmış salım profili elde edilmiştir (Mittal ve diğerleri, 2007).

Bir diğer çalışmada çeşitli organik çözücüler kullanılarak kanser tedavisinde kullanılan kostunolid etkin maddesi yüklü PLGA nanopartikülleri hazırlanmıştır. Organik çözücü olarak diklorometan, asetonitril ve aseton kullanılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda kullanılan organik çözücünün partikül boyutunu etkilediği, su ile karışabilme özelliği gösteren aseton kullanılarak hazırlanan formülasyonun başarılı şekilde hazırlanamadığı belirtilmiştir (Vineeth ve diğerleri, 2014).

2.2.2. Lipozomlar

Lipozomlar sulu bir çekirdeğin etrafında bir ya da daha fazla fosfolipit çift tabakasından oluşan küresel taşıyıcılardır. Lipozomların sahip oldukları esnek fizikokimyasal özellikler etkileyici bir ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmalarına imkan tanımaktadır (Sercombe ve diğerleri, 2015). Lipozomlar fosfolipit küreler olarak da tanımlanmaktadır. Fosfolipitler amfifilik yapıda olup yapılarındaki açıl zincirlerinin hidrofobik etkileriyle sulu çözeltiyi bir kabuk gibi sarabilmektedir. Keşfedildiği yıllarda biyolojik membrana benzerlikleri ile ilgili çalışmalarda kullanılmış olan lipozomlar, günümüzde kozmetik alanında (Rahimpour ve Hamishehkar, 2012), kanser hastalıklarının tedavisi de dahil farklı hastalıkların teşhis ve tedavisinde (James ve diğerleri, 1994) kullanılmaktadır. Lipozomların yapısının şematik hali Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Lipozomların yapısının şematik gösterimi (Frézard ve diğerleri, 2007)

Lipozom ilaç taşıyıcı sistemlerin getirdiği avantajlar şu şekilde sıralanabilir (Immordino ve diğerleri, 2006; Daraee ve diğerleri, 2016):

- Taşıyıcı sisteme hem hidrofilik hem hidrofobik ilaçların aynı anda yüklenebilmesi,
- Yüklenen ilacın çözünürlüğünün artması (Pattni ve diğerleri, 2015),
- Aktif hedeflendirilmeye ve yüzey modifikasyonuna elverişli olmaları,
- Toksik olmamaları,
- Vücut ile yüksek biyouyumluluk göstermeleri,
- Sistemik ya da sistemik olmayan uygulamalarda immunojenite göstermemeleridir.

Hidrofilik karakterdeki etkin maddelerin lipozomlara yüklenmesi formülasyon geliştirmede sorun yaratmaktadır (Xu ve diğerleri, 2012). Ayrıca dolaşım sisteminde stabilitelerinin düşük olması, yüklenilen etkin maddenin saklama koşullarında sızması, kolaylıkla oksidasyona ve hidrolize uğramaları gibi problemler de görülmektedir (Sharma ve Sharma, 1997; Daraee ve diğerleri, 2016). Lipozom hazırlanmasında kullanılan fosfolipitlerin pahalı olması ise bu taşıyıcı sistemlerin diğer dezavantajlarıdır (Akbarzadeh ve diğerleri, 2013). Piyasada bulunan lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlere örnekler ve içerdikleri etkin maddeler Çizelge 2.6'da gösterilmiştir (Chang ve Yeh, 2012; Pattni ve diğerleri, 2015).

Çizelge 2.6. Piyasadaki lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlere örnekler

Etkin madde	Ürün adı
Doksorubisin	Doxil [®] , DaunoXome [®] , Lipodox [®] , Caelyx [®]
Vinkristin sülfat	Marqibo [®]
Amfoterisin B	Ambisome [®] , Abelcet [®] , Amphotec [®]
Sitarabin	DepoCyte [®]
Verteporfin	Visudyne [®]
Morfin sülfat	DepoDur [®]
Hepatit A antijeni virüsü	Exapal [®]

Onay almış lipozomal ilaç taşıyıcı sistemler incelendiğinde daha çok intravenöz uygulama için kullanıldıkları görülmektedir. Oral yol, gastrointestinal sistemde lipidlerin hızla parçalanması sonucu biyoyararlanımlarının düşük olmasından dolayı çok fazla tercih edilmemektedir. Göze ve transdermal uygulanan lipozom ilaç şekilleri de bulunmaktadır (Hsin-I ve Ming-Kung, 2012).

Lipozomların hazırlanmasında beş farklı gruptaki fosfolipitler kullanılmaktadır (Daraee ve diğerleri, 2016):

1. Doğal kaynaklardan elde edilen fosfolipitler
2. Doğal kaynaklardan elde edilip modifiye edilen fosfolipitler
3. Yarı sentetik fosfolipitler
4. Sentetik fosfolipitler
5. Doğal olmayan baş gruplara sahip olan fosfolipitler

Doğal kaynaklardan elde edilen fosfolipitler bitkilerden ve hayvanlardan elde edilebilmektedir. Bitkisel kaynaklara yumurta, soya, buğday tohumu ve ayçiçek tohumu; hayvansal kaynaklara ise süt, soya ve karides örnek verilebilir (Hoogevest ve Wendel, 2014). Doğal kaynaklardan elde edilen fosfolipitler sentetik ve yarı sentetik fosfolipitlere göre fiyatlarının uygun olmasından dolayı farmasötik endüstride sıklıkla tercih edilmektedir. Farmasötik endüstride kullanılan fosfolipitler Çizelge 2.7’de gösterilmiştir (Li ve diğerleri, 2015).

Çizelge 2.7. Farmasötik endüstride kullanılan fosfolipitler

• Fosfotidilkolin	• Fosfotidilinositol
• Fosfotidiletanolamin	• Fosfotidilgliserol
• Fosfotidilserin	• Kardiolipin
• Fosfotidik asit	

Lipozomlar negatif yüklü, pozitif yüklü veya nötr olabilir. Lipozom formülasyonu içeriğine oleik asit ilavesi lipozomun negatif yüklenmesini, dioleil trimetilamonyum propan (DOTAP) ilavesi lipozomun pozitif yüklenmesini sağlamaktadır. Pozitif veya

negatif yüzey yüküne sahip lipozomlar kolayca agrege olmazlar ve saklama koşullarında nötr hallerine göre daha stabildir. Özellikle gen tedavisine yönelik çalışmalarda katyonik lipozomlar sıklıkla kullanılmaktadır (Shim ve diğerleri, 2013). Kolesterol de lipozom formülasyonuna giren bir diğer önemli bileşendir. Kolesterol lipozomun stabilitesini artırır ve yüklenmiş ilacın salımını yavaşlatır (Tabandeh ve diğerleri, 2013).

Lipozomları oluşturan lipitlerin faz geçiş sıcaklıkları (T_m) bir diğer önemli parametredir. Lipitler faz geçiş sıcaklığının altında jel halindeyken, bu sıcaklığın üzerindeki ortamlarda sıvı haldedir. Lipitler faz geçiş sıcaklığının üzerinde su ve etkin madde geçişine daha elverişlidir. Lipozomlara yüklenmiş etkin maddenin dışarıya çıkmaması ve formülasyonun stabil kalması için lipozomlar faz geçiş sıcaklığının altında bir sıcaklıkta saklanmalıdır (Pattni ve diğerleri, 2015).

Lipozomlar fonksiyonlarına, tabaka sayısı ve büyüklüğüne göre sınıflandırılmaktadır.

Lipozomlar fonksiyonlarına göre (Bibi ve diğerleri, 2012; Sercombe ve diğerleri, 2015);

- Konvansiyonel lipozomlar
- Stealth lipozomlar
- Ligand hedeflenmiş lipozomlar
- Dış uyaranlarla salımı tetiklenen lipozomlar olmak üzere sınıflandırılır.

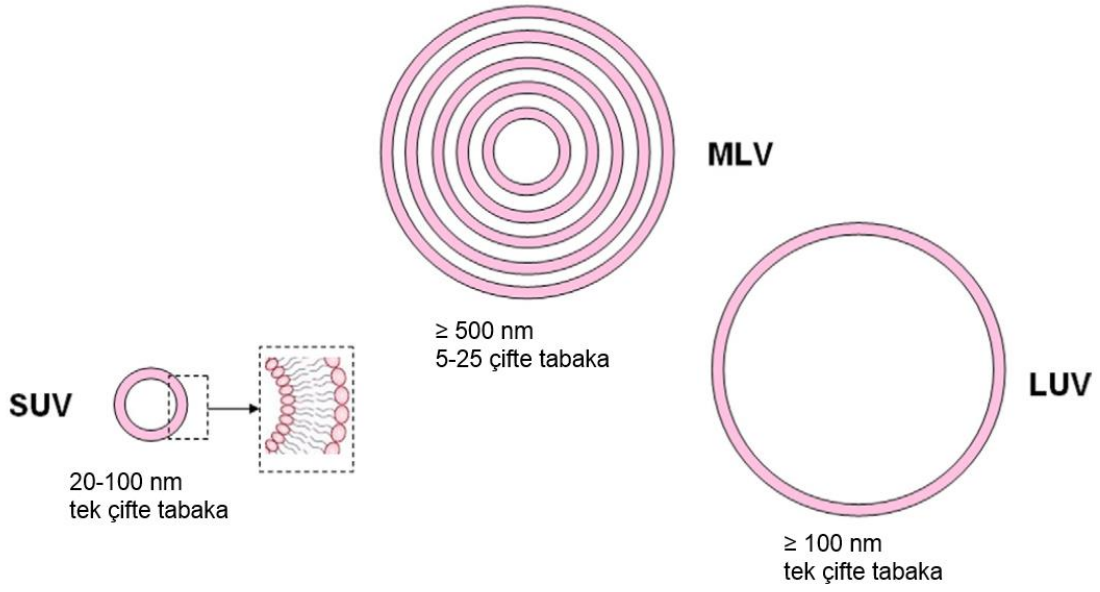
İlk geliştirilen, birinci jenerasyon lipozomlar konvansiyonel (klasik) lipozomlardır. Yapılarında anyonik, katyonik, nötr fosfolipitler ve kolesterol bulunur. Konvansiyonel lipozomlar özellikle karaciğer ve dalakta bulunan RES hücreleri tarafından hızlı klirens uğrar ve dolaşım sisteminden uzaklaştırılır. Bu durum lipozomların özellikle hedef bölgeye gitmesini engellemekte ve RES hücrelerin fazla olduğu organlarda toksik etkinin görülmesine neden olabilmektedir (Allen ve Cullis, 2013).

Lipozomların daha uzun süre dolaşım sisteminde kalabilmesi için Stealth lipozomlar geliştirilmiştir. Stealth lipozomların yüzeyleri hidrofilik polimerler ile kaplanmıştır, plazma proteinlerinden daha az etkilenirler ve bu sayede dolaşımda daha uzun süre

kalabilirler. Lipozomların Stealth özellik kazanması için en çok kullanılan polimer PEG'tir. PEG haricinde modifiye edilmiş veya edilmemiş dekstran, poliamino asit, pullulan ve ganglioitler de lipozomlara Stealth özellik kazandırmak için kullanılmaktadır (Nag ve Awasthi, 2013).

Ligand hedeflenmiş lipozomlar bir hücre ya da organa hedeflendirilmiş lipozomlardır. Bu amaçla monoklonal antikolar, antijenler, nükleik asitler, protein/peptitler ve karbonhidratlar kullanılmaktadır (Bertrand ve diğerleri, 2014). Ligand hedeflenmiş lipozomlar ile yapılan çalışmalar özellikle kanser tedavisi üzerinde yoğunlaşmıştır (Noble ve diğerleri, 2014).

Lipozomun boyutu dolaşım sisteminde kalış süresini, hem boyutu hem de tabaka sayısı ise yüklenebilen ilaç miktarını etkilemektedir (Akbarzadeh ve diğerleri, 2013). Lipozomlar tabaka sayısına göre tek tabakalı ve çok tabakalı lipozomlar (MLV) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Tek tabakalı lipozomlar ise kendi içerisinde büyük tek tabakalı lipozomlar (LUV) ve küçük tek tabakalı lipozomlar (SUV) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Sharma ve Sharma, 1997). Küçük tek tabakalı lipozomların partikül boyutu 20-100 nm arasında, büyük tek tabakalı lipozomların 100 nm'den büyük ve çok tabakalı lipozomların ise partikül boyutu 500 nm'den büyüktür (Pattni ve diğerleri, 2015). Tek tabakalı lipozomlarda sulu çekirdeğin etrafı tek bir fosfolipit tabakasından oluşmaktadır. Çok tabakalı lipozomlar ise küçükten büyüğe doğru giden 5-25 tabakadan oluşmaktadır ve tabakalar birbirinden sulu faz ile ayrılmıştır. Şekil 2.7'de tabaka sayısına göre lipozomlar şematize gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Çok tabakalı (MLV), büyük tek tabakalı (LUV) ve küçük tek tabakalı (SUV) lipozomların şematize gösterimi (Yang ve diğerleri, 2011)

Lipozomlar üç farklı ana yöntemle elde edilebilmektedir (Anwekar ve diğerleri, 2011; Wagner ve Vorauer-Uhl, 2010):

1.Mekanik Dispersiyon Yöntemleri

- Lipit film hidrasyon yöntemi
- Membran ekstrüksiyon
- Ultrasonikasyon
- French pres yöntemi
- Dondurup çözme yöntemi
- Mikroemülsiyon

2. Çözücü Dispersiyon Yöntemleri

- Eter enjeksiyon
- Etanol enjeksiyon
- Ters faz uçurma yöntemi
- Çift emülsiyon yöntemi

3. Deterjan Uzaklaştırma Yöntemleri

- Diyaliz yöntemi
- Deterjan uzaklaştırma yöntemi
- Kolon kromatografisi yöntemi
- Seyreltme yöntemi

Bu yöntemler farklı büyüklük ve tabaka sayısına sahip lipozomların hazırlanmasında kullanılabilmektedir. Lipozomların partikül büyüklüğünün ve tabaka sayısının ayarlanabilmesi oldukça önemlidir. Çok tabakalı lipozomların boyutunun ve tabaka sayısının küçültülmesi için French pres yöntemi (Wagner ve Vorauer-Uhl, 2010), sonikasyon (Huang ve diğerleri, 2010) ve ekstrüksiyon (Ong ve diğerleri, 2016) yöntemi kullanılmaktadır. Bu işlemler sonucunda SUV ve LUV elde edilmektedir. Çizelge 2.8’de MLV, SUV ve LUV hazırlamada kullanılan yöntemler gösterilmiştir (Wagner ve Vorauer-Uhl, 2010; Akbarzadeh ve diğerleri, 2013).

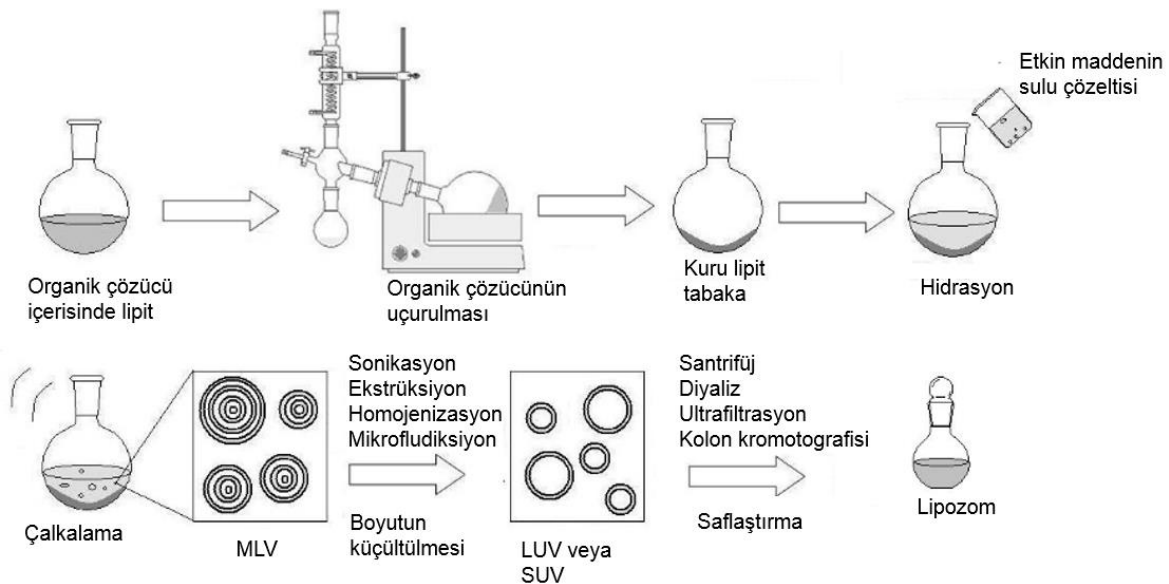
Çizelge 2.8. MLV, SUV ve LUV hazırlamada kullanılan yöntemler

Lipozom tipi	Yöntem
MLV	Lipit film hidrasyon yöntemi, eter enjeksiyon yöntemi, diyaliz yöntemi
SUV	Sonikasyon yöntemi, French pres yöntemi, membran ekstrüksiyon yöntemi, etanol enjeksiyon yöntemi
LUV	Dondurup çözme yöntemi, deterjan diyaliz yöntemi

İlaç ve kozmetik endüstrisinde büyük ölçekli üretimde patentli farklı yöntemler de kullanılmaktadır. Deterjan diyaliz yöntemi ve mikro akışkanlaştırma yöntemi büyük ölçekte üretim yaparken kullanılan tekniklerdir. Deterjan diyaliz yönteminde LIPOPREP® II-CIS (Diachema, İsviçre) sanayide kullanılırken, mikro akışkanlaştırma yönteminde Mikrofluidizer® (Massachusetts, Amerika) kullanılmaktadır (Anwekar ve diğerleri, 2011).

Lipit film hidrasyon yöntemi

Lipit film hidrasyon yöntemi Bangham ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir ve lipozom hazırlanmasında sıkça kullanılan basit bir yöntemdir. Bu yöntemde lipit/lipit karışımı öncelikle organik çözücü içerisinde çözünür. Basınç altında organik çözücü uçurulur ve lipit film elde edilir. Oluşan lipit film tabaka sulu faz ile hidrate edilir, çalkalanır ve lipitler kendiliğinden kapanarak lipozomu meydana getirirler. Şekil 2.8’de lipozom hazırlamak için uygulanan lipit film hidrasyon yöntemi şematize edilmiştir. Bu yöntemle heterojen dağılım gösteren 1 μm ’nin üstünde partikül büyüklüğüne sahip MLV’ler elde edilmektedir (Samad ve diğerleri, 2007). Kullanım amacına göre bu yöntem sonucu elde edilen lipozomların partikül boyutunu küçültmek gerekebilir. Titanyum başlıklarla yapılan sonikasyon bu amaç için sıklıkla kullanılmakta ve etkili sonuçlar alınabilmektedir. Ancak başlıklı sonikasyon yöntemi sırasında sıcaklığın artması, etkin madde ve lipit tabakaların zarar görmesi, düşük enkapsülasyon etkinliği, başlıktan metal kontaminasyonu gibi problemler görülebilmektedir (Pattni ve diğerleri, 2015). Bu yöneme alternatif olarak lipozomun partikül büyüklüğünü küçültmek için su banyosu ile sonikasyon ve polikarbonat membranla ekstrüksiyon yöntemleri de uygulanabilmektedir.



Şekil 2.8. Lipit film hidrasyon yönteminin şematize gösterimi (Lopes ve diğerleri, 2013:95)

Lipozomlar ile yapılan çalışmalar

Yapılan bir çalışmada paklitaksel ve rapamisini tek veya kombine halde içeren lipozomlar hazırlanmış, lipozom formülasyonlarının etkin maddelerin çözelti hallerine göre meme kanseri hücreleri ve meme kanseri modeli geliştirilen BALB/c fareler üzerine etkileri incelenmiştir. Lipit film tabaka yöntemiyle hazırlanan lipozomlarda soya fosfotidilkolin, kolesterol kullanılmış ve formülasyonlar pegile edilmiştir. 4T1 meme kanseri hücrelerinde yapılan sitotoksikite çalışmalarında rapamisin yüklü lipozomlar çözelti haline göre yaklaşık 4,4 kat, paklitaksel içeren lipozomlar da çözelti haline göre yaklaşık 1,4 kat düşük dozda IC₅₀ değerine ulaşıldığı belirtilmiştir. İn vivo hayvan deneylerinde paklitaksel içeren lipozomun çözelti haline göre yaklaşık 1,8 kat tümör büyümesini yavaşlattığı görülmüştür (Eloy ve diğerleri, 2016).

2010 yılında yapılan bir çalışmada gempisabin hidroklorür içeren pegile lipozomlar hazırlanmış ve formülasyonların ticari ürün Gemzar®'a göre tiroit kanseri geliştirilmiş fareler üzerinde etkileri incelenmiştir. Lipozomlar Gemzar®'a göre yaklaşık 10 kat düşük dozda uygulanmasına rağmen tiroit kanseri tedavisinde ticari ürün ile benzer sonuçlar vermiştir. Aynı çalışmada ticari ürünlerdeki gempisabin hidroklorürün yarılanma ömrü 1 saat bulunmuşken lipozom içerisindeki etkin maddenin yarılanma ömrü 8 saat bulunmuş ve eğri altında kalan alanlar kıyaslandığında lipozom formülasyonun yaklaşık 7 katlık bir artış gösterdiği belirtilmiştir (Paolino ve diğerleri, 2010).

Bir diğer çalışmada Herpes Simplex virüsünde etkili olan antiviral etkili distamisin içeren lipozomlar hazırlanmıştır. HSV1 ve HSV2 hücreleri ile yapılan sitotoksikite deneyinde distamisin içeren lipozom formülasyonunun çözelti haline göre daha etkili olduğu bildirilmiştir. Tavşan epidermal hücreleri üzerinde yapılan sitotoksikite çalışmasında ise lipozom formülasyonun çözelti haline göre çok daha az toksik etki gösterdiği bulunmuştur. Tavşanların gözlerine damla halinde aynı dozda uygulanan çözelti ve lipozom formülasyonları üzerinde yapılan farmakokinetik çalışmalar sonucunda lipozom formülasyonun etkin maddenin yarılanma ömrünü uzattığı, eğri altında kalan alanın ise çözelti haline göre 1,73 kat yüksek olduğu bulunmuştur (Chetoni ve diğerleri, 2015).

Pitrubhakta ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada gempitabin hidroklorür içeren çözelti, lipozom ve pegile lipozom formülasyonu 5 mg /kg dozda intravenöz yoldan sıçanlara uygulanmıştır. Çözelti ilaç şekli 6. saat sonunda kanda tespit edilemezken lipozom formülasyonları 24. saate kadar belirlenebilmiştir. Çözelti, lipozom ve pegile lipozom formülasyonlarının AUC değerleri sırasıyla 11,37 $\mu\text{g}\cdot\text{saat/mL}$, 18,87 $\mu\text{g}\cdot\text{saat/mL}$ ve 21,37 $\mu\text{g}\cdot\text{saat/mL}$ olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada yarılanma ömürleri çözelti, lipozom ve pegile lipozom formülasyonları için sırasıyla 1,57 saat, 7,29 saat, 13,86 saat olarak bulunmuştur. Pegile lipozom içerisinde gempitabin hidroklorürün uygulanmasının yarılanma ömrünü ve biyoyararlanımı artırdığı belirtilmiştir (Pitrubhakta ve diğerleri, 2012).

Yapılan başka bir çalışmada dimiristil fosfotidilkolin (DMPC), dipalmitoil fosfotidilkolin (DPPC) ve disteroil fosfotidilkolinin (DSPC) kullanılmasıyla kolesterol içeren ve içermeyen lipozomlar hazırlanmış ve formülasyonların 30 gün süresince 37°C ve 50°C'deki stabiliteleri incelenmiştir. Kolesterol içermeyen formülasyonların stabiliteleri kolesterol içeren formülasyonlara göre düşük bulunmuştur. Özellikle faz geçiş sıcaklığı en düşük olan DMPC ile hazırlanan kolesterol içermeyen formülasyon stabilitesi DPPC ve DSPC ile hazırlanan formülasyonlara göre daha düşük olduğu gözlenmiştir (Briuglia ve diğerleri, 2015).

Diğer bir çalışmada kurkumin yüklü lipozom formülasyonları soya fosfotidilkolin (SPC), yumurta fosfotidilkolin (EPC) ve hidrojene soya fosfotidilkolin (HSPC) kullanılarak hazırlanmıştır. HSPC ile hazırlanan formülasyonların salım hızı diğer iki formülasyona göre oldukça düşük bulunmuştur. Bu durumun görülmesinde hidrojene soya fosfotidilkolinin faz geçiş sıcaklığının diğer iki yağa göre daha yüksek olmasının etkili olduğu belirtilmiştir. Deriden geçiş çalışmalarında da benzer sonuçlar elde edilmiş ve en az geçişi yüksek faz geçiş sıcaklığına sahip HSPC formülasyonu göstermiştir (Chen ve diğerleri, 2012).

Polimerik nanopartikül ve lipozom ilaç taşıyıcı sistemlerin karşılaştırılması

Polimerik nanopartiküller ve lipozomlar nano boyuttaki ilaç taşıyıcı sistemlerin iki önemli sınıfıdır. Her iki taşıyıcı sistemde birbirine göre avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Hem lipozomlar hem de polimerik nanopartiküller hidrofilik ve hidrofobik

karakterdeki etkin maddelerin yüklenmesine elverişlidir. Lipozomlar biyolojik ortamda ve saklama koşullarında polimerik nanopartiküllere göre daha düşük stabilite göstermektedir. Polimerik nanopartiküllerin sterilizasyonu lipozomlara göre daha kolayken, lipozomlar polimerik nanopartiküllere göre daha yüksek biyoyoumluluk göstermektedir. Çizelge 2.9'da lipozom ve polimerik nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemlerin karşılaştırılması görülmektedir (Khan ve diğerleri, 2016).

Çizelge 2.9. Lipozom ve polimerik nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemlerin karşılaştırılması

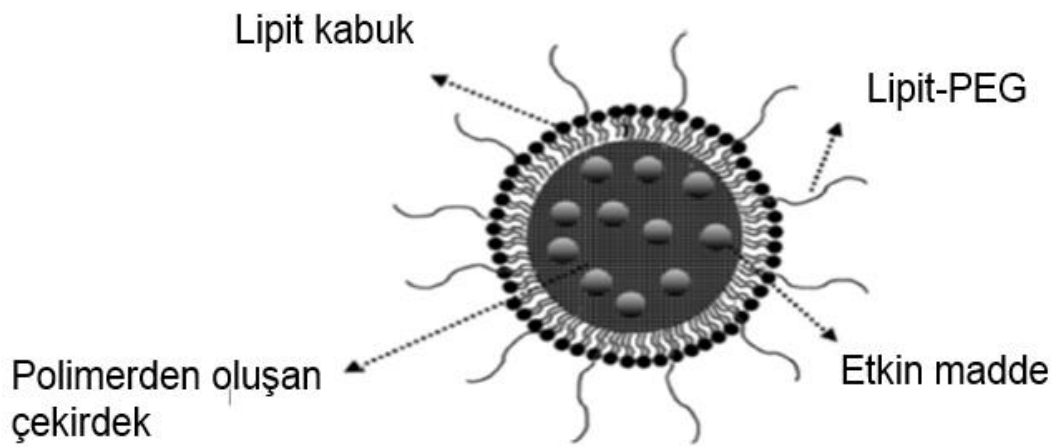
Parametre	Lipozom	Polimerik nanopartikül
Parantral yol ile uygulama	Uygun	Uygun
Oral yol ile uygulama	Uygun değil	Uygun
Biyoyoumluluk	Çok	Az
Biyolojik ortamda stabilite	Az stabil	Çok stabil
Fiziksel stabilite	Az stabil	Çok stabil
Hidrofilik ilaç yüklenmesi	Uygun	Uygun
Hidrofobik ilaç yüklenmesi	Uygun	Uygun
Sterilizasyon	Zor	Kolay

2.2.3. Lipit polimer hibrit nanopartiküller (LPHNP)

Lipozom ve polimerik nanopartiküler sistemlerde görülen problemleri ortadan kaldırmak amacıyla lipozom ve polimerik nanopartiküllerin bir arada olduğu, her iki taşıyıcı sistemin beraberinde getirdiği avantajları bulunduran lipit polimer hibrit nanopartikül (LPHNP) ilaç taşıyıcı sistemler son yıllarda oldukça önem kazanmıştır (Yang ve diğerleri, 2013; Zhao ve diğerleri, 2014). LPHNP ilaç taşıyıcı sistemler, lipit tabaka ile polimerik çekirdeğin elektrostatik etkileşim, hidrofobik etkileşim veya Van der Waals bağları ile birleşmeleri sonucu oluşan sistemlerdir (Zhang ve Zhang, 2010; Mandal ve diğerleri, 2013) (Şekil 2.9). LPHNP ilaç taşıyıcı sistemlerin kanser tedavisinde, aşı adjuvanı olarak, nükleik asit taşınmasında, aktif hedeflemede, genetik hastalıkların tedavisinde ve teşhis amaçlı görüntülemede kullanımı üzerinde araştırmalar devam etmektedir (Bose ve diğerleri, 2016). Özellikle çoklu ilaç direnci

gelişmiş (MDR) ve hayati tehlikesi yüksek olan kanser türlerinin tedavisinde birden fazla ilaç yüklenebilmesine elverişli olmasından dolayı son yıllarda LPHNP ilaç taşıyıcı sistemlerle yapılan çalışmalar hız kazanmıştır (Wong ve diğerleri, 2006; Prasad ve diğerleri, 2013). LPHNP ilaç taşıyıcı sistemler üç kısımdan oluşmaktadır:

- 1-Polimerik çekirdek
- 2-Lipit tabaka
- 3-Hidrofilik polimerik kabuk



Şekil 2.9. LPHNP ilaç taşıyıcı sistemlerin şematize gösterimi (Hadinoto ve diğerleri, 2013)

Polimerik çekirdek taşıyıcı sistemin iskeletidir mekanik stabiliteyi sağlar, etkin maddenin kontrollü salımını gerçekleştirir ve etkin maddenin metabolik bozunmasını engellemektedir. Ayrıca polimerik çekirdek, partikül büyüklüğü dağılımının belirli sınırlar içinde kalmasını sağlamaktadır. Polimerik çekirdeğin oluşturulmasında biyoparçalanabilir, biyoyumlu olmaları ve toksik olmamaları nedeniyle PLGA, PCL, dekstran ve albümin tercih edilmektedir. Lipit tabaka hücreye penetrasyonu ve biyoyumluluğu artırmaktadır. Lipit tabakayı oluşturmak için nötral, anyonik ve katyonik fosfolipitler kullanılabilir. Lesitin, dipalmitoil fosfatidilkolin (DPPC), dipalmitoil trimetilamonyum propan (DPTAP), dioleil trimetilamonyum propan (DOTAP) ve dioleil fosfoetanolamin (DOPE) bu lipitlere örnektir. Ayrıca bu tabaka etkin maddenin polimerden sızmasını engelleyerek taşıyıcı sisteme yüklenebilecek ilaç miktarını artırmaktadır. En dıştaki hidrofilik polimerik kabuk ise RES hücreleri tarafından algılanmayı engelleyip LPHNP ilaç taşıyıcı sistemin fagosite edilmesini önleyerek ilacın daha uzun süre dolaşım sisteminde kalmasını sağlar. Bu amaçla

farklı lipit-PEG türleri kullanılmaktadır (Zhang ve diğerleri, 2008; Chan ve diğerleri, 2009). Literatürlerde farklı tip ve yapısal özellikte LPHNP sistemler geliştirilmiştir. Bu LPHNP sistemlerin tipleri ve yapılarına ait tanımlayıcı özellikler Çizelge 2.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 2.10. Farklı tiplerdeki LPHNP sistemler ve yapısal özellikleri

Tip	Yapısal özellik	Referans
Polimer çekirdek-lipit kabuk	Polimer çekirdeğin etrafını lipit tabaka çevrelemiştir.	Troutier ve diğerleri, 2005
Lipozomun polimer içerisine hapsediği sistemler	Bu sistemlerde lipozomun etrafı polimer ile çevrelenmiştir ve bu yapılar birbirine bağlıdır.	Lee ve diğerleri, 2007
Çekirdek kabuk tipi içi boş lipit-polimer-lipit nanopartikülleri	İçteki çekirdek, lipit tabaka ile çevrelenmiştir. Bu tabakanın etrafında polimerik tabaka vardır. Polimerik tabakanın dışında lipit ve dış tabakada ise lipit-PEG tabakası bulunmaktadır.	Shi ve diğerleri, 2011
Eritrosit membranı ile kamufle edilmiş polimerik nanopartikül	Bu sistemde polimerik nanopartikülün etrafını eritrositten elde edilen membranı çevrelemiştir.	Hu ve diğerleri, 2011

LPHNP sistemlerin avantajları aşağıda verilmiştir (Clawson ve diğerleri, 2011; Hadinoto ve diğerleri, 2013):

- Yüksek oranda ilaç yükleme kapasitesi,
- Raf ömrü ve dolaşım sistemindeki stabiliteyi artırması,
- Kontrollü salım özelliği göstermesi,
- Yüksek biyouyumluluk ve biyoyararlanım göstermesi,
- Yüzey modifikasyonuna elverişli olması (folik asit, transferin, antikor vb),
- Partikül boyutuna bağlı olarak pasif hedeflenmeye olanak sağlamasıdır.

LPHNP hazırlama yöntemleri

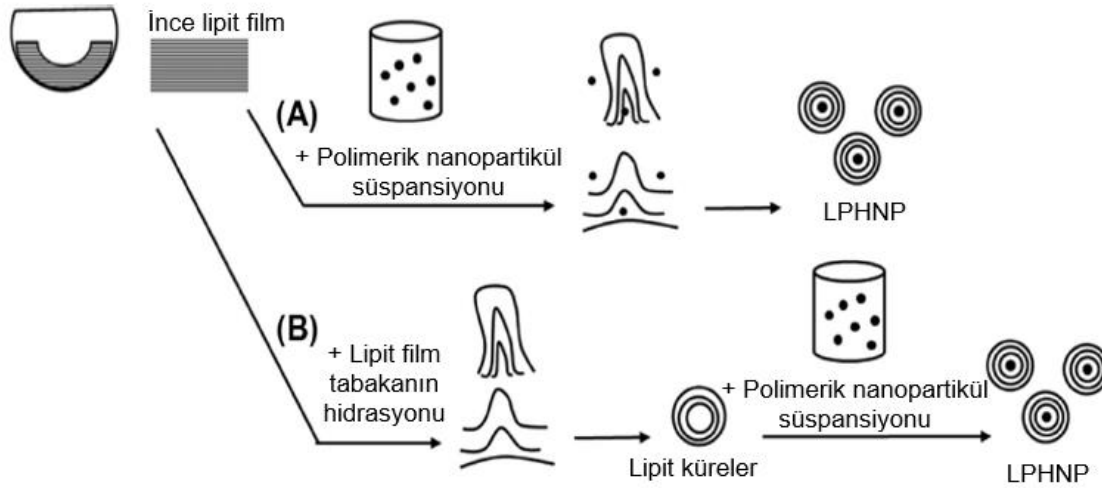
LPHNP sistemlerin hazırlamasında iki farklı yöntem kullanılmaktadır (Mandal ve diğerleri, 2013).

1. İki basamaklı yöntem
2. Tek basamaklı yöntem

İki basamaklı yöntem

LPHNP ilaç taşıyıcı sistemler ilk geliştirildiği yıllarda iki basamaklı yöntem en çok kullanılan yöntemken günümüzde hazırlama basamağının uzun süre alması, suda çözünen ilaçlar için düşük yükleme kapasitesi gibi problemler görüldüğü için çok fazla tercih edilmemektedir (Cheow ve Hadinoto, 2011). Bu yöntemde polimerik nanopartikül ile lipozom ayrı ayrı hazırlanır daha sonra hidrasyon, sonikasyon veya ekstrüksiyon işlemleri uygulanarak birleşmeleri sağlanır. Emülsiyon çözücü uçurma, nanoçöktürme veya yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemleri ile hazırlanmış polimerik nanopartikül süspansiyonu, kloroform gibi bir organik çözücüde çözünmüş ve sonradan çözücüsü uçurulmuş kuru lipit film tabaka üzerine ilave edilmesiyle veya polimerik nanopartikül süspansiyonun hidrate edilmiş lipit film tabakaya ilave edilmesiyle elde edilebilir (Hadinoto ve diğerleri, 2013). Her iki hazırlama şeklinde de lipit ile polimerik nanopartikül lipitin faz geçiş sıcaklığının üzerinde bir sıcaklık ortamında inkübasyonu, ultrasonikasyon veya karıştırma uygulanmasıyla bir araya gelmektedir. Şekil 2.10'da LPHNP ilaç taşıyıcı sistem hazırlanırken uygulanan iki basamaklı yöntem şematize edilmiştir. Bu yöntemde partikül büyüklüğünü etkileyen faktörler:

- Lipozom oluşturma yöntemi,
- Lipozom ile polimerik nanopartikülü karıştırma protokolü,
- Polimer ve lipitin tipi,
- Lipitin yüzey yükü,
- Lipozom/polimer oranı ve
- Inkübasyon sıcaklığıdır (Troutier ve diğerleri, 2005).



Şekil 2.10. LPHNP ilaç taşıyıcı sistem hazırlanırken uygulanan iki basamaklı yöntemin şematize gösterimi (Hadinoto ve diğerleri, 2013)

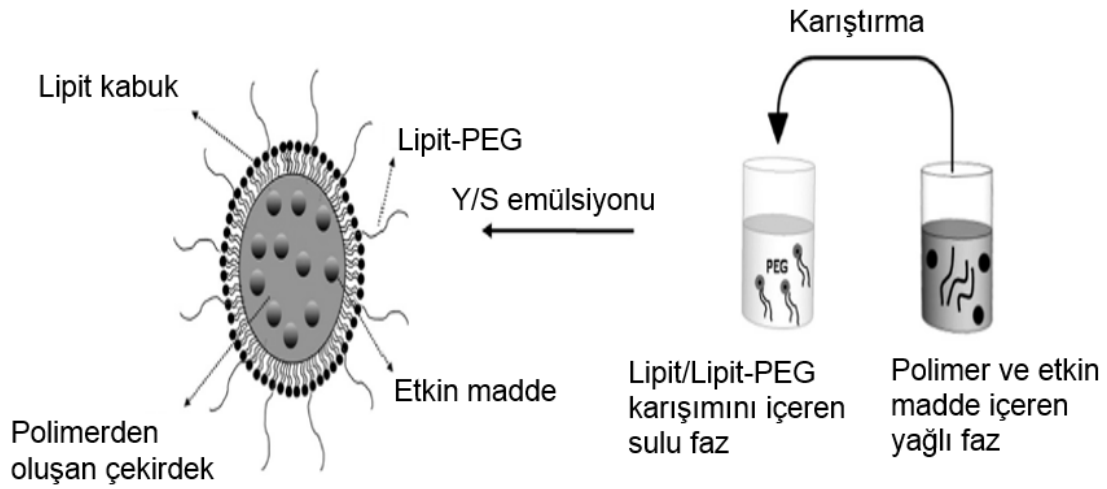
Tek basamaklı yöntem

İki basamaklı yöntemin enerji ve zaman açısından verimliliğinin düşük olması başka bir hazırlama yönteminin gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Tek basamaklı yöntem kısa sürede hazırlanabilen ve tekrarlanabilirliği yüksek bir yöntemdir. İki basamaklı yöntemin aksine bu yöntemde polimerik nanopartikül ve lipozom ayrı ayrı üretilmemektedir. Tek basamaklı yöntemde polimer ve lipit aynı fazda çözelti içerisinde bulunur. Tek basamaklı yöntemle LPHNP formülasyonlarının elde edilmesinde polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında da sıkça başvurulmuş modifiye emülsiyon çözücü uçurma ve modifiye nanoçöktürme yöntemleri kullanılmaktadır (Mandal ve diğerleri, 2013). Modifiye emülsiyon çözücü uçurma yöntemi tek veya çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi olmak üzere ikiye ayrılmaktadır ve hidrofilik karakterdeki etkin maddelerin yüklenmesinde modifiye çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi tercih edilmektedir (Cheow ve Hadinoto, 2011).

Tek emülsiyon çözücü uçurma yöntemi

Bu yöntem etkin maddenin organik faz içerisinde çözünmediği durumlarda uygulanır. Hidrofobik ilaçların yüklenmesi için kullanılan bir yöntemdir. Organik faz etkin madde ve polimeri içerirken, sulu faz lipiti içermektedir. Organik çözücü olarak su ile karışmayan kloroform ve diklorometan kullanılabilir. Organik fazın sulu faza

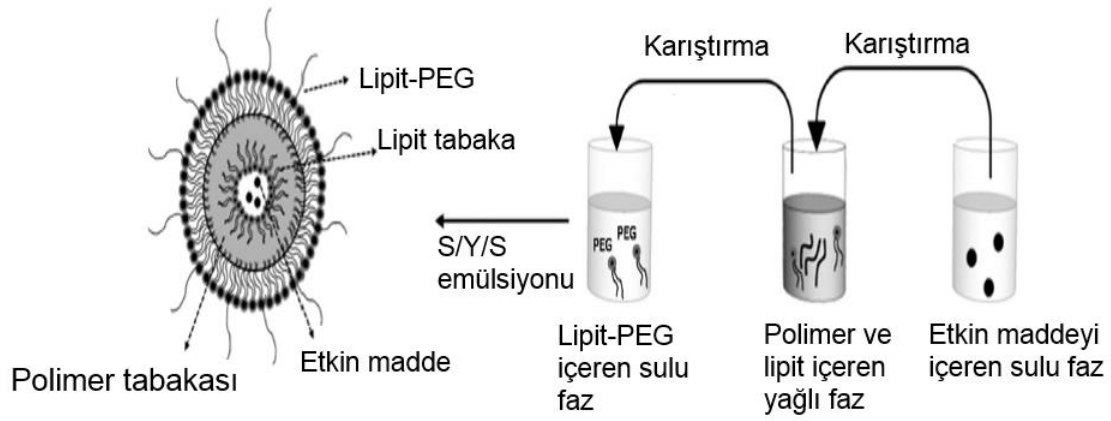
ilave edilip karıştırılmasıyla su içinde yağ (Y/S) emülsiyonu oluşur. Organik fazın uçurulmasıyla etkin maddenin tutunduğu polimer çekirdek lipit ile kaplanır ve LPHNP'ler kendiliğinden oluşur (Zhang ve Zhang, 2010). Ayrıca alternatif olarak lipit de polimer ve etkin madde ile beraber aynı fazda çözünebilir (Hadinoto ve diğerleri, 2013). Şekil 2.11'de tek emülsiyon çözücü uçurma yöntemi şematize edilmiştir.



Şekil 2.11. Tek emülsiyon çözücü uçurma yönteminin şematize gösterimi (Hadinoto ve diğerleri, 2013)

Çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi

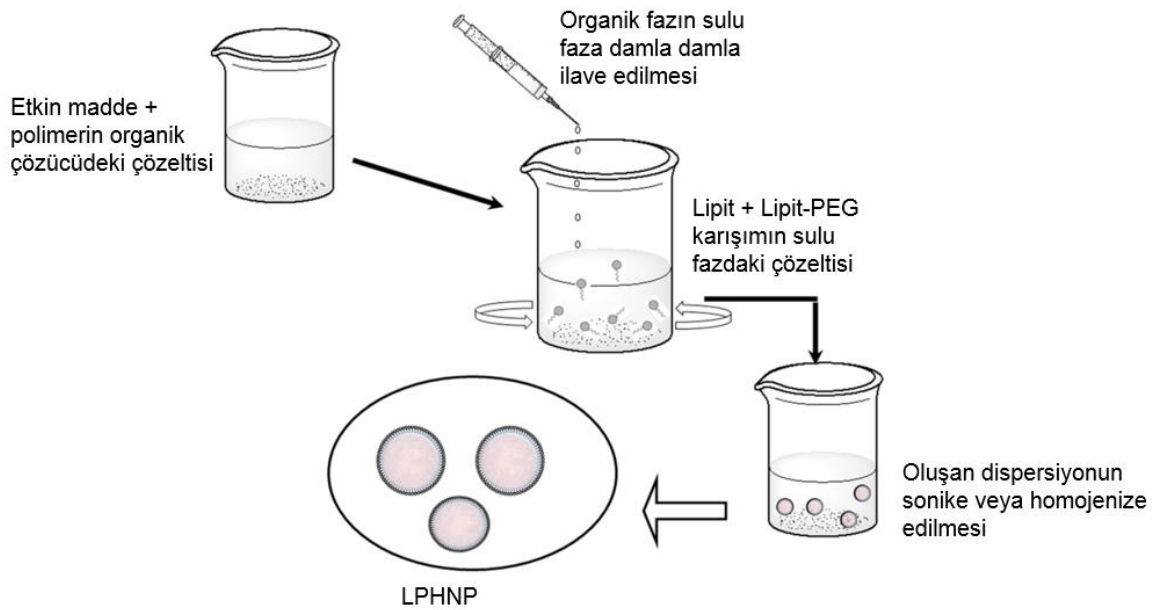
Bu yöntem hidrofilik karakterdeki etkin maddelerle çalışılırken kullanılmaktadır. Etkin madde sulu fazda çözünür ve bu faz polimer ile lipit içeren organik faza ilave edilir, karıştırılır böylece yağ içinde su (S/Y) emülsiyonu meydana gelir. Bu emülsiyon bir kez daha lipit-PEG içeren sulu faz ile emülsifiye edilir ve S/Y/S emülsiyonu oluşur. Daha sonra organik fazın uçurulmasıyla LPHNP ilaç taşıyıcı sistemler elde edilir (Hadinoto ve diğerleri, 2013). Çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi ile elde edilen LPHNP ilaç taşıyıcı sistemler yapısal olarak biraz farklıdır. Bu hazırlama yöntemi sonucu sulu çekirdeğin etrafının lipit tabaka ile kaplandığı, ortada polimer tabakanın bulunduğu en dışta ise lipit-PEG tabakanın yer aldığı LPHNP sistemler elde edilmektedir (Hadinoto ve diğerleri, 2013). Şekil 2.12'de çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi kullanılarak LPHNP formülasyonlarının elde edilmesi gösterilmiştir.



Şekil 2.12. Çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi kullanılarak LPHNP formülasyonlarının elde edilmesi (Hadinoto ve diğerleri, 2013)

Nanoçöktürme yöntemi

Bu yöntemde birbiriyle ile karışabilen iki çözücü kullanılır ve bu çözücülerden birinde polimer iyi çözünürken diğerinde çözünmez. Lipit/lipit-PEG karışımı sulu fazda çözünürken, etkin madde ve polimer aseton, asetonitril gibi su ile karışabilen bir organik çözücü içerisinde çözünür. Lipit/lipit-PEG karışımını içeren sulu fazın homojen bir karışım oluşturması için genelde 65-70°C ye kadar ısıtılması gerekebilir. Organik faz damla damla sulu faza manyetik karıştırma altında ilave edilir ve polimeri çözen çözücünün, polimeri çözmeyen çözücü faza difüze olmasıyla polimerin çöktürülmesi sağlanır (Zhang ve diğerleri, 2008). Sonrada kendiliğinden hidrofobik etkileşimler sayesinde lipidin hidrofobik kuyruğunun polimerle etkileşmesi ve hidrofilik baş kısmının sulu faza doğru yönelip çekirdeği çevrelemesiyle LPHNP'ler oluşur (Şekil 2.13). Bu yöntemde polimer konsantrasyonu ve organik fazların hacimsel oranları, partikül büyüklüğü ve polidispersite açısından önemlidir. Yöntemin en büyük avantajı büyük ölçekte üretim için elverişli olmasıdır. Yöntem suda çözünürlüğü yüksek ilaçlar için düşük enkapsülasyon etkinliği göstermesinden dolayı çok elverişli değildir (Hadinoto ve diğerleri, 2013).



Şekil 2.13. Nanoçöktürme yöntemiyle LPHNP formülasyonların elde edilmesi (Mandal ve diğerleri, 2013)

LPHNP'lerin stabilitesi

LPHNP'lerin in vivo ortamları taklit eden koşullarda gerçekleştirilen stabilite çalışmaları (Zhang ve diğerleri, 2008; Cheow ve diğerleri, 2011) bulunmakla birlikte saklama koşullarındaki stabiliteleri hakkındaki çalışmaların (Garg ve diğerleri, 2015) sayısı oldukça azdır. Lipit tabakayı oluşturan fosfolipitler aynı zamanda sürfaktan görevi görüp LPHNP formülasyonlarının stabilitesini artırabilmektedir (Young ve diğerleri, 2003; Mandal ve diğerleri, 2013). LPHNP sistemin stabilitesini etkileyen en önemli faktörler (Thevenot ve diğerleri, 2007):

- Sulu fazın pH'sı ve iyonik kuvveti,
- Lipitin çekirdeğin etrafını kaplaması sırasında inkübasyon sıcaklığı,
- Vezikül/çekirdek oranı

Sulu fazdaki iyonik kuvvetin artması genellikle stabiliteyi düşürmektedir. Lipidin faz geçiş sıcaklığının üzerinde çalışmak lipidin polimerik çekirdeğin etrafını kaplamasını kolaylaştırmaktadır. Vezikül/çekirdek oranı ise Eş. 2.1'de görüldüğü gibi açıklanmaktadır (Mandal ve diğerleri, 2013).

$$\text{Vezikül/Çekirdek} = \frac{\text{Lipitin toplam yüzey alanı } (\Delta v)}{\text{Polimerik çekirdeğin toplam yüzey alanı } (\Delta p)} \quad (2.1)$$

$\Delta v/\Delta p$ oranı yüksekse stabil yapının varlığından bahsedilirken, $\Delta v/\Delta p$ oranının düşük olması zamanla agregasyonun meydana gelebileceğinin göstergesidir (Mandal ve diğerleri, 2013). LPHNP sistemlerin stabilitesini artırmaya yönelik uygulanan bir diğer yaklaşım formülasyonlara lipit-PEG ilavesiyle sterik engel oluşturmaktır. Özellikle uzun zincirli lipit-PEG türlerinin kullanılması daha stabil yapıların oluşmasını sağlayacaktır. Bir başka yaklaşım da fosfolipitlerle beraber sürfaktan maddelerin kullanılmasıdır (Cheow ve Hadinoto, 2011). Bu amaç için d- α - tokoferol PEG süksinat kullanılabilir.

LPHNP'lerin karakterizasyonu

LPHNP'lerin karakterizasyonunda pek çok fizikokimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılabilir. Özellikle partikül büyüklüğü, zeta potansiyel ve yüzey morfolojileri LPHNP'lerin in vivo profillerinin belirlenmesinde önemli parametrelerdir. İncelenebilecek parametreler ve kullanılan yöntemler Çizelge 2.11'de gösterilmiştir (Mandal ve diğerleri, 2013).

Çizelge 2.11. LPHNP karakterizasyonunda kullanılan parametreler ve yöntemler

Parametre	Yöntem
Partikül büyüklüğü dağılımı	Foton korelasyon spektroskopu, Dinamik ışık saçılımı
Yüzey yükü	Foton korelasyon spektroskopu, Dinamik ışık saçılımı
Morfoloji	Transmission elektron mikroskopu (TEM) Taramalı elektron mikroskopu (SEM) Atomik kuvvet mikroskopu (AFM) Konfokal laser taramalı mikroskop (CSLM) Floresans mikroskopu
Lipit tabaka kalınlığı	Küçük açılı x-ray saçılımı (SAXS), TEM
Yüzeylerarası kimyasal bileşenler	X-ray fotoelektron spektroskopu (XPS)
Lipit tabakanın akıcılığı	Floresans prob yöntemi
Lipit kabuk geçişi	Nükleer manyetik rezonans (NMR) Fourier dönüşümleri infrared spektroskopu (FTIR) Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) Toz x-ray dağılımı (PXRD)
İlaç yükleme kapasitesi	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), Diyaliz, Membran filtrasyon
İlaç salımı	HPLC, UV spektroskopu, Örnekleme ve ayırma yöntemi
İn vitro hücre içine geçiş	Floresans mikroskopu
Sitotoksisite	MTT hücre yaşam deneyi ATP belirleme deneyi Trypan mavisi ile renklendirme

LPHNP ilaç taşıyıcı sistemler ile yapılan çalışmalar

Yapılan bir çalışmada dosetaksel yüklü, yüzeyi folat ile modifiye edilmiş 25 nm'den küçük LPHNP'ler hazırlanmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında folat reseptörlerini fazla sayıda üreten KB kanser hücreleri kullanılmıştır. Floresans boya ile işaretlenmiş folat modifiye edilmiş ve edilmemiş LPHNP formülasyonları KB hücrelerine uygulandığında, folat ile modifiye edilmiş hücrelerin 3 kat daha fazla hücre içine geçtiği belirlenmiştir. Dosetaksel içeren ticari ürün Taxotere® ve LPHNP formülasyonlarının KB hücreleri sitotoksiteleri incelendiğinde IC₅₀ değerlerinin yakın bulunduğu hibrit sistem içerisinde etkin maddenin aktivitesini koruduğu gözlenmiştir. KB kanser hücrelerinin farelere enjeksiyonu sonucu geliştirilen kanser modeli verilerine göre LPHNP sisteminin hem folat ile modifiye edilmiş hem de edilmemiş haliyle ticari ürün Taxotere® göre çok daha etkili olduğu bulunmuştur (Dehaini ve diğerleri, 2016).

Devrim ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada lizozim yüklü nanopartikül ve LPHNP formülasyonları hazırlanmıştır. L929 fare fibroblast hücreleri üzerinde yapılan sitotoksite çalışmalarında hem nanopartikül hem de LPHNP sistem benzer sitotoksite gösterirken, aynı hücreler ile yapılan hücre içine geçiş çalışmalarında hibrit sistemin nanopartikül formülasyonuna göre hücre içi geçişi artırdığı sonucu gözlenmiştir. Aynı çalışmada LPHNP ilaç taşıyıcı sistemin 120 saat süreyle partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli değerlendirilerek distile su, pH 7,4 fosfat tamponu, DMEM, DMEM + % 10 fetal bovin serum ve fetal bovin serum ortamlarında stabilitesi incelenmiştir. 120 saat süresince % 100 fetal bovin serumlu ortam hariç hibrit sisteminin tüm ortamlarda stabilitesini koruduğu belirtilmiştir (Devrim ve diğerleri, 2016).

Yapılan bir çalışmada LPHNP formülasyonları nanoçöktürme yöntemiyle geliştirilmiştir. Formülasyon içindeki (lipit + lipit-PEG)/polimer kütlege oranı ile lipit/lipit-PEG molar oranının formülasyon üzerine etkisi incelenmiştir. Lipit-PEG miktarı artıkcça daha küçük boyuttaki partiküllerin elde edildiği ve bu partiküllerin fosfat tamponu içerisinde daha iyi stabilite gösterdiği görülmüştür. (Lipit + lipit-PEG)/polimer kütlege oranı % 10 olduğunda lipit/lipit-PEG oranı ne olursa olsun 1000 nm'den büyük taneciklerin elde edildiği ve daha küçük taneciklerin elde edilebilmesi

için en azından (Lipit + lipit-PEG)/ polimer kütlece oranının % 15 olması gerektiği belirtilmiştir (Chan ve diğerleri, 2009).

Başka bir çalışmada dosetaksel yüklü PLGA, PLGA-PEG nanopartikül formülasyonları ile PLGA-Lipit-PEG'ten oluşan LPHNP formülasyonları hazırlanmıştır. En düşük yükleme kapasitesi PLGA-PEG'ten oluşan nanopartikül formülasyonunda görülürken, en yüksek yükleme kapasitesine hibrit sistemde ulaşılmıştır. Hibrit sistemden etkin maddenin kontrollü olarak salındığı gözlenmiştir. Hibrit sistem etkin maddenin % 50'sini yaklaşık 20 saatte salarken, PLGA-PEG'ten oluşan nanopartikül formülasyonun yaklaşık 10 saatte, sadece PLGA'dan oluşan formülasyon ise yaklaşık 7 saatte etkin maddenin % 50'sini saldığı gözlenmiştir (Zhang ve diğerleri, 2008).

Mandal ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada erlotinib yüklü LPHNP formülasyonu hazırlamışlardır. Lipit-PEG/polimer oranının artmasının partikül boyutunu istatistiksel açıdan anlamlı olarak değiştirmede, lipit/polimer oranının ise % 32'nin üstüne çıktığında gözle görülür şekilde agregasyonların olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Formülasyona ilave edilen erlotinib konsantrasyonunun % 20'nin üzerine çıkmasının, enkapsülasyon etkinliğini düşürdüğü ve partiküllerin agreg oldukları belirlenmiştir. % 20'nin üstündeki konsantrasyonda ise aşırı doygunluğun olduğu ve daha fazla etkin maddenin yüklenemediği sonucuna varılmıştır. 2-8°C de 1 ay süresince yapılan stabilite çalışmasında LPHNP formülasyonunun partikül boyutunun değişmediği gözlenmiştir. A549 akciğer kanseri hücreleri ile yapılan sitotoksite çalışmalarında erlotinib içeren LPHNP formülsyonu, erlotinibin çözelti haline göre çok daha etkili bulunmuştur (Mandal ve diğerleri, 2016).

Nanotaşıyıcı sistemlerin stabilitesi

Nano boyuttaki ilaç taşıyıcı sistemlerin agregasyona uğramaları, polimerler ve lipitlerin hidrolize uğramaları ve etkin maddenin saklama şartlarında dışarı sızması nanotaşıyıcı sistemlerin stabilite problemleridir. Nanotaşıyıcı sistemlerin stabilitesini artırmak için liyofilizasyon (Ghanbarzadeh ve diğerleri, 2013), püskürterek kurutma (Lo ve diğerleri, 2004) ve süper kritik sıvı teknolojisi (Mishima, 2008) en çok uygulanan yaklaşımlardır.

Liyofilizasyon

Liyofilizasyon (dondurarak kurutma) nanotaşıyıcı sistemlerin uzun süre stabil kalmalarını sağlamak için uygulanan bir işlemdir. Bu sistemlerin stabilitesini artırmak için suyun uzaklaştırılması gerekmektedir. Liyofilizasyon oldukça yavaş gerçekleşen ve pahalı bir yöntemdir (Abdelwahed ve diğerleri, 2006).

Nanotaşıyıcı sistemlerin liyofilize edilmesindeki önemli nokta işlem sonrasında yapının bütünlüğünün korunmasıdır. Özellikle lipid bulunduran taşıyıcı sistemlerde liyofilizasyon basamağında tabakalarda hasar oluşabilmektedir. (Chen ve diğerleri, 2010). Bu problemi engellemek için formülasyonlara liyoprotektan ve kriyoprotektan özellikte şekerler ilave edilmektedir.

Kriyoprotektanlar ve liyoprotektanlar

Dondurarak kurutma işlemi nanotaşıyıcı sistemler üzerinde özellikle dondurma ve suyun uzaklaşması basamaklarında stres koşulları oluşturmaktadır. Bu durumun önüne geçebilmek için dondurarak kurutma işlemi öncesi formülasyona bazı yardımcı maddeler ilave edilmelidir. Dondurma basamağında meydana gelen stresi engellemek için ilave edilenlere kriyoprotektan, kurutma basamağının oluşturduğu stresi engellemek için ilave edilenlere ise liyoprotektan adı verilmektedir. Nanopartiküllerin dondurarak kurutulmasında sıklıkla kullanılan yardımcı maddelerin bazıları şunlardır (Abdelwahed ve diğerleri, 2006):

- | | | |
|------------|----------------------|------------|
| • Glikoz | • Trehaloz | • Laktoz |
| • Sükroz | • Polivinil alkol | • Mannitol |
| • Maltoz | • Polivinil prolidon | • Aerosil |
| • Sorbitol | • Fruktoz | • Dekstran |

Kriyoprotektan ve liyoprotektan özellikteki maddelerin camsı geçiş sıcaklığının (T_g) yüksek olması istenir. Camsı geçiş sıcaklığı maddenin özelliklerini kaybedip viskoz hale geçmeye başladığı sıcaklıktır. Maddeler camsı geçiş sıcaklığının altında amorf yapıdadır. Liyofilizasyonda camsı hale geçme dondurma basamağında kristallenmeden sonra meydana gelir. Su buza dönüşürken konsantrasyon artmasıyla viskoz bir hal almaktadır. Camsı geçiş sıcaklığının üzerinde bir sıcaklıkta bu viskoz yapı bekletildiğinde aniden aşırı bir hareketlilik kazanır. Buna bağlı olarak da bozunma yolları bu aşırı hareketlilikten dolayı aktive olmuş olur. Dolayısıyla yüksek T_g değerine sahip olmak stabilite açısından oldukça önemlidir (Duddu ve Monte, 1997). Camsı geçiş sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda viskozite yüksektir ve taneciklerin kümeleşme ihtimali azalır. Glikoz gibi monosakkarit yapıdaki şekerlere karşı disakkarit yapıdaki trehaloz, sükroz, mannitol ve laktozun liyofilizasyonda yardımcı madde olarak kullanılmalarının daha başarılı sonuçlar verdiği literatürde belirtilmiştir (Wang, 2000).

Nanotaşıyıcı sistemlerin sterilizasyonu

Nanotaşıyıcı sistemlerin in vivo uygulamalarda steril olması ve pirojen içermemesi istenmektedir. Farmakopelerde genellikle SAL (Sterilite güvence seviyesi) değeri 10^{-6} olarak kabul edilmektedir. Bu değer geçerli bir sterilizasyon işlemi için üründe mikroorganizma bulunma olasılığının en fazla milyonda bir olması gerektiğini göstermektedir (Von Woedtke ve Kramer, 2008). Mikroorganizma kontaminasyonuna ekipmanlar, üretim tesisi ve çalışan personel neden olmaktadır. Nanotaşıyıcı sistemlerin sterilizasyonunda filtrasyon, otoklav ile sterilizasyon, radyasyon ışıması, formaldehit ve etilen oksit ile sterilizasyon yöntemleri kullanılmaktadır.

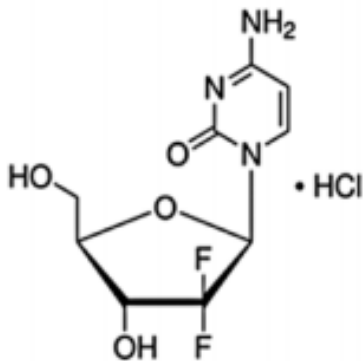
Filtrasyon ile sterilizasyonda $0,22 \mu\text{m}$ 'lik membran filtreler kullanılmaktadır. Yüksek miktarda ürün steril edilecekse oldukça uygun bir yöntemdir fakat bu sterilizasyon yöntemi büyük boyuttaki tanecikler için uygun değildir (Tsukada ve diğerleri, 2009). Otoklav ile sterilizasyon genellikle 121°C sıcaklıkta 15-20 dakika uygulanmaktadır. Bu yöntemin dezavantajı nanopartiküllerin işlem sonucu agregre olması ve taşıyıcı sistemin yapısının bozulmasıdır (Vetten ve diğerleri, 2014). Radyasyon ile sterilizasyonda gama ışını (γ), elektron ışıması, X-ray ve UV ışığı radyasyonu

kullanılmaktadır. Bu yöntem ile sterilizasyonun avantajı kimyasal kullanılmaması, ısıtma basamağının olmaması ve işlem sonucunda ısıma kalıntısının kalmamasıdır. UV ışığı ile sterilizasyon daha çok partikülün yüzeyinde sterilizasyon sağlarken, gama ve elektron ışıması ile görülen yüksek penetrasyon sayesinde taneciğin tümünün sterilizasyonu sağlanabilir. Gama ve elektron ışıması ile sterilizasyonda en büyük problem yüksek kGy'de nanopartikül materyaline de zarar verebilmesidir. Gama ve elektron ışımasında 10 ile 35 arasında kGy uygulanmasının yapıyı bozmadığı belirtilmiştir (Maksimenko ve diğerleri, 2008).

2.3. Gemsitabin Hidroklorür

2.3.1. Gemsitabin hidroklorürün yapısı ve özellikleri

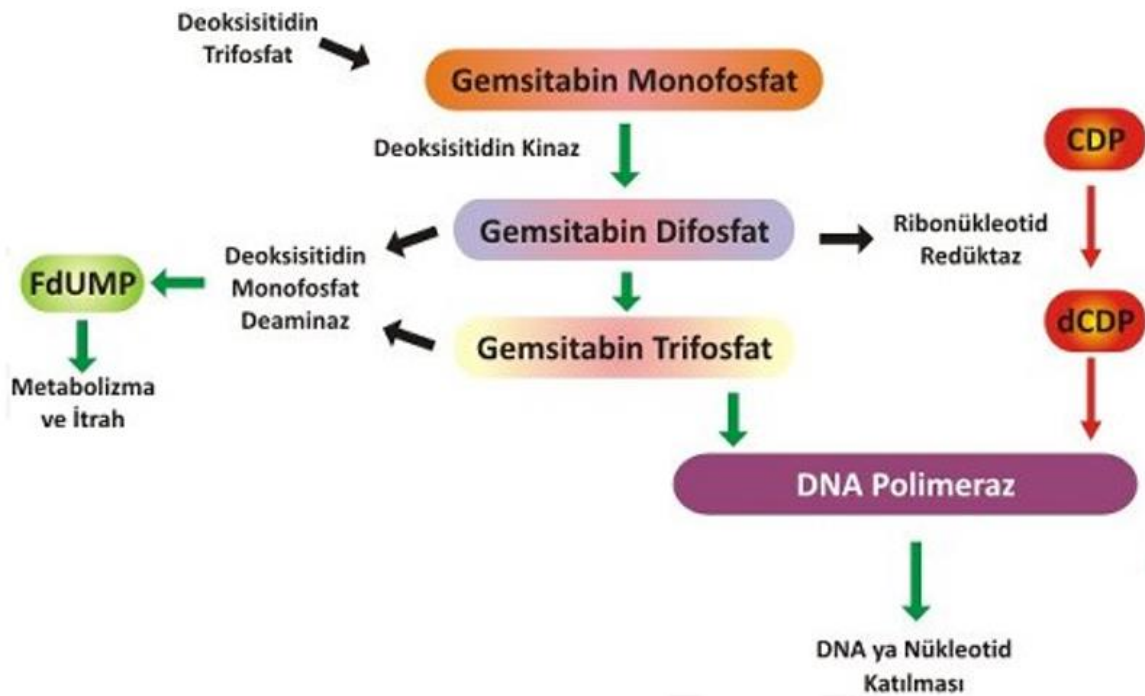
Gemsitabin hidroklorür, gemsitabinin hidroklorür tuzudur ve 2'-deoksi-2',2'-diflorositidin monohidroklorür olarak isimlendirilmektedir. Molekül formülü $C_9H_{11}F_2N_3O_4 \cdot HCl$ ve molekül ağırlığı 299,66 g/mol'dür. Biyofarmasötikleri sınıflandırma sistemine göre sınıf 3 grubu bir ilaçtır. Gemsitabin hidroklorürün pKa değeri 3.58 ve sudaki çözünürlüğü 16,8 mg/mL'dir (Joshi ve diğerleri, 2014). Beyaz renkli kristal toz halindedir. Erime derecesi yaklaşık 270°C'dir. Suda çözünür, metanolde kısmen çözünür etanol ve polar organik çözücülerde çözünmemektedir. Gemsitabin hidroklorürün moleküler yapısı Şekil 2.14'de gösterilmektedir.



Şekil 2.14. Gemsitabin hidroklorürün moleküler yapısı (Chen ve diğerleri, 2014)

2.3.2. Gemsitabin hidroklorürün farmakolojisi ve etki mekanizması

Gemsitabin hidroklorür piyasada sadece paranteral intravenöz uygulamaya uygun dozaj şekli bulunmaktadır ve geniş spektrumlu bir antitümör ajandır. 1996 yılında Eli Lilly and Company (Indianapolis, Indiana, ABD) firması tarafından geliştirilmiş ve FDA'den onaylanarak pankreas kanseri tedavisinde uygulanmaya başlanmıştır. 2004 yılından itibaren meme kanseri tedavisinde paklitaksel ile kombine olarak kullanılmaktadır (National Cancer Institute, 2013). Daha sonraki yıllarda pankreas, küçük hücre dışı akciğer, mesane ve over kanserinin tedavisinde tek başına veya diğer kemoterapötik ajanlarla kombine halde kullanıma sunulmuştur (Toschi ve diğerleri, 2005; Martin-Banderas ve diğerleri, 2013). Gemsitabin hidroklorür suda çözünürlüğü yüksek olan bir ön ilaçtır, hücre içinde deoksisitidin kinazlar ve nükleozit kinazlar tarafından aktif metabolitleri olan gemsitabin difosfat (dFdCDP) ve gemsitabin trifosfata (dFdCTP) dönüşerek sitotoksik etki göstermektedir (Chung ve diğerleri, 2012; Lansakara ve diğerleri, 2012). Şekil 2.15'de gemsitabinin etki mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 2.15. Geminin etki mekanizması (CDP: sitidin difosfat, dCDP:deoksisitidin difosfat; FdUMP: florodeoksiüridin monofosfat) (Rx Media Pharma, 2017)

Gemcitabinin sitotoksik etkisi DNA sentezinin inhibisyonuna neden olan dFdCDP ve dFdCTP'ye bağımlı meydana gelmektedir. Bu iki aktif metabolit DNA polimeraz ve ribonükleotid redüktazı inhibe eder. Bu aktif metabolitlerin DNA'ya katılması DNA zincirinde hasara ve sonlanmaya neden olur. Bu hata kendini saklayabilir ve DNA'nın onarılması çok daha zor hale gelir (Mini ve diğerleri, 2006). Gemcitabinin difosfat ve trifosfat metaboliti deoksitidin monofosfat deaminaz enzimi sentezini inhibe eder bu durum aktif metabolitin hücre içinde daha çok birikmesine neden olur. Bu enzim hücre içindeki yabancı maddelerin uzaklaştırılmasından sorumludur. Difosfat metaboliti ayrıca deoksitidin kinazların aktivitesini artırır, bu durumda aktif trifosfat metabolitin daha fazla üretilmesine yol açar. Tüm bunlar sonucunda gemcitabin DNA sentezi için gerekli olan deoksinükleotitlerin üretilmesinden sorumlu ribonükleotid redüktazı inhibe eder (Tripathy, 2002). Gemcitabin DNA yapısına girdikten sonra, DNA zincirinde bir nükleotit artış olur. Prensip olarak bu artış, hücre ölümüne (apoptozis) yol açan ileri düzeyde DNA sentezinin tam inhibisyonu anlamına gelmektedir. Gemcitabin hidroklorür içeren bazı müstahzarlar ve üreten firmalar Çizelge 2.12'de yer almaktadır (Rx Media Pharma, 2017).

Çizelge 2.12. Gemcitabin hidroklorür içeren bazı müstahzarlar ve üreten firmalar

Müstahzar adı	Üretici firma	Farmasötik dozu
Gemzar®	Lilly	200 ve 1000 mg
Gemcitabine Kabi®	Fresenius Kabi	200 ve 1000 mg
Gemful®	Teva	200, 1000 ve 2000 mg
Gemko®	Koçak	200, 1000, 1400 ve 2000 mg
Gemsibin®	Dem ilaç	200 ve 1000 mg
Gesita®	Sandoz	200 ve 1000 mg
Sitagem®	Mustafa Nevzat	200, 1000 ve 2000 mg

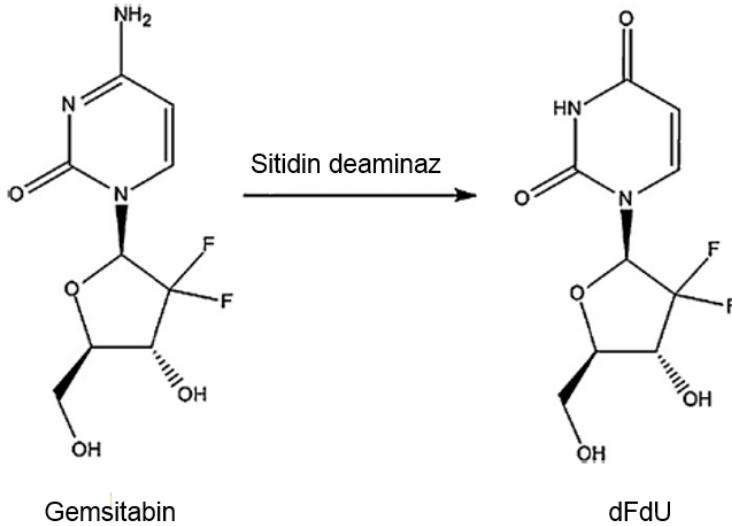
Gemcitabin hidroklorürün yan etkileri

Gemcitabin hidroklorür diğer antikanser ilaçlar gibi pek çok yan etkiye sahiptir. Dar terapötik pencereye sahip olması ve etkin tedavi için yüksek doz uygulanması yan

etkilerin görülme şiddet ve sıklığını artırmaktadır (Wang ve diğerleri, 2014). Bu istenmeyen etkilerden en çok görülenleri bulantı, kusma, kemik iliğinin baskılanması, anemi, ödem ve akciğerde toksisite oluşturmalarıdır (Imen ve diğerleri, 2006; Soni ve diğerleri, 2015).

2.3.3. Gemsitabinin hidroklorürün metabolizması

Gemsitabin vücuda alındığında hızla metabolize olup inaktif metabolitlerine dönüşmektedir (Derakhshandeh ve Fathi, 2012). Başta kan, böbrek, karaciğer olmak üzere pek çok organda sitidin deaminazların etkisiyle hızla deaminasyona uğrayarak inaktif metaboliti 2',2'-difloro deoksi üridine (dFdU) dönüşmektedir (Şekil 2.16). Plazmadaki yarılanma ömrü 32-84 dakikadır (Sloat ve diğerleri, 2011). Vücut içerisinde hızla metabolize olarak inaktif metabolitine dönüştüğü için yüksek doz uygulanmasını gerekli kılmaktadır. Bu durum yan etkilerin artmasını ve hasta uyuncunun düşmesini de beraberinde getirmektedir.



Şekil 2.16. Gemsitabinin sitidin deaminazların etkisiyle deaminasyona uğrayıp inaktif metabolitine dönüşmesi (Derakhshandeh ve Fathi, 2012)

2.3.4. Gemsitabin hidroklorürün uygulama dozu

Gemsitabin klinikte meme kanseri tedavisinde paklitaksel ile kombine kullanılmaktadır. 1. gün intravenöz infüzyon olarak yaklaşık 3 saatlik sürede

paklitaksel (175 mg/m^2) uygulanmasını takiben her bir 21 günlük kürün 1. ve 8. günlerinde 30 dakikalık intravenöz infüzyon ile gemsitabin 1250 mg/m^2 dozunda hastaya verilmektedir (Gemzar®, 2017). Hastada gözlenen yan etkilere bağlı olarak bir kür sırasında veya kürler arasında doz azaltılmasına gidilebilir.

2.3.5. Gemsitabin hidroklorürün farmakokinetik özellikleri

Gemsitabinin hidroklorür lineer farmakokinetik göstermektedir. Plazma proteinlere bağlanması ihmal edilebilir düzeydedir. 70 dakikadan kısa süren infüzyon sonucunda dağılım hacminin 50 L/m^2 , daha uzun süren uygulama sonucunda ise 370 L/m^2 olduğu bulunmuştur. Yarılanma ömrü yaş ve cinsiyete bağlı olarak değişmekle birlikte kısa süreli infüzyon sonunda 42-94 dakika, uzun süreli infüzyon sonucunda ise 245-638 dakika arasında bulunmuştur. Sistemik klirens cinsiyet ve yaşa bağlı olarak $30,7 \text{ L/saat/m}^2$ ile $92,2 \text{ L/saat/m}^2$ arasında değişmektedir. Kadınlardaki klirens erkeklere göre yaklaşık olarak % 25 daha düşüktür. Yaşla birlikte hem kadınlarda hem de erkelerde klirens düşmektedir. Renal klirens $2-7 \text{ L/saat/m}^2$ 'dir (Gemzar®, 2017). İdrarla değişmeden atılan gemsitabin oranı % 10'dan daha azdır. Uygulamadan sonraki bir hafta içerisinde uygulanan gemsitabin dozunun %92 ile %98'i, başlıca inaktif metaboliti dFdU dönüşmüş formuyla idrarla atılmaktadır (Moen ve Wellington, 2005). Yaklaşık olarak % 1'lik kısmı ise feçesle atılmaktadır (Tani ve diğerleri, 2006).

2.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürleri, dokulardan ekstrakte edilen hücrelerin yapay bir ortamda büyütülmesiyle elde edilmektedir. Hücre kültürü çalışmalarında dokulardan enzimatik veya mekanik yöntemlerle izole edilen hücreler kontrol altında çoğaltılırlar. Hücre kültürü çalışmaları fizyolojisi ve biyokimyasal özellikleri standardize edilmiş hücrelerle, ilaçların etkinlikleri ve toksisitelerinin araştırılmasına imkan sağlar (Antoni ve diğerleri, 2015).

Hücre kültürü çalışmalarının kanser araştırmaları açısından önemi

Kanser tedavisi araştırmalarında hücre kültürü çalışmalarına sıkça başvurulmaktadır. Bu çalışmaların kanser tedavisinde sağlamış oldukları avantajlardan bazıları şunlardır (Ferreira ve diğerleri, 2013:141):

- Hücreler kolayca üretilebilir ve hücreler genetik olarak manüpile edilebilir,
- Solid tümörlerin heterojen yapısı analizlerini zorlaştırmaktadır. Hücre kültürleri homojen bir popülasyonla çalışma imkanı sağlamaktadır,
- Hücreler, kanserin kökenini oluşturan tümörlü yapıya yüksek benzerlik gösterir,
- Hücreler uygulanan ilaca karşı hızlı bir şekilde cevap oluşturur,
- Pek çok kanser türünde çalışmak için çeşitli hücre kültürleri bulunmaktadır,
- Hücreler uzun bir süre pasajlanıp kullanılabilir, kullanılabilmektedir,
- Deneyler aynı koşullarda gerçekleştiği için tekrarlanabilirliği yüksektir.

Genel itibarıyla meme kanseri hücreleri östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve HER2 pozitif veya negatif olmasına göre sınıflandırılmaktadır. Meme kanseri araştırmalarında sıklıkla kullanılan hücre türleri ve özellikleri Çizelge 2.13'de gösterilmiştir (Holliday ve Speirs, 2011).

Çizelge 2.13. Meme kanseri hücreleri ve sınıflandırılması

Sınıf	İmmünoprofil	Hücre örneği
Luminal A	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁻	MCF-7, T47D, SUM185
Luminal B	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁺	BT474, ZR-75
Basal	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	MDA-MB-468, SUM190, BT549, MDA-MB-231, Hs578T, SUM1315
HER2	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁺	SKBR3, MDA-MB-453

Luminal A, Luminal B ve HER2 grubundaki hücreler daha çok hormon tedavisinde tercih edilmektedir. Basal sınıfındaki hücreler hormon tedavisinde kullanılmaz, çok

daha dirençli ve agresiftir. Hücre proliferasyon ve sitotoksosite çalışmalarında metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT), 2,3-Bis(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum (XTT), Alamar mavisi ve Trypan mavisi sıklıkla kullanılmaktadır (Śliwka ve diğerleri, 2016).

2.4.1. Hücre proliferasyon ve sitotoksosite testleri

MTT ve XTT hücre canlılığı ve proliferasyonu deneylerinde sıklıkla kullanılan tetrazolium tuzlarıdır (Tsukatani ve diğerleri, 2009; Wang ve diğerleri, 2010). Her iki yöntemde de hücrelerdeki mitokondriyal dehidrojenaz enzim aktivitesi hücre canlılığını ölçmede kullanılmaktadır. Canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrojenaz enzim aktivitesi sonucu MTT indirgenerek suda çözünmeyen mor formozan kristallerine dönüşürken (Abe ve Matsuki, 2000), XTT indirgenerek suda çözünebilir turuncu formozan kristallerine dönüşür (Wang ve diğerleri, 2011). Daha sonra oluşan renkli kristaller spektrofotometrik olarak ölçülür.

Alamar mavisi (resazurin) oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları sonucu renk değişikliği meydana gelen bir boyadır. Canlı hücrelerdeki mitokondriyal aktivite sonucu bu renk değişikliği gerçekleşmekte ve hücre canlılığı bu renk değişikliği sonucu florometrik veya kalorimetrik olarak ölçülmektedir (O'Brien ve diğerleri, 2000). Alamar mavisi testi MTT testine göre daha hassas sonuçlar verebilmektedir (Hamid ve diğerleri, 2004). Trypan mavisi yönteminde ise ölü hücreler membran selektivitelerini kaybetmeleri sonucu stoplazmaları içerisine boyayı absorbe eder, yaşayan hücreler ise boyanmamış olarak kalır. Optik mikroskop kullanılarak boyanmış ve boyanmamış hücreler sayılır ve canlılık oranı belirlenir. Bu yöntemin hücre sayısı çok olduğunda sayımın uzun sürmesi gibi zorlukları vardır (Avelar-Freitas ve diğerleri, 2014).

2.5. Deney Tasarımı

Farmasötik endüstride deney tasarımı (Design of Experiment, DoE) son zamanlarda oldukça sık kullanılmaya başlanmıştır. Konvansiyonel formülasyon geliştirme çalışmaları, her seferde tek faktörün değiştirildiği, diğer faktörlerin sabit tutulduğu ve basamak basamak ilerleyen sistemlerdir. Ancak bu sistemlerde faktörler arası

etkileşimler incelenmemekte ve çok fazla zaman ve deney sayısına ihtiyaç duyulmaktadır. Deney tasarımı ise formülasyon gelişimindeki birçok parametreyi optimize eden, bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Deney tasarımı sonucu elde edilen matematiksel modeller sayesinde sonuçlar yorumlanabilir, optimizasyon yapılarak tasarım aralığı belirlenebilir. DoE daha az deneysel çalışma yapma, daha kolay problemi tanımlama ve önleme, kritik parametrelerin tanımlanması, optimum faktör seviyelerinin belirlenebilmesi, ölçek büyütme aşamasında proses optimizasyonu gibi avantajlara sahiptir (Demir ve diğerleri, 2017).

Deney tasarımı;

- Tam faktöriyel tasarım,
- Kısmi faktöriyel tasarım,
- Plackett-Burman tasarımı,
- Yanıt yüzey tasarımları olarak sınıflandırılır (NIST, 2013).

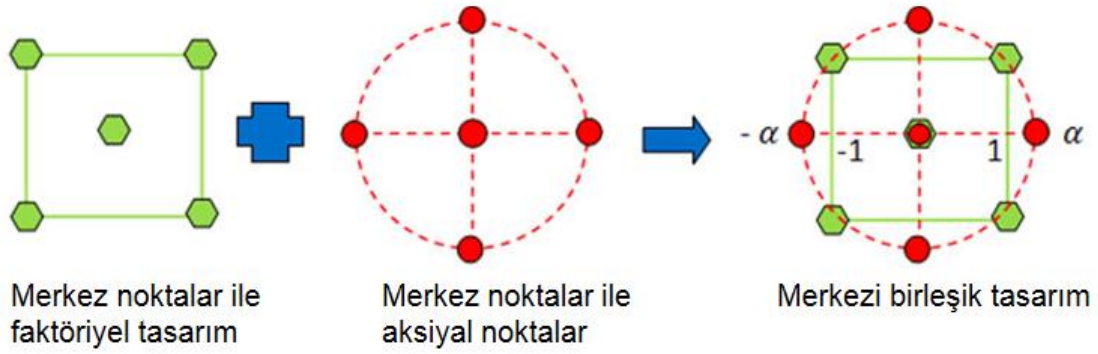
2.5.1. Yanıt yüzey tasarımları

Yanıt yüzey tasarımları bağımsız değişkenlerle cevaplar arasındaki bağlantıyı hızlı bir şekilde elde edilmesini sağlayan istatistiksel ve matematiksel temellere dayanan pek çok farklı alanda kullanılan bir tekniktir (Bezerra ve diğerleri, 2008). Yanıt yüzey tasarımında bağımsız değişkenlere karşı yanıt değişkenlerini daha kesin ve doğru tahmin edebilmek için etkileşim, karesel (2. dereceden) ya da kübik (3. dereceden) modeller kurularak gerçekleştirilir. Yanıt yüzey tasarımları üç grup altında incelenmektedir (Zolgharnein ve diğerleri, 2013):

1. Box Behnken tasarım
2. Doehlert tasarım
3. Merkezi birleşik tasarım

Merkezi birleşik tasarım

Bu tasarım iki seviyeli faktöriyel tasarım (tam veya kısmi), yıldız noktalar ve ilave merkez noktalardan oluşmaktadır. Yıldız noktalar en düşük ve en yüksek düzey noktalarıdır. Merkez noktalar her faktör için düşük ve yüksek seviyelerin ortasıdır. Merkez noktalar ölçümlerin tekrarlanabilirliğini ölçmek için birçok kez tekrarlanır. Merkezi birleşik tasarım faktöriyel tasarım, aksiyel noktalar ve merkez noktalarının tekrarlanmalarından oluşur (Khuri ve Mukhopadhyay, 2010). Şekil 2.17’de merkezi birleşik tasarımın şematize gösterimi bulunmaktadır.



Şekil 2.17. Merkezi birleşik tasarımın şematize gösterimi (Zhao ve diğerleri, 2012)

Tasarımdaki toplam deney sayısı $2^k + 2k + n$ ile bulunur. k bağımsız değişken sayısı iken n deneyin tekrarlanabilirliğini ölçmek için kullanılan merkez noktaların sayısıdır (Kollipara ve diğerleri, 2010). Yıldız noktalar merkez noktalara α kadar mesafededir (Zolgharnein ve diğerleri, 2013). $\alpha = (2^{k/4})$ ile hesaplanır (Çizelge 2.14). α 'nın tam değeri tasarım için istenen özelliklere ve içerdiği faktör sayısına bağlıdır. $-\alpha, -1, 0, 1, \alpha$ olmak üzere tasarımda her faktör beş seviye içerir.

Çizelge 2.14. Faktör sayısına göre hesaplanan α değerleri

Faktör sayısı	Faktöriyel miktar	α değeri
2	2^2	$2^{2/4} = 1.414$
3	2^3	$2^{3/4} = 1.682$
4	2^4	$2^{4/4} = 2.000$

Deney tasarımı sonucu elde edilen cevaplar programa yüklenerek tasarımı ifade eden en uygun model belirlenir. A, B ve C bağımsız değişkenler olmak üzere lineer modelde bağımsız değişkenler tek başlarına cevabı etkilerken (A, B ve C), 2FI (two-factor interaction) modelinde bağımsız değişkenlerle beraber iki farklı bağımsız değişkenin etkileşimleri de cevabı etkileyebilmektedir (A, B, C, AB, BC, AC). Cubic ve quadratic modellerde bağımsız değişkenlerin kendileriyle olan etkileşimlerinin de (A^2 , B^2 ve C^2) cevap üzerine etkisi incelenmektedir. Uygun modelin lack of fit tests bölümündeki Prob>F değerinin istatistiksel olarak anlamsız olması ($p>0,05$) olması gerekmektedir. Bağımsız değişkenlerden hangilerinin cevapları istatistiksel olarak etkilediğinin belirlenmesi için varyans analizi (ANOVA) program tarafından yapılır. Prob>F kısmındaki $p<0,05$ olan bağımsız değişkenler cevapları istatistiksel olarak anlamlı derecede etkilemektedir. Bağımsız değişkenlerden F değeri büyük olan cevabı istatistiksel açıdan en çok etkilemektedir. Program bağımsız değişkenlere ve cevaplara göre 3D yanıt yüzey grafikleri çizebilmektedir. Bu grafikler iki bağımsız değişkenin etkileşimleriyle birlikte cevapların değişimini göstermektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

1,2-dioleil-sn-glisero-3-fosfatidilkolin (DOPC)	Avanti Polar Lipids Inc, ABD
1,2-dipalmitoil-sn- glisero-3-fosfatidilkolin (DPPC)	Avanti Polar Lipids Inc, ABD
1,2-distearoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin -N-[Metoksi (PEG)-2000] (DSPE-PEG2000) (Amonyum tuzu)	Avanti Polar Lipids Inc, ABD
3-(4-5-dimetiltiyazol-2-il)-2-5-difenil -tetrazolyum bromit (MTT)	Life Technologies, ABD
Aseton	Sigma-Aldrich, Fransa
Asetonitril	Sigma-Aldrich, İsrail
Diklorometan	Sigma-Aldrich, ABD
Diyaliz membran (M.A. 12,400 kDa)	Sigma-Aldrich, ABD
Dulbelco's Modified Eagles's Medium	Capricorn, Almanya
Etanol	Sigma-Aldrich, Almanya
Etil asetat	Sigma-Aldrich, Fransa
Fetal bovine serum	Capricorn, Almanya
Gemko®	Koçak Farma, Türkiye
Gemcitabin hidroklorür	Sigma-Aldrich, ABD
Klorofom	Sigma-Aldrich, Almanya
Kolesterol	Avanti Polar Lipids Inc, ABD
Kumarin-6	Sigma-Aldrich, ABD
L- α -Soya fosfatidilkolin	Avanti Polar Lipids Inc, ABD
Lutrol F-68	BASF, Almanya
Mannitol	Merck, Almanya
Metanol	Sigma-Aldrich, İsrail
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, ABD
PVA (M.A. 13-23 kDa)	Sigma-Aldrich, ABD
PVA (M.A. 31-50 kDa)	Sigma-Aldrich, ABD

Resomer® RG 502 H	Evonik, Almanya
Resomer® RG 502	Evonik, Almanya
Resomer® RG 503 H	Evonik, Almanya
Resomer® RG 504	Evonik, Almanya
Resomer® RG 504 H	Evonik, Almanya
Resomer® RG 653 H	Evonik, Almanya
Resomer® RG 752 H	Evonik, Almanya
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich, Çek Cumhuriyeti
Steril fosfat tamponu (pH 7,4)	Life Technologies, ABD
Trehaloz	Tüm Ekip İlaç, Türkiye
Trypsin-EDTA	Capricorn, Almanya

3.1.2. Kullanılan alet ve malzemeler

0,22 µm naylon filtre	Sartorius, Almanya
96 gözlü plakalar	Thermo Scientific, Danimarka
Bidistile su ünitesi	Mes mp Minipure®, Türkiye
C18, 5 µm, 250 x 4.6 mm ters faz kolon	Waters, ABD
Diferansiyel tarama kalorimetresi	Shimadzu DSC-60, Japonya
Flasklar (25 cm ² ve 75 cm ²)	SPL Life Sciences, Kore
Floresan mikroskop	Leica, Almanya
Franz difüzyon hücreleri	Çalışkan Cam, Türkiye
FTIR spektrometre	Perkin Elmeri, ABD
HPLC	Hewlett-Packard 1050, Almanya
HPLC	Agilent 1220 LC, Almanya
İnkübatör	Sanyo, Japonya
Laminar akış	Clean Air, Almanya
Liyofilizatör	Christ-Alpha 1-2 LD plus, Almanya
Manyetik karıştırıcı	Thermo Scientific, Almanya
Otomatik pipet seti	Eppendorf, Almanya
Partikül büyüklüğü ölçme cihazı	Sympatec HELOS 0728, Almanya
Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçüm aleti	Malvern Zetasizer Nano, İngiltere
-80°C dondurucu	Thermo Scientific, ABD

Mikro plaka okuyucu	SpectraMax, ABD
pH metre	Sartorius, Almanya
Rotaevaporatör	Büchi, İsviçre
Santrifüj tüpleri	Isolab, Almanya
Santrifüj	Allegra X-30R, Almanya
SEM	Quanta 400F Field Emission, ABD
Stabilite kabini	Nüve TK 252, Türkiye
Steril pipet	Costar, ABD
Su banyosu	Nüve, Türkiye
Süzme kiti	Alltech, Türkiye
Tali görüntü tabanlı sitometre	Invitrogen, Kore
TEM	FEI Tecnai G ² Spirit, ABD
Terazi	Ohaus®, Çin
Termostatlı ısıtıcı	Nüve NB 20, Türkiye
Ultrasantrifüj	Hitachi CS 150GXL, Japonya
Ultrasonik banyo	Brainsonic 221, Almanya
UV spektrofotometre	Shimadzu UV 1700, Japonya
Vorteks	Nüve-NM 110, Türkiye

3.2. Yöntem

Tez çalışmalarında gemsitabin hidroklorür yüklü nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarının geliştirilmesi, formülasyonların karakterizasyonu, hücre kültürü çalışmaları ve hayvan deneyi çalışmaları yapılmıştır.

3.2.1. Etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri üzerine yapılan çalışmalar

Gemsitabin hidroklorürün erime derecesi tayini

Gemsitabin hidroklorürün erime derecesi tayini için Shimadzu DSC-60 (Japonya) cihazı ile diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) yöntemi kullanılmıştır. DSC, örnek ve referansın sıcaklıklarının aynı olması için gereken ısı miktarının ölçümüne dayanan termal analiz yöntemidir. Çalışma 10°C/dak tarama hızında 300°C'ye

kadar yapılmıştır. Örnekler 2 mg tartılarak alüminyum örnek kaplarına konulmuştur. Bu örnek referans boş hücreye karşı analiz edilmiş ve etkin madde termogramı elde edilmiştir. 20-300°C sıcaklık aralığında, azot atmosferi altında deney gerçekleştirilmiştir.

Gemsitabin hidroklorürün FTIR analizi

Gemsitabin hidroklorürün Fourier Transform Infrared (FTIR) spektrumları Perkin Elmer Spektrum 400 ATR-FT-IR spektrometresi ile alınmış ve dalga sayısı cm^{-1} cinsinden değerlendirilmiştir. FTIR ile yapılan analizde örnek gönderilen infrared ışığı absorbe eder, farklı dalga boylarında absorbe edilen enerji ölçülerek maddenin moleküler yapısı ve bileşenleri belirlenir. Farklı dalga boyunda elde edilen absorpsiyon bantları her bir madde için eşsizdir ve maddelerin tanınmasında kullanılır.

Gemsitabin hidroklorürün ortalama partikül boyutunun ve zeta potansiyelinin ölçülmesi

Etkin maddenin partikül büyüklüğünü ölçmek için Sympatec Helos Particle Sizer cihazı kullanılmıştır. Cihaz 0,1-8750 μm arasındaki partikül büyüklüğüne sahip tanecikleri ölçmeye elverişlidir ve çalışma prensibi partikül yüzeyine çarpan lazer ışığının kırılmasının belirlenmesidir. Gemsitabin hidroklorürün çözünmediği organik çözücü olan aseton içerisinde disperse edilerek ölçümler yapılmıştır. Gemsitabin hidroklorürün distile su içerisindeki çözeltisinin zeta potansiyeli ölçümünde ise Malvern Zetasizer Nano ZS aleti kullanılmıştır (n=3).

Gemsitabin hidroklorürün UV spektrofotometredeki dalga boyu taraması

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) analizlerine başlanmadan önce gemsitabin hidroklorürün UV spektrofotometre kullanılarak maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu (λ_{max}) belirlenmiştir. Dalga boyu taraması için gemsitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponu ve sıçan plazması içerisinde 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmış ve 200-900 nm arasında 1 cm'lik kuvarz küvetler kullanılarak köre karşı spektrumu alınmıştır.

3.2.2. Gemsitabin hidroklorürün miktar tayini yöntemlerinin geliştirilmesi

Gemsitabin hidroklorürün miktar tayini UV dedektörlü HPLC cihazı ile yapılmıştır. HPLC yöntemleri in vitro deneylerde; etkin maddenin enkapsülasyon etkinliği, yükleme kapasitesi, in vitro salım çalışmaları ve stabilite testlerinde (Yöntem 1) ve in vivo farmakokinetik çalışmalarda (Yöntem 2) kullanılmıştır.

Miktar tayini yöntemi (Yöntem 1)

Gemsitabin hidroklorürün miktarının tayin edildiği in vitro deneylerin gerçekleştirilmesi için Yöntem 1 (Paolino ve diğerleri, 2010) uygulanmış ve Hewlett-Packard Series 1050 HPLC kullanılmıştır. İn vitro deneyler için HPLC’de mobil faz oranları, akış hızı, enjeksiyon hacmi gibi parametreler değiştirilerek en uygun çalışma şartları belirlenmiştir. Gemsitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponu çözeltisindeki miktar tayini Çizelge 3.1’deki koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Gemsitabin hidroklorürün HPLC analiz yöntemi (Yöntem 1) parametreleri

Kolon	Reverse phase-C-18, 5 µm, 250×4,6 mm
Mobil faz	Asetonitril:su (5:95 h/h)
Akış debisi	1 mL/dakika
Enjeksiyon hacmi	20 µL
Bastırma (attenuation)	2-6
Eşik seviyesi (threshold)	2
Pik genişliği (Pk wd)	0,16
Dalga boyu	268 nm
Alıkonma zamanı	5,5 dakika

Analitik yöntem validasyonu (Yöntem 1)

Validasyon, kullanılan yöntemin devamlı olarak doğru ve güvenilir bir şekilde beklenen sonuçları verdiğinin kanıtlanması için yapılması gereken işlemler bütünüdür. Validasyon işlemleri ile yöntemin geçerliliği ve güvenilirliği kanıtlanmış

olur. Validasyon çalışmaları etkin madde enkapsülasyon etkinliği, yükleme kapasitesi ve diyaliz membran geçiş çalışmalarında kullanılan pH 7,4 fosfat tamponunda yapılmıştır.

Doğrusallık

Analitik yöntemin doğrusallığı, belirli bir konsantrasyon aralığı içerisindeki numuneler ile elde edilen yanıtın orantılı olduğunun ifadesidir. Doğrusallık parametresini göstermek için pH 7,4 fosfat tamponu içinde gemitabin hidroklorürün stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden uygun seyreltmeler yapılarak 10 farklı derişim (0,01-5 µg/mL) hazırlanmış ve HPLC'ye enjekte edilmiştir. Konsantrasyonlara karşılık gelen pik yükseklikleri bulunmuştur. 3 ayrı stok çözeltiden elde edilen farklı konsantrasyonlara karşılık elde edilen pik yüksekliklerine en küçük kareler yöntemi uygulanmıştır ve standart doğru denklemi elde edilmiştir. Gerekli istatistiksel parametreler hesaplanmıştır.

Doğruluk ve geri elde

Analiz yönteminin doğruluğu, ölçülen değerin, gerçek değere yakınlığıdır. Miktar tayini yönteminin doğruluğu geri elde etme yüzdesine bağlıdır. %95 olasılıkla daha önceden kabul edilen ölçütler arasında kalmalıdır. Gemitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde hazırlanan %80, %100 ve %120 gemitabin hidroklorür içeren çözeltilerinde kalibrasyon denklemi kullanılarak geri elde miktarları hesaplanmış ve gerekli istatistiksel parametrelerle değerlendirilmiştir.

Kesinlik

Kesinlik, bir yöntemin birbirini izleyen ölçümleri arasındaki yakınlığın derecesini ifade etmektedir. Analitik yöntemin kesinliğini tayin etmek amacıyla deney içi ve deneyler arası kesinlik çalışmaları yapılmıştır. Kesinlik ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı ile değerlendirilmiştir.

➤ Deney içi kesinlik (Tekrar edilebilirlik)

Gemsitabin hidroklorürün kalibrasyon doğru denklemini oluşturmak için pH 7,4 fosfat tamponu içerisindeki stok çözeltiden 0,2 µg/mL derişimde hazırlanan çözelti arka arkaya 10 kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçların ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır.

➤ Deneyler arası kesinlik (Tekrar elde edilebilirlik)

Gemsitabin hidroklorürün kalibrasyon denklemini oluşturmak için hazırlanan stok çözeltiden uygun seyreltmeler yapılarak 0,2; 0,4; 1,2; 5 µg/mL derişimlerde çözeltileri hazırlanmıştır. Bu numuneler birbirini takip eden 3 gün içerisinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Elde edilen pik yüksekliklerine karşılık gelen derişimlerin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır.

Özgünlük ve seçicilik

Kullanılan analiz yönteminin sadece analiz etmek istenilen maddeyi saptaması gerekmektedir. Formülasyon içindeki yardımcı maddelerin aynı dalga boyunda absorbands gösterip göstermediğinin kontrolü yapılmıştır. Bu amaçla etkin madde içermeyen nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonları pH 7,4 fosfat tamponu içinde disperse edilip 268 nm dalga boyunda HPLC'ye enjekte edilmiştir.

Duyarlılık ve saptama sınırı

Duyarlılık bir analitik yöntemin saptayabileceği en küçük konsantrasyon değeri olup saptayabilme sınırı (LOD) ve kantitatif olarak tayin edilebileceği en küçük konsantrasyon değeri (LOQ) ile ifade edilir. Duyarlılık ve saptama sınırı şu denklemlerle hesaplanır.

$$\text{Duyarlılık sınırı (LOD)} = (3,3 \times \sigma) / S$$

$$\text{Saptama sınırı (LOQ)} = (10 \times \sigma) / S$$

σ: kalibrasyon aralığındaki en düşük derişimin standart sapması

S: kalibrasyon eğrisinin eğimi

Gemsitabin hidroklorürün çözeltisinin farklı sıcaklık koşullarındaki stabilite çalışmaları

Gemsitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponu içindeki 1 µg/mL konsantrasyondaki çözeltileri stabilite çalışmalarında kullanılmıştır. Çözeltilerin 4°C, 25°C ve 37°C sıcaklıklarda 15 gün süreyle stabiliteleri incelenmiştir. Numuneler başlangıç (0. gün), 5. 10. ve 15. günlerde alınarak miktar tayini Yöntemi 1'e göre HPLC ile tayin edilmiştir.

Miktar tayini yöntemi (Yöntem 2)

Bu yöntem in vivo deneylerde kullanılmak için geliştirilmiştir. Miktar tayini yöntemine geçmeden önce gemsitabin hidroklorürün plazmadaki dalga boyu taraması yapılmıştır. Gemsitabin hidroklorürün in vivo çalışmalardan elde edilen örneklerle miktar tayini, literatürde belirtilen HPLC yöntemi (Pitrubhakta ve diğerleri, 2012) modifiye edilerek Çizelge 3.2'de belirtilen koşullarda yapılmıştır.

Çizelge 3.2. Gemsitabin hidroklorürün biyoanalitik tayininde kullanılan HPLC yöntemi (Yöntem 2) parametreleri

Kolon	Reverse phase-C-18, 5 µm, 250×4,6 mm
Mobil faz	Asetonitril:su (5:95 h/h)
Akış debisi	1 mL/dakika
Kolon sıcaklığı	30°C
Enjeksiyon hacmi	100 µL
Dalga boyu	268 nm
Alıkonma zamanı	5,5 dakika

Analiz için plazma numunelerinin elde edilmesi

Sprague Dawley türü sıçanlardan alınan kan numuneleri heparinli tüplere konarak, 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve plazmanın ayrılması sağlanmıştır. Elde edilen plazma toplanıp -18°C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

Analiz edilecek etkin madde içeren plazma numunesinin hazırlanması

Etkin maddenin bidistile su içerisinde farklı derişimlerde çözeltisi hazırlanmıştır. 100 µL plazma içerisinde etkin madde içeren 200 µL çözelti ve 300 µL asetronitril ilave edilerek numuneler hazırlanmıştır. Numuneler 30 saniye vorteks karıştırıcı ile karıştırılmıştır ve 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım alınıp 0,22 µm'lik membran filtreden süzölmüştür. Hazırlanan bu analiz numunesinin 100 µL'si HPLC sistemine enjekte edilerek analiz edilmiştir. İn vivo çalışmalar için Agilent 1220 LC HPLC kullanılmıştır.

Biyoanalitik yöntemin validasyonu (Yöntem 2)

Kullanılan yöntemin kabul edilebilirliğini sağlayan validasyon parametrelerinden; doğrusalılık, doğruluk, özgünlük, ekstraksiyon etkinliği, plazma numunelerinin stabilitesi, duyarlılık ve saptama sınırı incelenmiştir.

Doğrusallık

Doğrusallık, belirli bir konsantrasyon aralığı içerisindeki numuneler ile elde edilen yanıtın orantılı olduğunun ifadesidir. Gemsitabin hidroklorürün plazma içerisindeki 12 farklı derişimde (0,2-10 µg/mL) 3 ayrı seri çözeltisi hazırlanmıştır ve HPLC'ye enjekte edilmiştir. Konsantrasyonlara karşılık gelen pik alanları bulunmuştur. Gemsitabin hidroklorürün farklı konsantrasyonlara karşılık elde edilen pik alanlarına en küçük kareler yöntemi uygulanmıştır ve standart doğru denklemi elde edilmiştir. Gerekli istatistiksel parametreler hesaplanmıştır.

Doğruluk

Analiz yönteminin doğruluğu, ölçölen değerin, gerçek değere yakınlığıdır. Miktar tayini yönteminin doğruluğu geri elde etme yüzdesine bağlıdır.

Ekstraksiyon etkinliği (Geri elde)

Gemsitabin hidroklorürün plazma içerisinde hazırlanan %80, %100 ve %120 gemsitabin hidroklorür içeren çözeltileri HPLC'ye enjekte edilmiş ve elde edilen pik alanlarından kalibrasyon denklemi kullanılarak ekstraksiyon etkinliği hesaplanmıştır.

Kesinlik

Kesinlik, bir yöntemin birbirini izleyen ölçümleri arasındaki yakınlığın derecesini ifade etmektedir. Analitik yöntemin kesinliğini tayin etmek amacıyla deney içi ve deneyler arası kesinlik çalışmaları yapılmıştır. Kesinlik ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı ile değerlendirilmiştir.

➤ Deney içi kesinlik (Tekrar edilebilirlik)

Gemsitabin hidroklorürün kalibrasyon doğru denklemini oluşturmak için sıçan plazması içerisindeki stok çözeltisinden uygun seyreltmeler yapılarak hazırlanan çeşitli derişimdeki çözeltilerden seçilen 3 µg/mL derişimdeki hazırlanan çözeltisi arka arkaya 10 kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçların ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır.

➤ Deneyler arası kesinlik (Tekrar elde edilebilirlik)

Gemsitabin hidroklorürün plazma içerisinde 0,4; 1; 2; 5 µg/mL derişimlerde çözeltileri hazırlanmıştır. Bu numuneler birbirini takip eden 3 gün içerisinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen derişimlerin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır.

Özgünlük ve seçicilik

Kullanılan analiz yönteminin sadece analiz etmek istenilen maddeyi saptaması gerekmektedir. Numune içinde var olan diğer maddelerin aynı dalga boyunda

saptanıp saptanmadığının kontrolü yapılmıştır. Bu amaçla etkin madde içermeyen LPHNP formülasyonu 268 nm dalga boyunda HPLC'ye enjekte edilmiştir.

Duyarlılık ve saptama sınırı

Duyarlılık bir analitik yöntemin saptayabileceği en küçük konsantrasyon değeri olup saptayabilme sınırı (LOD) ve kantitatif olarak tayin edilebileceği en küçük konsantrasyon değeri (LOQ) ile ifade edilir. Duyarlılık ve saptama sınırı aşağıdaki denklemlerle hesaplanır.

$$\text{Duyarlılık sınırı (LOD)} = (3,3 \times \sigma) / S$$

$$\text{Saptama sınırı (LOQ)} = (10 \times \sigma) / S$$

σ : kalibrasyon aralığındaki en düşük derişimin standart sapması

S: kalibrasyon eğrisinin eğimi

Plazma örneklerinin stabilitesi

Gemsitabin hidroklorürün plazma içerisinde 0,4; 1 ve 5 µg/mL derişimdeki örnekleri hazırlanmış -18°C'de 2 ay boyunca bekletilmiştir. Numuneler başlangıç (0.gün), 15. 30. ve 60. günde alınarak miktar tayini Yöntem 2'ye göre HPLC ile tayin edilmiştir.

3.3. Formülasyon Çalışmaları

3.3.1. Etkin madde yardımcı madde etkileşimleri

Gemsitabin hidroklorür ile hazırlanan nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarında kullanılan maddeler arasında etkileşim olup olmadığının incelenmesi için diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) analizi yapılmıştır.

DSC analizi

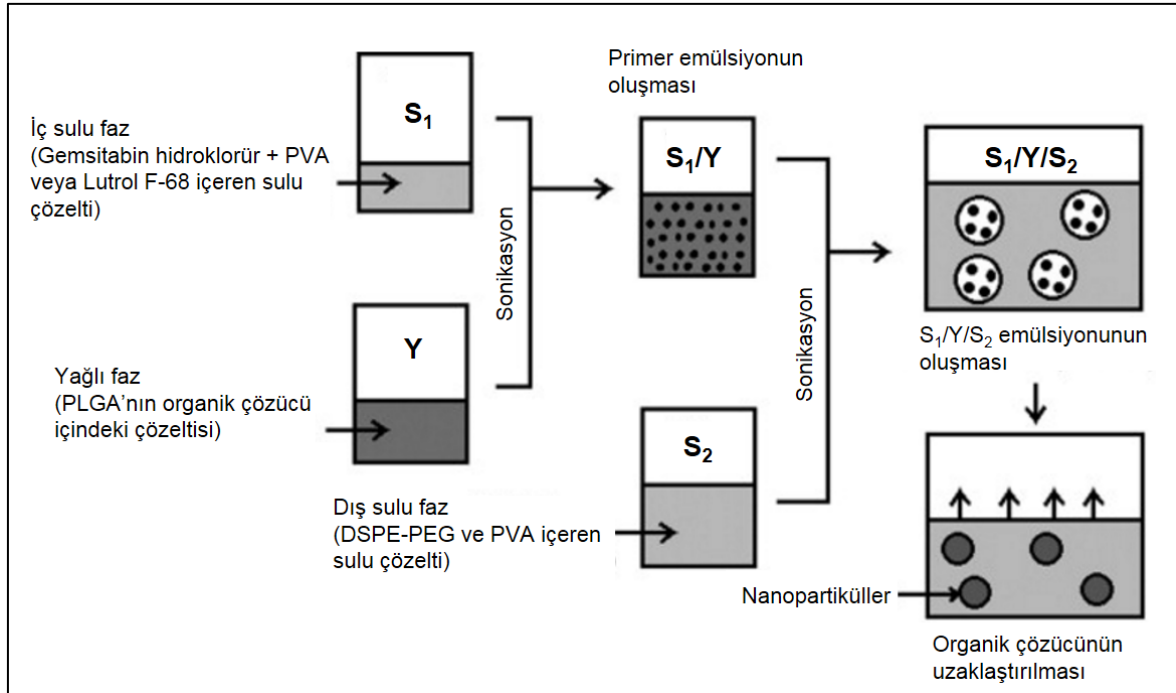
Çalışmalar 10°C/dak tarama hızında 300°C'ye kadar yapılmıştır. Nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarını hazırlamada kullanılan yardımcı maddelerin tek başlarına ve etkin madde içeren fiziksel karışımları ile liyofilize formülasyonların

termogramları incelenmiştir. Örnekler 2 mg tartılarak alüminyum örnek kaplarına konulmuştur. Alüminyum kapak kapatılarak aletin ısıtma hücresine yerleştirilmiştir. 20-300°C sıcaklık aralığında, azot atmosferi altında deneyler gerçekleştirilmiştir.

3.3.2. Gempitabin hidroklorür içeren nanopartikül hazırlama yöntemi

Gempitabin hidroklorür yüklü nanopartiküllerin hazırlanmasında modifiye çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi (Mondalek ve diğerleri, 2008; Shi ve diğerleri, 2013) kullanılmıştır. Formülasyonların hazırlanmasında farklı laktik asit/glikolik asit içeren, farklı molekül ağırlığına ve farklı terminal gruba sahip PLGA'lar denenmiştir. PLGA farklı çözücü/çözücü karışımları içinde çözülmüş ve organik çözücülerin nanopartiküllerin karakterizasyon üzerine etkileri incelenmiştir.

Bu yöntemde etkin madde yüzey etkin madde içeren (PVA veya Lutrol F-68) sulu çözelti (S_1) içinde çözülmüştür. Etkin madde içeren çözelti organik çözücü içerisinde çözünen PLGA çözeltisine (Y) ilave edilmiştir, ultrasonik homojenizatör ile sonike edilmiş ve S_1/Y primer emülsiyonu elde edilmiştir. Oluşan primer emülsiyon DSPE-PEG ve PVA'nın sulu çözeltisine (S_2) ilave edilerek, ultrasonik homojenizatör ile sonike edilmiş ve $S_1/Y/S_2$ emülsiyonları oluşturulmuştur. Vakum altında çalıştırılan evaporatör ile organik çözücü uzaklaştırılmış ve 18000 rpm'de yapılan santrifüj işlemi sonucunda nanopartiküllerin çöktürülmesi sağlanmıştır. Süpernatant kısım uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen çökelek liyoprotektan içeren sulu çözelti ile dağıtılmıştır ve -55°C de 40 saat liyofilize edilmiştir. Şekil 3.1'de modifiye çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi şematize edilmiştir.



Şekil 3.1. Modifiye çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi ile nanopartiküllerin hazırlanması (Miladi ve diğerleri, 2014)

3.3.3. Gemsitabin hidroklorür içeren nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesi üzerine çalışmalar

Nanopartikül hazırlamada kullanılan PLGA'lar ve özellikleri

Gemsitabin hidroklorür içeren nanopartiküller hazırlanırken farklı laktik asit/glikolik asit içeriğine, farklı molekül ağırlıklarına ve farklı terminal fonksiyonel gruplara sahip PLGA'lar kullanılmıştır. Bu PLGA'lar ve fizikokimyasal özellikleri Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. PLGA polimerlerine ait fizikokimyasal özellikler

Ticari Adı	Polimer	Molekül Ağırlığı	Vizkozite (dL/g)	Terminal Fonksiyonel Grubu
Resomer RG 502	Poli (laktik-ko-glikolik asit) 50:50	7-17 kDa	0,16-0,24	Alkil ester
Resomer RG 502 H	Poli (laktik-ko-glikolik asit) 50:50	7-17 kDa	0,16-0,24	Serbest karboksilik asit
Resomer RG 503 H	Poli (laktik-ko-glikolik asit) 50:50	24-38 kDa	0,32-0,44	Serbest karboksilik asit
Resomer RG 504	Poli (laktik-ko-glikolik asit) 50:50	38-54 kDa	0,45-0,60	Alkil ester
Resomer RG 504 H	Poli (laktik-ko-glikolik asit) 50:50	38-54 kDa	0,45-0,60	Serbest karboksilik asit
Resomer RG 653 H	Poli (laktik-ko-glikolik asit) 65:35	24-38 kDa	0,32-0,44	Serbest karboksilik asit
Resomer RG 752 H	Poli (laktik-ko-glikolik asit) 75:25	4-15 kDa	0,14-0,22	Serbest karboksilik asit

Gemsitabin hidroklorür içeren nanopartikül formülasyonlarında yapılan ön çalışmalar

Gemsitabin hidroklorür içeren nanopartikül formülasyonu hazırlamak üzere ön çalışmalar yapılmıştır. Modifiye çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi kullanılarak formülasyonlar hazırlanmıştır. Bu çalışmalarda PLGA miktarının ve kullanılan yüzey etkin maddenin formülasyon üzerindeki etkisi incelenmiştir. Primer ve çift emülsiyon oluşturulması sırasında tüm formülasyonlarda 60'ar saniye ultrasonik homojenizatör uygulanmıştır. Ön deneme çalışmalarında liyofilizasyon basamağında liyoprotektan kullanılmamıştır. Çizelge 3.4.'te ön çalışma formülasyonlarına ait bilgilere yer verilmiştir.

Çizelge 3.4. Gemsitabin hidroklorür içeren nanopartikül formülasyonlarında yapılan ön çalışmalar

		Ö-NP1	Ö-NP2	Ö-NP3	Ö-NP4	Ö-NP5	Ö-NP6
Organik faz (5 mL)	PLGA 50:50 (7-17 kDa) (mg)	25	50	75	100	50	50
	Diklorometan (mL)	5	5	5	5	5	5
İç sulu faz (2 mL)	Gemsitabin hidroklorür (mg)	2	2	2	2	2	2
	PVA (13-23 kDa) (mg)	10	10	10	10	-	-
	PVA (31-50 kDa) (mg)	-	-	-	-	10	-
	Lutrol F-68 (mg)	-	-	-	-	-	10
Dış sulu faz (15 mL)	PVA (13-23 kDa) (mg)	150	150	150	150	-	-
	PVA (31-50 kDa) (mg)	-	-	-	-	150	150

Ön çalışmalar sonucunda liyofilizasyon işleminin nanopartiküllerin partikül boyutunu artırdığı bunu engellemek için liyoprotektan kullanılması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır. PLGA konsantrasyonunun artmasının enkapsülasyon etkinliğini artırdığı, yüksek molekül ağırlıklı PVA ile hazırlanan formülasyonun daha yüksek enkapsülasyon etkinliği gösterdiği ve iç fazda farklı bir sürfaktan olarak Lutrol F-68 kullanıldığında 400 nm'den büyük partiküllerin elde edildiği gözlenmiştir. Nanopartikül formülasyonlarını hazırlamada organik faz olarak sadece DCM kullanıldığında partikül boyutunun büyük olduğu gözlenmiş ve bundan sonraki çalışmalarda DCM:ACE (1:1 h/h) karışımı organik çözücü olarak kullanılmıştır. PVA (13-23 kDa) sürfaktan olarak kullanıldığında düşük enkapsülasyon etkinliği ve büyük partikül boyutu elde edilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda sürfaktan olarak iç ve dış fazda PVA (31-50 kDa) kullanılmasına karar verilmiştir.

Gemsitabin hidroklorür yüklü nanopartikül formülasyonları geliştirme çalışmaları

Nanopartiküllerin hazırlanmasındaki ön çalışmalardan elde edilen veriler sonucunda formülasyon geliştirme çalışmalarına geçilmiştir. Bu çalışmadaki amaç yüksek enkapsülasyon etkinliği ve düşük partikül boyutu elde edebilmektir. Bu aşamada;

- PLGA miktarının etkisi,
- Etkin madde miktarının etkisi,
- Asit veya ester yapıdaki PLGA polimerinin etkisi,
- Organik çözücü/çözücü karışımının etkisi,
- PLGA polimerinin molekül ağırlığının etkisi,
- PLGA polimerinin laktik asit/glikolik asit oranının etkisinin incelenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır.

PLGA miktarının etkisi

PLGA miktarının etkisini incelemek için PLGA 50:50 (7-17 kDa) asit terminal fonksiyonel gruba sahip polimer kullanılmıştır. Hazırlanan formülasyonlara ait bilgiler Çizelge 3.5’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. Farklı PLGA miktarları kullanılarak hazırlanan formülasyonlar

Organik faz	PLGA 50:50 (7-17 kDa) (Asit)	160 mg (NP1) 240 mg (NP2) 320 mg (NP3)
	Organik çözücü	4 mL DCM:ACE (1:1 h/h)
İç sulu faz	Gemsitabin hidroklorür	4 mg
	PVA (31-50 kDa) (%1)	1,6 mL
Dış sulu faz	PVA (31-50 kDa) (%2)	6 mL

Bu çalışma sonucunda PLGA miktarı arttıkça enkapsülasyon etkinliğinin arttığı bulunmuştur. 320 mg PLGA kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerin partikül

boyutunun 240 mg PLGA kullanılarak hazırlanan formülasyona göre büyük olduğu gözlenmiş ve bundan sonraki çalışmalara 240 mg polimer kullanılarak devam edilmesine karar verilmiştir.

Etkin madde miktarının etkisi

Etkin madde miktarının etkisini incelemeye yönelik hazırlanan nanopartiküllerde 4 mg ve 2 mg etkin madde içeren formülasyonlar hazırlanmıştır. Çizelge 3.6'da etkin madde etkisini incelemeye yönelik hazırlanan formülasyonlara ait bilgiler yer almaktadır.

Çizelge 3.6. Farklı miktarda etkin madde kullanılarak hazırlanan formülasyonlar

Organik faz	PLGA 50:50 (7-17 kDa) (Asit)	240 mg
	Organik çözücü	4 mL DCM:ACE (1:1 h/h)
İç sulu faz	Gemcitabin hidroklorür	4 mg (NP2) 2 mg (NP4)
	PVA (31-50 kDa) (%1)	1,6 mL
Dış sulu faz	PVA (31-50 kDa) (%2)	6 mL

Bu deney sonucunda formülasyonlar arasında % enkapsülasyon etkinliği ve partikül büyüklüğü açısından anlamlı fark gözlenmemiş, etkin madde gemcitabin hidroklorürün pahalı olmasından dolayı bundan sonraki çalışmalarda 2 mg etkin madde kullanılmasına karar verilmiştir.

Farklı terminal gruba sahip PLGA kullanılarak hazırlanan formülasyonlar

Farklı terminal gruba sahip PLGA seçiminin formülasyonlar üzerine etkisinin incelenmesi için PLGA 50:50 polimerinin asit veya ester terminal gruba sahip polimerleri kullanılmıştır. PLGA'nın farklı terminal fonksiyonel gruba sahip polimerleri kullanılarak hazırlanan formülasyonlara ait bilgiler Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Farklı terminal fonksiyonel gruba sahip PLGA polimeri kullanılarak hazırlanan formülasyonlar

Organik faz	PLGA 50:50 (7-17 kDa) (Asit)	240 mg (NP4)
	PLGA 50:50 (38-54 kDa) (Asit)	240 mg (NP5)
	PLGA 50:50 (7-17 kDa) (Ester)	240 mg (NP6)
	PLGA 50:50 (38-54 kDa) (Ester)	240 mg (NP7)
	Organik çözücü	4 mL DCM:ACE (1:1 h/h)
İç sulu faz	Gemsitabin hidroklorür	2 mg
	PVA (31-50 kDa) (%1)	1,6 mL
Dış sulu faz	PVA (31-50 kDa) (%2)	6 mL

Asit terminal fonksiyonel gruba sahip PLGA polimerleri seçiminin hidrofilik karakterdeki gemsitabin hidroklorürün taşıyıcı sisteme yüklenmesinde gerek partikül boyutu gerekse enkapsülasyon etkinliği açısından daha iyi sonuçlar verdiği gözlenmiş ve bundan sonraki çalışmalarda asit terminal gruba sahip PLGA polimerlerinin kullanılmasına karar verilmiştir.

Organik çözücü/çözücü karışımlarının etkisi

Farklı organik çözücü/çözücü karışımlarının formülasyonlar üzerine etkisini incelemek için polimer olarak PLGA 50:50 (7-17 kDa) kullanılmıştır. Farklı organik çözücü/çözücü karışımları kullanılarak hazırlanan formülasyonlara ait bilgiler Çizelge 3.8’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.8. Organik çözücü/çözücü karışımlarının etkisi incelemeye yönelik hazırlanan formülasyonlar

Organik faz	PLGA 50:50 (7-17 kDa) (Asit)	240 mg
	Organik çözücü	4 mL DCM (NP8) 4 mL Aseton (NP9) 4 mL Etil asetat (NP10) 4 mL DCM:Etil asetat (1:1 h/h) (NP11) 4 mL DCM:ACE (1:1 h/h) (NP4) 4 mL DCM:ACE (1:2 h/h) (NP12) 4 mL DCM:ACE (1:4 h/h) (NP13)
İç sulu faz	Gemsitabin hidroklorür	2 mg
	PVA (31-50 kDa) (%1)	1,6 mL
Dış sulu faz	PVA (31-50 kDa) (%2)	6 mL

Organik çözücü olarak sadece etil asetat ve sadece diklorometan kullanılan formülasyonlarda partikül büyüklüğü yüksek bulunmuştur. Sadece aseton kullanıldığında stabil bir primer emülsiyonun hazırlanamadığı, enkapsülasyon etkinliğinin düştüğü görülmüştür. Farklı organik çözücü karışımları kullanılan formülasyonlar içerisinde partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinliği açısından DCM:ACE (1:1 h/h) ve (1:2 h/h) karışımları uygun bulunmuştur ve ilerleyen çalışmalarda bu çözücü karışımları kullanılmıştır. Organik çözücü olarak DCM:ACE (1:1 h/h) ve (1:2 h/h) karışımları kullanıldığında farklı molekül ağırlığına ve farklı laktik asit/glikolik asit oranına sahip PLGA polimerlerinin formülasyonlar üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Farklı molekül ağırlığına sahip PLGA kullanılarak hazırlanan formülasyonlar

Polimerin molekül ağırlığının formülasyonlar üzerindeki etkisini incelemek için organik çözücü olarak DCM:ACE (1:1 h/h) ve (1:2 h/h) karışımları kullanılmıştır. Formülasyonlarda PLGA 50:50'nin farklı molekül ağırlığına sahip polimerleri (7-17 kDa, 24-38 kDa ve 38-54 kDa) kullanılmıştır. PLGA'nın farklı molekül ağırlıklı polimerleri kullanılarak hazırlanan formülasyonlara ait bilgiler Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3.9. Farklı molekül ağırlığına sahip PLGA'lar kullanılarak hazırlanan formülasyonlar

		DCM:ACE (1:1 h/h)	DCM:ACE (1:2 h/h)
Organik faz	PLGA 50:50 (7-17 kDa) (Asit)	240 mg (NP4)	240 mg (NP12)
	PLGA 50:50 (24-38 kDa) (Asit)	240 mg (NP14)	240 mg (NP15)
	PLGA 50:50 (38-54 kDa) (Asit)	240 mg (NP5)	240 mg (NP16)
	Organik çözücü	4 mL	4 mL
İç sulu faz	Gemsitabin hidroklorür	2 mg	2 mg
	PVA (31-50 kDa) (%1)	1,6 mL	1,6 mL
Dış sulu faz	PVA (31-50 kDa) (%2)	6 mL	6 mL

Farklı molekül ağırlığına sahip PLGA'lar kullanılarak hazırlanan formülasyonlardan elde edilen veriler sonucunda polimerin molekül ağırlığı arttıkça taşıyıcı sistemin partikül boyutunun ve gemsitabin hidroklorürün enkapsülasyon etkinliğinin arttığı gözlenmiştir. Bu aşamadan sonra farklı laktik asit/glikolik asit oranına sahip polimer kullanımının formülasyonlar üzerine etkisi incelenmiştir.

Farklı laktik asit/glikolik asit oranına sahip PLGA polimeri kullanılarak hazırlanan formülasyonlar

Polimerin farklı laktik asit/glikolik asit oranına sahip olmasının formülasyonlar üzerindeki etkisini incelemek için organik çözücü olarak DCM:ACE (1:1 h/h) ve (1:2 h/h) karışımları kullanılmıştır. Farklı laktik asit/glikolik asit oranına sahip formülasyonlarının hazırlanması için PLGA 50:50, PLGA 65:35 ve PLGA 75:25 polimerleri kullanılmıştır. Formülasyonlara ait bilgiler Çizelge 3.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.10. Farklı laktik asit/glikolik asit oranına sahip PLGA polimeri kullanılarak hazırlanan formülasyonlar

		DCM:ACE (1:1 h/h)	DCM:ACE (1:2 h/h)
Organik faz	PLGA 50:50 (24-38 kDa) (Asit)	240 mg (NP14)	240 mg (NP15)
	PLGA 65:35 (24-38 kDa) (Asit)	240 mg (NP17)	240 mg (NP19)
	PLGA 75:25 (4-15 kDa) (Asit)	240 mg (NP18)	240 mg (NP20)
	Organik çözücü	4 mL	4 mL
İç sulu faz	Gemcitabin hidroklorür	2 mg	2 mg
	PVA (31-50 kDa) (%1)	1,6 mL	1,6 mL
Dış sulu faz	PVA (31-50 kDa) (%2)	6 mL	6 mL

Her iki organik çözücü karışımı kullanıldığında da PLGA içerisindeki laktik asit/glikolik asit oranı arttıkça enkapsülasyon etkinliğinin düştüğü ve partikül boyutunun arttığı belirlenmiştir.

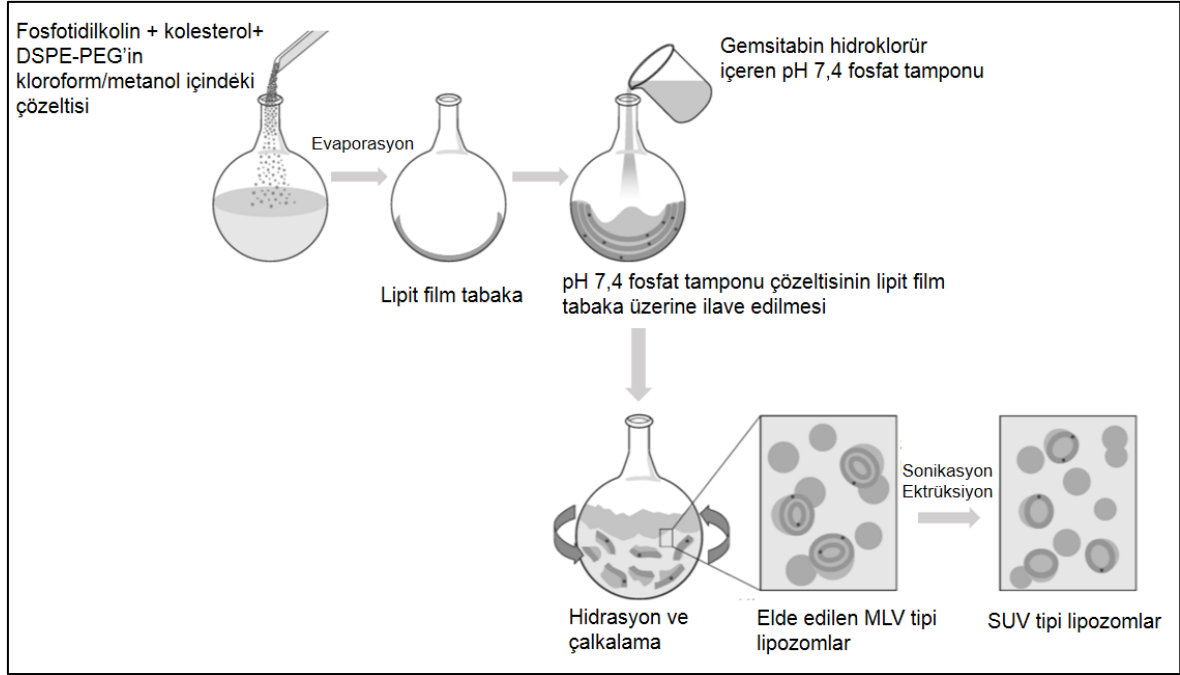
Farklı laktik asit/glikolik asit oranlarına sahip polimer karışımları kullanılmasının formülasyonların partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi incelenmiştir. En yüksek enkapsülasyon etkinliği gösteren PLGA 50:50 polimeri ile PLGA 65:35 ve PLGA 75:25 polimeri (1:1 a/a) karışımları kullanılmıştır. PLGA 50:50 ile PLGA 65:35 (1:1 a/a) karışımından hazırlanan formülasyon en yüksek enkapsülasyon etkinliği göstermiş ve bu formülasyon pegile edilmiştir. Formülasyonlara ait bilgiler Çizelge 3.11’de verilmiştir.

Çizelge 3.11. PLGA 50:50/PLGA 65:35 ve PLGA 50:50/PLGA 75:25 polimer karışımları kullanılarak hazırlanan formülasyonlara ait bilgiler

		NP21	NP22	PEG NP21
Organik faz	PLGA 50:50 (38-54 kDa) (Asit)	120 mg	120 mg	120 mg
	PLGA 65:35 (24-38 kDa) (Asit)	120 mg	-	120 mg
	PLGA 75:25 (4-15 kDa) (Asit)	-	120 mg	-
	Organik çözücü (DCM:ACE) (1:2 h/h)	4 mL	4 mL	4 mL
İç sulu faz	Gemsitabin hidroklorür	2 mg	2 mg	2 mg
	PVA (31-50 KDa) (%1)	1,6 mL	1,6 mL	1,6 mL
Dış sulu faz	PVA (31-50 KDa) (%2)	6 mL	6 mL	6 mL
	DSPE-PEG ₂₀₀₀	-	-	15 mg

3.3.4. Gemsitabin hidroklorür içeren lipozom formülasyonlarının geliştirilmesi üzerine çalışmalar

Lipozom formülasyonlarının hazırlanmasında lipit film hidrasyon yöntemi (Pitruhbakta ve diğerleri, 2012; Alinaghi ve diğerleri, 2014) kullanılmıştır. Bu yöntemde farklı fosfatidilkolin türleri kolesterol ile beraber kloroform/metanol karışımında armut tipi cam balon içerisinde farklı molar oranlarda çözülmüştür. Organik çözücü karışımı vakum altında evaporatörde uçurulmuştur ve lipit tabaka elde edilmiştir. Lipit tabaka gemsitabin hidroklorür içeren pH 7,4 fosfat tamponu ile hidrate edilmiş ve 45°C deki su banyosunda 1 saat bekletildikten sonra 30 dk ultrasonik banyoda sonike edilerek MLV tipi lipozomlar oluşturulmuştur. Oluşan lipozomlara partikül boyutunu küçültmek için ekstrüksiyon işlemi uygulanmıştır. Bu amaçla lipozomlar sırasıyla 800, 400 ve 200 nm'lik polikarbonat membran filtrelerden 10'ar defa geçirilerek SUV tipi lipozomlar elde edilmiştir. Süspande haldeki lipozomlara 50000 rpm'de 45 dakika santrifüj uygulanmış ve çökmeleri sağlanmıştır. Elde edilen çökelek liyoprotektan içeren sulu çözelti ile dağıtılmış ve -55°C de 40 saat liyofilize edilmiştir. Şekil 3.2'de lipit film hidrasyon yöntemiyle lipozomların hazırlanışı gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Lipit film hidrasyon yöntemi ile lipozomların hazırlanması (Avanti Polar Lipids, 2017)

Hazırlanan lipozom formülasyonlarında;

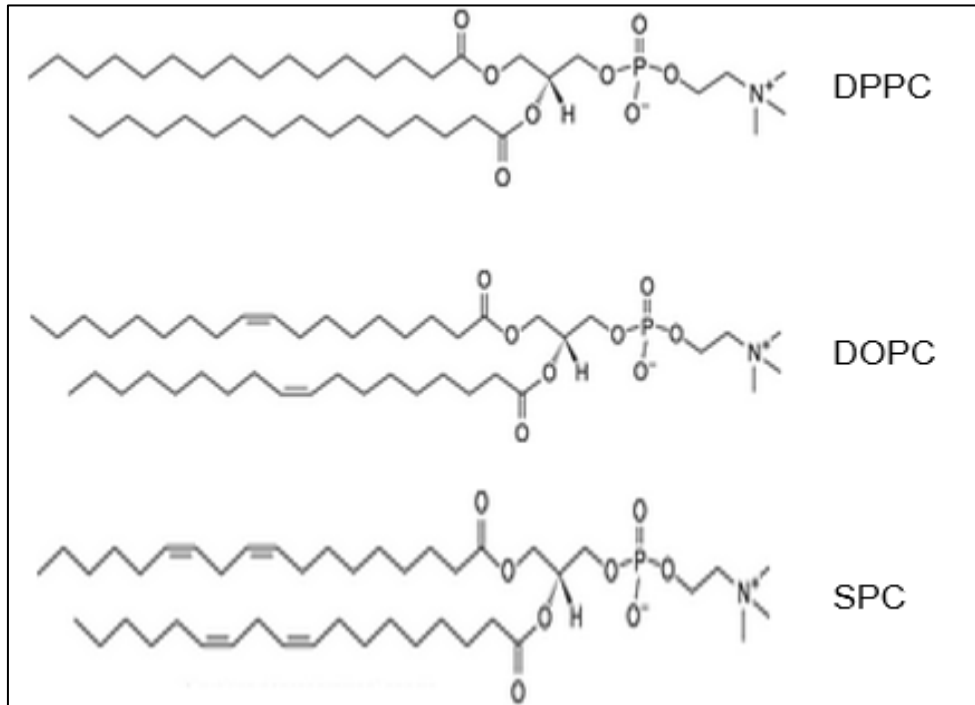
- Ekstrüzyon işleminin,
- Liyofilizasyon işleminin,
- Fosfotidilkolin/kolesterol farklı molar oranlarının,
- Farklı tipteki fosfotidilkolinlerin etkisi incelenmiştir.

Lipozom hazırlamada kullanılan fosfotidilkolinler ve özellikleri

Gemcitabin hidroklorür içeren lipozomlar hazırlanırken soya fosfotidilkolin (SPC), dipalmitoil fosfotidilkolin (DPPC) ve dioleil fosfotidilkolin (DOPC) kullanılmıştır. Bu fosfotidilkolinlere ait fizikokimyasal özellikler Çizelge 3.12’de, kimyasal yapıları ise Şekil 3.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.12. Kullanılan fosfatidilkolinlere ait fizikokimyasal özellikler

Lipit	C=C doymamış bağ sayısı	Faz geçiş sıcaklığı	Hidrokarbon zinciri uzunluğu
DPPC	0	41°C	16
DOPC	2	-17°C	18
SPC	4	45°C	18



Şekil 3.3. DPPC, DOPC ve SPC'nin kimyasal yapısı

Lipozom formülasyonlarında yapılan ön çalışmalar

Lipozomlarda yapılan ön denemelerde formülasyonlar lipit film hidrasyon yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Bu formülasyonlarda lipit olarak SPC kullanılmış ve formülasyonlara etkin madde ilave edilmemiştir. Lipozomlar üzerine ekstrüzyon işleminin etkisi incelenmiştir. Ön denemelerin gerçekleştirildiği formülasyonlarda liyofilizasyon işleminde liyoprotektan ilave edilmemiştir. Formülasyonlara ait bilgiler Çizelge 3.13'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.13. Lipozom formülasyonunda yapılan ön çalışmalara ait bilgiler

	Ö-LP1	Ö-LP2
Yağ fazı	SPC:kolesterol (4:1 molar oranı)	SPC:kolesterol (4:2 molar oranı)
	Kloroform:metanol (3:1 h/h) (2 mL)	
Hidrasyon fazı	pH 7,4 fosfat tamponu (5 mL)	

Ön denemelerde lipozomların partikül boyutunu küçültmek için ekstrüksiyon işleminin gerekli olduğu ve lipozomların liyoprotektan ilave edilmeden gerçekleştirilen liyofilizasyon işlemine karşı dayanıksız olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Gemsitabin hidroklorür içeren lipozom formülasyonları geliştirme çalışmaları

Farklı molar oranlarda soya fosfatidilkolin/kolesterol karışımı kullanılarak lipozom formülasyonları hazırlanmıştır. Bu formülasyonlara ait bilgiler Çizelge 3.14’de yer almıştır.

Çizelge 3.14. Farklı SPC:kolesterol molar oranları ile hazırlanan formülasyonlar

Yağ fazı	SPC:kolesterol (4:1, molar oranı)	LP1
	SPC:kolesterol (4:2, molar oranı)	LP2
	SPC:kolesterol (4:4, molar oranı)	LP3
	Kloroform:metanol (3:1, h/h)	2 mL
Hidrasyon fazı	Gemsitabin hidroklorür	4 mg
	pH 7,4 fosfat tamponu	5 mL

Lipozom formülasyonları içerisindeki kolesterolün molar oranı arttıkça enkapsülasyon etkinliğinin düştüğü, düşük molar oranda kolesterol kullanıldığında ise partikül büyüklüğünün arttığı belirlenmiştir. Fosfatidilkolin:kolesterol molar oranı

4:2 olan formülasyon partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinliği açısından uygun bulunmuştur. Farklı yağların lipozom formülasyonu üzerine etkisini incelemek için dipalmitoil fosfatidilkolin (DPPC) ve dioleil fosfatidilkolin (DOPC) kolesterol ile ayrı ayrı 4:2 molar oranında kullanılıp lipozomların hazırlanmasına karar verilmiştir. Bu yağlar içerisinde en yüksek enkapsülasyon etkinliği gösteren soya fosfatidilkolin (SPC) kullanılan formülasyon pegile edilmiştir. Formülasyonlara ait bilgiler Çizelge 3.15’de verilmiştir.

Çizelge 3.15. Farklı fosfatidilkolinler kullanılarak hazırlanan ve pegile edilen lipozom formülasyonları

	Yağ fazı (Kloroform:metanol 3:1 h/h) (2 mL)		Hidrasyon fazı (pH 7,4 fosfat tamponu) (5 mL)
		DSPE-PEG ₂₀₀₀	Gemcitabin hidroklorür
LP2	SPC:kolesterol (4:2 molar oranı)	-	4 mg
LP4	DOPC:kolesterol (4:2 molar oranı)	-	4 mg
LP5	DPPC:kolesterol (4:2 molar oranı)	-	4 mg
PEG LP2	SPC:kolesterol (4:2 molar oranı)	15 mg	4 mg

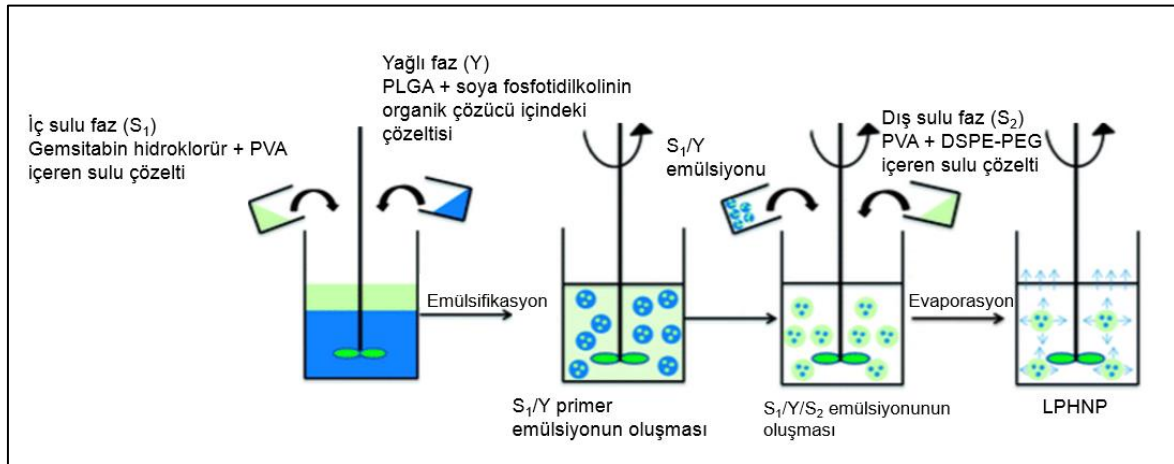
Bu aşamadan sonra hem nanopartikül hem de lipozom taşıyıcı sistemlerin özelliklerini taşıyan lipit polimer hibrit nanopartikül (LPHNP) ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasına geçilmiştir.

3.3.5. Gemcitabin hidroklorür içeren LPHNP formülasyonlarının geliştirilmesi üzerine çalışmalar

Gemcitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonlarının hazırlanmasında modifiye çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi (Wang ve diğerleri, 2012; Cheow ve Hadinoto, 2011) ve modifiye nanoçöktürme yöntemi (Chan ve diğerleri, 2009; Mandal ve diğerleri, 2013) kullanılmıştır. LPHNP formülasyonlarının geliştirilmesinde kullanılan modifiye çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi iki farklı şekilde (Yöntem1 ve Yöntem 2) uygulanmıştır.

Modifiye çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi ile LPHNP'lerin hazırlanması (Yöntem 1)

Bu yöntemde etkin madde gempitabin hidroklorür PVA'nın sulu çözeltisinde (S_1) çözülmüştür. Etkin madde içeren çözelti organik çözücü içerisinde çözünen PLGA ve soya fosfatidilkolin içeren çözeltiye (Y) ilave edilmiş ve ultrasonik homojenizatör ile karıştırılarak ve S_1/Y primer emülsiyonu elde edilmiştir. Oluşan primer emülsiyon DSPE-PEG içeren PVA'nın sulu çözeltisine (S_2) ilave edilmiş ve ultrasonik homojenizatör ile birkez daha karıştırılmış ve $S_1/Y/S_2$ emülsiyonları oluşturulmuştur. Vakum altında çalıştırılan evaporatör ile organik çözücü uzaklaştırılmış ve 18000 rpm'de yapılan santrifüj işlemi ile LPHNP'lerin çöktürülmesi sağlanmıştır. Şekil 3.4'de Yöntem 1 şematize edilmiştir. Süpernatant kısım uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen çökelek liyoprotektan içeren sulu çözelti ile dağıtılmıştır ve -55°C de 40 saat liyofilize edilmiştir.

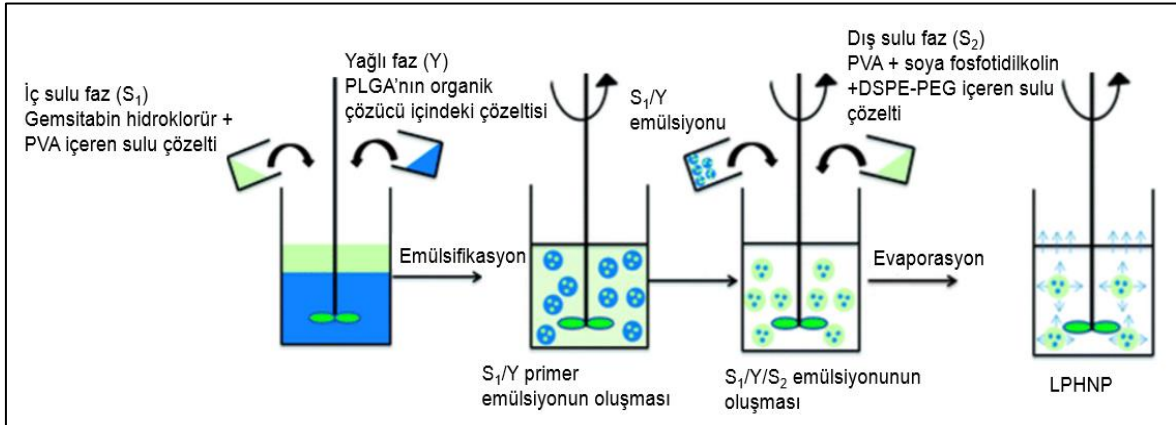


Şekil 3.4. Modifiye çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi (Yöntem 1) (Fan ve diğerleri, 2013)

Modifiye çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi ile LPHNP'lerin hazırlanması (Yöntem 2)

Bu yöntemde etkin madde gempitabin hidroklorür PVA'nın sulu çözeltisinde (S_1) çözülmüştür. Etkin madde içeren çözelti organik çözücü içerisinde çözünen PLGA çözeltisine (Y) ilave edilmiş ve ultrasonik homojenizatör ile karıştırılarak ve S_1/Y primer emülsiyonu elde edilmiştir. Oluşan primer emülsiyon soya fosfatidilkolin ve

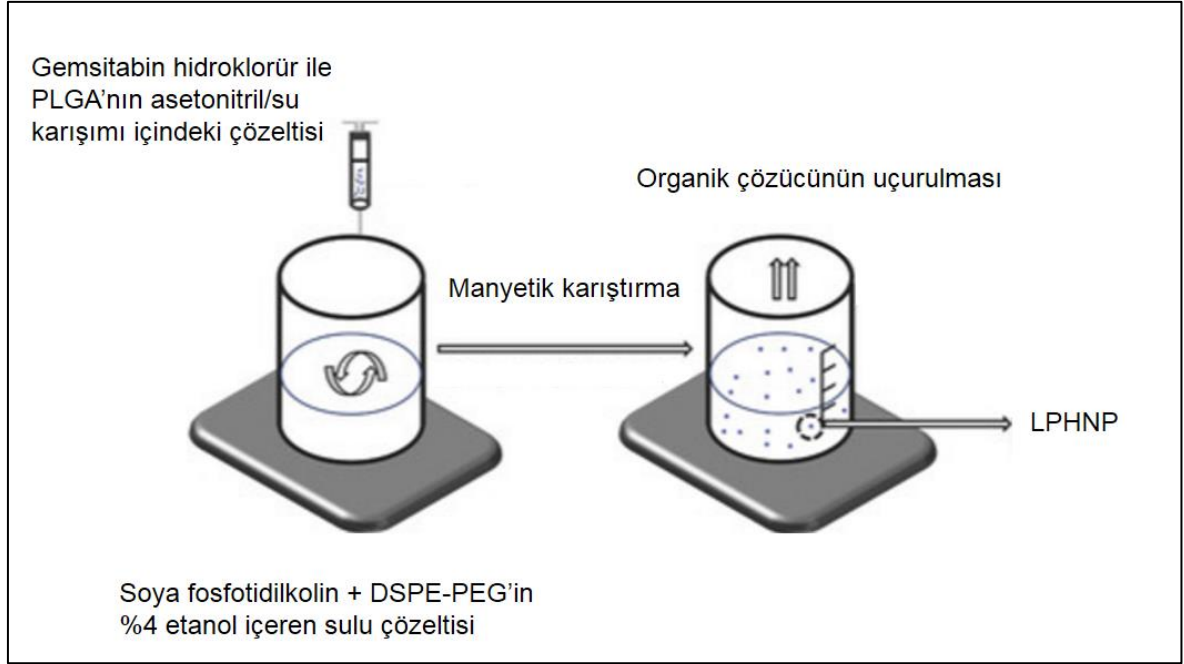
DSPE-PEG içeren PVA'nın sulu çözeltisine (S_2) ilave edilmiş, ultrasonik homojenizatör ile karıştırılmış ve $S_1/Y/S_2$ emülsiyonları oluşturulmuştur. Vakum altında çalıştırılan evaporatör ile organik çözücü uzaklaştırılmış ve 18000 rpm'de santrifüj edilerek LPHNP'lerin çöktürülmesi sağlanmıştır. Şekil 3.5'de Yöntem 2 şematize edilmiştir. Süpernatant kısım uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen çökelek liyoprotektan içeren sulu çözelti ile dağıtılmıştır ve -55°C de 40 saat liyofilize edilmiştir.



Şekil 3.5. Modifiye çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi (Yöntem 2) (Fan ve diğerleri, 2013)

Modifiye nanoçöktürme yöntemi ile LPHNP'lerin hazırlanması

Gempitabin hidroklorür distile suda çözülmüş ve çözeltinin üzerine asetronitril ilave edilmiştir. Bu çözeltiye PLGA'nın asetronitril içerisindeki çözeltisi eklenmiştir. DSPE-PEG ve soya fosfatidilkolinin %4 etanol içeren sulu çözeltisi hazırlanmış, 65°C 'ye kadar ısıtılmıştır. Bu çözeltiye gempitabin hidroklorür ve PLGA içeren çözelti manyetik karıştırıcı altında damla damla ilave edilmiştir. Elde edilen karışım 3 dakika vorteks karıştırıcıyla sonrasında ise organik çözücünün uçurulması için 2 saat manyetik karıştırıcıyla karıştırılmıştır. Elde edilen süspansiyon 18000 rpm'de santrifüj edilerek LPHNP'lerin çöktürülmesi sağlanmıştır. Şekil 3.6'da modifiye nanoçöktürme yöntemi şematize edilmiştir. Süpernatant kısım uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen çökelek liyoprotektan içeren sulu çözelti ile dağıtılmıştır ve -55°C de 40 saat liyofilize edilmiştir.



Şekil 3.6. LPHNP'lerin nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanması (Klippstein ve diğerleri, 2015)

LPHNP formülasyonlarında yapılan ön çalışmalar

Ön çalışmalarda modifiye çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemleri (Yöntem 1 ve Yöntem 2) ile modifiye nanoçöktürme yöntemi kıyaslanmıştır. Farklı molekül ağırlığına sahip PLGA 50:50 polimerleri kullanılmış soya fosfatidilkolinin (SPC) farklı fazlara (organik faz ve dış sulu faz) ilave edilmesinin formülasyonlar üzerine etkisi incelenmiştir. Literatür verilerinden hareketle SPC/PLGA kütlece oranı %20 kullanarak formülasyonların hazırlanmasına karar verilmiştir. Yöntem 1 kullanılarak hazırlanan formülasyonlar (soya fosfatidilkolinin organik faza ilave edildiği) Çizelge 3.16'da ve Yöntem 2 (soya fosfatidilkolinin dış sulu faza ilave edildiği) kullanılarak hazırlanan formülasyonlar Çizelge 3.17'de gösterilmiştir. Modifiye nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan formülasyona ait bilgiler Çizelge 3.18'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.16. Yöntem 1 kullanılarak hazırlanan LPHNP formülasyonları

Organik faz	PLGA 50:50 (7-17 kDa) (Asit)	120 mg (Ö-LPHNP1)
	PLGA 50:50 (38-54 kDa) (Asit)	120 mg (Ö-LPHNP2)
	Soya fosfatidilkolin	24 mg
	Organik çözücü	2 mL (DCM:ACE) (1:2 h/h)
İç sulu faz	Gemcitabin hidroklorür	4 mg
	PVA (31-50 kDa) (%1)	0,8 mL
Dış sulu faz	PVA (31-50 kDa) (%2)	3 mL

Çizelge 3.17. Yöntem 2 kullanılarak hazırlanan LPHNP formülasyonları

Organik faz	PLGA 50:50 (7-17 kDa) (Asit)	120 mg (Ö-LPHNP3)
	PLGA 50:50 (38-54 kDa) (Asit)	120 mg (Ö-LPHNP4)
	Organik çözücü	2 mL (DCM:ACE) (1:2 h/h)
İç sulu faz	Gemcitabin hidroklorür	4 mg
	PVA (31-50 kDa) (%1)	0,8 mL
Dış sulu faz	Soya fosfatidilkolin	24 mg
	PVA (31-50 kDa) (%2)	3 mL

Çizelge 3.18. Modifiye nanoçöktürme yöntemiyle hazırlanan LPHNP formülasyonları

Organik faz	PLGA 50:50 (38-54 kDa) (Asit)	120 mg (Ö-LPHNP5)
	Organik çözücü	2 mL asetonitril
	Gemcitabin hidroklorür	4 mg (Distile su/asetonitril karışımı içinde)
Sulu faz %4 etanol	Soya fosfatidilkolin	24 mg

Modifiye nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan LPHNP formülasyonunda modifiye çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemleri (Yöntem 1 ve Yöntem 2) ile hazırlanan formülasyonlara göre düşük enkapsülasyon etkinliği ve yüksek partikül boyutu

gözlenmiştir. Modifiye çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemleri incelendiğinde Yöntem 1'in Yöntem 2'ye göre enkapsülasyon etkinliğini ve partikül büyüklüğü açısından daha başarılı sonuçlar verdiği görülmüştür. Bundan sonraki çalışmalarda LPHNP formülasyonlarının hazırlanmasında Yöntem 1'in kullanılmasına karar verilmiştir.

Optimum nanopartikül formülasyonunda olduğu gibi PLGA 50:50, PLGA 65:35 ve PLGA 75:25 ile (1:1 a/a) oranında karıştırılarak LPHNP formülasyonları hazırlanmıştır. Formülasyonlara ait bilgiler Çizelge 3.19'da belirtilmiştir.

Çizelge 3.19. PLGA 50:50/PLGA 65:35 ve PLGA 50:50/PLGA 75:25 karışımları ile hazırlanan LPHNP formülasyonları

		Ö-LPHNP6	Ö-LPHNP7
Organik faz	PLGA 50:50 (38-54 kDa) (Asit)	60 mg	60 mg
	PLGA 65:35 (24-38 kDa) (Asit)	60 mg	-
	PLGA 75:25 (4-15 kDa) (Asit)	-	60 mg
	Soya fosfatidilkolin	24 mg	24 mg
	Organik çözücü DCM:ACE (1:2 h/h)	2 mL	2 mL
İç sulu faz	Gemcitabin hidroklorür	4 mg	4 mg
	PVA (31-50 KDa) (%1)	0,8 mL	0,8 mL
Dış sulu faz	PVA (31-50 KDa) (%2)	3 mL	3 mL

PLGA 50:50/PLGA 65:35 (1:1 a/a) oluşan karışımla hazırlanan formülasyonun (Ö-LPHNP6) PLGA 50:50/PLGA 75:25 (1:1 a/a) polimer karışımı kullanılan formülasyona göre (Ö-LPHNP7) enkapsülasyon etkinliği yüksek bulunmuştur. Bundan sonraki çalışmalarda PLGA 50:50 ve PLGA 65:35 polimer karışımlarının kullanılmasına karar verilmiştir. LPHNP sistemini oluşturan son kısım DSPE-PEG ile kaplama işlemidir. En yüksek enkapsülasyon etkinliği elde edilen (Ö-LPHNP6) formülasyonu pegile edilmiş ve iki farklı liyoprotektan (trehaloz ve mannitol) kullanılarak liyofilize edilmiştir. Formülasyonlara ait bilgiler Çizelge 3.20'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.20. LPHNP formülasyonlarında farklı liyoprotektanların etkisi

		Ö-LPHNP8	Ö-LPHNP9
Organik faz	PLGA 50:50 (38-54 kDa) (Asit)	60 mg	60 mg
	PLGA 65:35 (24-38 kDa) (Asit)	60 mg	60 mg
	Soya fosfatidilkolin	24 mg	24 mg
	Organik çözücü DCM:ACE (1:2 h/h)	2 mL	2 mL
İç sulu faz	Gemsitabin hidroklorür	4 mg	4 mg
	PVA (31-50 KDa) (%1)	0,8 mL	0,8 mL
Dış sulu faz	DSPE-PEG ₂₀₀₀	13,11 mg	13,11 mg
	PVA (31-50 KDa) (%2)	3 mL	3 mL
Liyofilizasyon	Mannitol (%10)	1,5 mL	-
	Trehaloz (%10)	-	1,5 mL

Trehaloz kullanarak liyofilize edilen formülasyonda mannitol kullanarak liyofilize edilene göre daha küçük partikül büyüklüğü ve düşük polidispersite indeksi elde edilmiştir. Bu aşamadan sonraki formülasyon geliştirme çalışmalarında liyoprotektan olarak trehaloz kullanılmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda deney tasarımı kullanılarak LPHNP formülasyonları hazırlanmıştır.

Deney tasarımı uygulanarak hazırlanan LPHNP formülasyonları

Ön denemeler ve literatür incelemelerine göre LPHNP formülasyonları hazırlamak için önemli olan bağımsız parametreler ile alt ve üst limitler belirlenmiştir. LPHNP formülasyonlarını hazırlamak için tespit edilen parametrelerin uygun oranlarının belirlenmesi amacıyla yanıt yüzey tasarımları yöntemlerinden merkezi birleşik tasarım yöntemi kullanılmıştır. Desing-Expert Version 6.0.6 DoE programı kullanılarak deney tasarımı yapılmıştır.

Deney tasarımındaki bağımsız parametreler,

A: PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranı

B: % Soya fosfatidilkolin/PLGA oranı

C: DSPE-PEG miktarıdır.

Bağımlı parametreler,

Y1: % enkapsülasyon etkinliği,

Y2: Partikül büyüklüğü,

Y3: 24 saatteki % kümülatif etkin madde salımı kullanılmıştır.

LPHNP formülasyonu hazırlanırken uygulanan deney tasarımıdaki bağımsız değişkenler ve kullanılan limitler Çizelge 3.21’de verilmiştir.

Çizelge 3.21. LPHNP formülasyonu hazırlanırken uygulanan deney tasarımıdaki bağımsız değişkenler ve kullanılan limitler

	Alt limit	Üst limit
PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranı	0,5	1,5
% SPC/PLGA oranı	%10	%30
DSPE-PEG miktarı	5 mg	15 mg

Merkezi birleşik yanıt yüzey deney tasarımına göre tasarım yapılmıştır. Bağımsız değişken sayısı k , n tekrarlanan merkez noktalar olmak üzere tasarımdaki toplam deney sayısı $2^k + 2k + n$ ile bulunmuştur. Deney tasarımıdaki bağımsız değişken sayısı (k) 3’tür. Merkezi birleşik deney tasarımımda 6 tane tekrarlanan merkez nokta, 6 tane ($2 \times$ bağımsız değişken sayısı, $2 \times 3=6$) aksiyal nokta ve 8 tanesi ($2^{\text{bağımsız değişken sayısı}}$, $2^3=8$) de faktöriyel noktalar olmak üzere toplam 20 ($8+6+6=20$) deney yapılması tasarlanmıştır. α değeri $2^{3/4}=1,682$ ($2^{k/4}$, $2^{3/4}=1,682$) olarak bulunmuştur. Çizelge 3.22’de deney tasarımına ait kodlanmış ve normal seviyeler gösterilmiştir.

Çizelge 3.22. Merkezi birleşik deney tasarımına ait kodlanmış ve normal seviyeler

Formülasyon	Nokta Yerleşimi	KODLANMIŞ SEVİYELER			NORMAL SEVİYELER		
		PLGA 50:50/ 65:35 oranı	% SPC/PLGA oranı	DSPE-PEG miktarı (mg)	PLGA 50:50/ 65:35 oranı	% SPC/PLGA oranı	DSPE-PEG miktarı (mg)
LPHNP1	Merkez Noktalar	0	0	0	1,00	20,00	10,00
LPHNP2		0	0	0	1,00	20,00	10,00
LPHNP3		0	0	0	1,00	20,00	10,00
LPHNP4		0	0	0	1,00	20,00	10,00
LPHNP5		0	0	0	1,00	20,00	10,00
LPHNP6		0	0	0	1,00	20,00	10,00
LPHNP7	Aksiyal Noktalar	1,682	0	0	1,84	20,00	10,00
LPHNP8		0	1,682	0	1,00	36,82	10,00
LPHNP9		0	0	1,682	1,00	20,00	18,41
LPHNP10		-1,682	0	0	0,16	20,00	10,00
LPHNP11		0	-1,682	0	1,00	3,18	10,00
LPHNP12		0	0	-1,682	1,00	20,00	1,59
LPHNP13	Faktöriyel Noktalar	-1	-1	-1	0,50	10,00	5,00
LPHNP14		-1	-1	1	0,50	10,00	15,00
LPHNP15		-1	1	-1	0,50	30,00	5,00
LPHNP16		-1	1	1	0,50	30,00	15,00
LPHNP17		1	1	1	1,50	30,00	15,00
LPHNP18		1	1	-1	1,50	30,00	5,00
LPHNP19		1	-1	1	1,50	10,00	15,00
LPHNP20		1	-1	-1	1,50	10,00	5,00

3.4. Geliştirilen Nanopartikül, Lipozom ve LPHNP Formülasyonları Üzerinde Yapılan İn Vitro Kontroller

3.4.1. Partikül büyüklüğü ve dağılımı

Formülasyonların partikül büyüklüğü ve dağılımı Malvern Zetasizer Nano ZS aleti ile ölçülmüştür. Cihazın partikül büyüklüğü ölçüm aralığı 0,3 nm-10 µm arasındadır. Cihaz partikül büyüklüğü ve dağılımını ölçerken Dynamic Light Scattering (DLS) (Dinamik Işık Saçılımı) tekniğini kullanmaktadır. Bu teknik Brown hareketleri gerçekleştiren partiküllerin farklı difüzyon özellik göstermelerinin ölçümüne dayanmaktadır. Disperse haldeki partiküller üzerlerine lazer ışını gönderildiğinde partiküller sahip oldukları Brown hareketleri sayesinde ışığı farklı şiddetlerde saçarlar. Brown hareketlerinin hızına göre bu saçılımlar farklılık göstermektedir ve Stokes-Einstein eşitliği kullanılarak partikül büyüklüğü hesaplanmaktadır (Malvern, 2017). Distile su içinde nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonları disperse edilerek partikül büyüklüğü ölçme küvetine konulmuş ve ölçümler gerçekleştirilmiştir. Deneyler üç paralel tekrar edilmiştir (n=3).

3.4.2. Zeta potansiyeli ölçümleri

Nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarının zeta potansiyel ölçümleri Malvern Zetasizer Nano ZS aleti kullanılarak yapılmıştır. Cihaz zeta potansiyeli ölçümünde elektroforez çalışma prensibini kullanmaktadır. Elektroforez partiküllerin elektriksel alandaki hareketlerini ifade etmektedir. Zeta potansiyel hücreleri iki elektrottan oluşmaktadır. Bir elektriksel alan elektrotlara uygulandığında net yüke sahip tanecikler karşıt yüke sahip elektroda doğru hızla hareket eder. Taneciklerin bu hareketi zeta potansiyelleri ile bağlantılıdır ve çeşitli modellerle hesaplanmaktadır. Nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonları distile su içinde disperse edilerek alette ölçüm yapılmıştır. Deneyler üç paralel tekrar edilmiştir (n=3).

3.4.3. Yüzde enkapsülasyon etkinliği (%EE)

Enkapsülasyon etkinliği hesaplamak için 5 mg liyofilize haldeki nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonu tartılarak 5 mL organik çözücü içerisinde disperse edilmiştir. Nanopartikül ve LPHNP formülasyonlarını disperse etmek için diklorometan, lipozom formülasyonlarını disperse etmek için kloroform organik çözücü olarak kullanılmıştır. Dispersiyon 1 dk vorteks karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 15 dakika ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Üzerine 10 mL pH 7,4 fosfat tamponu ilave edilerek 10 dakika vorteks karıştırıcı karıştırılmış ve 1 saat mekanik çalkalayıcı ile çalkalanmıştır. Çalkalama işlemi sonucunda organik faz ile sulu fazın ayrılması sağlanmıştır. Üstteki sulu kısım 0,22 µm'lik membran filtreden süzülerek HPLC'de analiz edilmiştir. Deneyler üç paralel tekrar edilmiştir (n=3).

% enkapsülasyon etkinliği, analizle elde edilen etkin madde miktarının, başlangıçta formülasyona ilave edilen etkin madde miktarına yüzdece oranıdır. % enkapsülasyon etkinliğini hesaplamak için kullanılan eşitlik aşağıda gösterilmiştir (Eş. 3.1).

$$\%EE = \frac{\text{Pratikte analiz edilen etkin madde miktarı}}{\text{Toplam ilave edilen etkin madde miktarı}} \times 100$$

(Eş. 3.1)

3.4.4. Yüzde ilaç yüklenmesi (%İY)

Yüzde ilaç yüklenmesi formülasyonlar içindeki toplam etkin madde miktarının, formülasyonların toplam kütesine yüzdece oranıdır. Buna göre % ilaç yüklenmesini hesaplamak için kullanılan eşitlik şöyledir (Eş. 3.2).

$$\%İY = \frac{\text{Formülasyonun içindeki toplam etkin madde miktarı}}{\text{Formülasyonun toplam kütesi}} \times 100$$

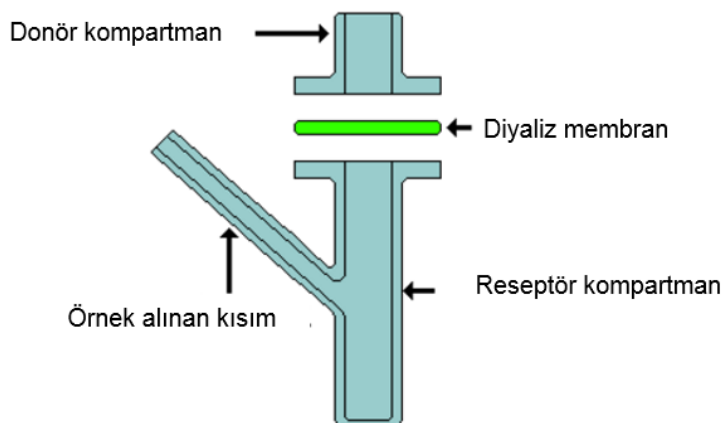
(Eş. 3.2)

3.4.5. İn vitro salım çalışmaları

İn vitro salım yöntemini belirlemek için nanopartikül formülasyonları kullanılmış ve iki farklı salım yöntemi denenmiştir. Bu yöntemler Franz difüzyon hücresi yöntemi ve diyaliz tüp yöntemidir.

Franz difüzyon hücresi yöntemi

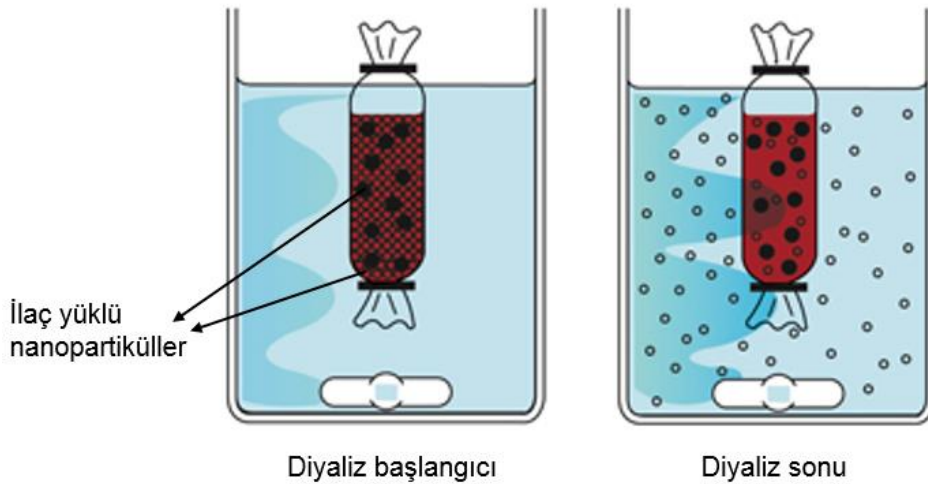
Franz difüzyon hücresi yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen in vitro salım deneyleri su banyosunda $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde yapılmıştır. 12400 Da selüloz membran kullanılmıştır. Membranlar bir gece pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde bekletilmiştir. Diyaliz membran Franz hücrelerinin ortasına yerleştirilmiştir. Hücrelerin alt kısmına (reseptör kompartman) pH 7,4 fosfat tamponu (2,5 mL), üst kısmına (donör kompartman) pH 7,4 fosfat tamponu içindeki etkin madde çözeltisi, liyofilize haldeki nanopartikül, lipozom ve LPHNP dispersiyonları (2 mg/mL) koyulmuştur. Şekil 3.7'de Franz difüzyon hücresinin şematik gösterimi vardır. Deney ortam sıcaklığı sabit tutulup sabit karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Belirli zamanlarda (0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 12; 24. saat) alt kısımdan örnekler alınmış 0,22 μm 'lik membran filtreden süzölmüş ve HPLC'de analiz edilmiştir. Örnekler alındıktan sonra çekilen örnek hacmi kadar alt kısma pH 7,4 fosfat tamponu ilave edilmiştir. Deneyler üç paralel tekrar edilmiştir (n=3).



Şekil 3.7. Franz difüzyon hücresinin şematik gösterimi (Permegear, 2017).

Diyaliz tüp yöntemi

Diyaliz tüp yönteminde diyaliz membran 24 saat boyunca pH 7,4 fosfat tamponunda ıslatılmıştır. Bu yöntemde 12400 kDa selüloz membran içerisine 3 mL liyofilize nanopartikül süspansiyonu (6 mg/mL) konulmuş ve membranın her iki ucu bağlanmıştır. Elde edilen diyaliz torbası 20 mL pH 7,4 fosfat tamponu ortamına bırakılmış belirli zamanlarda (0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 12; 24. saat) 1 mL'lik örnekler alınarak 0,22 μm 'lik membran filtreden süzölmüş ve HPLC'de analiz edilmiştir. Şekil 3.8'de diyaliz tüp yöntemi şematize edilmiştir. Örnekler alındıktan sonra çekilen örnek hacmi kadar ortama pH 7,4 fosfat tamponu ilave edilmiştir. Deney $37 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta sabit karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Deneyler üç paralel tekrar edilmiştir (n=3).



Şekil 3.8. Diyaliz tüp yöntemi şematik gösterimi (Liu ve diğerleri, 2016)

Her iki yöntemde de nanopartikül formülasyonlarında benzer sonuçlar elde edilmiştir. Kolay hazırlanabilmesi, daha az yer kaplaması ve çok sayıda salım deneyi yapmaya daha elverişli olduğu için Franz difüzyon hücresi yöntemiyle salım çalışmalarına devam edilmesine karar verilmiştir. Zamana karşı elde edilen kümülatif salım profilleri sonuçlarından gemitabin hidroklorür yüklü nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarının salım kinetikleri belirlenmiştir. Bu amaçla DDSolver programı kullanılmıştır. Salım kinetiklerinin belirlenmesinde Çizelge 3.23'deki denklemlerden faydalanılmıştır.

Çizelge 3.23. Salım kinetiklerinin belirlenmesinde kullanılan eşitlikler (Siswanto ve diğerleri, 2015)

Model	Eşitlik
1.derece	$F=100 [1-\text{Exp}(-k_1 t)]$
Higuchi	$F=k_H t^{0.5}$
Hixson-Crowell	$F=100 [1-(1-k_{HC} t)^3]$
Hopfenberg	$F=100 [1-(1-k_{HB} t)^n]$
Weibull	$F=100 \{1-\text{Exp}[-(t^\beta)/\alpha]\}$
Korsmeyer-Peppas	$F=k_{KP} t^n$
Baker-Lonsdale	$3/2 [1-(1-F/100)^{(2/3)}]-F/100=k_{BL} t$

3.4.6. Stabilite çalışmaları

Gemsitabin hidroklorür yüklü nanopatikül, lipozom ve LPHNP formülasyonları üzerinde in vitro ve in vivo stabilite çalışmaları yapılmıştır.

In vitro stabilite testleri

Gemsitabin hidroklorür içeren liyofilize haldeki pegile nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonları 4°C, 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamlarında 12 ay ve 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamlarında 6 ay süreyle bekletilmiş ve stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Farklı koşullarda saklanan formülasyonlardaki gemsitabin hidroklorür miktarı, partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçülerek TEM (Transmission Electron Microscopy) ve SEM (Scanning Electron Microscopy) görüntülemeleri yapılmıştır. Ayrıca formülasyonların her bir saklama koşulundaki yüzde bozunmadan kalan etkin madde miktarlarından hareketle raf ömürleri belirlenmiştir.

Formülasyonlardaki gemsitabin hidroklorür yüzdesi

Gemsitabin hidroklorür içeren liyofilize nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarındaki etkin madde miktarı başlangıç (0. gün), 1., 2., 3., 4., 5., 6., 9. ve 12. aylarda HPLC yöntemi ile tayin edilmiştir. Başlangıca göre, farklı zamanlarda formülasyonlar içerisindeki gemsitabin hidroklorür miktarlarından hareketle % kalan etkin madde hesaplanmıştır.

Formülasyonların partikül büyüklüğü ve dağılımı

Gemsitabin hidroklorür içeren liyofilize nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve dağılımı Malvern Zetasizer Nano ZS aleti ile başlangıç (0. gün), 1., 2., 3., 4., 5., 6., 9. ve 12. aylarda tayin edilmiştir.

Formülasyonların zeta potansiyeli

Gemsitabin hidroklorür içeren liyofilize nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarının zeta potansiyelleri Malvern Zetasizer Nano ZS aleti ile başlangıç (0. gün), 1., 2., 3., 4., 5., 6., 9. ve 12. aylarda tayin edilmiştir.

Formülasyonların in vivo ortamı taklit eden farklı ortamlardaki stabilite testlerinin değerlendirilmesi

Fosfat tamponu (pH 7,4), FBS ve %90 fosfat tamponu + %10 FBS ortamları içerisindeki liyofilize lipozom, nanopartikül ve LPHNP formülasyonları 5 gün süresince $37\pm1^{\circ}\text{C}$ de su banyosunda bekletilmiştir. Belirli aralıklarla örnekler alınıp partikül büyüklüğü, dağılımı ve zeta potansiyeli ölçümleri yapılmıştır.

3.4.7. Formülasyonların morfolojik özelliklerinin belirlenmesi

Formülasyonların TEM görüntüleri

Gemsitabin hidroklorür yüklü nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarının şekilleri TEM (Transmission Electron Microscopy) ile görüntülenmiştir. Ölçümler

Orta Doğu Teknik Üniversitesi TEM Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Kullanılan TEM cihazının markası FEI Tecnai G² Spirit Bio Twin'dir. TEM ile görüntüleme yapmak için distile su içerisinde süspansiyon halindeki bir damla nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonu karbon kaplı bakır grid üzerine damlatılmış ve partiküllerin karbon materyale yapışması sağlanmıştır. TEM'de 120 kV'da inceleme yapılmıştır.

Formülasyonların SEM görüntüleri

Gemcitabin hidroklorür yüklü nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarının şekilleri ve yüzey özellikleri SEM (Quanta 400F Field Emission SEM, yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu) cihazı kullanılarak incelenmiştir. Liyofilize haldeki formülasyonlardaki liyoprotektanın nanotaşıyıcıların SEM ile görüntülenmesini engellediği tespit edilmiştir. Görüntülemenin gerçekleştirilebilmesi için liyofilizasyon işlemi uygulanmamış formülasyonlar hazırlanmış ve 25°C sıcaklıkta 48 saat kurutulmuştur. Formülasyonlar, iki tarafı yapışkan bant aracılığı ile metal levhalar üzerine sabitlenmiş, altın-paladyum karışımı ile kaplanarak fotoğrafları çekilmiştir.

3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

Deneylerde MCF-7 ve MDA-MB-231 olmak üzere iki tip meme kanseri hücre dizisi kullanılmıştır. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre dizileri ATCC'den (American Tissue Culture Collection) alınmıştır. Hücreler %10 serum, %100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren DMEM'li besi yerinde 37 C'de %5 karbondioksit içeren inkübatörde kültüre edilmiştir. Bütün deneylerde büyüme fazındaki hücreler kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmaları Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.5.1. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde gemcitabinin hidroklorürün sitotoksik etkilerinin MTT testi ile değerlendirilmesi

MTT testi ile gemcitabin hidroklorür çözeltisi, ticari ürün Gemko® ve gemcitabin hidroklorür içeren nanopartikül, lipozomlar ve LPHNP formülasyonlarının sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. MTT hücrenin mitokondriyal aktivitesinden

hareketle sitotoksositeyi ölçmeye dayanan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir. 96 çukurlu plakaların her çukuruna 5×10^3 hücre olacak şekilde MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri ekilmiştir. Hücre yoğunluğu %70-80 olduktan sonra hücrelerin besi yeri fenol kırmızısı içermeyen besi yeri ile değiştirilmiştir. Artan konsantrasyonlarda (0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1000 μ M) hazırlanan gemsitabin hidroklorür çözeltisi, Gemko® ve gemsitabin hidroklorür yüklü nanopartikül, lipozom, LPHNP formülasyonları hücrelere verilmiş ve %5 karbondioksit içeren inkübatörde 37°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. 72 saatin sonunda hücrelerin üzerindeki besi yeri uzaklaştırılmış ve hücreler bir kez PBS ile yıkanmıştır. Hücrelerin üzerine 200 μ L fenol kırmızısı içermeyen besi yeri konulduktan sonra her bir çukura 50 μ L MTT solüsyonu (1 g/L, PBS de hazırlanmış) eklenmiştir. Ayrıca (-) kontrol olarak boş üç çukura sadece 200 μ L besi yeri ve başka boş üç çukura da 200 μ L besi yeri + 50 μ L MTT solüsyonu ilave edilmiştir. Hücreler 3 saat MTT solüsyonu ile inkübe edildikten sonra süpernatant atılmıştır ve her bir çukura (tepkime sonrası oluşan mor renkli formazan kristallerinin üzerine) 160 μ L DMSO ilave edilmiş ve formazan kristallerinin çözünmesi için çalkalayıcıda 10 dakika bekletilmiştir. 570 nm'de plaka okuyucu kullanılarak her bir çukurun absorbans değeri ölçülmüştür. GraphPad Prism 5 programı kullanılarak logaritmik konsantrasyona karşı absorbans değerleri girilmiş ve nonlinear regresyon yapılarak gemsitabin hidroklorür çözeltisi, ticari ürün Gemko® ve gemsitabin hidroklorür yüklü formülasyonların IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Her iki hücre için, sadece kanser hücreleri ve besi yeri içeren kontrol grupları belirlenmiştir. Ayrıca etkin madde içermeyen nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonları da nanotaşıyıcı sistemlerin sitotoksisiteilerinin incelenmesi için hücrelere uygulanmıştır.

3.5.2. Formülasyonların hücre içine geçiş deneyleri

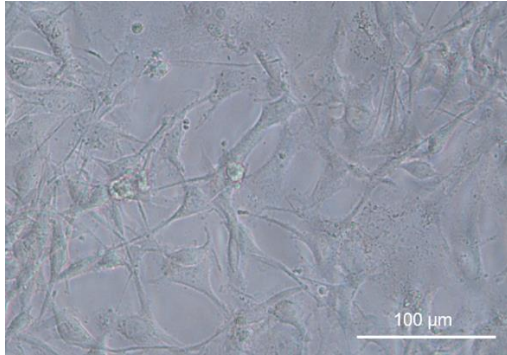
Floresan görüntüleme

1×10^4 MCF-7 ve MDA-MB-231 hücresi 96 çukurlu cam plakanın her bir kuyucuğuna ekilmiştir. Ertesi gün hücreler kumarin-6 çözeltisi, etkin madde içermeyen kumarin-6 yüklü lipozom, nanopartikül ve LPHNP formülasyonları ile 4 saat boyunca inkübe edilmiştir (100 μ g/mL). 4 saat sonunda hücreler PBS ile 2 kez yıkanmıştır. Hücreler %2'lik paraformaldehit ile 15 dakika fikse edilmiş ve sonrasında

%0,1 Triton X-100 ile 5 dakika permeabilize edilmiştir. Nükleik asitleri boyamak için hücreler 0,1 µg/mL DAPI çözeltisi ile 5 dakika inkübe edilmiştir. Floresan ışıkta Leica DMIL floresan mikroskop ile görüntülenmiş ve Leica DFC 420C kamera ile kayıt edilmiştir. Kullanılan hücrelerin faz kontrast mikroskop görüntüleri Resim 3.1 (MCF-7 meme kanseri hücresi) ve Resim 3.2'de (MDA-MB-231 meme kanseri hücresi) verilmiştir.



Resim 3.1. MCF-7 hücrelerinin Leica mikroskoptaki faz kontrast görüntüleri



Resim 3.2. MDA-MB-231 hücrelerinin Leica mikroskoptaki faz kontrast görüntüleri

Floresan şiddetinin ölçümü

1×10^4 MCF-7 ve MDA-MB-231 hücresi 96 çukurlu cam plakanın her bir kuyucuğuna ekilmiştir. Ertesi gün hücrelerin besiyeri yeni besiyeri ile değiştirilmiş ve hücreler kumarin-6 çözeltisi, etkin madde içermeyen kumarin-6 yüklü lipozom, nanopartikül ve LPHNP formülasyonları ile 4 saat boyunca inkübe edilmiştir (100 µg/mL). İnkübasyon sonrasında hücreler 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Hücreler %2'lik paraformaldehit ile 15 dakika fikse edilmiş ve hücrelerin içindeki floresan yoğunluğu

SpectraMax® i3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices) kullanılarak ölçülmüştür.

Formülasyonlardan etkilenen hücre sayısının belirlenmesi

Kumarin-6 çözeltisini, etkin madde içermeyen kumarin-6 yüklü lipozom, nanopartikül ve LPHNP formülasyonu içine alan hücre sayısının dedeksiyonu Tali Image-Based Cytometer (Life Sciences) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 2×10^5 MCF-7 ve MDA-MB-231 hücresi 12 çukurlu plakanın her bir kuyucuğuna ekilmiştir. Ertesi gün hücrelerin besi yeri yeni besi yeri ile değiştirilmiş ve hücreler kumarin-6 çözeltisi, kumarin-6 yüklü lipozom, nanopartikül ve LPHNP formülasyonları ile 4 saat boyunca inkübe edilmiştir (100 µg/mL). Daha sonra hücreler tripsinlenmiş ve 10 dakika 400 x g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası pellet 50 µL PBS ile resüspande edilmiş ve örnekler Tali sisteminin slaytlarına yüklenerek analiz edilmiştir. Resim 3.3'de Tali Image-Based Cytometer cihazının görüntüsü verilmiştir.



Resim 3.3. Tali Image-Based Cytometer cihazı

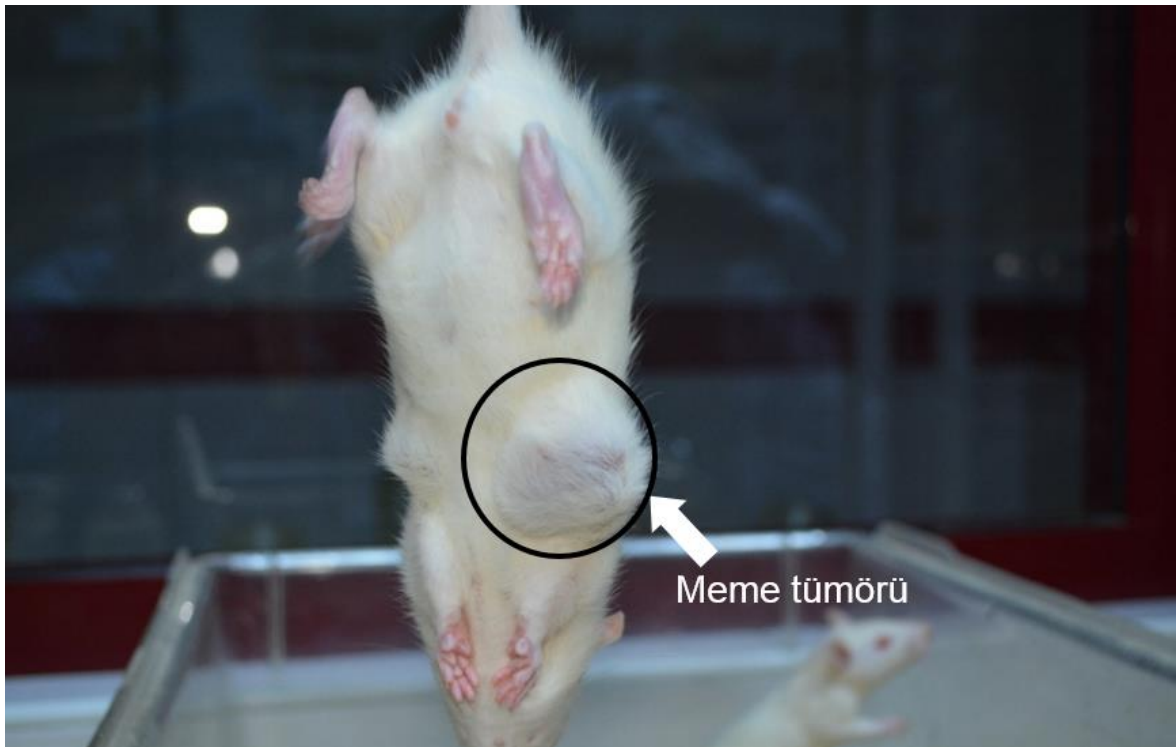
3.6. Ticari Ürün Gemko® ve Gemsitabin Hidroklorür Yüklü LPHNP Formülasyonları ile Yapılan İn Vivo Çalışmalar

İn vivo çalışmalarda kullanılan hayvanlar

Sprague Dawley cinsi dişi sıçanlar kullanılmıştır. İn vivo deneyler, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Komutanlığı Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanlığı'ndan karar no (14/188) ile onay alınarak yapılmıştır. Deneyler Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi (Gülhane Askeri Tıp Akademisi) Fizyoloji Anabilim Dalı Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Hayvanlarda meme kanseri modelinin oluşturulması

Hayvanlarda kanser modelinin oluşturulması için imbred dişi Sprague Dawley sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanlara doğumlarının 21. gününde 50 mg/kg dozda nitrozo metil üre (NMU) intraperitonel olarak uygulanmıştır. NMU uygulanmasından yaklaşık 3-4 ay sonra hayvanlarda meme kanserinin geliştiği gözlenmiştir. Resim 3.4'de meme tümörü gelişen bir sıçan gösterilmiştir.



Resim 3.4. Meme tümörü gelişmiş bir sıçan

Meme tümörü oluşan hayvanlara uygulanan tedavi

Hayvanlarda meme tümörü, 200 mm³ hacme ulaştığı zaman tedavilere başlanmıştır. Tümör hacminin hesaplanmasında Eş. 3.3 kullanılmıştır. Tedavi için tümör gelişen hayvanlara ticari ürün Gemko® ve gemitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonları Çizelge 3.24'de belirtilen dozlarda verilmiştir. Gemitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonları hayvanlara verilmeden önce UV ışığı altında 2 saat sterilize edilmiştir. Tedavi 30 gün boyunca 3 günde bir defa intraperitoneal yol ile uygulanmıştır. Hayvanlara ticari ürün serum fizyolojik çözeltisi içinde çözülerek, LPHNP formülasyonları ise disperse edilerek verilmiştir. Hayvanların her uygulama öncesi ağırlık değişimleri gözlenmiş ve tümör hacimleri dijital kumpas kullanılarak ölçülmüştür. Kıyaslama yapmak amacıyla hiçbir uygulama yapılmayan tümörlü hayvanlar kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Resim 3.5'de dijital kumpasla tümör boyutları ölçülen bir hayvan, Resim 3.6'de ise intraperitoneal yoldan ilaçların uygulanması gösterilmiştir.

$$V: 0,5 \times (W^2 \times L)$$

V: Tümör hacmi (mm³)

W:Tümörün kısa kenarının uzunluğu (mm)

L: Tümörün uzun kenarının uzunluğu (mm)

(Eş. 3.3)



Resim 3.5. Dijital kumpas kullanarak tümör boyutlarının ölçülmesi

Çizelge 3.24. Sıçanlara uygulanan gemitabin hidroklorür içeren LPHNP formülasyonları, ticari ürün Gemko® dozları ve deney grupları

Grup 1	Kontrol
Grup 2	Gemko® (5 mg/kg)
Grup 3	Gemko® (50 mg/kg)
Grup 4	LPHNP (5 mg/kg)
Grup 5	LPHNP (10 mg/kg)



Resim 3.6. İntraperitonel yoldan hayvanlara formülasyonların uygulanması

Histopatolojik çalışmalar

30 günlük uygulama sonucu tedavi gören tümörlü sıçanların tümör bölgelerinde örnek alınmış ve patolojik incelemeye gönderilmiştir. Sağlıklı ve kanser gelişen meme dokusundan da örnekler alınarak tedavi grubuyla kıyaslama yapabilmek için patolojik inceleme yapılmıştır. Örnekler %10'luk tamponlu formol içinde bekletilmiştir. Parafin bloklardan elde edilen kesitler Hematoksilen-Eozin ile boyanmıştır. Preparatlar Nikon Eclipse E400 ışık mikroskobu ile incelenmiştir. Deneyler GATA Patoloji Bölümünde gerçekleştirilmiştir.

Farmakokinetik çalışmalar

Farmakokinetik çalışmalarda altışar adet sağlıklı 200 ± 10 gram ağırlığında 3-4 aylık dişi Sprague Dawley sıçan kullanılmıştır. Hayvanlara 10 mg/kg dozda gempitabin hidroklorür içeren ticari ürün Gemko® ve LPHNP formülasyonları intraperitonel yoldan verilmiştir. Belirli zamanlarda (0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 12; 24; 48 ve 72. saat) kuyruk veninden kan örneği alınıp heparinli tüplere konulmuş ve 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek plazmalar ayrılmıştır. Alınan örnekler analiz edilinceye kadar -18°C sıcaklıkta saklanmıştır. Resim 3.4'de kuyruk veninden kan alınan bir

hayvan gösterilmiştir. Plazmadaki gempitabin hidroklorür analizleri HPLC’de yapılmıştır. Farmakokinetik parametrelerin belirlenmesi için Kinetica® Version 5.0 programı kullanılmıştır.



Resim 3.7. Sıçanların kuyruk veninden kan alınması

3.7. Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

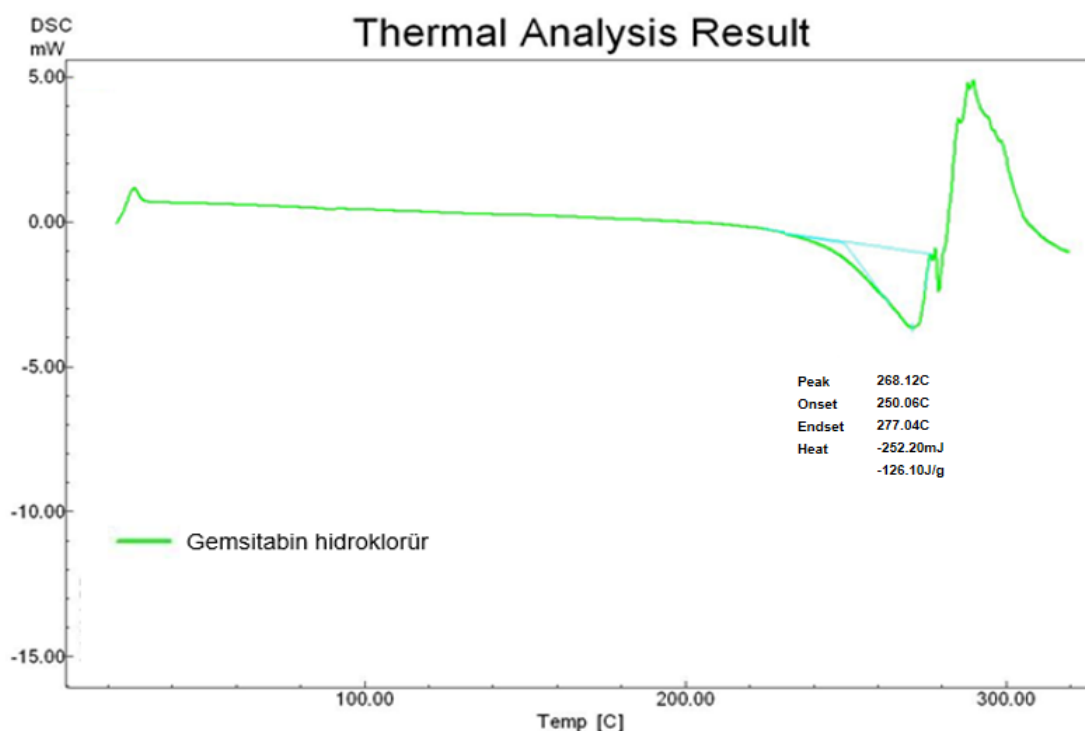
Elde edilen sonuçlar GraphPad Prism adlı istatistik programı kullanılarak t testi ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yöntemi Tukey karşılaştırılmalı testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Yapılan Çalışmalar

4.1.1. Gemsitabin hidroklorürün erime derecesi tayini

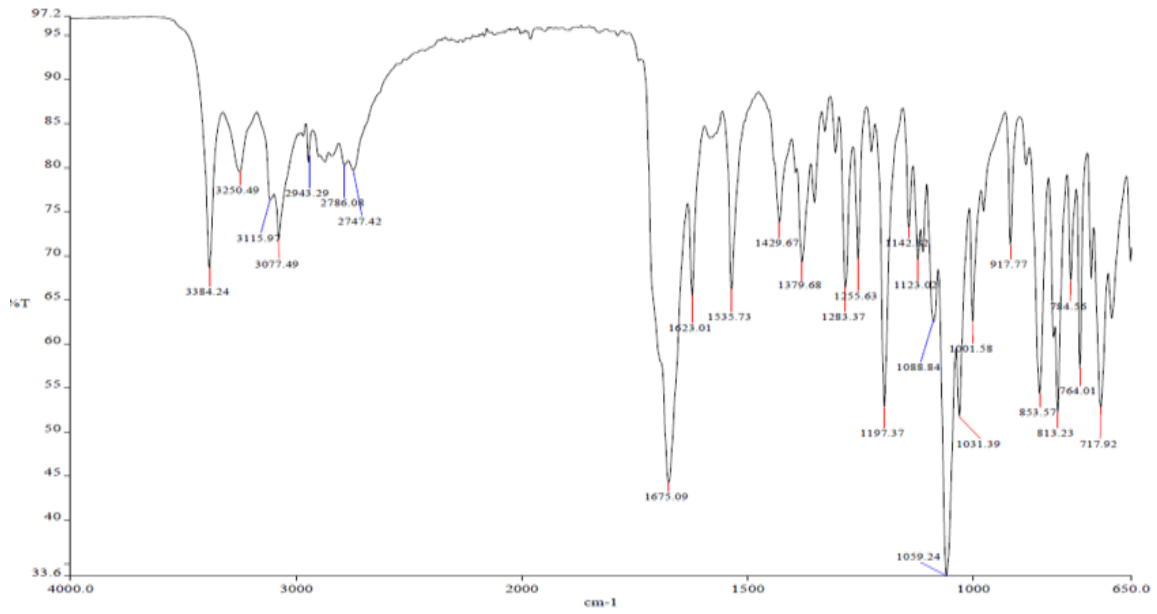
Gemsitabin hidroklorürün erime derecesi tayini diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) yöntemi kullanılarak Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Gemsitabin hidroklorürün DSC termogramı Şekil 4.1’de verilmiştir. Gemsitabin hidroklorür 268°C’de endotermik pik vermiştir.



Şekil 4.1. Gemsitabin hidroklorürün erime derecesi tayini

4.1.2. Gemsitabin hidroklorürün FTIR analizi

Gemsitabin hidroklorürün fourier transform infrared (FTIR) spektrumları Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı gibi alınmış ve dalga sayısı cm^{-1} cinsinden değerlendirilmiştir. Gemsitabin hidroklorürün FTIR spektrumu Şekil 4.2’de ve yapısında bulunan bağlar Çizelge 4.1’de verilmiştir.



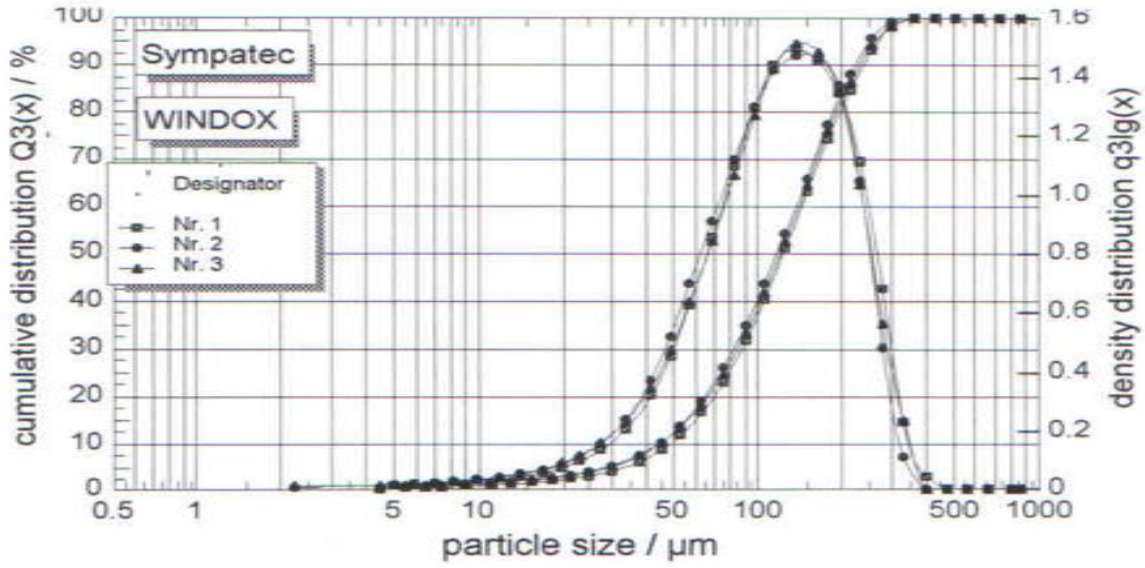
Şekil 4.2. Gemcitabin hidroklorüre ait FTIR spekturumu

Çizelge 4.1. Gemcitabin hidroklorür yapısında bulunan bağlar

Gemsitabin hidroklorürün FTIR Spekturumu	Gemsitabin hidroklorür yapısında bulunan bağlar
3384 cm ⁻¹	-NH ₂ bağı
3250-3077 cm ⁻¹	=C-H
1675 cm ⁻¹	C=O bağı
1197 cm ⁻¹	C-O bağı

4.1.3. Gemcitabin hidroklorürün ortalama partikül boyutunun ve zeta potansiyelinin ölçülmesi

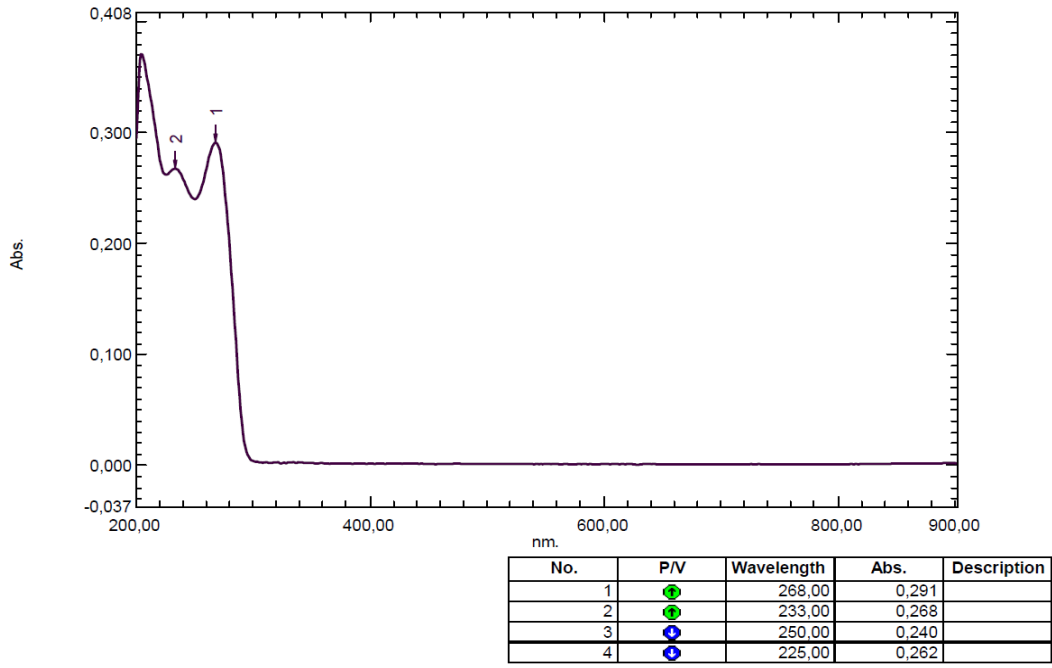
Etkin maddenin ortalama partikül boyutunun ölçülmesi deneyi Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Lazer difraksiyon yöntemi ile ölçüm yapan Sympatec Helos Particle Sizer cihazında gemcitabin hidroklorürün ortalama partikül büyüklüğü 120±3 µm bulunmuştur. Gemcitabin hidroklorürün partikül boyutunu ve dağılımını gösteren grafik Şekil 4.3’de verilmiştir. Gemcitabin hidroklorürün distile su içerisindeki çözeltisinin zeta potansiyeli pozitifdir ve 5,80±1,22 mV olarak bulunmuştur.



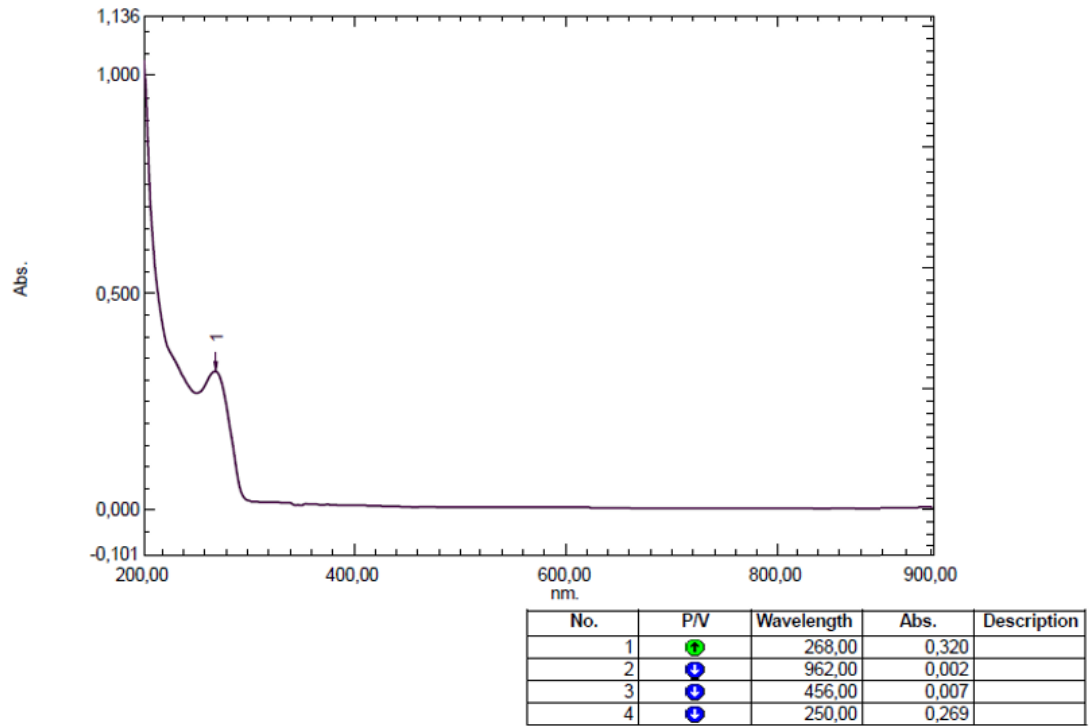
Şekil 4.3. Gemitabin hidroklorüre ait partikül büyüklüğü ve dağılımı

4.1.4. Gemitabin hidroklorürün UV spektrofotometredeki dalga boyu taraması

Etkin maddenin pH 7,4 fosfat tamponu ve sıçan plazması ortamları içerisindeki maksimum absorbans gösterdiği dalga boyunun belirlenmesi çalışmaları Bölüm 3.2.1’de belirtildiği gibi yapılmıştır. Gemitabin hidroklorürün her iki ortamda da maksimum absorbans verdiği dalga boyunun (λ_{max}) 268 nm olduğu görülmüştür. Gemitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponu içindeki çözeltisinin spektrum grafiği Şekil 4.4’de, sıçan plazması içerisindeki spektrum grafiği Şekil 4.5’de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Gemcitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponu çözeltisi içindeki spektrum grafiği



Şekil 4.5. Gemcitabin hidroklorürün sıçan plazması içindeki çözeltisinin spektrum grafiği

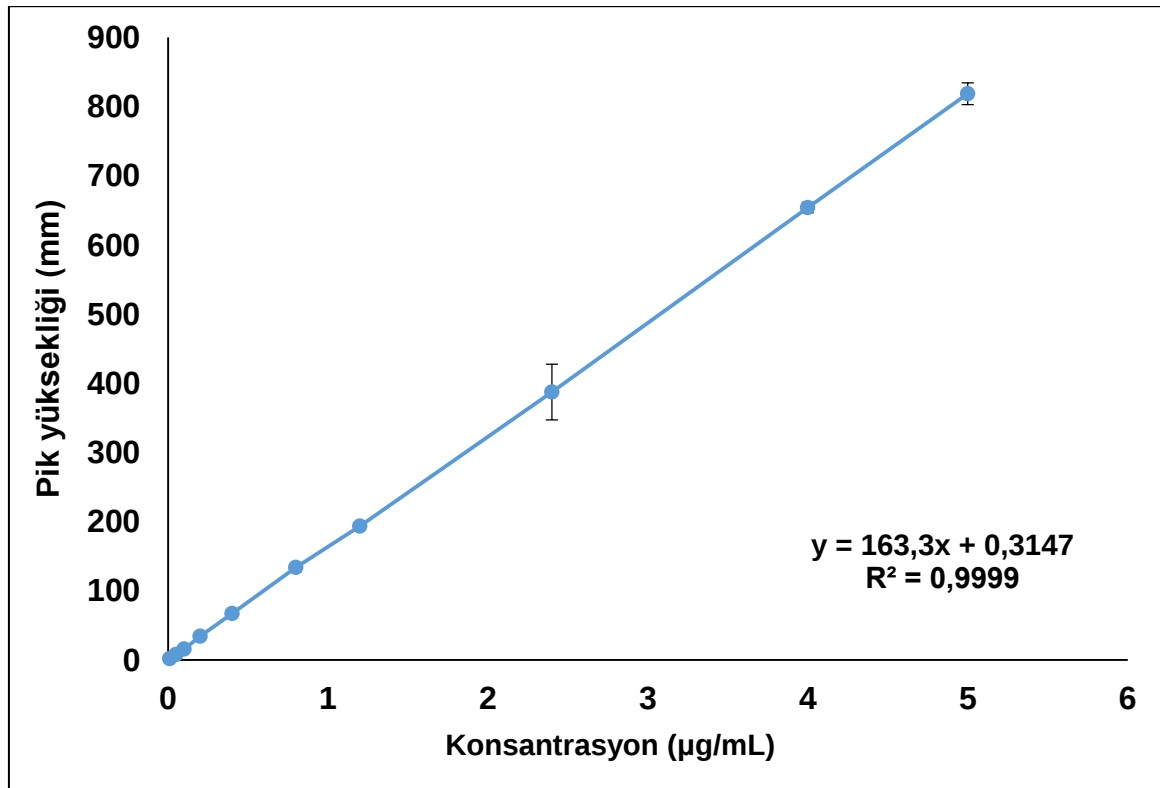
4.2. Gemsitabin Hidroklorürün Miktar Tayini Yöntemlerinin Geliştirilmesi

4.2.1. Miktar tayini yöntemi (Yöntem 1) validasyonu

Gemsitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki miktar tayinine ait validasyon çalışmaları HPLC aleti kullanılarak Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.

Doğrusallık

Gemsitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki 0,01 µg/mL -5 µg/mL konsantrasyon aralığında 10 farklı numune hazırlanarak doğrusallık parametresi değerlendirilmiştir. 3 ayrı seri çözeltisi hazırlanmış ve HPLC'ye enjekte edilmiştir. Konsantrasyonlara karşılık gelen pik alanları bulunmuş ve grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.6'da kalibrasyon doğrusu gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Gemsitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponundaki kalibrasyon doğrusu

Doğruluk ve geri elde

Gemsitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde hazırlanan %80, %100 ve %120 gemsitabin hidroklorür içeren çözeltilerinde kalibrasyon denklemi kullanılarak geri elde miktarları hesaplanmış ve gerekli istatistiksel parametrelerle değerlendirilmiştir. Hesaplanan değerler Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Gemsitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponundaki doğruluk ve geri elde sonuçları

Çözeltideki gemsitabin hidroklorür yüzdesi	Çözeltideki gemsitabin hidroklorür derişimi (µg/mL)	Hesapla bulunan gemsitabin hidroklorür derişimi (µg/mL) (Ort ± SS)	% Geri elde	Varyasyon katsayısı
%80	0,32	0,327 ± 0,005	%102	1,53
%100	0,40	0,394 ± 0,005	%99	1,17
%120	0,48	0,468 ± 0,002	%98	0,49

Kesinlik

Deney içi ve deneyler arası kesinlik olmak üzere iki farklı parametre incelenmiştir. Kesinlik ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı ile değerlendirilmiştir.

Deney içi kesinlik (Tekrar edilebilirlik)

Gemsitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponu içerisindeki stok çözeltisinden 0,2 µg/mL derişimde hazırlanan çözelti arka arkaya 10 kez HPLC’ye enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçların ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. Çizelge 4.3’de gemsitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponu içindeki deney içi kesinlik sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Gemsitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponu içindeki deney içi kesinlik sonuçları

Örnek No	Gemsitabin hidroklorür çözeltilisinin derişimi ($\mu\text{g/mL}$)	Hesapla bulunan derişimler ($\mu\text{g/mL}$)
1	0,2	0,203
2	0,2	0,204
3	0,2	0,208
4	0,2	0,206
5	0,2	0,200
6	0,2	0,203
7	0,2	0,210
8	0,2	0,207
9	0,2	0,206
10	0,2	0,203
ORT		0,205
Standart sapma		0,003
Varyasyon katsayısı		1,37

Deneyler arası kesinlik (Tekrar elde edilebilirlik)

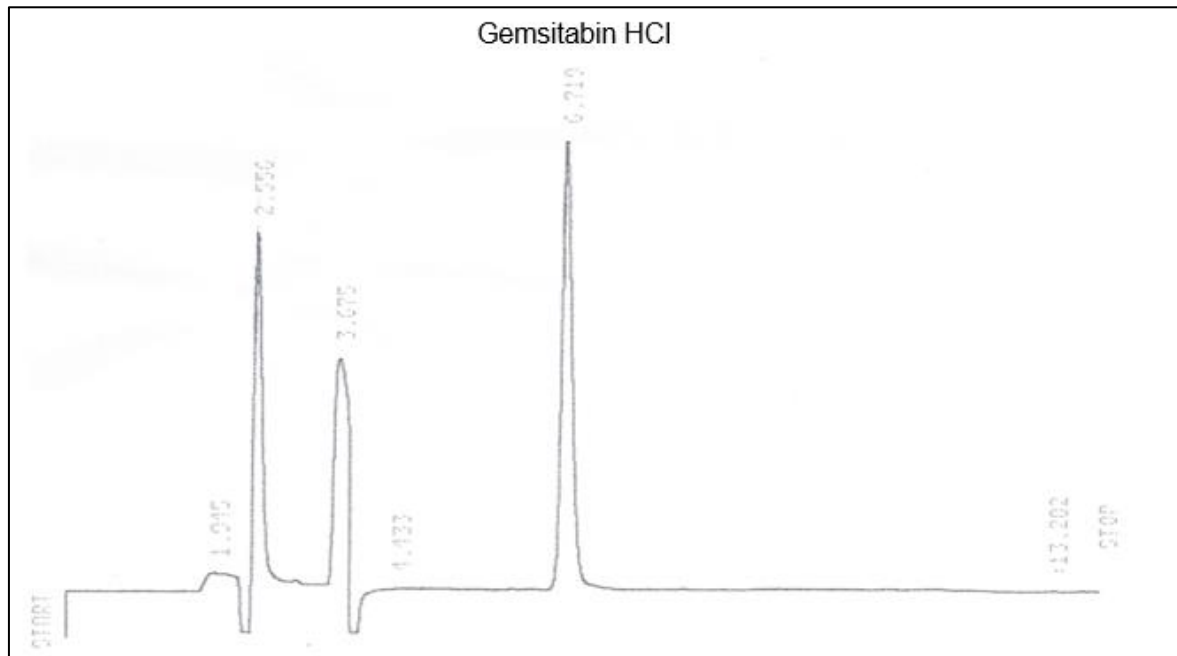
Gemsitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponundaki farklı konsantrasyonlarındaki çözeltileri birbirini takip eden 3 gün içerisinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Elde edilen pik yüksekliklerine karşılık gelen derişimlerin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. Deneyler arası kesinliğe ait sonuçlar Çizelge 4.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Gemsitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponundaki deneyler arası kesinlik sonuçları

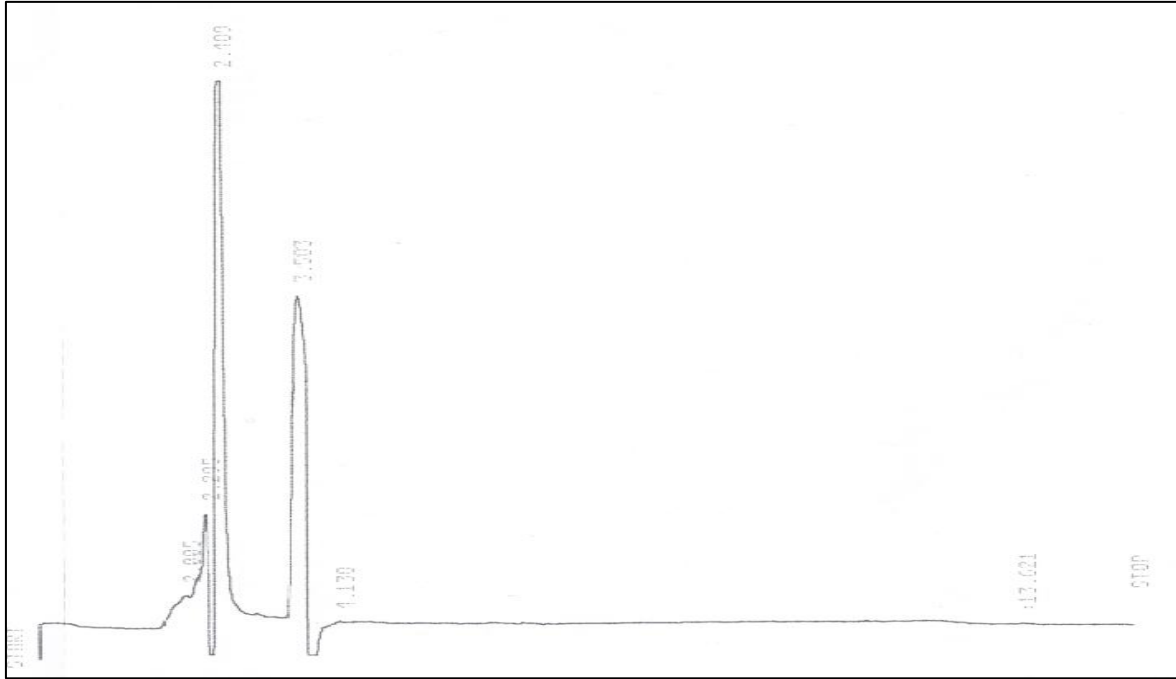
Derişim (µg/mL)	1. Gün	2. Gün	3. Gün	ORT	SS	Varyasyon katsayısı
5,0	5,16	5,03	5,18	5,12	0,07	1,30
1,2	1,22	1,22	1,27	1,24	0,02	1,91
0,4	0,409	0,409	0,423	0,414	0,007	1,60
0,2	0,205	0,206	0,205	0,205	0,001	0,23

Özgünlük ve seçicilik

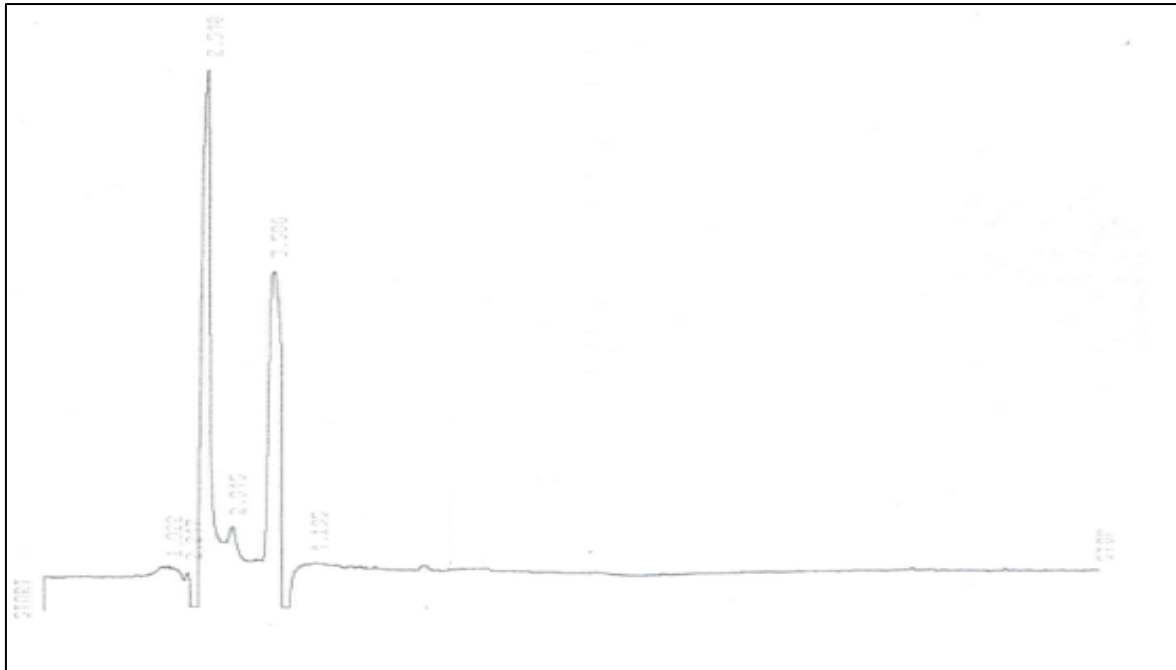
Kullanılan analiz yönteminin sadece analiz etmek istenilen maddeyi saptayabildiğinin, formülasyon içindeki yardımcı maddelerin aynı dalga boyunda absorbands gösterip göstermediğinin kontrolü yapılmıştır. Etkin madde, gemsitabin hidroklorür içermeyen nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonuna ait kromatogramlar Şekil 4.7-Şekil 4.10 arasında gösterilmiştir.



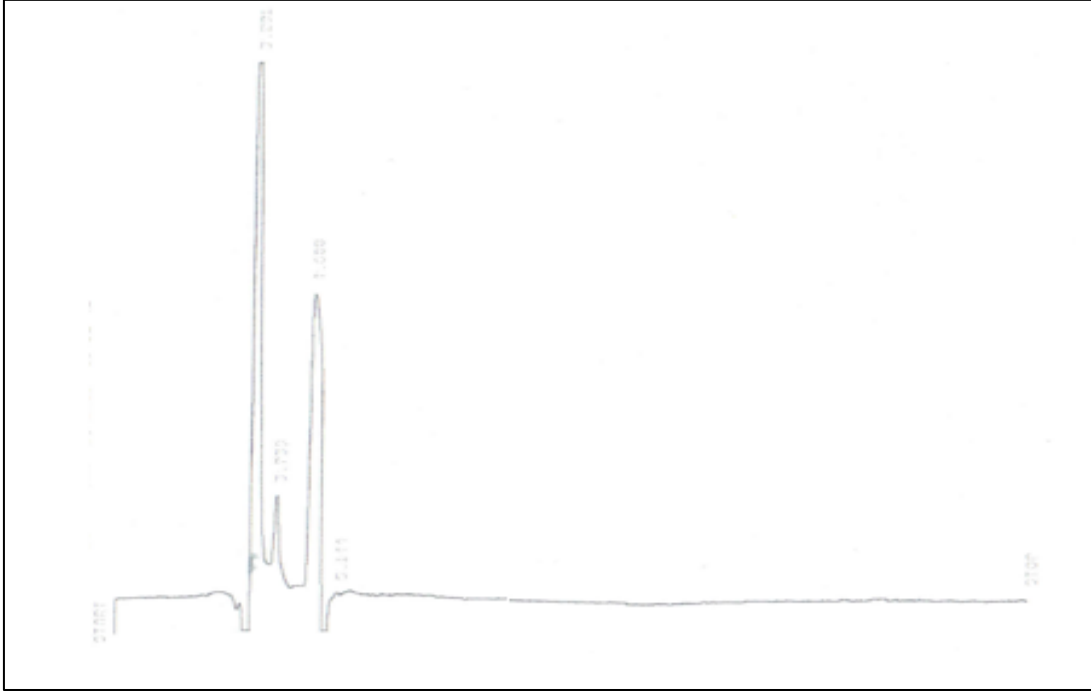
Şekil 4.7. Gemsitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponundaki kromatogram (1,2 µg/mL)



Şekil 4.8. Etkin madde içermeyen nanopartikül formülasyonuna ait kromatogram



Şekil 4.9. Etkin madde içermeyen lipozom formülasyonuna ait kromatogram



Şekil 4.10. Etkin madde içermeyen LPHNP formülasyonuna ait kromatogram

Duyarlılık ve saptama sınırı

Geliştirilen analitik yöntemin duyarlılık sınırı (LOD) ve saptama sınırı (LOQ) hesaplanmıştır. Analitik yöntemin duyarlılık sınırı (LOD) 5,430 ng/mL, saptama sınırı (LOQ) 16,454 ng/mL olarak bulunmuştur.

Gemsitabin hidroklorürün çözeltisinin farklı sıcaklık koşullarındaki stabilite çalışmaları

Gemsitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponu içindeki 1 µg/mL konsantrasyondaki çözeltileri stabilite çalışmalarında kullanılmıştır. Çözeltiler 4°C, 25°C ve 37°C sıcaklıklarda 15 gün süreyle bekletilmiş ve stabiliteleri incelenmiştir. Numuneler başlangıç (0. gün), 5. 10. ve 15. günlerde alınarak miktar tayini yöntemi 1'e göre HPLC ile tayin edilmiştir. Her bir zamana ait örneklerin ortalama geri elde, % geri elde, standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri belirlenmiştir. Gemsitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponu içindeki çözeltilerine ait farklı sıcaklıklardaki stabilite sonuçları Çizelge 4.5 – Çizelge 4.7 arasında yer almaktadır.

Çizelge 4.5. Gemsitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponu içindeki çözeltisinin 4°C'deki stabilite sonuçları

Zaman (Gün)	Konsantrasyon (µg/mL)	Geri elde ORT (µg/mL)	% geri elde	SS	BSS
0	1,0	1,02	102	0,02	0,020
5	1,0	0,97	97	0,03	0,026
10	1,0	0,99	99	0,02	0,019
15	1,0	1,03	103	0,02	0,014

Çizelge 4.6. Gemsitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponu içindeki çözeltisinin 25°C'deki stabilite sonuçları

Zaman (Gün)	Konsantrasyon (µg/mL)	Geri elde ORT (µg/mL)	% geri elde	SS	BSS
0	1,0	0,97	97	0,02	0,016
5	1,0	1,01	101	0,02	0,022
10	1,0	0,98	98	0,02	0,018
15	1,0	1,02	102	0,02	0,019

Çizelge 4.7. Gemsitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponu içindeki çözeltisinin 37°C'deki stabilite sonuçları

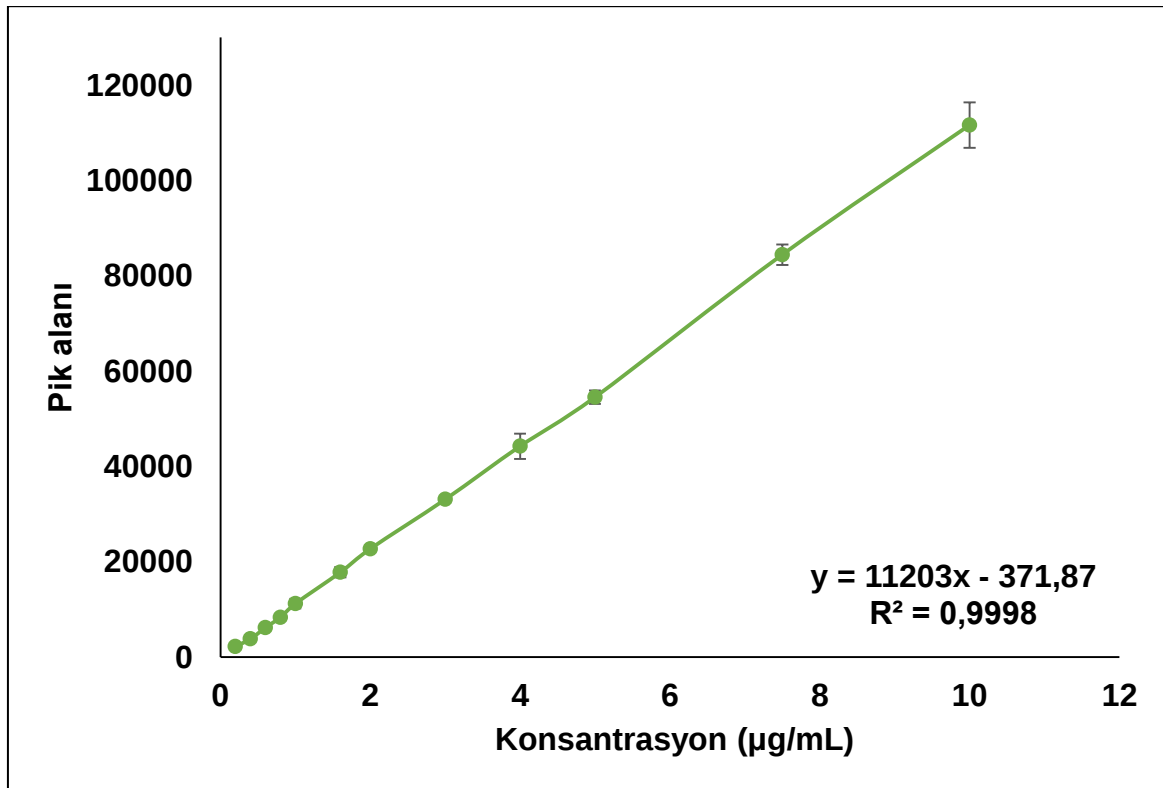
Zaman (Gün)	Konsantrasyon (µg/mL)	Geri elde ORT (µg/mL)	% geri elde	SS	BSS
0	1,0	0,99	99	0,02	0,019
5	1,0	1,03	103	0,02	0,016
10	1,0	1,02	102	0,02	0,022
15	1,0	0,97	97	0,01	0,015

4.2.2. Miktar tayini yöntemi (Yöntem 2) validasyonu (Biyoanalitik yöntem validasyonu)

Hayvan deneylerinde plazmadaki gemitabin hidroklorürün miktar tayinine ait validasyon çalışmaları HPLC aleti kullanılarak Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.

Doğrusallık

Gemitabin hidroklorürün sıçan plazmasında 0,2 µg/mL-10 µg/mL konsantrasyon aralığında 12 farklı numune hazırlanarak doğrusallık parametresi değerlendirilmiştir. 3 ayrı seri çözeltisi hazırlanmış ve HPLC’ye enjekte edilmiştir. Konsantrasyonlara karşılık gelen pik alanları bulunmuş ve grafiğe geçirilmiştir. En küçük kareler yöntemine göre değerlendirilmiş, standart doğru denklemi bulunmuş ve doğrusallığı kanıtlanmıştır. Şekil 4.11’de kalibrasyon doğrusuna ait grafik gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Gemitabin hidroklorürün sıçan plazmasındaki kalibrasyon doğrusu

Doğruluk ve ekstraksiyon etkinliği

Sıçan plazması içerisinde hazırlanan %80, %100 ve %120 gemitabin hidroklorür içeren çözeltilerden kalibrasyon denklemi kullanılarak ekstraksiyon etkinliği hesaplanmış ve gerekli istatistiksel parametrelerle değerlendirilmiştir. Hesaplanan değerler Çizelge 4.8’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. Gemitabin hidroklorürün plazma içindeki çözeltisinden ekstraksiyon etkinliği hesapları

Çözeltideki gemitabin hidroklorür yüzdesi	Çözeltideki gemitabin hidroklorür derişimi (µg/mL)	Hesapla bulunan gemitabin hidroklorür derişimi (µg/mL) (Ort ± SS)	% Ekstraksiyon etkinliği	Varyasyon katsayısı
%80	0,8	0,796 ± 0,010	%100	1,27
%100	1,0	1,026 ± 0,014	%103	1,37
%120	1,2	1,178 ± 0,016	%98	1,36

Kesinlik

Deney içi ve deneyler arası kesinlik olmak üzere iki farklı parametre incelenmiştir. Kesinlik ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri ile değerlendirilmiştir.

Deney içi kesinlik (Tekrar edilebilirlik)

Gemitabin hidroklorürün plazma içerisindeki stok çözeltisinden 3 µg/mL derişimde hazırlanan çözelti arka arkaya 10 kez HPLC’ye enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçların ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. Çizelge 4.9’da gemitabin hidroklorürün plazma içindeki deney içi kesinlik sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. Gemitabin hidroklorürün plazma içindeki deney içi kesinlik sonuçları

Örnek No	Gemitabin hidroklorür çözeltilisinin derişimi (µg/mL)	Hesapla bulunan derişimler (µg/mL)
1	3,00	3,018
2	3,00	2,912
3	3,00	2,972
4	3,00	2,991
5	3,00	2,983
6	3,00	3,003
7	3,00	3,041
8	3,00	2,987
9	3,00	3,032
10	3,00	3,058
ORT		3,000
Standart sapma		0,042
Varyasyon katsayısı		1,38

Deneyler arası kesinlik (Tekrar elde edilebilirlik)

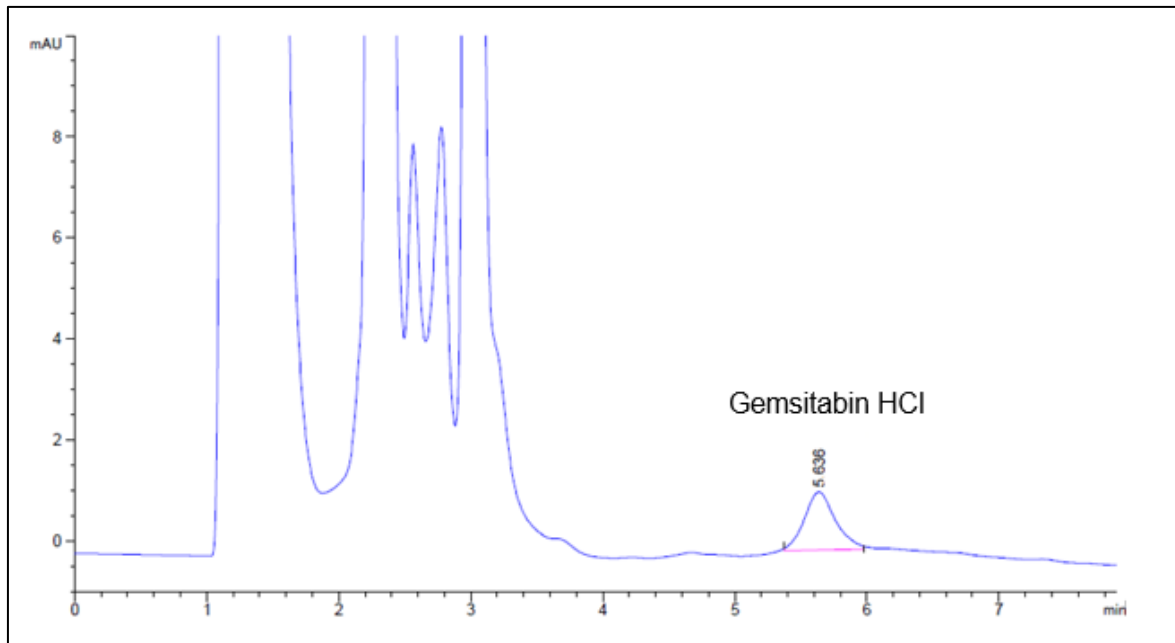
Gemitabin hidroklorürün plazmadaki farklı konsantrasyonlarındaki çözeltileri birbirini takip eden 3 gün içerisinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen derişimlerin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. Deneyler arası kesinliğe ait sonuçlar Çizelge 4.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.10. Gempitabin hidroklorürün plazma içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları

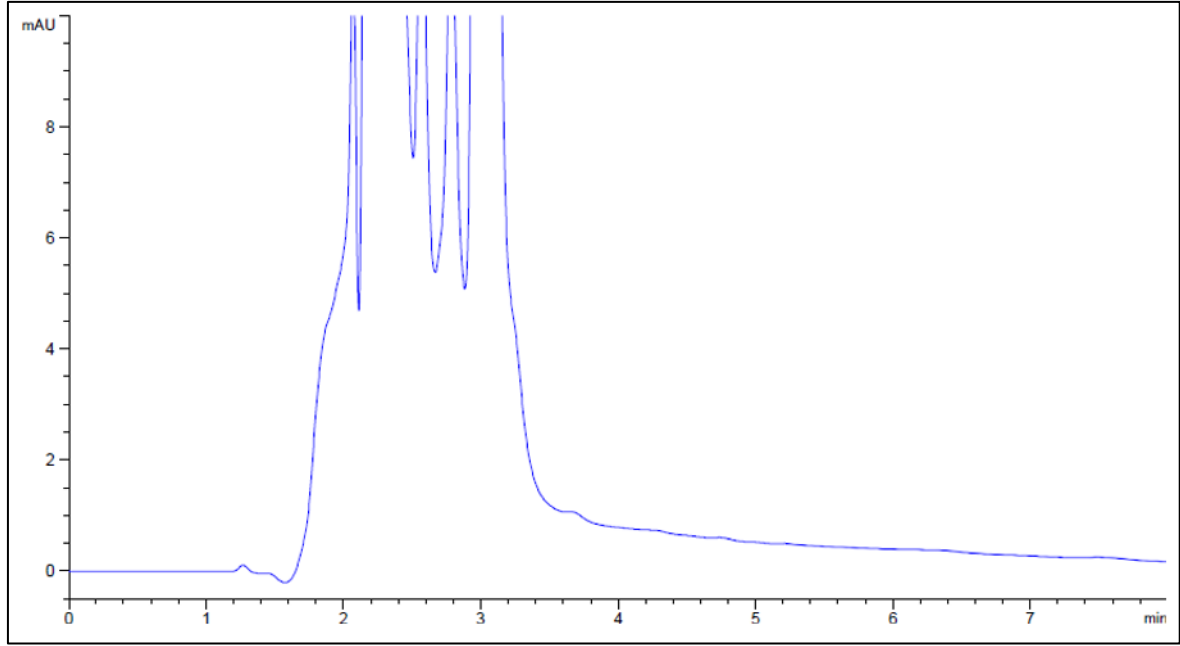
Derişim (µg/mL)	1. Gün	2. Gün	3. Gün	ORT	SS	Varyasyon katsayısı
5,0	5,16	5,02	5,13	5,10	0,06	1,17
2,0	2,14	2,02	2,08	2,08	0,05	2,36
1,0	0,99	1,01	1,02	1,01	0,01	1,18
0,4	0,41	0,40	0,41	0,407	0,008	1,97

Özgünlük ve seçicilik

Kullanılan analiz yönteminin sadece analiz etmek istenilen maddeyi saptayabildiğinin, formülasyon içindeki yardımcı maddelerin aynı dalga boyunda absorbands gösterip göstermediğinin kontrolü yapılmıştır. Etkin madde ve gempitabin hidroklorür içermeyen LPHNP formülasyonuna ait kromatogramlar Şekil 4.12 ve Şekil 4.13’de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. Plazmadaki gempitabin hidroklorüre ait kromatogram



Şekil 4.13. Etkin madde içermeyen LPHNP formülasyonuna ait kromatogram

Duyarlılık ve saptama sınırı

Analitik yöntemin duyarlılık sınırı (LOD) 13,6 ng/mL, saptama sınırı (LOQ) 41,5 ng/mL olarak bulunmuştur.

Plazma örneklerinin stabilitesi

Farklı konsantrasyonlarda gempitabin hidroklorür içeren plazma örneklerinin 60 günlük stabilite sonuçları Çizelge 4.11 – Çizelge 4.13 arasında gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. Plazmadaki 0,4 µg/mL derişimdeki gempitabin hidroklorürün stabilitesi

Zaman (Gün)	Konsantrasyon (µg/mL)	Geri elde Ort (µg/mL)	% Ekstraksiyon verimi	SS	BSS
0	0,4	0,407	102	0,004	0,010
15	0,4	0,397	99	0,009	0,022
30	0,4	0,402	101	0,013	0,032
60	0,4	0,398	100	0,013	0,032

Çizelge 4.12. Plazmadaki 1 µg/mL derişimdeki gemitabin hidroklorürün stabilitesi

Zaman (Gün)	Konsantrasyon (µg/mL)	Geri elde Ort (µg/mL)	% Ekstraksiyon verimi	SS	BSS
0	1,0	1,02	102	0,03	0,003
15	1,0	0,98	98	0,04	0,037
30	1,0	1,04	104	0,03	0,031
60	1,0	0,97	97	0,03	0,031

Çizelge 4.13. Plazmadaki 5 µg/mL derişimdeki gemitabin hidroklorürün stabilitesi

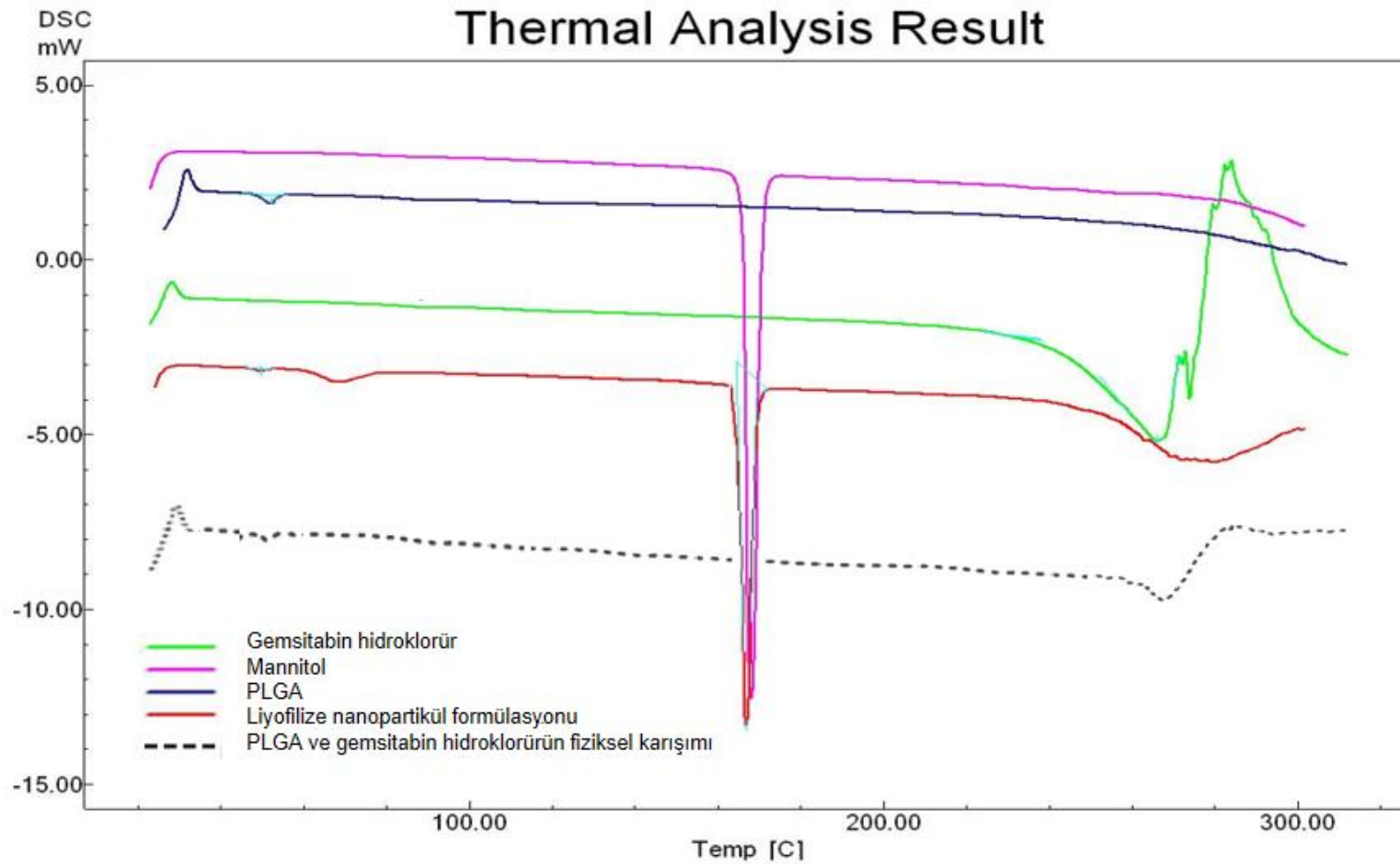
Zaman (Gün)	Konsantrasyon (µg/mL)	Geri elde Ort (µg/mL)	% Ekstraksiyon verimi	SS	BSS
0	5,0	5,09	102	0,09	0,017
15	5,0	5,06	101	0,11	0,021
30	5,0	4,92	98	0,12	0,025
60	5,0	4,98	100	0,09	0,018

4.3. Formülasyon Çalışmaları

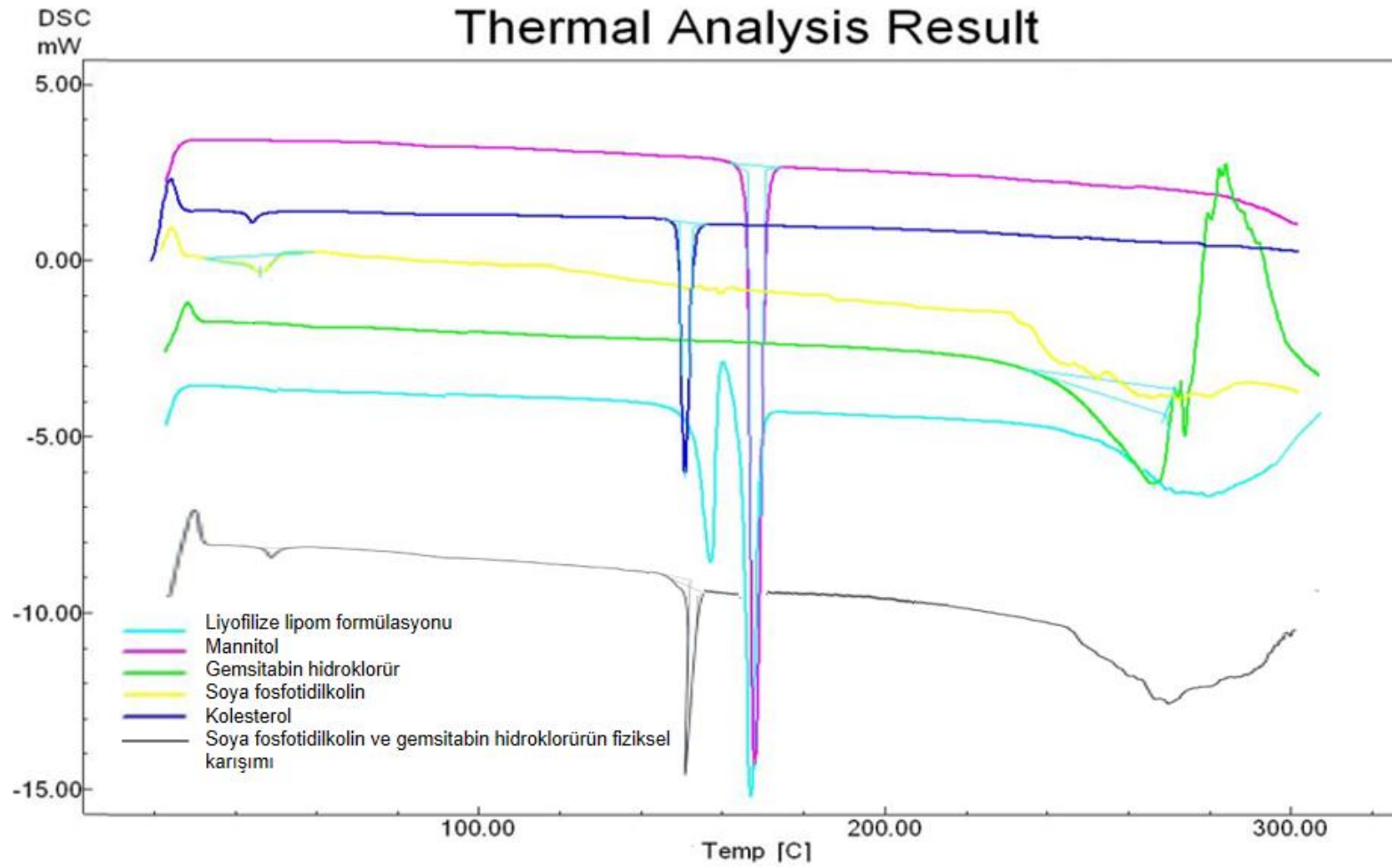
4.3.1. Etkin madde yardımcı madde etkileşimleri

DSC analizi

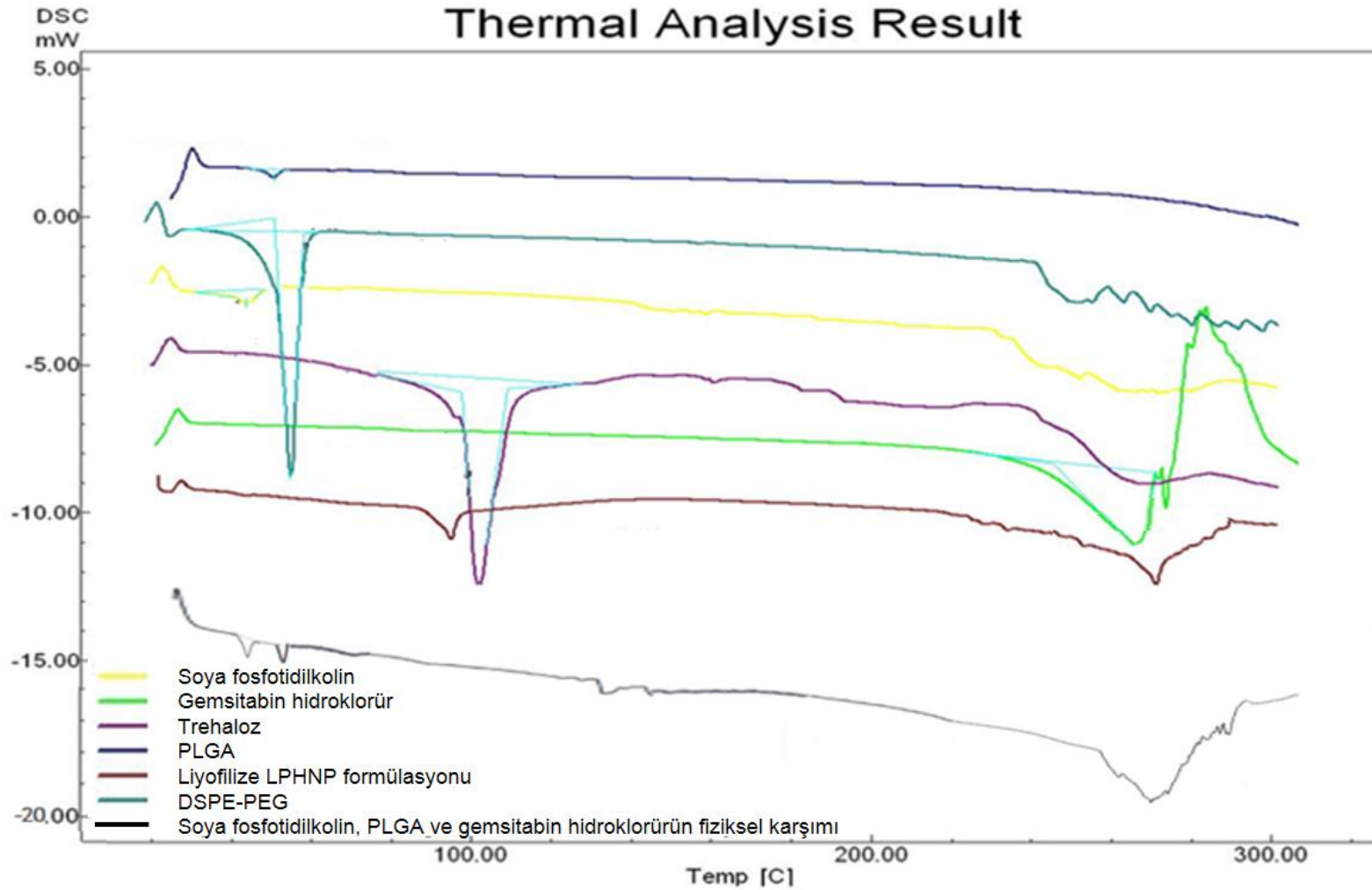
Deneyler Bölüm 3.3.1’de anlatıldığı gibi yapılmış ve etkin madde ile formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddeler arasında etkileşim olup olmadığı incelenmiştir. Deneyler sonucunda elde edilen grafikler Şekil 4.14-Şekil 4.16 arasında gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Gemcitabin hidroklorür, mannitol, PLGA, liyofilize nanopartikül formülasyonu ve PLGA-gemcitabin hidroklorür fiziksel karışımına ait DSC termogramı



Şekil 4.15. Gemsitabin hidroklorür, soya fosfatidilkolin, mannitol, kolesterol, liyofilize lipozom formülasyonu ve soya fosfatidilkolin-gemsitabin hidroklorür fiziksel karışımına ait DSC termogramı



Şekil 4.16. Gensitabin hidroklorür, PLGA, soya fosfatidilkolin, DSPE-PEG, trehaloz, liyofilize LPHNP formülasyonuna ve soya fosfatidilkolin-PLGA-gensitabin hidroklorürün fiziksel karışımına ait DSC termogramı

4.3.2. Geliştirilen nanopartikül formülasyonlarına ait sonuçlar

Gemsitabin hidroklorür içeren nanopartikül formülasyonlarında yapılan ön çalışmalar

Nanopartiküller formülasyonlarının geliştirilmesi sırasında yapılan ön denemelerde PLGA miktarının etkisi ile iç ve dış sulu fazda kullanılan yüzey etkin maddelerin farklı olmasının etkisi incelenmiştir. Gemsitabin hidroklorür yüklü nanopartikül formülasyonlarında gerçekleştirilen ön çalışmalara ait partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (PDI), zeta potansiyeli, % enkapsülasyon etkinliği (%EE) ve % ilaç yükleme (%İY) ait sonuçlar Çizelge 4.14'de verilmiştir. Ayrıca bu formülasyonlarda liyofilizasyon işleminin partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli üzerindeki etkisi de incelenmiştir (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.14. Nanopartikül formülasyonlarında yapılan ön çalışmalara ait sonuçlar

	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)	(%EE)	(%İY)
Ö-NP1	291 ± 5	0,130 ± 0,009	-12,8 ± 0,3	0,094 ± 0,001	0,014 ± 0,000
Ö-NP2	326 ± 7	0,307 ± 0,058	-16,0 ± 0,7	0,294 ± 0,004	0,019 ± 0,000
Ö-NP3	362 ± 10	0,270 ± 0,033	-15,4 ± 0,5	0,467 ± 0,007	0,020 ± 0,000
Ö-NP4	391 ± 21	0,381 ± 0,015	-16,5 ± 0,2	0,627 ± 0,007	0,023 ± 0,000
Ö-NP5	260 ± 4	0,215 ± 0,045	-18,7 ± 0,3	0,363 ± 0,006	0,019 ± 0,000
Ö-NP6	421 ± 5	0,273 ± 0,058	-13,1 ± 1,1	0,277 ± 0,004	0,018 ± 0,000

Çizelge 4.15. Nanopartikül formülasyonlarında yapılan ön çalışmalarda liyofilizasyonun etkisi

	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)	
Ö-NP2	258 ± 3	0,174 ± 0,025	-16,5 ± 1,7	Liyofilizasyon öncesi
Ö-NP4	274 ± 6	0,262 ± 0,013	-14,4 ± 0,5	
Ö-NP5	248 ± 4	0,167 ± 0,017	-16,4 ± 1,9	
Ö-NP6	320 ± 5	0,241 ± 0,046	-13,0 ± 0,3	
Ö-NP2	326 ± 7	0,307 ± 0,058	-16,0 ± 0,7	Liyofilizasyon sonrası
Ö-NP4	391 ± 21	0,381 ± 0,015	-16,5 ± 0,2	
Ö-NP5	260 ± 4	0,215 ± 0,045	-18,7 ± 0,3	
Ö-NP6	421 ± 5	0,273 ± 0,058	-13,1 ± 1,1	

Gemsitabin hidroklorür içeren nanopartikül formülasyonları geliştirme çalışmaları

Nanopartiküller üzerinde yapılan ön denemeler sonucunda hem iç sulu hem de dış sulu fazda yüksek molekül ağırlığına sahip PVA (31-50 kDa) kullanımının partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinliği açısından daha başarılı sonuçlar verdiği görülmüş ve bundan sonraki çalışmalarda yüzey etkin madde olarak PVA (31-50 kDa) kullanılmasına karar verilmiştir. Ayrıca ilerleyen çalışmalarda liyofilizasyon işlemi sonucunda nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutunun büyümesini engellemek için liyoprotektan (mannitol) kullanılmıştır. Nanopartikül formülasyonu geliştirme çalışmalarında PLGA miktarının etkisi, etkin madde miktarının etkisi, asit veya ester yapıdaki PLGA polimerinin etkisi, organik çözücü/çözücü karışımının etkisi, PLGA polimerinin molekül ağırlığının etkisi, PLGA polimerinin laktik asit/glikolik asit oranının formülasyonlar üzerindeki etkisi incelenmiştir.

PLGA miktarının etkisi

PLGA miktarının etkisi incelemek için asit terminal fonksiyonel gruba sahip PLGA 50:50 (7-17 kDa) polimeriyle çalışılmıştır. Formülasyonlarda 160 mg, 240 mg ve 320 mg polimer kullanılmıştır. Çizelge 4.16'da PLGA miktarının etkisini incelemeye yönelik hazırlanan formülasyonların partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (PDI), zeta potansiyeli, %EE ve %İY ait sonuçlar gösterilmiştir.

Çizelge 4.16. Farklı PLGA miktarları kullanılarak hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar

	NP1 (160 mg)	NP2 (240 mg)	NP3 (320 mg)
Partikül büyüklüğü (nm)	211 ± 5	232 ± 10	284 ± 22 ^a
PDI	0,163 ± 0,035	0,248 ± 0,032	0,302 ± 0,148
Zeta potansiyeli (mV)	-12,2 ± 2,1	-16,6 ± 1,2	-14,3 ± 1,7
%EE	4,82 ± 0,28	6,47 ± 0,58 ^b	8,29 ± 0,04 ^a
%İY	0,141 ± 0,008	0,123 ± 0,011	0,119 ± 0,001

^a NP2-NP3 arasındaki farkı, ^b NP1-NP2 arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05).

Etkin madde miktarının etkisi

Etkin madde miktarının etkisini incelemeye yönelik hazırlanan nanopartiküllerde 4 mg ve 2 mg gemsitabin hidroklorür kullanılan formülasyonlar hazırlanmıştır. Çizelge 4.17'de etkin madde etkisini incelemeye yönelik hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar yer almaktadır.

Çizelge 4.17. Farklı miktarda etkin madde kullanılarak hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar

	NP2 (4 mg)	NP4 (2 mg)
Partikül büyüklüğü (nm)	232 ± 10	213 ± 3
PDI	0,248 ± 0,032	0,130 ± 0,026
Zeta potansiyeli (mV)	-16,6 ± 1,2	-11,6 ± 0,3
%EE	6,47 ± 0,58	6,92 ± 0,48
%İY	0,123 ± 0,011	0,064 ± 0,005

Farklı terminal gruba sahip PLGA kullanılarak hazırlanan formülasyonlar

Farklı terminal gruba sahip PLGA seçiminin formülasyonlar üzerine etkisinin incelenmesi için PLGA 50:50 polimerinin asit veya ester terminal gruba sahip polimerleri kullanılmıştır. PLGA'nın farklı terminal fonksiyonel gruba sahip polimerleri kullanılarak hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar Çizelge 4.18'de verilmiştir.

Çizelge 4.18. Farklı terminal fonksiyonel gruba sahip PLGA polimeri kullanılarak hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar

	NP4 (7-17 kDa Asit)	NP5 (38-54 kDa Asit)	NP6 (7-17 kDa Ester)	NP7 (38-54 kDa Ester)
Partikül büyüklüğü (nm)	213 ± 3	235 ± 7	244 ± 13 ^a	262 ± 14 ^b
PDI	0,130 ± 0,026	0,104 ± 0,021	0,225 ± 0,025	0,157 ± 0,032
Zeta potansiyeli (mV)	-11,6 ± 0,3	-9,6 ± 0,9	-13,3 ± 0,4	-13,8 ± 1,4
%EE	6,92 ± 0,48	7,91 ± 0,74	3,94 ± 0,22 ^a	4,63 ± 0,29 ^b
%İY	0,064 ± 0,005	0,076 ± 0,007	0,036 ± 0,002	0,042 ± 0,003

^a NP4-NP6 arasındaki farkı, ^b NP5-NP7 arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05).

Organik çözücü/çözücü karışımlarının etkisi

Farklı organik çözücü/çözücü karışımlarının formülasyonlar üzerine etkisini incelemek için polimer olarak PLGA 50:50 (7-17 kDa) kullanılmıştır. Formülasyonlara ait sonuçlar Çizelge 4.19'da belirtilmiştir.

Çizelge 4.19. Organik çözücü/çözücü karışımlarının etkisi incelemeye yönelik hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar

	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)	%EE	%İY
NP8 (DCM)	486 ± 24	0,342 ± 0,156	-18,4 ± 2,4	4,87 ± 0,07	0,045 ± 0,001
NP9 (ACE)	246 ± 9	0,221 ± 0,048	-21,7 ± 0,6	1,67 ± 0,01	0,041 ± 0,000
NP10 (EA)	252 ± 7	0,181 ± 0,032	-16,7 ± 0,7	3,32 ± 0,09	0,031 ± 0,001
NP11 (DCM: EA 1:1 h/h)	270 ± 4	0,244 ± 0,052	-15,6 ± 0,6	4,38 ± 0,11	0,038 ± 0,001
NP4 (DCM:ACE 1:1 h/h)	213 ± 3	0,130 ± 0,026	-11,6 ± 0,3	6,92 ± 0,48 ^a	0,064 ± 0,005
NP12 (DCM:ACE 1:2 h/h)	231 ± 10	0,225 ± 0,040	-19,2 ± 1,6	12,0 ± 0,4 ^b	0,107 ± 0,004
NP13 (DCM:ACE 1:4 h/h)	237 ± 17	0,270 ± 0,047	-14,0 ± 1,9	4,21 ± 0,15 ^c	0,045 ± 0,000

^a NP4-NP12 arasındaki farkı, ^b NP12-NP13 arasındaki farkı, ^c NP4-NP13 arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05).

Farklı molekül ağırlığına sahip PLGA'lar kullanılarak hazırlanan formülasyonlar

Polimerin molekül ağırlığının formülasyonlar üzerindeki etkisini incelemek için organik çözücü olarak DCM:ACE (1:1 h/h) ve (1:2 h/h) karışımları kullanılmıştır. Formülasyonların hazırlanmasında PLGA 50:50'nin farklı molekül ağırlığına sahip polimerleriyle (7-17 kDa, 24-38 kDa ve 38-54 kDa) çalışılmıştır. PLGA'nın farklı molekül ağırlıklı polimerleri kullanılarak hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar Çizelge 4.20'de verilmiştir.

Çizelge 4.20. Farklı molekül ağırlığına sahip PLGA'lar kullanılarak hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar

		Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)	%EE	%İY
(DCM:ACE 1:1 h/h)	NP4 (PLGA 7-17 kDa)	213 ± 3	0,130 ± 0,026	-11,6 ± 0,3	6,92 ± 0,48	0,064 ± 0,005
	NP14 (PLGA 24-38 kDa)	231 ± 6 ^a	0,086 ± 0,011	-18,4 ± 0,6	7,87 ± 0,38	0,073 ± 0,004
	NP5 (PLGA 38-54 kDa)	235 ± 7 ^b	0,104 ± 0,021	-9,60 ± 0,9	7,91 ± 0,74	0,076 ± 0,007
(DCM:ACE 1:2 h/h)	NP12 (PLGA 7-17 kDa)	231 ± 10	0,225 ± 0,040	-19,2 ± 1,6	12,0 ± 0,4	0,107 ± 0,004
	NP15 (PLGA 24-38 kDa)	239 ± 13	0,297 ± 0,122	-12,5 ± 0,6	12,7 ± 0,9	0,179 ± 0,015
	NP16 (PLGA 38-54 kDa)	245 ± 23	0,311 ± 0,097	-12,4 ± 1,0	14,0 ± 0,3 ^c	0,244 ± 0,006

^a NP4-NP14 arasındaki farkı, ^b NP4-NP5 arasındaki farkı, ^c NP12-NP16 arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05).

Farklı laktik asit/glikolik asit oranına sahip PLGA polimeri kullanılarak hazırlanan formülasyonlar

Polimerin farklı laktik asit/glikolik asit oranına sahip olmasının formülasyonlar üzerindeki etkisini incelemek için organik çözücü olarak DCM:ACE (1:1 h/h) ve (1:2 h/h) karışımları kullanılmıştır. Farklı laktik asit/glikolik asit oranına sahip formülasyonların hazırlanması için PLGA 50:50, PLGA 65:35 ve PLGA 75:25 polimerleriyle çalışılmıştır. Formülasyonlara ait sonuçlar Çizelge 4.21'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.21. Farklı laktik asit/glikolik asit oranına sahip PLGA polimeri kullanılarak hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar

		Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyel i (mV)	%EE	%İY
(DCM:ACE 1:1 h/h)	NP14 (PLGA 50:50)	231 ± 6	0,086 ± 0,011	-18,4 ± 0,6	7,87 ± 0,38 ^a	0,073 ± 0,004
	NP17 (PLGA 65:35)	235 ± 7	0,069 ± 0,025	-16,0 ± 0,4	5,45 ± 0,86 ^b	0,046 ± 0,002
	NP18 (PLGA 75:25)	239 ± 5	0,190 ± 0,056	-12,7 ± 1,1	3,92 ± 0,16 ^c	0,037 ± 0,002
(DCM:ACE 1:2 h/h)	NP15 (PLGA 50:50)	239 ± 13	0,297 ± 0,122	-12,5 ± 0,6	12,7 ± 0,9 ^d	0,179 ± 0,015
	NP19 (PLGA 65:35)	245 ± 3	0,164 ± 0,028	-13,6 ± 0,4	9,48 ± 0,75 ^e	0,103 ± 0,008
	NP20 (PLGA 75:25)	265 ± 6 ^f	0,204 ± 0,036	-14,8 ± 0,9	7,51 ± 0,32 ^f	0,082 ± 0,003

^a NP14-NP17 arasındaki farkı, ^b NP17-NP18 arasındaki farkı, ^c NP14-NP18 arasındaki farkı, ^d NP15-NP19 arasındaki farkı, ^e NP19-NP20 arasındaki farkı, ^f NP15-NP20 arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05).

Bundan sonraki basamakta yüksek enkapsülasyon etkinliği gösteren PLGA 50:50 (38-54 kDa) polimeri PLGA 65:35 ve PLGA 75:25 polimerleri ile ayrı ayrı 1:1 oranında (a/a) karıştırılarak formülasyonlar hazırlanmıştır. Ayrıca en yüksek enkapsülasyon etkinliği gösteren PLGA 50:50/PLGA 65:35 polimer karışımı kullanılarak hazırlanan formülasyon pegile edilmiştir. Formülasyonlara ait sonuçlar Çizelge 4.22’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.22. PLGA 50:50/PLGA 65:35 ve PLGA 50:50/PLGA 75:25 polimer karışımları kullanılarak hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar

	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)	%EE	%İY
NP21 (PLGA 50:50/PLGA 65:35)	267 ± 10	0,241 ± 0,019	-13,8 ± 0,8	18,0 ± 0,7 ^b	0,163 ± 0,006
NP22 (PLGA 50:50/PLGA 75:25)	276 ± 26	0,390 ± 0,022	-19,1 ± 1,0	11,1 ± 0,6	0,101 ± 0,006
PEG NP21 (PLGA 50:50/PLGA 65:35)	215 ± 4 ^a	0,128 ± 0,023	-17,7 ± 0,8	18,8 ± 1,5	0,167 ± 0,013

^a NP21-PEG NP21 arasındaki farkı, ^b NP21-NP22 arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05).

4.3.3. Geliştirilen lipozom formülasyonlarına ait sonuçlar

Lipozomlarla yapılan çalışmalarda formülasyonlara ait partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (PDI), zeta potansiyeli, % enkapsülasyon etkinliği (%EE) ve % ilaç yükleme (%İY) parametreleri incelenmiştir.

Lipozom formülasyonlarında yapılan ön çalışmalar

Lipozomlara ait ön çalışmalarda yağ olarak SPC kullanılmış ve etkin madde ilave edilmemiştir. Ekstrüksiyon işleminin formülasyonlar üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ön denemeler için hazırlanan bu formülasyonlarda liyofilizasyon işleminde liyoprotektan ilave edilmemiştir. Formülasyonlara ait sonuçlar Çizelge 4.23'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.23. Lipozom formülasyonunda yapılan ön çalışmalara ait sonuçlar

			Ekstrüsiyon işleminde kullanılan membran filtre boyutu			
		Hidrasyondan sonrası	800 nm	400 nm	200 nm	Liyofilizasyon sonrası (Liyoprotektan ilave edilmemiş)
Ö-LP1	Partikül büyüklüğü (nm)	1808 ± 278	622 ± 122	384 ± 43	184 ± 5	546 ± 81
	PDI	1,000 ± 0,000	0,537 ± 0,105	0,284 ± 0,094	0,134 ± 0,009	0,725 ± 0,099
Ö-LP2	Partikül büyüklüğü (nm)	1096 ± 345	543 ± 70	355 ± 36	176 ± 8	494 ± 69
	PDI	0,725 ± 0,188	0,481 ± 0,147	0,267 ± 0,071	0,104 ± 0,022	0,524 ± 0,141

Gemsitabin hidroklorür içeren lipozom formülasyonları geliştirme çalışmaları

Farklı molar oranlarında soya fosfatidilkolin/kolesterol karışımı kullanılarak lipozom formülasyonları hazırlanmıştır. Bu formülasyonlara ait sonuçlar Çizelge 4.24’de yer almıştır.

Çizelge 4.24. Farklı SPC:kolesterol molar oranları ile hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar

	LP1 (SPC:kolesterol 4:1)	LP2 (SPC:kolesterol 4:2)	LP3 (SPC:kolesterol 4:4)
Partikül büyüklüğü (nm)	289 ± 34	219 ± 26 ^a	191 ± 10 ^b
PDI	0,399 ± 0,053	0,196 ± 0,092	0,192 ± 0,021
Zeta potansiyeli (mV)	-14,3 ± 0,6	-14,7 ± 0,5	-15,6 ± 1,3
%EE	26,2 ± 1,4	23,8 ± 1,0 ^c	12,9 ± 0,6 ^b
%İY	0,501 ± 0,028	0,444 ± 0,007	0,235 ± 0,010

^a LP1-LP2 arasındaki farkı, ^b LP1-LP3 arasındaki farkı, ^c LP2-LP3 arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05).

Farklı fosfatidilkolin türlerinin lipozom formülasyonu üzerine etkisini incelemek için soya fosfatidilkolin (SPC), dipalmitoil fosfatidilkolin (DPPC) ve dioleil fosfatidilkolin (DOPC) kolesterol ile ayrı ayrı 4:2 molar oranında kullanılarak lipozom formülasyonları hazırlanmıştır. Bu formülasyonlar incelendiğinde en yüksek enkapsülasyon etkinliği gösteren SPC/kolesterol (4:2 molar oranı) kullanılarak hazırlanan formülasyon pegile edilmiştir. Formülasyonlara ait sonuçlar Çizelge 4.25'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.25. Farklı fosfatidilkolinler kullanılarak hazırlanan lipozom formülasyonlarına ait sonuçlar

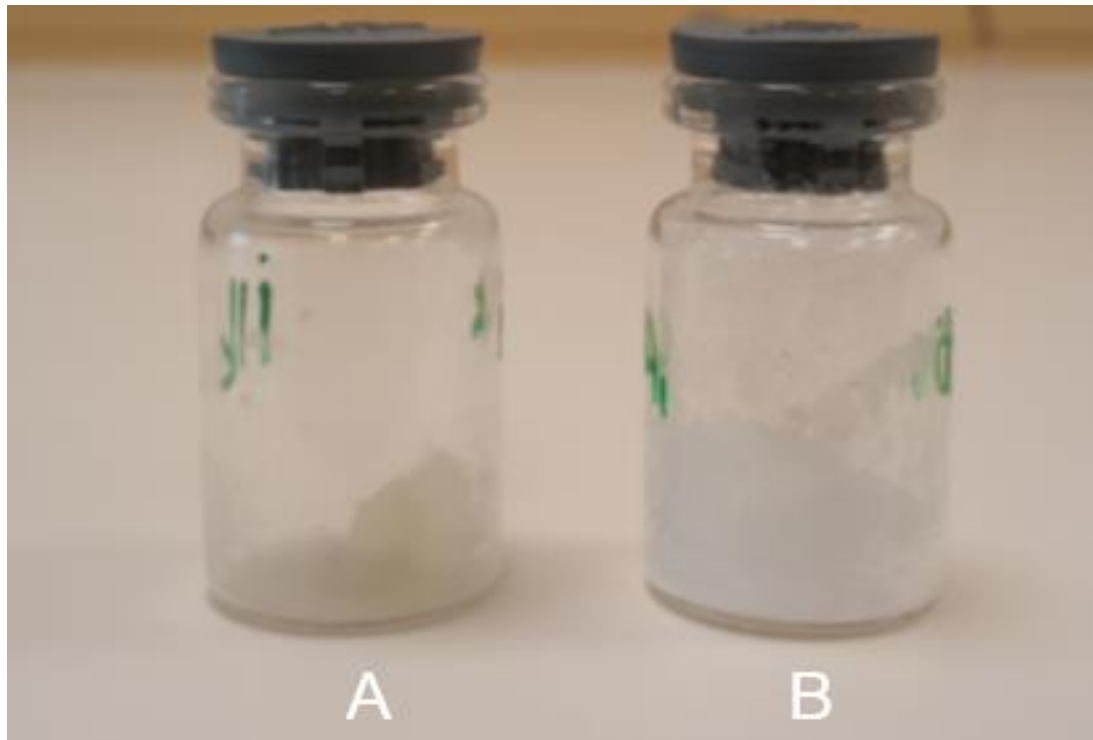
	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)	%EE	%İY
LP2 (SPC:kolesterol 4:2)	219 ± 26	0,196 ± 0,092	-14,7 ± 0,5	23,8 ± 1,0 ^a	0,442 ± 0,021
LP4 (DOPC:kolesterol 4:2)	225 ± 24	0,285 ± 0,080	-19,0 ± 1,1	22,2 ± 2,9 ^b	0,393 ± 0,051
LP5 (DPPC:kolesterol 4:2)	203 ± 17	0,263 ± 0,040	-19,9 ± 1,3	16,2 ± 2,8	0,255 ± 0,043
PEG LP2 (SPC:kolesterol 4:2)	206 ± 18	0,266 ± 0,040	-23,1 ± 1,0	26,1 ± 0,2	0,511 ± 0,016

^a LP2-LP5 arasındaki farkı, ^b LP4-LP5 arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05).

Gemsitabin hidroklorür yüklü lipozom formülasyonlarının liyofilizasyon işlemi öncesi ve liyofilizasyon işlemi sonrası partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi (PDI) sonuçları Çizelge 4.26'da verilmiştir. Liyofilizasyon işleminde liyoprotektan kullanılan ve kullanılmayan lipozom formülasyonuna ait fotoğraf Resim 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.26. Gemsitabin hidroklorür içeren lipozom formülasyonlarında liyofilizasyon işleminin öncesi ve sonrasına ait sonuçlar

	Partikül büyüklüğü (nm)		Polidispersite indeksi	
	Liyofilizasyon öncesi	Liyofilizasyon sonrası	Liyofilizasyon öncesi	Liyofilizasyon sonrası
LP1 (SPC:kolesterol 4:1)	190 ± 4	289 ± 34	0,048 ± 0,033	0,399 ± 0,053
LP2 (SPC:kolesterol 4:2)	183 ± 8	219 ± 26	0,065 ± 0,028	0,196 ± 0,092
LP3 (SPC:kolesterol 4:4)	177 ± 4	191 ± 10	0,077 ± 0,041	0,192 ± 0,021
LP4 (DOPC:kolesterol 4:2)	184 ± 7	225 ± 24	0,086 ± 0,018	0,285 ± 0,080
LP5 (DPPC:kolesterol 4:2)	182 ± 15	203 ± 17	0,089 ± 0,025	0,263 ± 0,040
PEG LP2 (SPC:kolesterol 4:2)	179 ± 16	206 ± 18	0,095 ± 0,011	0,266 ± 0,040



Resim 4.1. (A) Liyoprotektan içermeyen ve (B) liyoprotektan içeren liyofilize lipozom formülasyonlarına ait görüntü

4.3.4. Gemsitabin hidroklorür içeren LPHNP formülasyonlarına ait sonuçlar

LPHNP formülasyonlarında yapılan ön çalışmalar

Gemsitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonlarına ait ön çalışmalarda modifiye çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemleri (Yöntem 1 ve Yöntem 2) ile modifiye nanoçöktürme yöntemi kıyaslanmıştır. Formülasyonlarda partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (PDI), zeta potansiyeli, % enkapsülasyon etkinliği (%EE) ve % ilaç yükleme (%İY) parametreleri incelenmiştir. Bu üç yöntemin kullanılmasıyla hazırlanan ön formülasyonlara ait sonuçlar Çizelge 4.27’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.27. İki farklı çift emülsiyon çözücü uçurma ve nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar

	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)	%EE	%İY
Ö-LPHNP1 (Yöntem 1)	225 ± 12	0,284 ± 0,051	-12,4 ± 0,4	21,4 ± 0,6	0,262 ± 0,004
Ö-LPHNP2 (Yöntem 1)	234 ± 18	0,253 ± 0,052	-13,7 ± 0,8	24,5 ± 0,9	0,316 ± 0,006
Ö-LPHNP3 (Yöntem 2)	257 ± 28	0,422 ± 0,084	-12,4 ± 0,4	17,5 ± 1,1	0,214 ± 0,007
Ö-LPHNP4 (Yöntem 2)	280 ± 27	0,398 ± 0,055	-12,7 ± 0,4	20,8 ± 1,3	0,262 ± 0,008
Ö-LPHNP5 (Nanoçöktürme)	476 ± 80	0,722 ± 0,060	-20,9 ± 1,2	7,90 ± 0,20	0,098 ± 0,001

Nanoçöktürme yöntemiyle hazırlanan formülasyon, modifiye çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemleri ile hazırlanan formülasyonlara göre oldukça düşük enkapsülasyon etkinliği göstermiştir (%7,90±0,20). Modifiye çift emülsiyon yöntemiyle hazırlanan formülasyonlar incelendiğinde Yöntem 1 kullanılarak hazırlanan formülasyonlar Yöntem 2 kullanılarak hazırlanan formülasyonlara göre partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinliği açısından daha başarılı sonuçlar

vermiştir. Bundan sonraki çalışmalarda Yöntem 1 kullanılarak formülasyonların hazırlanmasına karar verilmiştir.

PLGA 50:50/PLGA 65:35 ve PLGA 50:50/PLGA 75:25 polimerlerinin 1:1 (a/a) karışımıyla hazırlanan ön deneme LPHNP formülasyonlarına ait sonuçlar Çizelge 4.28'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.28. PLGA 50:50/PLGA 65:35 ve PLGA 50:50/PLGA 75:25 polimerlerinin karışımıyla hazırlanan ön deneme LPHNP formülasyonlarına ait sonuçlar

	Ö-LPHNP6 PLGA 50:50/PLGA 65:35 1:1 (a/a)	Ö-LPHNP7 PLGA 50:50/PLGA 75:25 1:1 (a/a)
Partikül büyüklüğü (nm)	241 ± 16	255 ± 12
PDI	0,377 ± 0,023	0,315 ± 0,013
Zeta potansiyeli (mV)	-15,4 ± 1,7	-21,6 ± 0,7
%EE	31,8 ± 1,2	22,6 ± 0,7
%İY	0,410 ± 0,012	0,290 ± 0,006

PLGA 50:50/PLGA 65:35 polimerleri 1:1 (a/a) karıştırıldığı formülasyonda (Ö-LPHNP6) en yüksek % enkapsülasyon etkinliği gözlenmiştir (%31,8±1,2). Bu formülasyon pegile edilmiş ve liyofilizasyon işleminde iki farklı liyoprotektan (mannitol ve trehaloz) kullanılmıştır. Bu formülasyonlara ait sonuçlar Çizelge 4.29'da yer almaktadır.

Çizelge 4.29. Farklı liyoprotektanlar kullanılarak hazırlanan LPHNP formülasyonları

	Ö-LPHNP8 (Mannitol)	Ö-LPHNP9 (Trehaloz)
Partikül büyüklüğü (nm)	232 ± 24	213 ± 11
PDI	0,350 ± 0,047	0,126 ± 0,026
Zeta potansiyeli (mV)	-18,5 ± 1,7	-21,0 ± 1,8
%EE	32,1 ± 0,6	33,6 ± 1,0
%İY	0,442 ± 0,010	0,485 ± 0,018

Trehaloz kullanılarak hazırlanan formülasyonda (Ö-LPHNP9) mannitol kullanılarak hazırlanan formülasyona göre (Ö-LPHNP8) daha küçük partikül büyüklüğü (213±11 nm) ve daha küçük PDI değeri (0,126±0,026) değeri elde edilmiştir. Bundan sonra deney tasarımı kullanılarak hazırlanacak formülasyonlarda trehaloz kullanılmasına karar verilmiştir.

Deney tasarımı uygulanarak hazırlanan LPHNP formülasyonları

LPHNP formülasyonlarının hazırlanmasında DoE programı kullanılarak merkezi birleşik tasarım yöntemi ile 20 formülasyon hazırlanmıştır. Bu formülasyonların partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (PDI), zeta potansiyeli, % enkapsülasyon etkinliği (%EE) ve % ilaç yüklenmesi (%İY) parametreleri incelenmiştir. Formülasyonlara ait sonuçlar Çizelge 4.30'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.30. Deney tasarımı ile hazırlanmış LPHNP formülasyonlarına ait sonuçlar

	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)	%EE	%İY
LPHNP1	221 ± 3	0,198 ± 0,020	-24,5 ± 0,8	32,3 ± 1,4	0,454 ± 0,011
LPHNP2	229 ± 4	0,178 ± 0,036	-18,1 ± 0,9	31,7 ± 1,8	0,422 ± 0,021
LPHNP3	225 ± 7	0,129 ± 0,044	-20,5 ± 0,7	30,1 ± 0,7	0,401 ± 0,016
LPHNP4	230 ± 9	0,146 ± 0,036	-18,3 ± 0,7	30,6 ± 0,9	0,397 ± 0,012
LPHNP5	226 ± 8	0,198 ± 0,020	-22,2 ± 0,7	30,1 ± 1,1	0,438 ± 0,012
LPHNP6	221 ± 5	0,178 ± 0,036	-23,3 ± 1,3	30,9 ± 0,8	0,470 ± 0,026
LPHNP7	233 ± 18	0,172 ± 0,061	-17,0 ± 2,5	34,3 ± 1,2	0,494 ± 0,018
LPHNP8	248 ± 29	0,286 ± 0,042	-19,5 ± 1,1	37,8 ± 0,3	0,605 ± 0,005
LPHNP9	269 ± 23	0,203 ± 0,026	-17,9 ± 0,7	29,0 ± 1,5	0,445 ± 0,022
LPHNP10	233 ± 20	0,196 ± 0,041	-18,1 ± 0,9	30,5 ± 0,4	0,512 ± 0,006
LPHNP11	213 ± 7	0,190 ± 0,081	-20,5 ± 1,0	27,1 ± 2,1	0,340 ± 0,039
LPHNP12	190 ± 9	0,188 ± 0,033	-23,6 ± 0,8	33,4 ± 0,9	0,520 ± 0,014
LPHNP13	185 ± 9	0,195 ± 0,027	-19,8 ± 2,0	36,2 ± 1,0	0,519 ± 0,016
LPHNP14	240 ± 9	0,156 ± 0,062	-21,0 ± 0,9	26,2 ± 1,0	0,323 ± 0,018
LPHNP15	224 ± 14	0,168 ± 0,019	-23,7 ± 0,8	37,4 ± 0,7	0,625 ± 0,011
LPHNP16	275 ± 24	0,284 ± 0,080	-16,7 ± 1,5	21,4 ± 0,5	0,287 ± 0,011
LPHNP17	237 ± 16	0,219 ± 0,048	-18,1 ± 0,9	45,2 ± 2,3	0,743 ± 0,034
LPHNP18	207 ± 13	0,173 ± 0,024	-18,0 ± 1,3	36,4 ± 0,6	0,561 ± 0,017
LPHNP19	251 ± 21	0,245 ± 0,036	-18,5 ± 2,7	30,1 ± 1,4	0,441 ± 0,022
LPHNP20	207 ± 7	0,178 ± 0,013	-22,3 ± 0,9	20,8 ± 1,7	0,273 ± 0,027

Deney tasarımı uygulanarak hazırlanan gempitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonların istatistiksel analizi

Deney tasarımında elde edilen LPHNP formülasyonlarının % enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü ve 24 saat sonunda salınan % kümülatif gempitabin

hidroklorür cevap olarak incelenmiştir ve sonuçlar Çizelge 4.31’de gösterilmiştir. Formülasyondaki bağımsız değişkenlerden hangilerinin cevapları istatistiksel olarak etkilediği ANOVA testi sonucu belirlenmiştir.

Çizelge 4.31. Deney tasarımı ile elde edilen LPHNP formülasyonlarına ait faktör içerikleri ve cevaplar

	FAKTÖRLER			CEVAPLAR		
	PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranı (A)	% SPC/ PLGA oranı (B)	DSPE-PEG miktarı (mg) (C)	%EE (Y1)	Partikül büyüklüğü (nm) (Y2)	% Kümülatif salınan (24 Saat) (Y3)
LPHNP1	1,00	20,00	10,00	32,3 ± 1,4	221 ± 3	59,0 ± 3,7
LPHNP2	1,00	20,00	10,00	31,7 ± 1,8	229 ± 4	59,9 ± 3,0
LPHNP3	1,00	20,00	10,00	30,1 ± 0,7	225 ± 7	57,7 ± 1,1
LPHNP4	1,00	20,00	10,00	30,6 ± 0,9	230 ± 9	60,0 ± 2,3
LPHNP5	1,00	20,00	10,00	30,1 ± 1,1	226 ± 8	60,1 ± 3,7
LPHNP6	1,00	20,00	10,00	30,9 ± 0,8	221 ± 5	55,6 ± 3,0
LPHNP7	1,84	20,00	10,00	34,3 ± 1,2	233 ± 18	73,4 ± 2,0
LPHNP8	1,00	36,82	10,00	37,8 ± 0,3	248 ± 29	58,4 ± 3,0
LPHNP9	1,00	20,00	18,41	29,0 ± 1,5	269 ± 23	62,5 ± 5,0
LPHNP10	0,16	20,00	10,00	30,5 ± 0,4	233 ± 20	40,9 ± 3,1
LPHNP11	1,00	3,18	10,00	27,1 ± 2,1	213 ± 7	57,2 ± 2,9
LPHNP12	1,00	20,00	1,59	33,4 ± 0,9	190 ± 9	61,1 ± 1,6
LPHNP13	0,50	10,00	5,00	36,2 ± 1,0	185 ± 9	39,7 ± 1,8
LPHNP14	0,50	10,00	15,00	26,2 ± 1,0	240 ± 9	58,9 ± 5,0
LPHNP15	0,50	30,00	5,00	37,4 ± 0,7	224 ± 14	58,4 ± 1,9
LPHNP16	0,50	30,00	15,00	21,4 ± 0,5	275 ± 24	46,0 ± 2,6
LPHNP17	1,50	30,00	15,00	45,2 ± 2,3	237 ± 16	62,3 ± 1,2
LPHNP18	1,50	30,00	5,00	36,4 ± 0,6	207 ± 13	73,9 ± 1,4
LPHNP19	1,50	10,00	15,00	30,1 ± 1,4	251 ± 21	73,7 ± 3,2
LPHNP20	1,50	10,00	5,00	20,8 ± 1,7	207 ± 7	68,1 ± 4,2

Deney tasarımı PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranı, SPC/PLGA yüzdesi, DSPE-PEG miktarı bağımsız değişken, % enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü ve % salınan madde miktarı cevap olarak kullanıldığında elde edilen istatistiksel analiz sonuçları Çizelge 4.32-Çizelge 4.34 arasında belirtilmiştir. Formülasyondaki

bağımsız değişkenlerin etkileri sonucu belirlenen % enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü ve % kümülatif salınan madde miktarını tanımlayan matematiksel modeller Eş. 4.1 - Eş. 4.3 arasında gösterilmiştir.

Deney tasarımı ile elde edilen LPHNP formülasyonlarındaki bağımsız değişkenlerin cevaplar üzerine etkisi

Çizelge 4.32. Merkezi birleşik tasarımın % enkapsülasyon etkinliği cevabı için ANOVA sonuçları

Hata Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F Değeri	Prob>F
Model	584	6	97,4	89,5	<0,0001*
A	22,9	1	22,9	21,1	0,0005
B	149	1	149	137	<0,0001*
C	17,1	1	17,1	15,8	0,0016
AB	147	1	147	135	<0,0001*
AC	243	1	243	223	<0,0001*
BC	5,28	1	5,28	4,85	0,0463
Residual (Kalıntı)	14,2	13	1,09		
Lack of fit (Uyum Eksikliği)	10,2	8	1,27	1,61	0,3108
Pure Error (Hata)	3,95	5	0,79		
Total (Genel Toplam)	599	19			
R ²	0,9764				

*"Prob > F" değerleri 0,05'den küçük olan terimler anlamlı değer olarak kabul edilmiştir.

% enkapsülasyon etkinliği cevabı incelendiğinde 2FI modeli Desing-Expert Version 6.0.6 programı tarafından uygun model olarak seçilmiştir. Modelde A,B,C, AB, AC ve BC terimlerinin anlamlı etkili olduğu bulunmuştur.

$$Y1=60,6-36,6*A-0,37*B - 2,11*C + 0,86*AB + 2,21*AC - 0,02*BC$$

(Eş. 4.1)

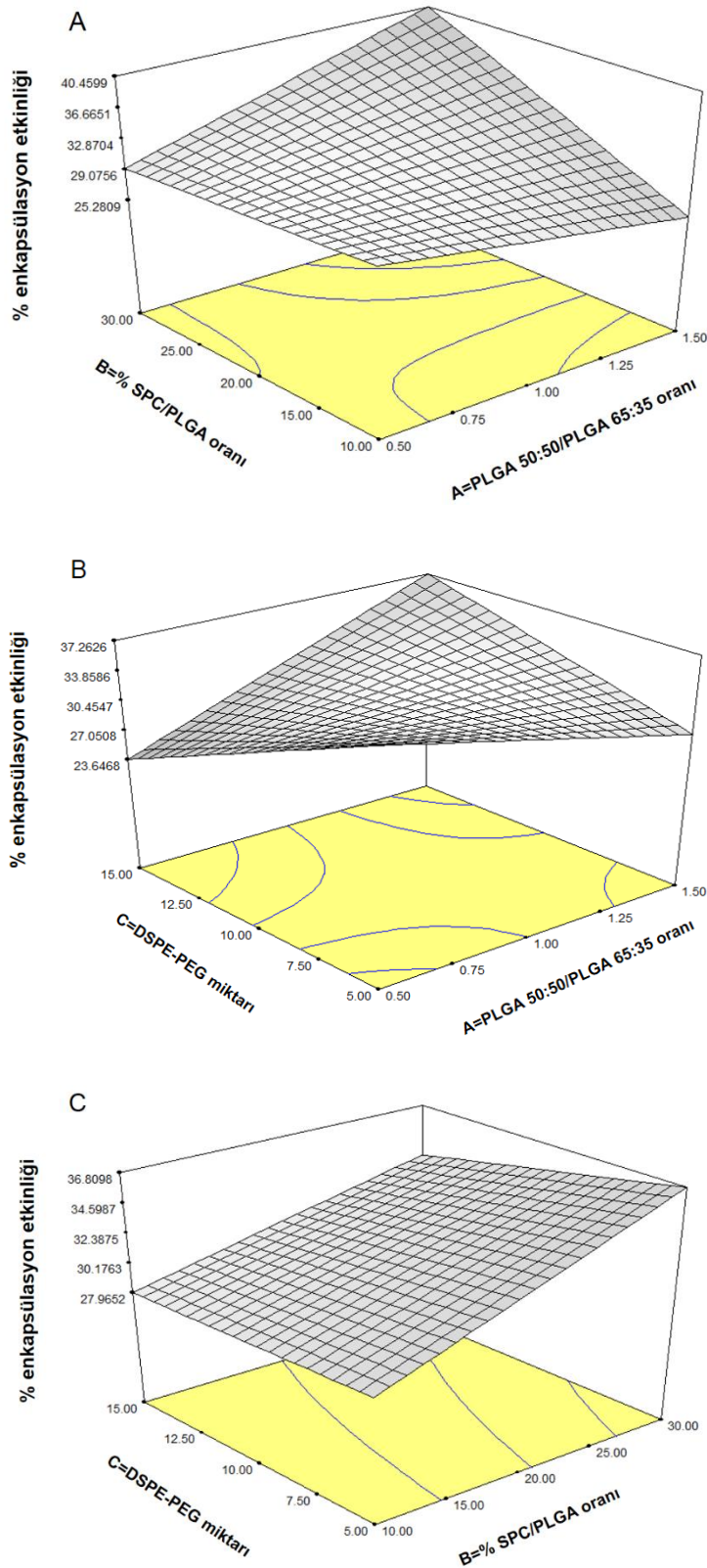
Y1: % enkapsülasyon etkinliği

A: PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranı

B: % SPC/PLGA oranı

C: DSPE-PEG miktarı

% enkapsülasyon etkinliği cevabı için istatistiksel olarak anlamlı etkiye sahip bağımsız değişkenlere ait yüzey cevap grafikleri Şekil 4.17’de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. % enkapsülasyon etkinliği cevabı için yüzey cevap grafikleri (A=PLGA50:50/PLGA 65:35 oranı X %SPC/PLGA oranı etkileşimi, B= PLGA50:50/PLGA 65:35 oranı X DSPE-PEG miktarı etkileşimi, C=%SPC/PLGA oranı X DSPE-PEG miktarı etkileşimi)

Çizelge 4.33. Merkezi birleşik tasarımın partikül büyüklüğü cevabı için ANOVA sonuçları

Hata Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F Değeri	Prob>F
Model	9373	6	1562	80,8	<0,0001*
A	35,4	1	35,4	1,83	0,1989
B	1034	1	1034	53,5	<0,0001*
C	7167	1	7167	371	<0,0001*
AB	968	1	968	50,0	<0,0001*
AC	128	1	128	6,62	0,0232
BC	40,5	1	40,5	2,09	0,1716
Residual (Kalıntı)	251	13	19,3		
Lack of fit (Uyum Eksikliği)	178	8	22,3	1,52	0,3352
Pure Error (Hata)	73,3	5	14,7		
Total (Genel Toplam)	9625	19			
R ²	0,9739				

*"Prob > F" değerleri 0,05'den küçük olan terimler anlamlı değer olarak kabul edilmiştir.

Partikül büyüklüğü cevabı incelendiğinde 2FI modeli Desing-Expert Version 6.0.6 programı tarafından uygun model olarak seçilmiştir. Modelde B,C, AB ve AC terimlerinin anlamlı etkili olduğu bulunmuştur.

$$Y_2 = 99,2 + 3,52 \cdot B + 7,08 \cdot C - 2,20 \cdot AB - 1,6 \cdot AC$$

(Eş. 4.2)

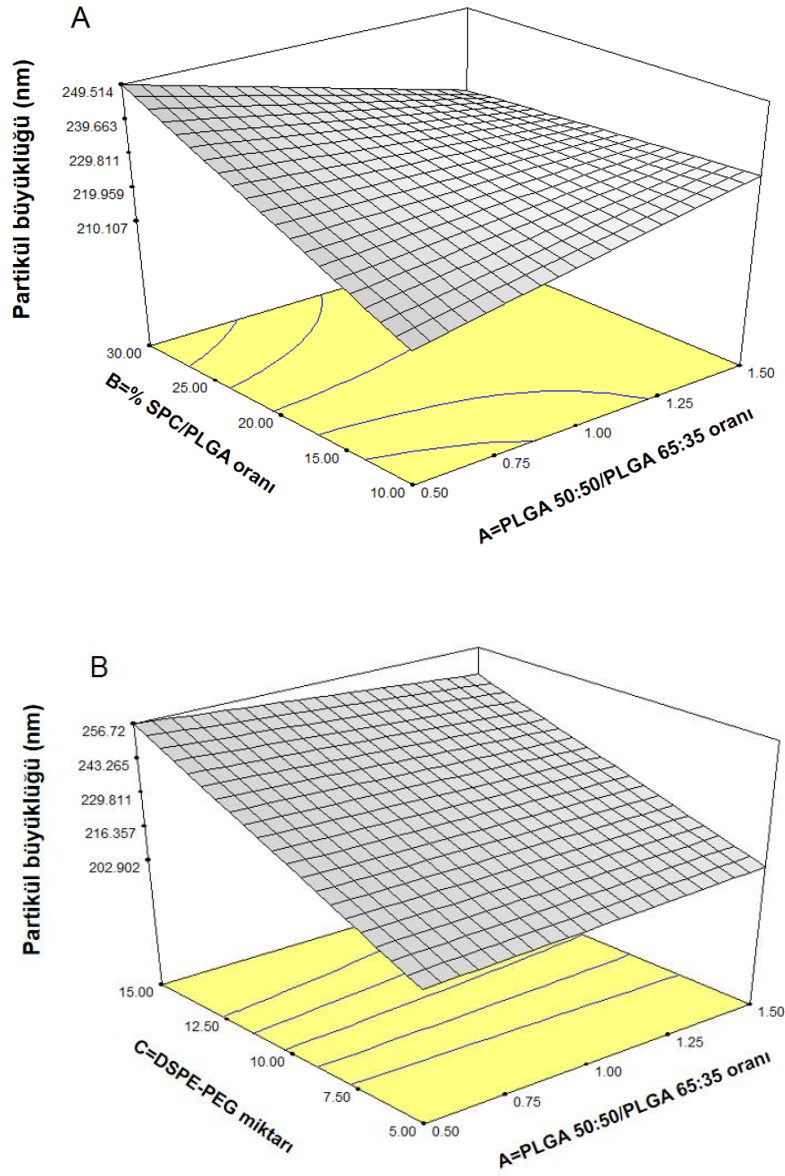
Y₂: Partikül büyüklüğü

A: PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranı

B: % SPC/PLGA oranı

C: DSPE-PEG miktarı

Partikül büyüklüğü cevabı için istatistiksel olarak anlamlı etkiye sahip bağımsız değişkenlere ait yüzey cevap grafikleri Şekil 4.18'de gösterilmiştir.



Şekil 4.18. Partikül büyüklüğü cevabı için yüzey cevap grafikleri
(A= PLGA50:50/PLGA 65:35 oranı X %SPC/PLGA oranı etkileşimi, B= PLGA50:50/PLGA 65:35 oranı X DSPE-PEG miktarı etkileşimi)

Çizelge 4.34. Merkezi birleşik tasarımın % kümülatif salınan madde cevabı için ANOVA sonuçları

Hata Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F Değeri	Prob>F
Model	1567	6	261	44,4	<0,0001*
A	1231	1	1231	210	<0,0001*
B	0,36	1	0,36	0,061	0,8083
C	0,73	1	0,73	0,12	0,7304
AB	16,2	1	16,2	0,277	0,1203
AC	20,5	1	20,5	3,49	0,0846
BC	298	1	298	50,7	<0,0001*
Residual (Kalıntı)	76,4	13	5,88		
Lack of fit (Uyum Eksikliği)	60,6	8	7,57	2,40	0,1751
Pure Error (Hata)	15,8	5	3,16		
Total (Genel Toplam)	1643	19			
R ²	0,9535				

*"Prob > F" değerleri 0,05'den küçük olan terimler anlamlı değer olarak kabul edilmiştir.

% kümülatif salınan madde cevabı incelendiğinde 2FI modeli Desing-Expert Version 6.0.6 programı tarafından uygun model olarak seçilmiştir. Modelde A ve BC terimlerinin anlamlı etkili olduğu bulunmuştur.

$$Y_3 = 3,07 + 31,1 \cdot A - 0,29 \cdot BC$$

(Eş. 4.3)

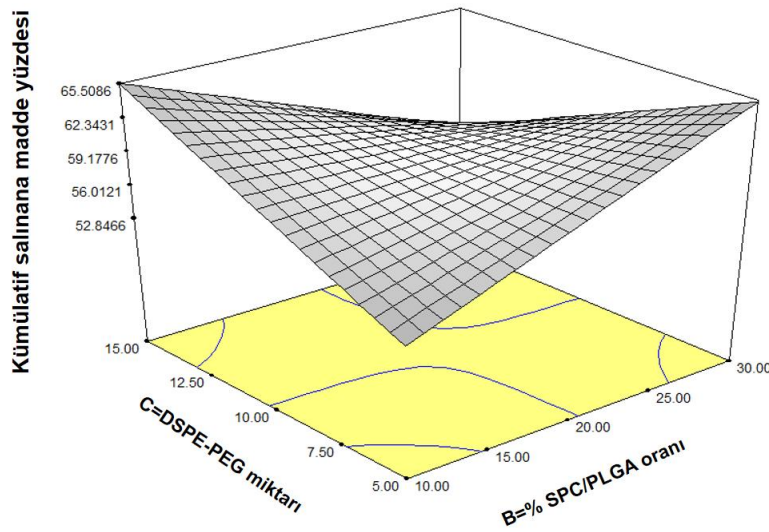
Y3: % kümülatif salınan gemitabin hidroklorür

A: PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranı

B: % SPC/PLGA oranı

C: DSPE-PEG miktarı

% kümülatif salınan madde cevabı için istatistiksel olarak anlamlı etkiye sahip bağımsız değişkenlere ait yüzey cevap grafiği Şekil 4.19'da gösterilmiştir.



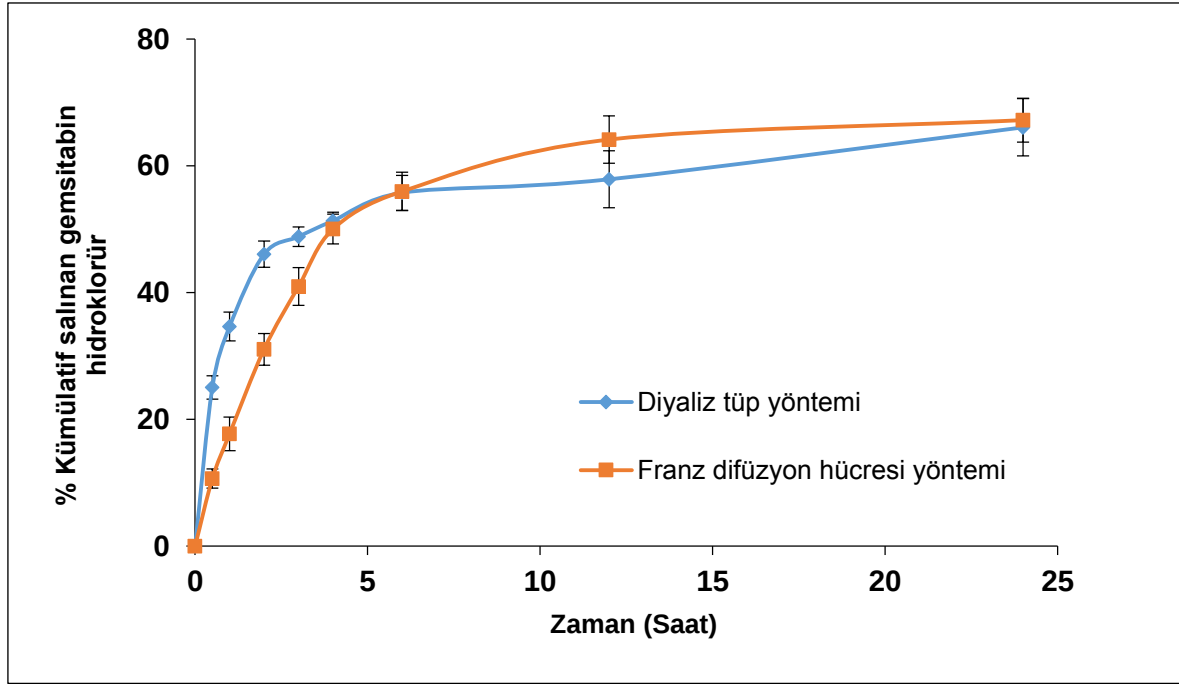
Şekil 4.19. % kümülatif salınan madde cevabı için yüzey cevap grafiği

4.3.5. Nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarına ait in vitro salım çalışmaları

Gemitabin hidroklorür yüklü nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarına ait çalışmalar Bölüm 3.4.5'de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

Gemsitabin hidroklorür yüklü nanopartikül formülasyonlarına ait sonuçlar

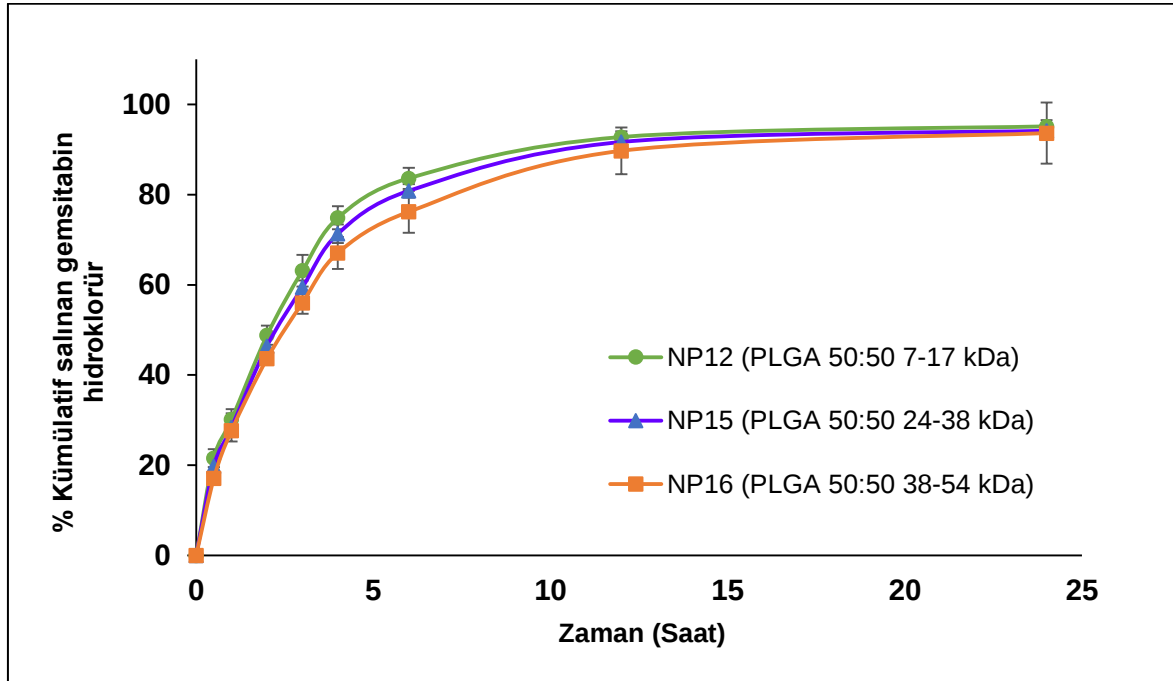
PLGA 65:35 kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonunda (NP17) Franz difüzyon hücresi yöntemi ile diyaliz tüp yöntemi kıyaslanmıştır. Her iki yöntemle ait salım profilleri Şekil 4.20’de gösterilmiştir.



Şekil 4.20. Nanopartikül formülasyonunda (NP17) Franz difüzyon hücresi yöntemi ve diyaliz tüp yöntemi kullanılarak elde edilen salım profilleri

Farklı molekül ağırlıklarına sahip PLGA polimerleri kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonları

Molekül ağırlığının salım üzerine etkisinin incelenmesi için PLGA 50:50 7-17 kDa, 24-38 kDa ve 38-54 kDa molekül ağırlığına sahip polimerleri kullanılarak formülasyonlar hazırlanmıştır. Şekil 4.21’de farklı molekül ağırlığına sahip polimerler ile hazırlanan formülasyonlara ait salım profilleri gösterilmiştir.

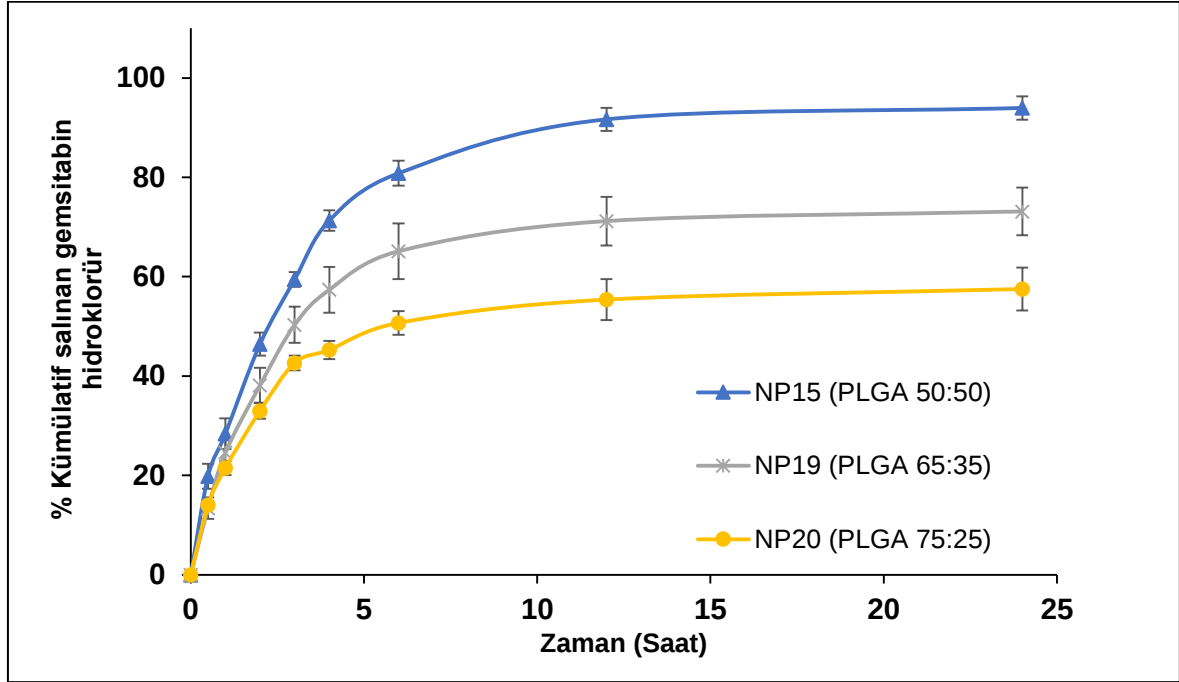


Şekil 4.21. Farklı molekül ağırlıklarına sahip PLGA polimeriyle hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ait salım profilleri

6. saatin sonunda PLGA 50:50 (7-17 kDa), PLGA 50:50 (24-38 kDa) ve PLGA 50:50 (38-54 kDa) kullanılarak hazırlanan formülasyondan sırasıyla %83,6±2,3; %80,8±1,5 ve %76,2±4,6'lık gemsitabin hidroklorür salımı görülmüştür. 24. saatin sonunda ise PLGA 50:50 (7-17 kDa) kullanılarak hazırlanan formülasyondan %95,1±1,4 ve PLGA 50:50 (38-54 kDa) kullanılarak hazırlanan formülasyonlardan %93,7±6,8'lik etkin madde çıkışı vardır.

Farklı laktik asit/glikolik asit oranına sahip PLGA polimerleri kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonları

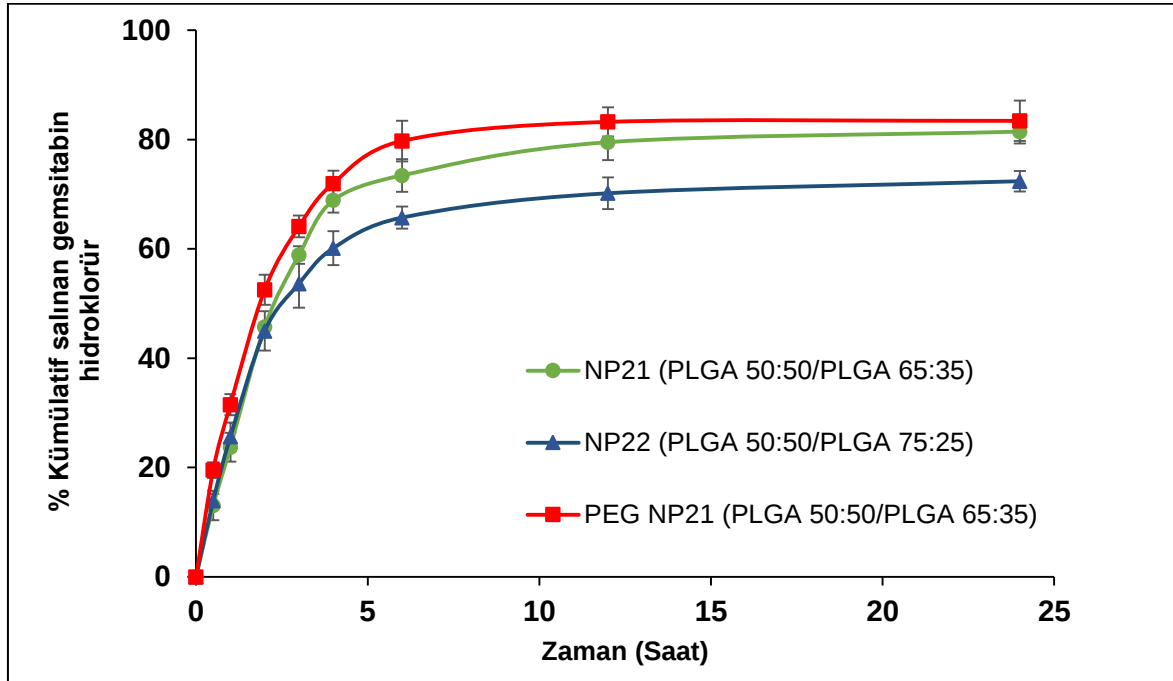
Laktik asit/glikolik asit oranının salım üzerine etkisinin incelenmesi için PLGA 50:50, PLGA 65:35 ve PLGA 75:25 polimerleri kullanılarak formülasyonlar hazırlanmıştır. Şekil 4.22'de farklı laktik asit/glikolik asit oranına sahip polimerler ile hazırlanan formülasyonlara ait salım profilleri gösterilmiştir.



Şekil 4.22. Farklı laktik asit/glikolik asit oranına sahip PLGA polimerleri kullanarak hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ait salım profilleri

6. saatin sonunda PLGA 50:50 (24-38 kDa) (NP15), PLGA 65:35 (24-38 kDa) (NP19) ve PLGA 75:25 (4-15 kDa) (NP20) kullanılarak hazırlanan formülasyondan sırasıyla %80,8±1,5; %65,1±5,6 ve %50,7±2,4'lük gempitabin hidroklorür salımı görülmüştür. 24. saatin sonunda ise NP15, NP19 ve NP20 formülasyonlarından %94,0±2,3; %73,1±4,8 ve %57,5±4,3'lük etkin madde çıkışı vardır.

PLGA 50:50 (38-54 kDa) polimerinin PLGA 65:35 ve PLGA 75:25 polimerleriyle 1/1 oranında (a/a) karışımları kullanılarak hazırlanan formülasyonlar ile pegile nanopartikül formülasyonuna ait salım profilleri Şekil 4.23'de yer almaktadır.

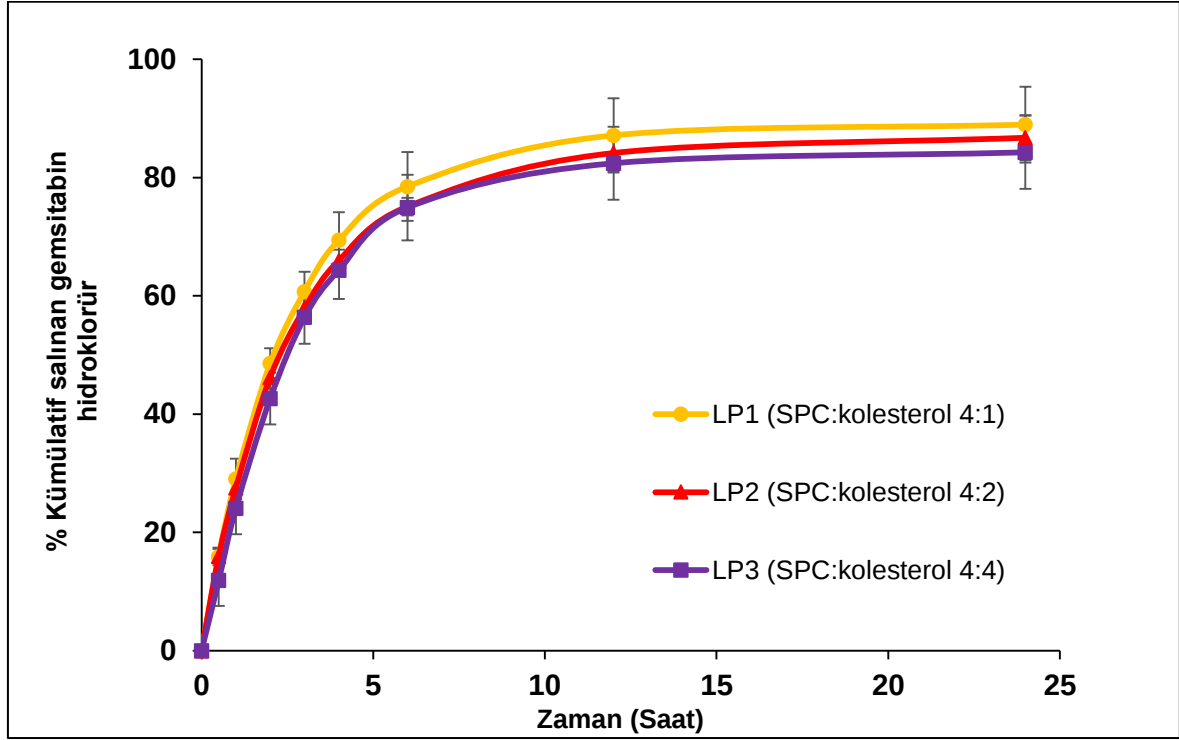


Şekil 4.23. PLGA 50:50 polimerinin PLGA 65:35 ve PLGA 75:25 polimeriyle 1/1 (a/a) oranında karışımları kullanılarak hazırlanan formülasyonlar ile pegile nanopartikül formülasyonuna ait salım profilleri

Farklı laktik asit/glikolik asit içeren PLGA polimerlerinin karışımları kullanılarak hazırlanan formülasyonlardan NP21, NP22 ve PEG NP21 formülasyonlarından 6. saatin sonunda sırasıyla %73,5±3,0; %65,7±2,0 ve %79,8±3,7'lik gemsitabin hidroklorür salımı gerçekleşmiştir. 24. saatin sonunda ise NP21, NP22 ve PEG NP21 formülasyonlarından sırasıyla %81,5±2,2; %72,4±1,9 ve %83,4±3,7'lik etkin madde çıkışı gözlenmiştir.

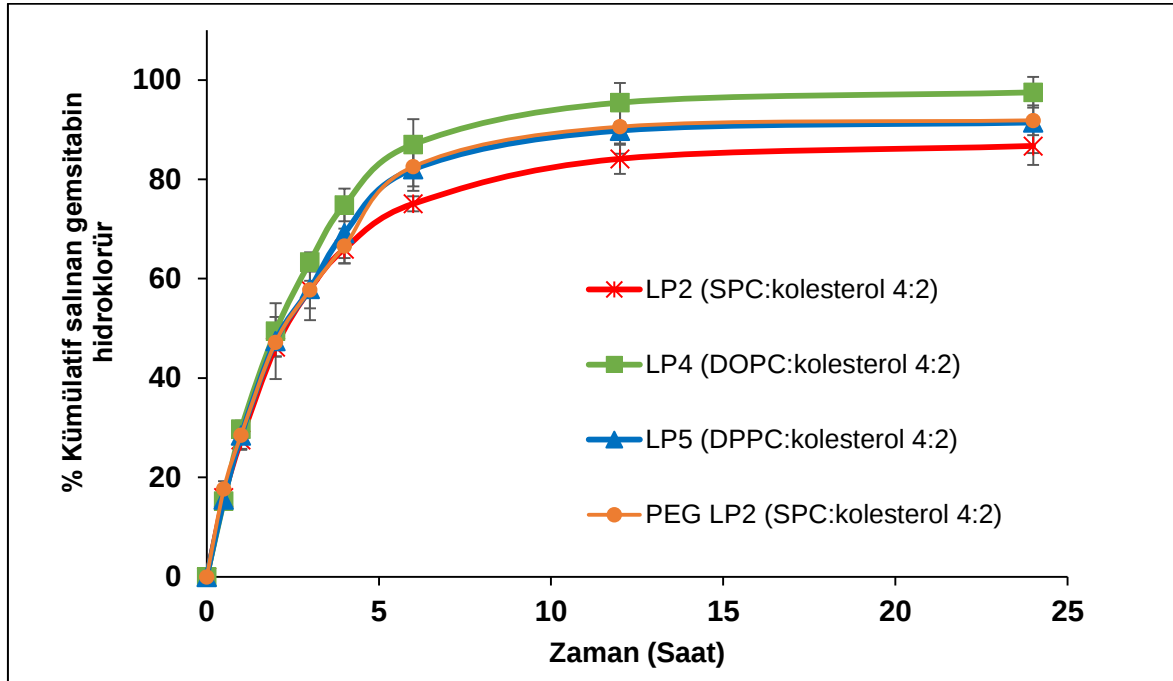
Gemsitabin hidroklorür yüklü lipozom formülasyonlarına ait sonuçlar

Gemsitabin hidroklorür içeren lipozom formülasyonlarında farklı SPC:kolesterol molar oranlarının (4:1, 4:2, 4:4) ve farklı yağların salım üzerine etkisi incelenmiştir. SPC:kolesterol farklı molar oranları ile hazırlanan formülasyonların salım profilleri Şekil 4.24'de, farklı yağlar kullanılarak hazırlanan ve pegile edilen lipozom formülasyonlarına ait salım profilleri Şekil 4.25'de gösterilmiştir.



Şekil 4.24. SPC:kolesterol farklı molar oranları kullanılarak hazırlanan formülasyonlara ait salım profilleri

Farklı SPC:kolesterol kullanılarak hazırlanan lipozom formülasyonlardan LP1, LP2 ve LP3 formülasyonlarından 6. saatin sonunda sırasıyla %78,5±5,8; %75,1±1,5 ve %74,9±5,6'lık gemitabin hidroklorür salımı gerçekleşmiştir. 24. saatin sonunda ise LP1, LP2 ve LP3 formülasyonlarından sırasıyla %89,0±6,3; %86,7±3,8 ve %84,2±6,2'lik etkin madde çıkışı gözlenmiştir.

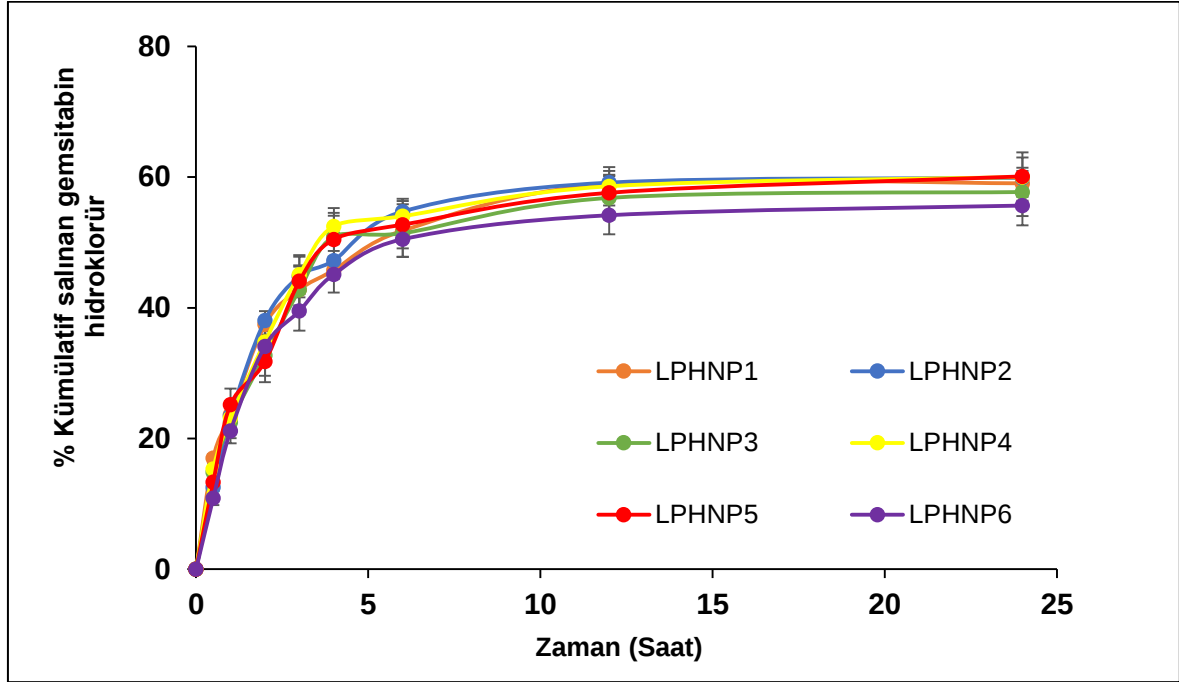


Şekil 4.25. Farklı yağlar kullanılarak hazırlanan ve pegile edilen lipozom formülasyonlarına ait salım profilleri

Farklı yağlar kullanılarak hazırlanan ve pegile edilen lipozom formülasyonları LP2, LP4, LP5 ve PEG LP2 formülasyonları 6. saatin sonunda sırasıyla %75,1 $\pm$ 1,50; %87,1 $\pm$ 5,1; %86,5 $\pm$ 4,4 ve %82,6 $\pm$ 4,0'lık etkin madde çıkışı göstermiştir. 24. saatin sonunda ise LP2, LP4, LP5 ve PEG LP2 formülasyonlarından %86,7 $\pm$ 3,8; %97,5 $\pm$ 3,1; %94,9 $\pm$ 5,2 ve %91,9 $\pm$ 3,2'lik gempitabin hidroklorür salımı görülmüştür.

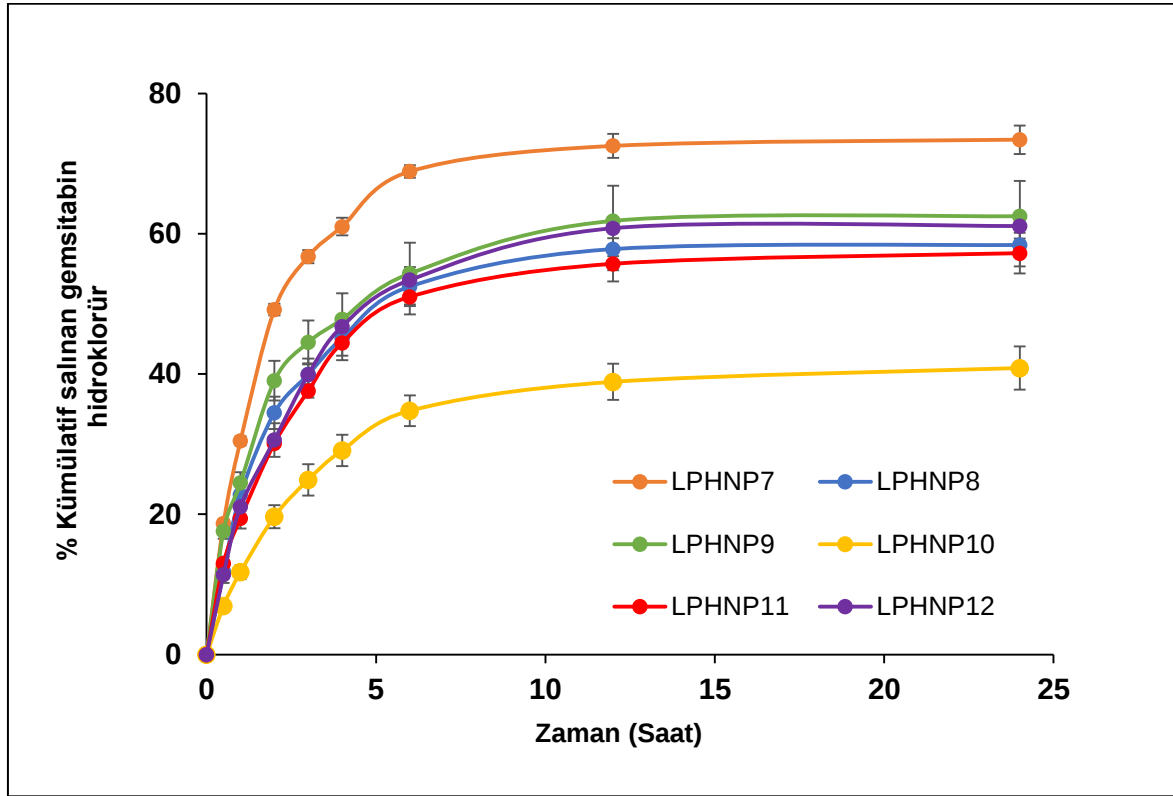
Gempitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonlarına ait sonuçlar

Deney tasarımıyla hazırlanan gempitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonlarından merkez noktalara ait formülasyonların salım profili Şekil 4.26'da, aksiyal noktalara ait formülasyonların salım profilleri Şekil 4.27'de ve faktöriyel noktalara ait formülasyonların salım profilleri Şekil 4.28'de gösterilmiştir.



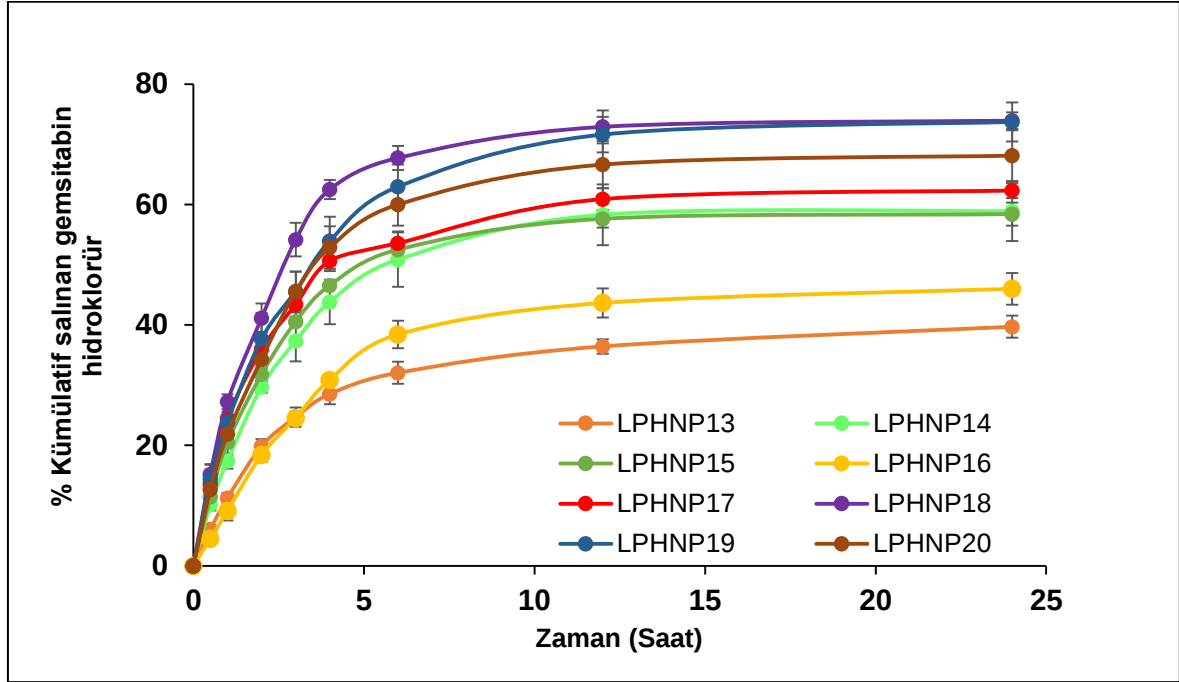
Şekil 4.26. Gemsitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonlarının merkez noktalara ait salım profilleri

Deney tasarımı sonucu elde edilen LPHNP formülasyonlarına ait merkez noktalar benzer salım profilleri göstermiştir. 6. saat sonunda merkez noktalar %50,5 ile %54,7 arası etkin madde çıkışı göstermiştir. 24. saat sonunda ise merkez noktalara ait formülasyonlardan %55,6 ile %60,1 arasında gemsitabin hidroklorür salımı görülmüştür.



Şekil 4.27. Gempisitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonlarının aksiyal noktalara ait salım profilleri

Deney tasarımı ile elde edilen formülasyonların kümülatif salınan gempisitabin hidroklorür sonuçları incelendiğinde bağımsız değişkenlerden PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranının salımı istatistiksel olarak anlamlı derecede etkilediği görülmüştür. LPHNP7 formülasyonunda PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranı 1,84'tür ve en yüksek yüzdede etkin madde salımı göstermiştir. Bu formülasyonunun 6. ve 24. saat sonundaki kümülatif salınan etkin madde yüzdeleri sırasıyla $68,9 \pm 0,9$ ve $73,4 \pm 2,0$ 'dır. En düşük yüzdede salım gösteren LPHNP10 formülasyonunda PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranı en düşüktür ve 0,16'dır. LPHNP10 formülasyonu 6. ve 24. saat sonunda etkin maddeyi sırasıyla $34,8 \pm 2,2$ ve $40,9 \pm 3,1$ oranında salmıştır.

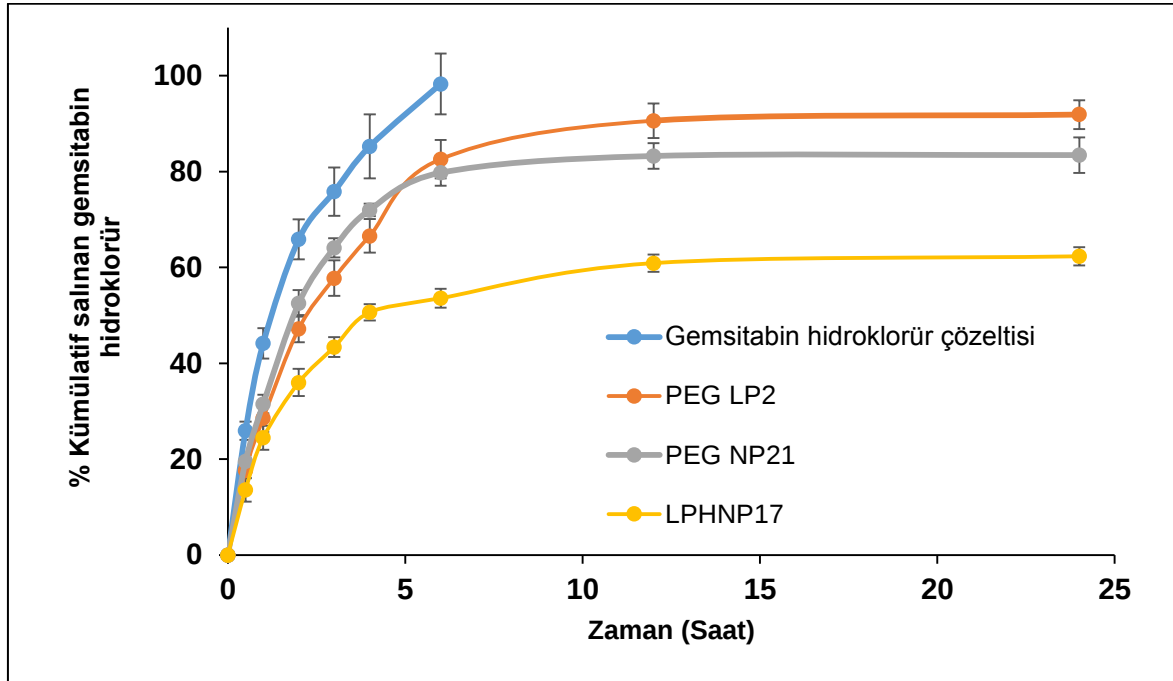


Şekil 4.28. Gemsitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonlarının faktöriyel noktalara ait salım profilleri

Deney tasarımı kullanılarak hazırlanan faktöriyel noktalara ait formülasyonlar incelendiğinde PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranı 0,5 olan formülasyonların (LPHNP13, LPHNP14, LPHNP15 ve LPHNP16) 24 saat sonundaki % kümülatif salınan etkin madde oranlarının düşük olduğu ve %39,7 ile %58,9 arasında değiştiği gözlenmiştir. PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranı 1,5 olan formülasyonlar (LPHNP17, LPHNP18, LPHNP19 ve LPHNP20) ise daha yüksek yüzdeli salım göstermiştir ve 24 saat sonunda % kümülatif salınan etkin madde oranları %62,3 ile %73,9 arasında değişmektedir.

Gemsitabin hidroklorür çözeltisi ve optimum formülasyonlara ait salım profilleri

Gemsitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponu içerisindeki çözeltisi ile gemsitabin hidroklorür yüklü en yüksek enkapsülasyon etkinliği göstermiş pegile nanopartikül (PEG NP21), lipozom (PEG LP2) ve LPHNP17 formülasyonlarına ait salım profilleri Şekil 4.29'da gösterilmiştir.



Şekil 4.29. Gemcitabin hidroklorür çözeltisi ile pegile nanopartikül, lipozom ve optimum LPHNP formülasyonlarına ait salım profilleri

Gemcitabin hidroklorür çözeltisi 6. saat sonunda yaklaşık olarak tamamı reseptör kompartmanda toplanmıştır. Pegile lipozom formülasyonu (PEG LP2), pegile nanopartikül formülasyonu (PEG NP21) ve LPHNP17 formülasyonu 6. saat sonunda ise sırasıyla %82,6±4,0; %79,8±3,7 ve %53,6±2,0'lık gemcitabin hidroklorür salımı göstermiştir. 24. saat sonunda ise PEG LP2, PEG NP21 ve LPHNP17 formülasyonlarından sırasıyla %91,9±3,2; %83,4±3,7 ve %62,3±1,2 oranında kümülatif etkin madde salımı gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.35'de pegile nanopartikül (PEG NP21), pegile lipozom (PEG LP2) ve en yüksek enkapsülasyon etkinliği gösteren LPHNP17 formülasyonlarının hesaplanan salım kinetiklerine ait r^2 , Akaike bilgi kriteri (AIC) ve model seçme kriteri (MSC) değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.35. Pegile edilmiş nanopartikül, lipozom ve optimum LPHNP formülasyonlarının hesaplanan salım kinetiklerine ait r^2 , AIC ve MSC değerleri

		PEG NP21 (Pegile nanopartikül formülasyonu)	PEG LP2 (Pegile lipozom formülasyonu)	LPHNP17
1. derece	r^2	$0,900 \pm 0,019$	$0,947 \pm 0,009$	$0,862 \pm 0,025$
	AIC	$43,1 \pm 1,1$	$40,0 \pm 1,1$	$26,2 \pm 1,8$
	MSC	$2,03 \pm 0,19$	$2,67 \pm 0,16$	$1,61 \pm 0,37$
Higuchi	r^2	$0,754 \pm 0,034$	$0,919 \pm 0,016$	$0,975 \pm 0,011$
	AIC	$49,4 \pm 0,7$	$43,0 \pm 1,6$	$19,2 \pm 2,1$
	MSC	$1,12 \pm 0,14$	$2,24 \pm 0,19$	$3,07 \pm 0,36$
Hixson-Crowell	r^2	$0,820 \pm 0,011$	$0,952 \pm 0,013$	$0,888 \pm 0,033$
	AIC	$47,2 \pm 0,2$	$39,3 \pm 1,5$	$25,3 \pm 2,1$
	MSC	$1,43 \pm 0,06$	$2,77 \pm 0,26$	$1,85 \pm 0,44$
Hopfenberg	r^2	$0,800 \pm 0,004$	$0,954 \pm 0,012$	$0,851 \pm 0,027$
	AIC	$48,7 \pm 0,3$	$39,7 \pm 1,5$	$27,3 \pm 2,1$
	MSC	$1,22 \pm 0,02$	$2,72 \pm 0,25$	$1,49 \pm 0,35$
Weibull	r^2	$0,949 \pm 0,002$	$0,992 \pm 0,002$	$0,992 \pm 0,003$
	AIC	$39,1 \pm 0,4$	$26,4 \pm 2,3$	$12,9 \pm 1,6$
	MSC	$2,59 \pm 0,04$	$4,61 \pm 0,36$	$4,31 \pm 0,34$
Korsmeyer-Peppas	r^2	$0,987 \pm 0,008$	$0,991 \pm 0,003$	$0,982 \pm 0,002$
	AIC	$12,4 \pm 3,7$	$12,0 \pm 1,3$	$17,0 \pm 0,3$
	MSC	$4,00 \pm 0,92$	$3,87 \pm 0,39$	$3,51 \pm 0,13$
Baker-Lonsdale	r^2	$0,920 \pm 0,000$	$0,955 \pm 0,003$	$0,934 \pm 0,003$
	AIC	$41,5 \pm 0,3$	$39,0 \pm 0,5$	$23,0 \pm 0,6$
	MSC	$2,25 \pm 0,00$	$2,81 \pm 0,07$	$2,32 \pm 0,05$

Nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonları Weibull ve Korsmeyer-Peppas salım kinetikleri modellerine uyumlu bulunmuş yüksek r^2 değeri göstermiştir. Formülasyonların Weibull modeli için β değerleri ve Korsmeyer-Peppas modeli için hesaplanan n değerleri Çizelge 4.36'da yer almaktadır.

Çizelge 4.36. Formülasyonların Weibull modeli için β değeri ve Korsmeyer-Peppas modeli için hesaplanan n değeri

	PEG NP21	PEG LP2	LPHNP17
β (Weibull)	$0,829 \pm 0,026$	$0,832 \pm 0,014$	$0,791 \pm 0,069$
n (Korsmeyer-Peppas)	$0,677 \pm 0,029$	$0,674 \pm 0,037$	$0,624 \pm 0,070$

4.3.6. Stabilite çalışmaları

İn vitro stabilite deneylerine ait bulgular

Stabilite testleri Bölüm 3.4.6'da anlatıldığı gibi yapılmıştır. Gemsitabin hidroklorür yüklü pegile nanopartikül, pegile lipozom ve optimum LPHNP formülasyonlarının 4°C , $25 \pm 2^{\circ}\text{C}/\%60 \pm 5$ bağıl nem ortamlarında 12 ay ve $40 \pm 2^{\circ}\text{C}/\%75 \pm 5$ bağıl nem ortamlarında 6 ay süreyle bekletilmiş ve stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

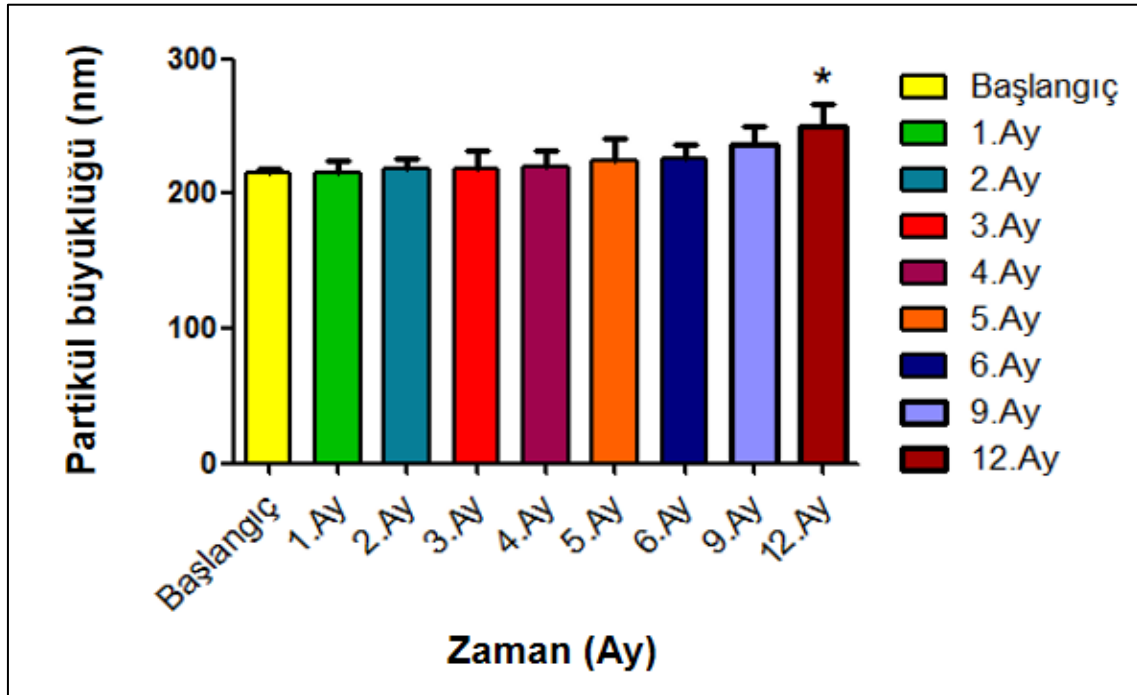
Nanopartikül formülasyonunun farklı saklama koşullarındaki stabilitesi

Gemsitabin hidroklorür yüklü pegile nanopartikül formülasyonunun (PEG NP21) stabilite testleri sırasında farklı saklama koşullarındaki partikül büyüklüğü, PDI değerleri, zeta potansiyelleri ve % kalan ilaç oranları hesaplanmıştır. Nanopartikül formülasyonunun 4°C sıcaklıktaki 12 aylık stabilite sonuçları Çizelge 4.37'de, $25 \pm 2^{\circ}\text{C}/\%60 \pm 5$ bağıl nem ortamındaki 12 aylık stabilite sonuçları Çizelge 4.38'de ve $40 \pm 2^{\circ}\text{C}/\%75 \pm 5$ bağıl nem ortamındaki 6 aylık stabilite sonuçları Çizelge 4.39'da gösterilmiştir.

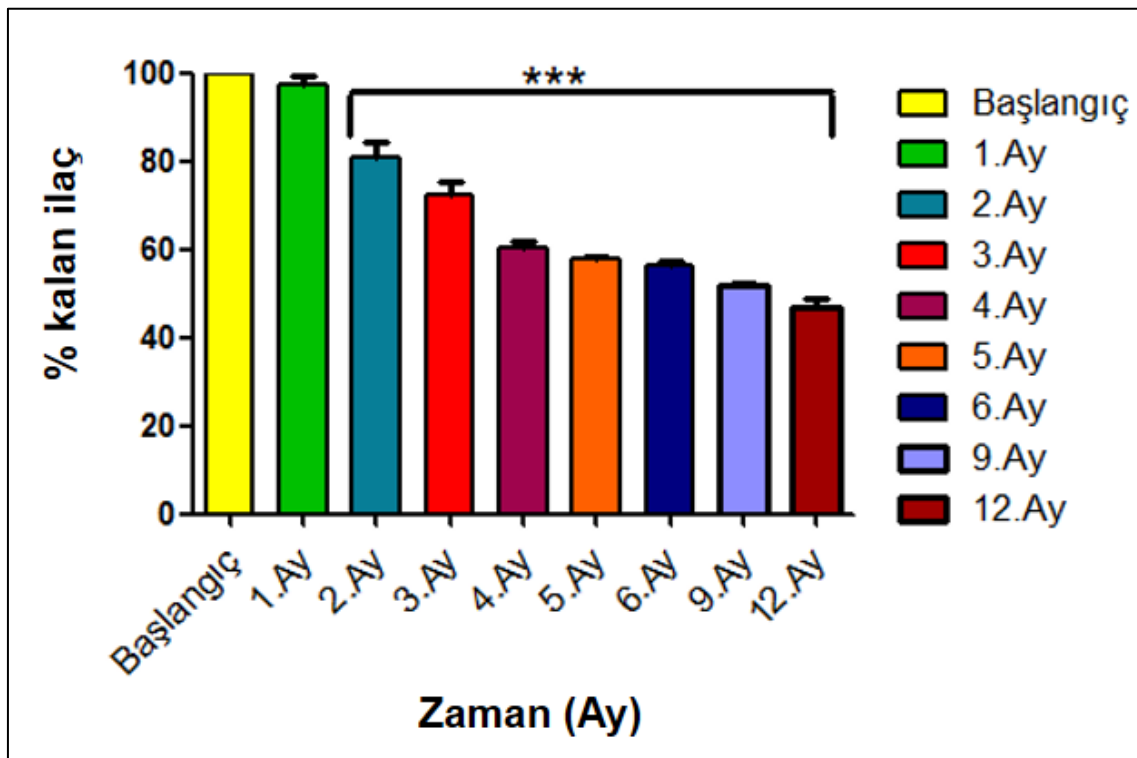
Çizelge 4.37. Pegile nanopartikül formülasyonunun (PEG NP21) 4°C sıcaklıktaki stabilitesi

Zaman	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)	% kalan ilaç
Başlangıç	215 ± 4	0,129 ± 0,023	-17,7 ± 0,8	100
1. Ay	215 ± 9	0,135 ± 0,035	-14,5 ± 0,7	97,3 ± 2,2
2. Ay	218 ± 7	0,119 ± 0,029	-17,6 ± 0,7	80,6 ± 3,6
3. Ay	218 ± 14	0,204 ± 0,019	-22,9 ± 0,9	72,1 ± 3,4
4. Ay	220 ± 12	0,212 ± 0,035	-17,9 ± 0,6	60,5 ± 1,2
5. Ay	225 ± 16	0,187 ± 0,025	-16,0 ± 0,6	57,9 ± 0,4
6. Ay	226 ± 10	0,227 ± 0,028	-18,9 ± 0,6	56,2 ± 0,9
9. Ay	237 ± 13	0,255 ± 0,029	-21,1 ± 0,5	51,8 ± 0,5
12. Ay	250 ± 17	0,353 ± 0,047	-20,1 ± 0,8	46,6 ± 2,0

Gemsitabin hidroklorür yüklü pegile nanopartikül formülasyonunun 4°C sıcaklıkta partikül büyüklüğü değişimleri Şekil 4.30'da, formülasyon içindeki % kalan ilaç oranları ise Şekil 4.31'de gösterilmiştir.



Şekil 4.30. Gempitabin hidroklorür yüklü pegile nanopartikül formülasyonunun (PEG NP21) 4°C sıcaklıkta partikül büyüklüğü değişimleri (*p<0,05)

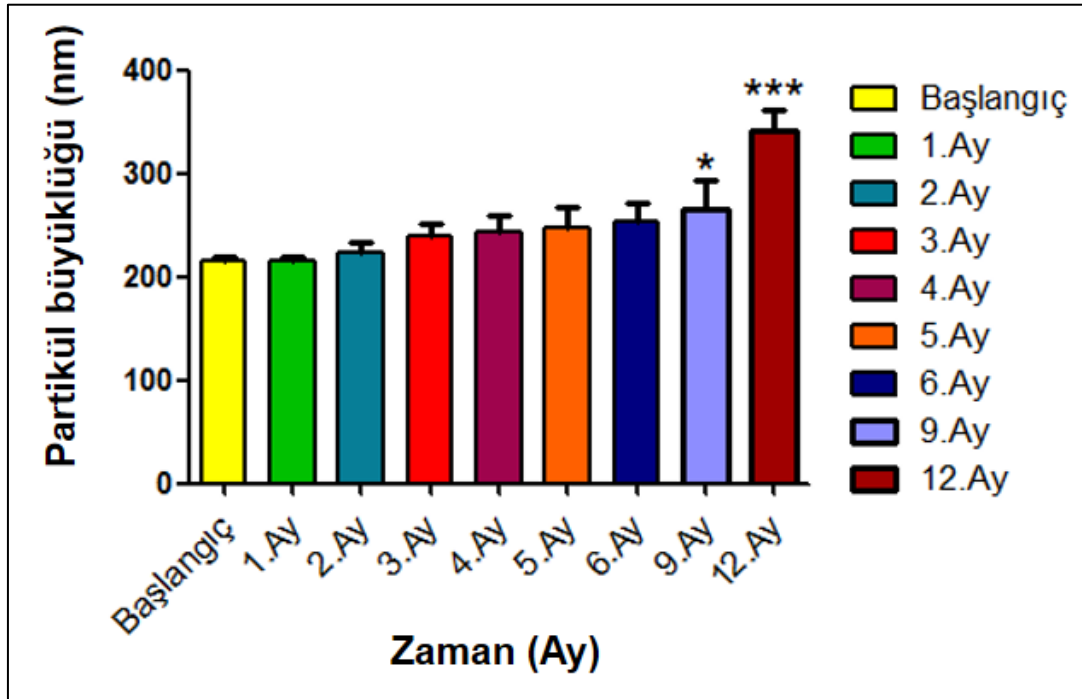


Şekil 4.31. Gempitabin hidroklorür yüklü pegile nanopartikül formülasyonunun (PEG NP21) 4°C sıcaklıkta % kalan ilaç oranları (**p<0,0001)

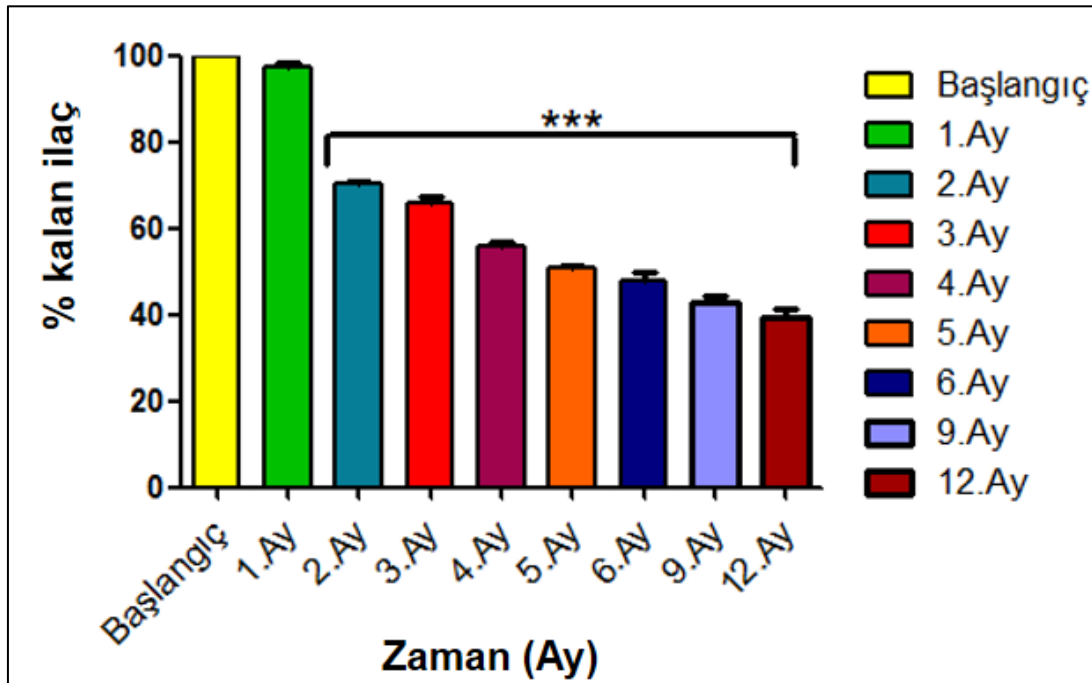
Çizelge 4.38. Pegile nanopartikül formülasyonunun (PEG NP21) $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ bağıl nem ortamındaki stabilitesi

Zaman	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)	% kalan ilaç
Başlangıç	215 ± 4	$0,129 \pm 0,023$	$-17,7 \pm 0,8$	100
1. Ay	215 ± 5	$0,177 \pm 0,048$	$-15,9 \pm 1,2$	$97,4 \pm 1,1$
2. Ay	224 ± 9	$0,281 \pm 0,027$	$-16,1 \pm 1,0$	$70,1 \pm 0,8$
3. Ay	239 ± 12	$0,394 \pm 0,099$	$-16,6 \pm 0,6$	$66,0 \pm 1,5$
4. Ay	243 ± 17	$0,376 \pm 0,046$	$-16,4 \pm 1,2$	$56,0 \pm 0,8$
5. Ay	248 ± 19	$0,239 \pm 0,027$	$-17,5 \pm 0,6$	$50,7 \pm 0,8$
6. Ay	253 ± 19	$0,222 \pm 0,022$	$-18,5 \pm 0,5$	$48,0 \pm 1,6$
9. Ay	266 ± 27	$0,298 \pm 0,045$	$-17,9 \pm 0,3$	$42,7 \pm 1,6$
12. Ay	341 ± 20	$0,497 \pm 0,069$	$-15,5 \pm 0,8$	$39,3 \pm 2,1$

Gemsitabin hidroklorür yüklü pegile nanopartikül formülasyonunun $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ bağıl nem ortamındaki partikül büyüklüğü değişimleri Şekil 4.32’de, formülasyon içindeki % kalan ilaç oranları ise Şekil 4.33’de gösterilmiştir.



Şekil 4.32. Gemcitabin hidroklorür yüklü pegile nanopartikül formülasyonunun (PEG NP21) $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ bağıl nem ortamındaki partikül büyüklüğü değişimleri (* $p<0,05$; *** $p<0,0001$)

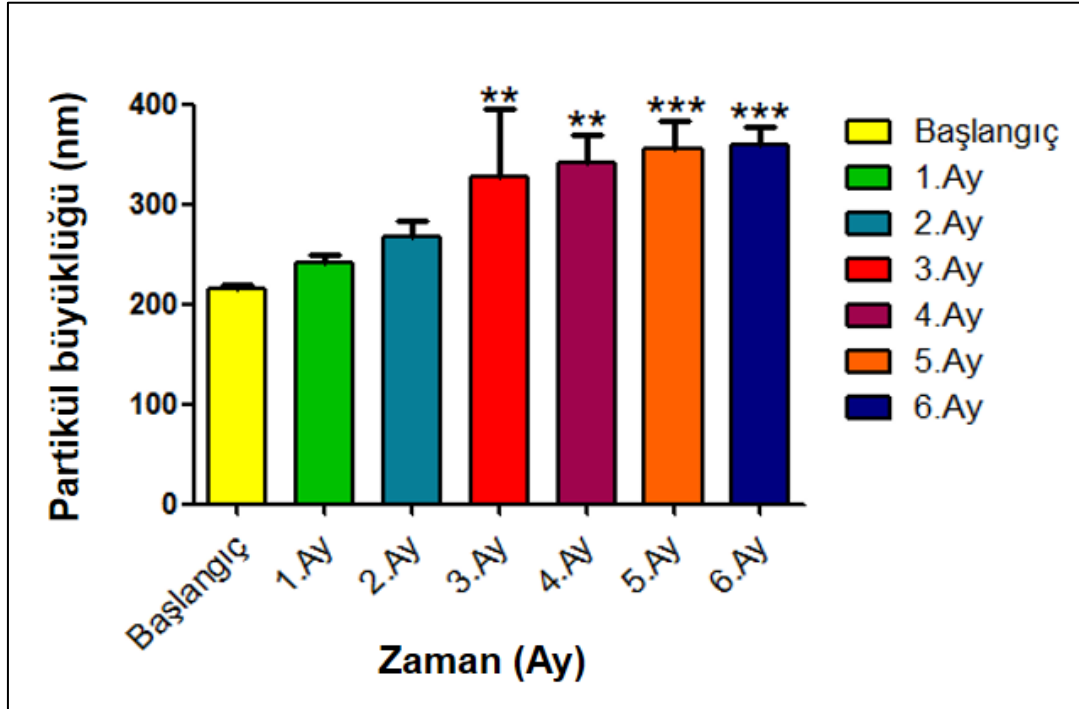


Şekil 4.33. Gemcitabin hidroklorür yüklü pegile nanopartikül formülasyonunun (PEG NP21) $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ bağıl nem ortamındaki % kalan ilaç oranları (*** $p<0,0001$)

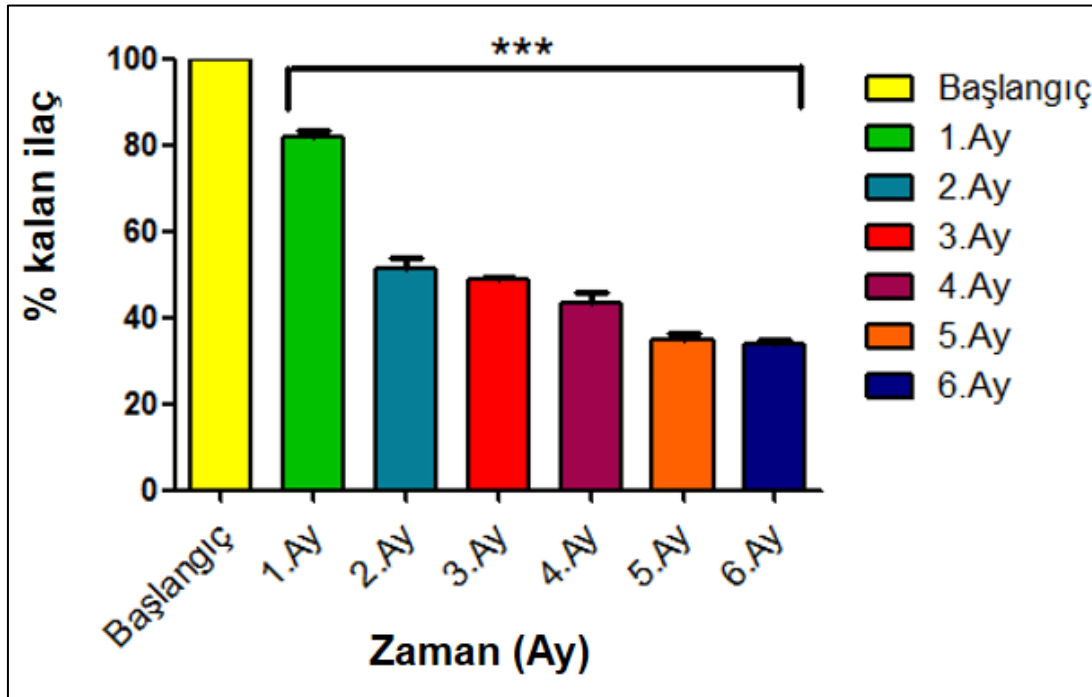
Çizelge 4.39. Pegile nanopartikül formülasyonunun (PEG NP21) $40\pm 2^{\circ}\text{C}/\%75\pm 5$ bağıl nem ortamındaki stabilitesi

Zaman	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)	% kalan ilaç
Başlangıç	215 ± 4	$0,129 \pm 0,023$	$-17,7 \pm 0,8$	100
1. Ay	241 ± 8	$0,263 \pm 0,067$	$-11,9 \pm 1,1$	$81,6 \pm 1,5$
2. Ay	267 ± 16	$0,303 \pm 0,029$	$-11,2 \pm 1,2$	$51,3 \pm 2,4$
3. Ay	328 ± 67	$0,501 \pm 0,124$	$-13,8 \pm 1,6$	$48,6 \pm 1,0$
4. Ay	342 ± 26	$0,418 \pm 0,041$	$-15,6 \pm 2,1$	$43,1 \pm 2,5$
5. Ay	356 ± 27	$0,452 \pm 0,043$	$-15,2 \pm 2,2$	$34,9 \pm 1,7$
6. Ay	360 ± 18	$0,408 \pm 0,057$	$-11,6 \pm 1,1$	$34,0 \pm 0,8$

Gemsitabin hidroklorür yüklü pegile nanopartikül formülasyonunun $40\pm 2^{\circ}\text{C}/\%75\pm 5$ bağıl nem ortamındaki partikül büyüklüğü değişimleri Şekil 4.34’de, formülasyon içindeki % kalan ilaç oranları ise Şekil 4.35’de gösterilmiştir.



Şekil 4.34. Gempitabin hidroklorür yüklü pegile nanopartikül formülasyonunun (PEG NP21) $40\pm 2^{\circ}\text{C}/\%75\pm 5$ bağıl nem ortamındaki partikül büyüklüğü değişimleri (** $p<0,01$; *** $p<0,0001$)



Şekil 4.35. Gempitabin hidroklorür yüklü pegile nanopartikül formülasyonunun (PEG NP21) $40\pm 2^{\circ}\text{C}/\%75\pm 5$ bağıl nem ortamındaki % kalan ilaç oranları (*** $p<0,0001$)

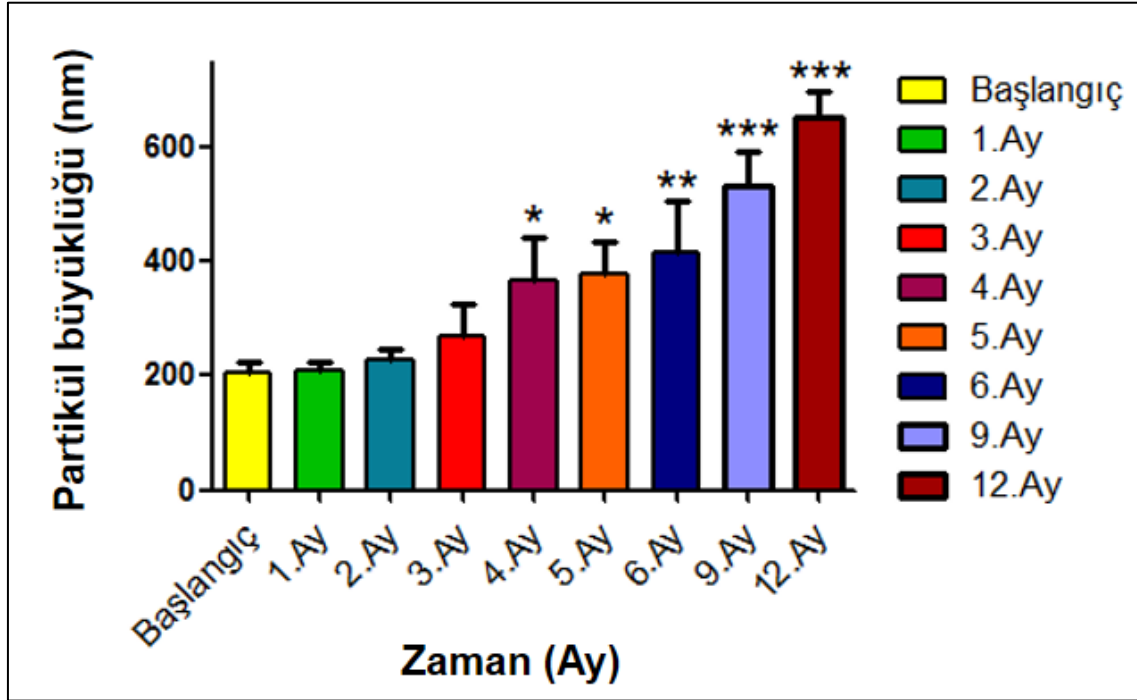
Lipozom formülasyonunun farklı saklama koşullardaki stabilitesi

Gemsitabin hidroklorür yüklü pegile lipozom formülasyonunun (PEG LP2) stabilite testleri sırasında farklı saklama koşullarındaki partikül büyüklüğü, PDI değerleri, zeta potansiyelleri ve % kalan ilaç oranları hesaplanmıştır. Lipozom formülasyonunun 4°C sıcaklıktaki 12 aylık stabilite sonuçları Çizelge 4.40'da, 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamındaki 12 aylık stabilite sonuçları Çizelge 4.41'de ve 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamındaki 6 aylık stabilite sonuçları Çizelge 4.42'de gösterilmiştir.

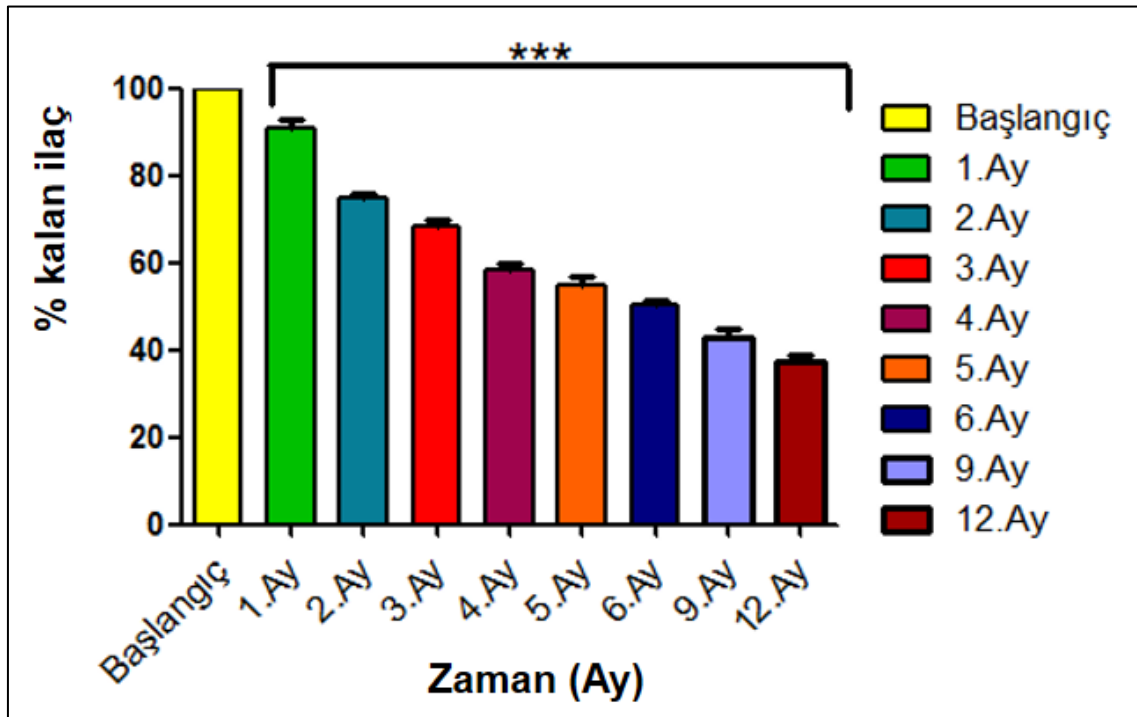
Çizelge 4.40. Pegile lipozom formülasyonunun (PEG LP2) 4°C sıcaklıktaki stabilitesi

Zaman	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)	% kalan ilaç
Başlangıç	206 ± 18	0,266 ± 0,040	-23,1 ± 1,0	100
1. Ay	207 ± 18	0,404 ± 0,053	-27,1 ± 1,6	90,7 ± 2,1
2. Ay	229 ± 18	0,533 ± 0,086	-18,6 ± 1,6	74,9 ± 0,9
3. Ay	268 ± 57	0,473 ± 0,119	-20,4 ± 1,1	68,1 ± 1,8
4. Ay	365 ± 77	0,541 ± 0,070	-18,6 ± 0,6	58,3 ± 1,5
5. Ay	378 ± 60	0,462 ± 0,094	-21,3 ± 0,6	54,8 ± 2,3
6. Ay	416 ± 88	0,465 ± 0,075	-21,6 ± 0,4	50,4 ± 1,1
9. Ay	532 ± 61	0,582 ± 0,044	-21,3 ± 1,1	42,7 ± 2,1
12. Ay	651 ± 47	0,630 ± 0,109	-21,7 ± 1,5	37,5 ± 1,4

Gemsitabin hidroklorür yüklü pegile lipozom formülasyonlarının 4°C sıcaklıktaki partikül büyüklüğü değişimleri Şekil 4.36'da, formülasyon içindeki % kalan ilaç oranları ise Şekil 4.37'de gösterilmiştir.



Şekil 4.36. Gempitabin hidroklorür yüklü pegile lipozom formülasyonunun (PEG LP2) 4°C sıcaklıkta partikül büyüklüğü değişimleri (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,0001)

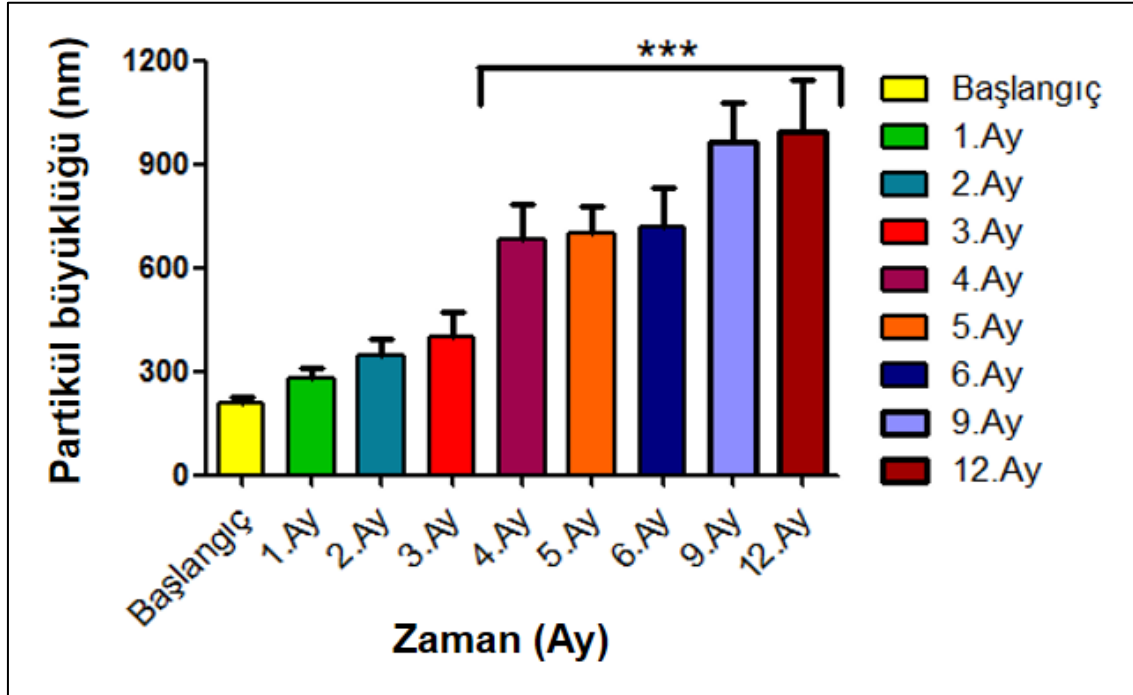


Şekil 4.37. Gempitabin hidroklorür yüklü pegile lipozom formülasyonunun (PEG LP2) 4°C sıcaklıkta % kalan ilaç oranları (***p<0,0001)

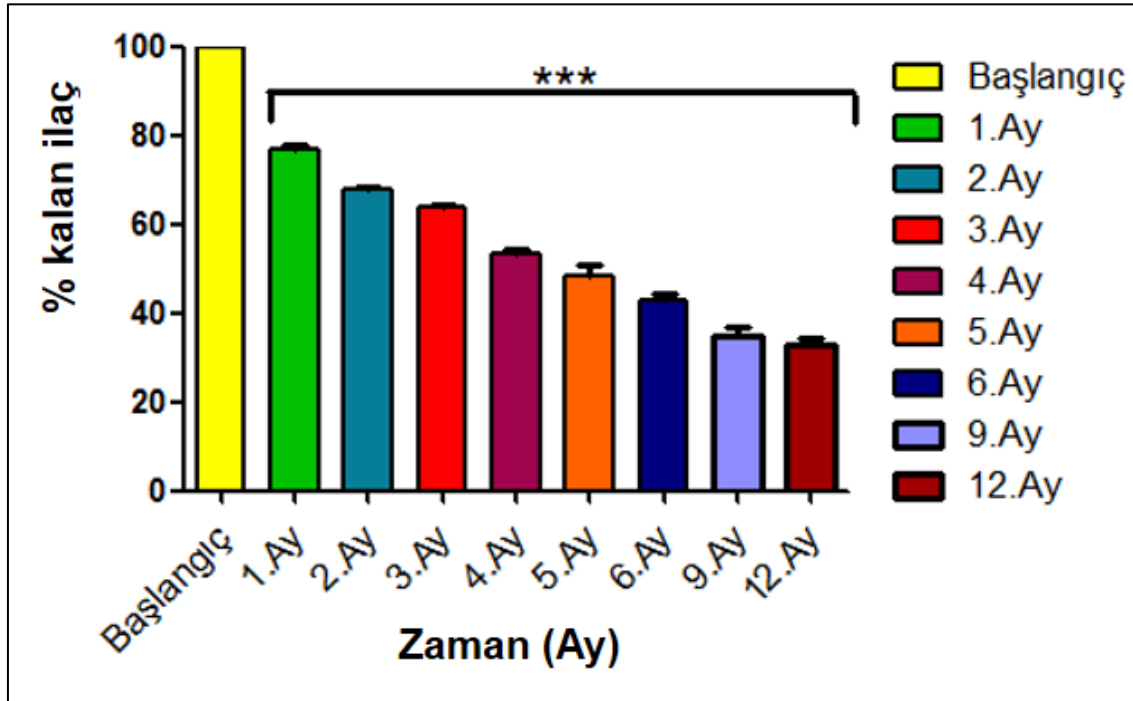
Çizelge 4.41. Pegile lipozom formülasyonunun (PEG LP2) $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ bağıl nem ortamındaki stabilitesi

Zaman	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)	% kalan ilaç
Başlangıç	206 ± 18	$0,266 \pm 0,040$	$-23,1 \pm 1,0$	100
1. Ay	278 ± 30	$0,414 \pm 0,066$	$-27,2 \pm 1,4$	$76,1 \pm 1,4$
2. Ay	346 ± 48	$0,553 \pm 0,075$	$-16,7 \pm 2,4$	$67,9 \pm 0,6$
3. Ay	400 ± 74	$0,662 \pm 0,058$	$-20,2 \pm 1,2$	$63,7 \pm 0,8$
4. Ay	682 ± 100	$0,688 \pm 0,180$	$-22,6 \pm 0,7$	$53,4 \pm 1,0$
5. Ay	698 ± 79	$0,592 \pm 0,173$	$-20,6 \pm 0,7$	$48,3 \pm 2,8$
6. Ay	717 ± 117	$0,612 \pm 0,140$	$-26,8 \pm 0,8$	$42,9 \pm 1,7$
9. Ay	966 ± 113	$0,738 \pm 0,148$	$-27,3 \pm 1,4$	$34,9 \pm 1,8$
12. Ay	991 ± 155	$0,925 \pm 0,118$	$-28,0 \pm 1,3$	$32,6 \pm 1,6$

Gemsitabin hidroklorür yüklü pegile lipozom formülasyonunun $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ bağıl nem ortamındaki partikül büyüklüğü değişimleri Şekil 4.38’de, formülasyon içindeki % kalan ilaç oranları ise Şekil 4.39’da gösterilmiştir.



Şekil 4.38. Gempitabin hidroklorür yüklü pegile lipozom formülasyonunun (PEG LP2) $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ bağıl nem ortamındaki partikül büyüklüğü değişimleri (***) $p<0,0001$)

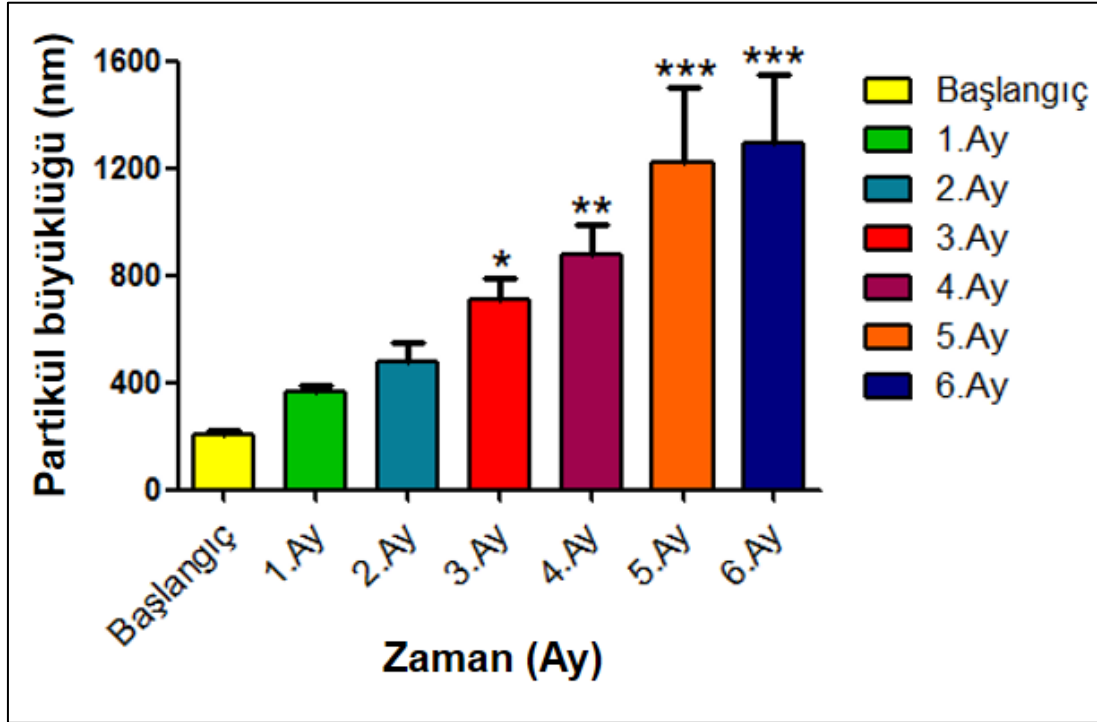


Şekil 4.39. Gempitabin hidroklorür yüklü pegile lipozom formülasyonunun (PEG LP2) $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ bağıl nem ortamındaki % kalan ilaç oranları (***) $p<0,0001$)

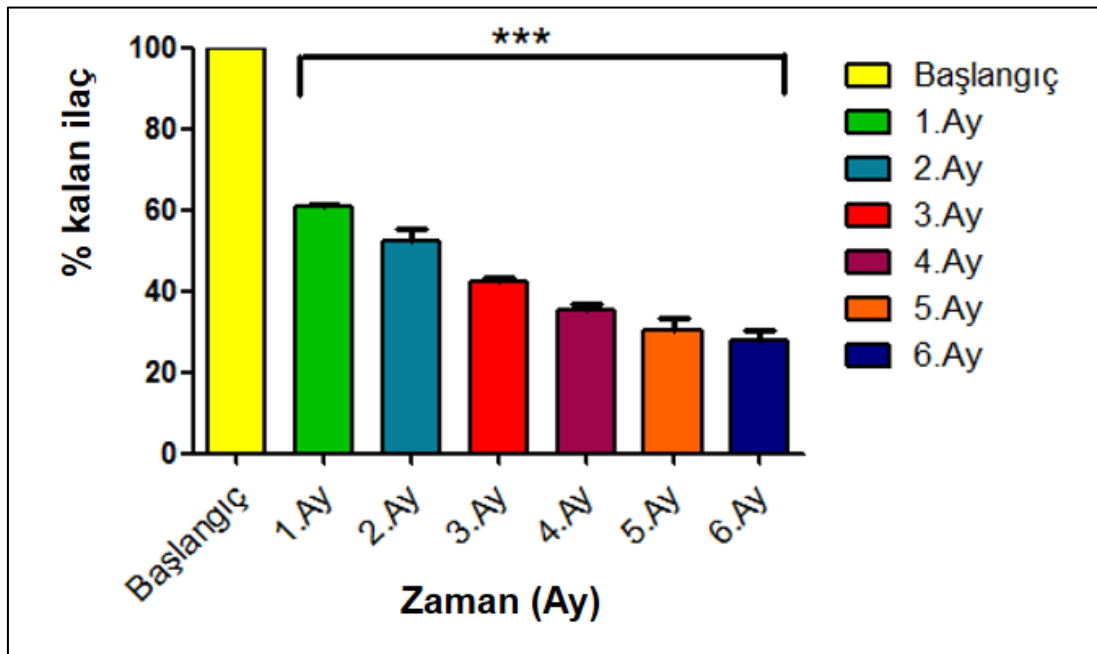
Çizelge 4.42. Pegile lipozom formülasyonunun (PEG LP2) $40\pm2^{\circ}\text{C}/\%75\pm5$ bağıl nem ortamındaki stabilitesi

Zaman	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)	% kalan ilaç
Başlangıç	206 ± 18	$0,266 \pm 0,040$	$-23,1 \pm 1,0$	100
1. Ay	365 ± 28	$0,447 \pm 0,050$	$-24,2 \pm 2,5$	$60,9 \pm 0,7$
2. Ay	479 ± 74	$0,551 \pm 0,080$	$-15,5 \pm 1,5$	$52,4 \pm 2,9$
3. Ay	707 ± 80	$0,728 \pm 0,040$	$-24,6 \pm 0,6$	$42,4 \pm 0,7$
4. Ay	874 ± 118	$0,623 \pm 0,091$	$-26,9 \pm 1,3$	$35,5 \pm 1,2$
5. Ay	1224 ± 276	$0,806 \pm 0,100$	$-26,8 \pm 1,4$	$30,4 \pm 2,7$
6. Ay	1294 ± 253	$0,831 \pm 0,058$	$-25,7 \pm 1,5$	$27,8 \pm 2,7$

Gemsitabin hidroklorür yüklü pegile lipozom formülasyonunun $40\pm2^{\circ}\text{C}/\%75\pm5$ bağıl nem ortamındaki partikül büyüklüğü değişimleri Şekil 4.40'da, formülasyon içindeki % kalan ilaç oranları ise Şekil 4.41'de gösterilmiştir.



Şekil 4.40. Gemcitabin hidroklorür yüklü pegile lipozom formülasyonunun (PEG LP2) $40\pm 2^{\circ}\text{C}/\%75\pm 5$ bağıl nem ortamındaki partikül büyüklüğü değişimleri (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,0001$)



Şekil 4.41. Gemcitabin hidroklorür yüklü pegile lipozom formülasyonunun (PEG LP2) $40\pm 2^{\circ}\text{C}/\%75\pm 5$ bağıl nem ortamındaki % kalan ilaç oranları (*** $p<0,0001$)

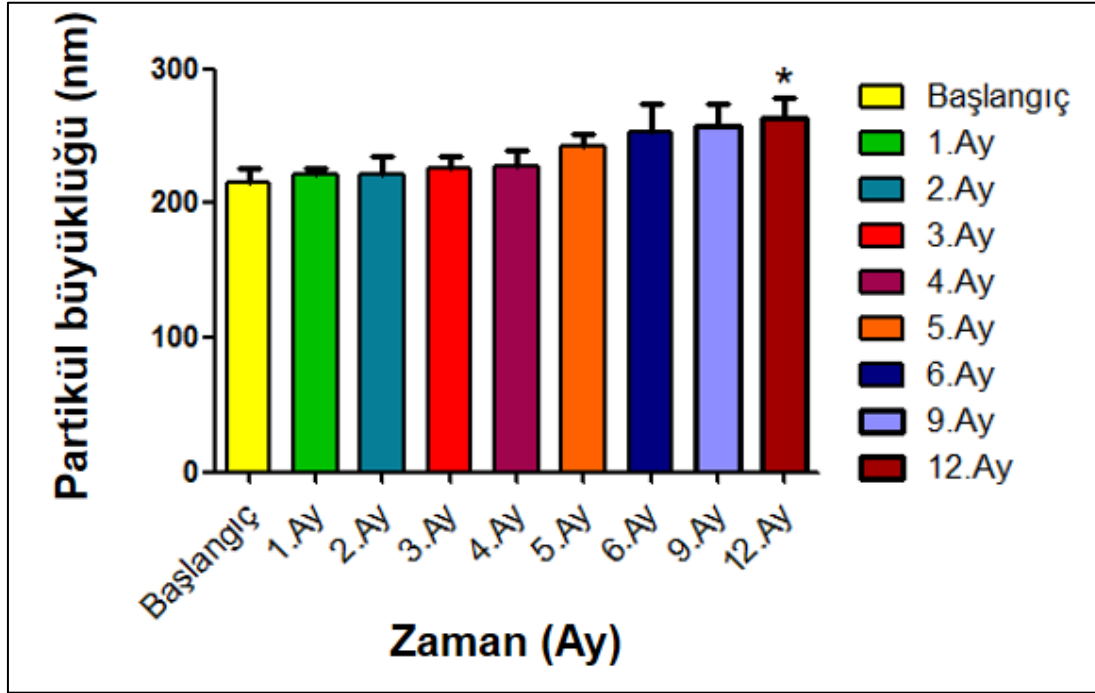
LPHNP formülasyonunun farklı saklama koşullardaki stabilitesi

Gemsitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonunun (LPHNP17) stabilite testleri sırasında farklı saklama koşullarındaki partikül büyüklüğü, PDI değerleri, zeta potansiyelleri ve % kalan ilaç oranları hesaplanmıştır. LPHNP formülasyonunun 4°C sıcaklıktaki 12 aylık stabilite sonuçları Çizelge 4.43’de, 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamındaki 12 aylık stabilite sonuçları Çizelge 4.44’de ve 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamındaki 6 aylık stabilite sonuçları Çizelge 4.45’de gösterilmiştir.

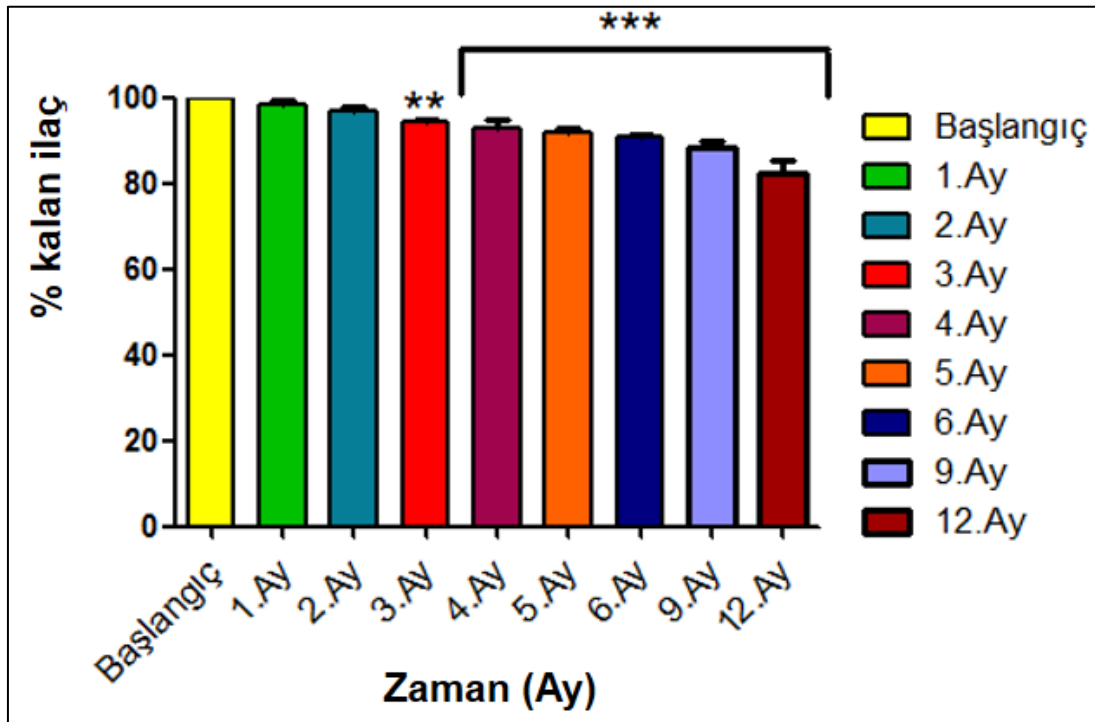
Çizelge 4.43. LPHNP (LPHNP17) formülasyonunun 4°C sıcaklıktaki stabilitesi

Zaman	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)	% kalan ilaç
Başlangıç	216 ± 10	0,155 ± 0,033	-20,6 ± 1,3	100
1. Ay	222 ± 4	0,236 ± 0,028	-19,8 ± 0,9	98,3 ± 1,1
2. Ay	222 ± 13	0,149 ± 0,025	-15,5 ± 0,6	96,6 ± 1,2
3. Ay	226 ± 9	0,162 ± 0,030	-16,4 ± 1,1	94,4 ± 0,3
4. Ay	227 ± 12	0,188 ± 0,016	-22,6 ± 0,9	92,8 ± 1,9
5. Ay	242 ± 9	0,257 ± 0,030	-23,7 ± 1,2	91,7 ± 0,9
6. Ay	253 ± 22	0,232 ± 0,027	-23,7 ± 0,5	90,8 ± 0,5
9. Ay	257 ± 17	0,232 ± 0,017	-17,5 ± 0,4	88,4 ± 1,4
12. Ay	264 ± 14	0,269 ± 0,038	-22,6 ± 1,5	82,5 ± 2,8

Gemsitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonunun 4°C sıcaklıktaki partikül büyüklüğü değişimleri Şekil 4.42’de, formülasyon içindeki % kalan ilaç oranları ise Şekil 4.43’de gösterilmiştir.



Şekil 4.42. Gempitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonunun (LPHNP17) 4°C sıcaklıktaki partikül büyüklüğü değişimleri (*p<0,05)

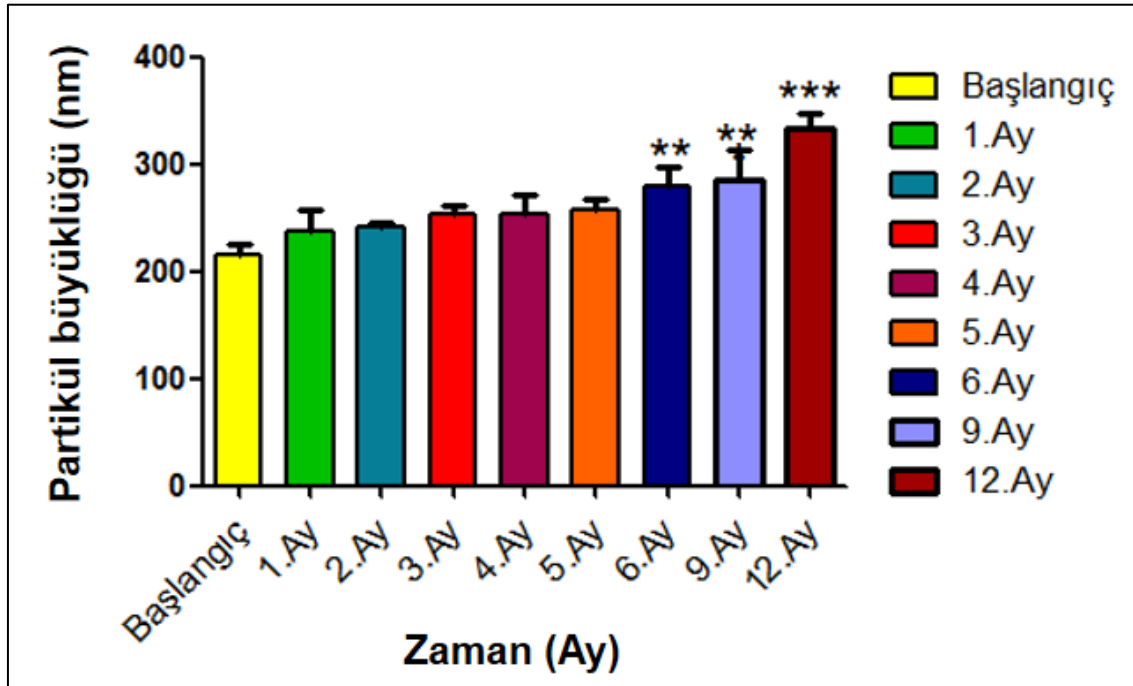


Şekil 4.43. Gempitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonunun (LPHNP17) 4°C sıcaklıktaki % kalan ilaç oranları (**p<0,01,***p<0,0001)

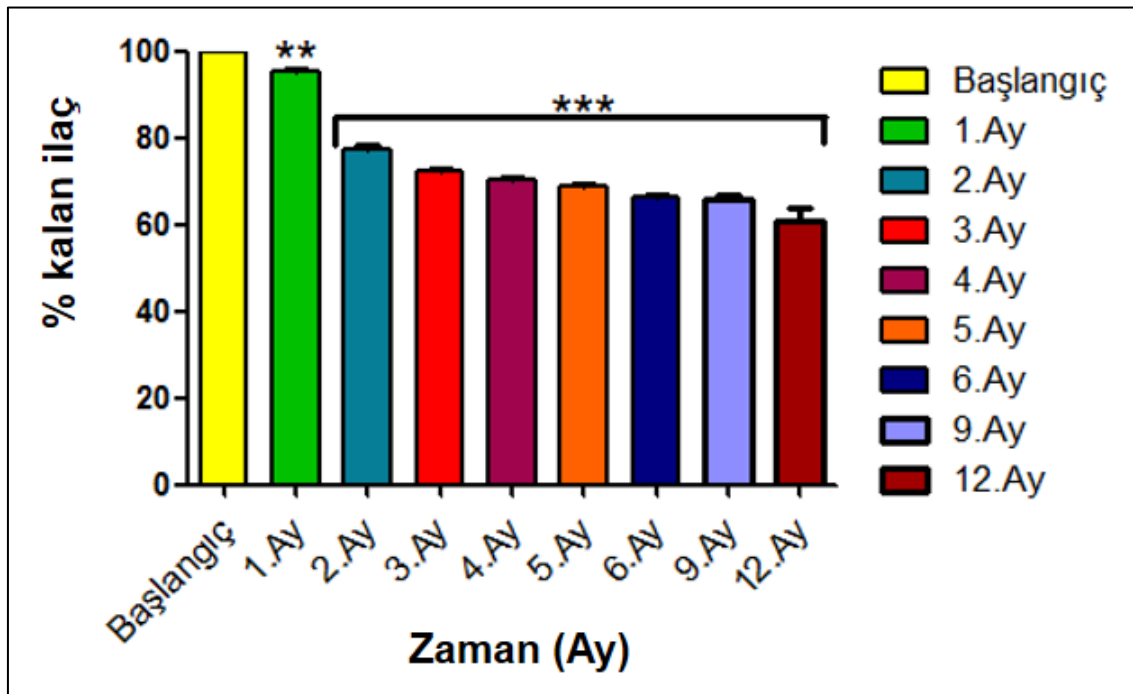
Çizelge 4.44. LPHNP formülasyonunun (LPHNP17) $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ bağıl nem ortamındaki stabilitesi

Zaman	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)	% kalan ilaç
Başlangıç	216 ± 10	$0,155 \pm 0,033$	$-20,6 \pm 1,3$	100
1. Ay	238 ± 19	$0,267 \pm 0,045$	$-19,5 \pm 0,9$	$95,1 \pm 0,7$
2. Ay	242 ± 4	$0,240 \pm 0,028$	$-16,2 \pm 1,4$	$77,2 \pm 1,4$
3. Ay	254 ± 7	$0,272 \pm 0,026$	$-18,7 \pm 0,8$	$72,2 \pm 0,6$
4. Ay	254 ± 18	$0,235 \pm 0,027$	$-17,7 \pm 0,9$	$70,4 \pm 0,7$
5. Ay	258 ± 9	$0,285 \pm 0,042$	$-23,9 \pm 2,1$	$68,6 \pm 0,9$
6. Ay	280 ± 18	$0,283 \pm 0,036$	$-23,0 \pm 0,5$	$66,3 \pm 0,8$
9. Ay	285 ± 28	$0,249 \pm 0,008$	$-17,2 \pm 0,6$	$65,1 \pm 1,3$
12. Ay	334 ± 13	$0,379 \pm 0,056$	$-17,3 \pm 0,7$	$60,8 \pm 2,8$

Gemsitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonunun $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ bağıl nem ortamındaki partikül büyüklüğü değişimleri Şekil 4.44’de, formülasyon içindeki % kalan ilaç oranları ise Şekil 4.45’de gösterilmiştir.



Şekil 4.44. Gempitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonunun (LPHNP17) $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ bağıl nem ortamındaki partikül büyüklüğü değişimleri (** $p<0,01$; *** $p<0,0001$)

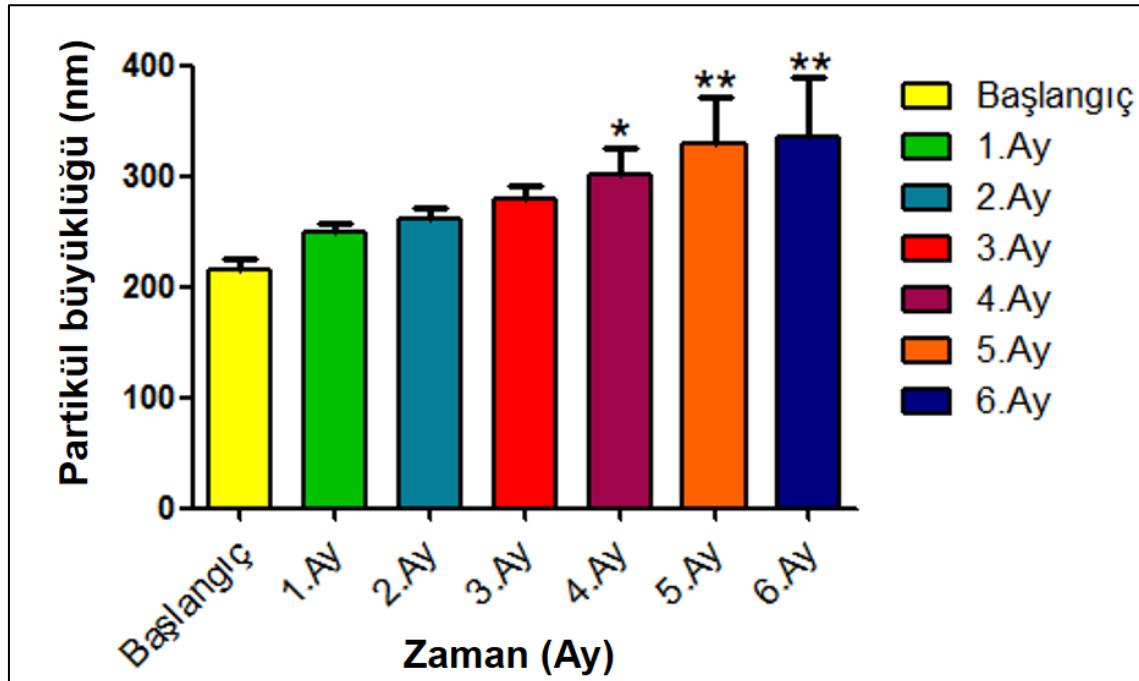


Şekil 4.45. Gempitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonunun (LPHNP17) $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ bağıl nem ortamındaki % kalan ilaç oranları (** $p<0,01$; *** $p<0,0001$)

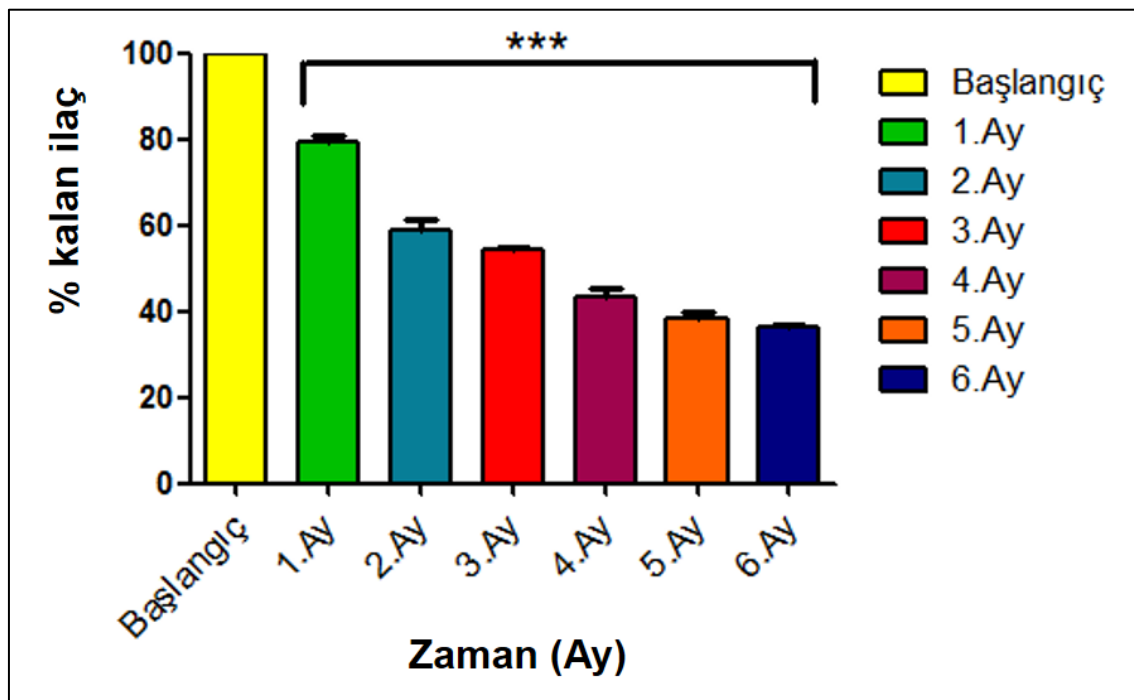
Çizelge 4.45. LPHNP formülasyonunun (LPHNP17) $40\pm2^{\circ}\text{C}/\%75\pm5$ bağıl nem ortamındaki stabilitesi

Zaman	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)	% kalan ilaç
Başlangıç	216 $\pm$ 10	0,155 $\pm$ 0,033	-20,6 $\pm$ 1,3	100
1. Ay	249 $\pm$ 9	0,161 $\pm$ 0,049	-18,4 $\pm$ 0,9	79,3 $\pm$ 1,6
2. Ay	261 $\pm$ 11	0,286 $\pm$ 0,044	-16,6 $\pm$ 0,7	59,0 $\pm$ 2,3
3. Ay	280 $\pm$ 12	0,349 $\pm$ 0,041	-15,7 $\pm$ 0,7	54,4 $\pm$ 0,5
4. Ay	301 $\pm$ 25	0,442 $\pm$ 0,049	-19,3 $\pm$ 0,5	43,3 $\pm$ 1,8
5. Ay	329 $\pm$ 42	0,476 $\pm$ 0,056	-22,6 $\pm$ 0,8	38,3 $\pm$ 1,6
6. Ay	336 $\pm$ 54	0,648 $\pm$ 0,061	-20,8 $\pm$ 1,1	36,3 $\pm$ 0,7

Gemsitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonun $40\pm2^{\circ}\text{C}/\%75\pm5$ bağıl nem ortamındaki partikül büyüklüğü değişimleri Şekil 4.46'da, formülasyon içindeki % kalan ilaç oranları ise Şekil 4.47'de gösterilmiştir.



Şekil 4.46. Gemsitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonunun (LPHNP17) $40\pm2^{\circ}\text{C}/\%75\pm5$ bağıl nem ortamındaki partikül büyüklüğü değişimleri (* $p<0,05$; ** $p<0,01$)



Şekil 4.47. Gempitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonunun (LPHNP17) $40\pm2^{\circ}\text{C}/\%75\pm5$ bağıl nem ortamındaki % kalan ilaç oranları (***) $p<0,0001$)

Gempitabin hidroklorür yüklü nanopartikül (PEG NP21) , lipozom (PEG LP2) ve LPHNP17 formülasyonlarının 4°C , $25\pm2^{\circ}\text{C}/\%60\pm5$ bağıl nem ortamı ve $40\pm2^{\circ}\text{C}/\%75\pm5$ bağıl nem ortamındaki raf ömürleri hesaplanmış ve Çizelge 4.46'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.46. Formülasyonların farklı saklama koşullarındaki raf ömürleri

Formülasyon	Raf ömrü (Ay)		
	4°C	$25\pm2^{\circ}\text{C}/\%60\pm5$ bağıl nem ortamı	$40\pm2^{\circ}\text{C}/\%75\pm5$ bağıl nem ortamı
PEG NP21 (Nanopartikül)	1,61	1,31	0,58
PEG LP2 (Lipozom)	1,28	1,16	0,53
LPHNP17	7,02	2,79	0,61

Formülasyonların in vivoyu taklit eden farklı ortamlardaki stabilite deneyleri ait bulgular

Fosfat tamponu (pH 7,4), FBS ve %90 fosfat tamponu + %10 FBS ortamları içerisindeki liyofilize nanopartikül (PEG NP21), lipozom (PEG LP2) ve LPHNP17 formülasyonları 5 gün süresince $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de sıcaklıktaki su banyosu ortamında bekletilmiştir. Belirli aralıklarla (başlangıç, 1, 2, 3, 4 ve 5. gün) örnekler alınıp partikül büyüklüğü, dağılımı ve zeta potansiyelleri ölçümleri yapılmıştır.

Nanopartikül formülasyonuna ait farklı ortamlardaki stabilite sonuçları

Pegile nanopartikül formülasyonunun (PEG NP21) farklı ortamlardaki partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli ölçüm sonuçları Çizelge 4.47-Çizelge 4.49 arasında gösterilmiştir.

Çizelge 4.47. %100 fosfat tamponu içerisindeki nanopartikül formülasyonu

Zaman	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)
Başlangıç	205 ± 5	$0,098 \pm 0,018$	$-13,8 \pm 1,1$
1. gün	210 ± 8	$0,094 \pm 0,026$	$-13,2 \pm 0,7$
2. gün	213 ± 9	$0,166 \pm 0,031$	$-13,6 \pm 0,8$
3. gün	213 ± 7	$0,168 \pm 0,017$	$-14,7 \pm 2,8$
4. gün	213 ± 7	$0,164 \pm 0,024$	$-15,8 \pm 1,8$
5. gün	214 ± 10	$0,134 \pm 0,035$	$-18,3 \pm 1,0$

Çizelge 4.48. %90 fosfat tamponu/%10 fetal bovin serum ortamı içerisindeki nanopartikül formülasyonu

Zaman	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)
Başlangıç	207 ± 10	0,114 ± 0,024	-17,2 ± 1,5
1. gün	216 ± 9	0,212 ± 0,032	-15,3 ± 2,1
2. gün	216 ± 11	0,260 ± 0,045	-17,6 ± 1,4
3. gün	225 ± 14	0,333 ± 0,041	-22,5 ± 1,4
4. gün	252 ± 12	0,397 ± 0,076	-21,4 ± 0,7
5. gün	258 ± 18	0,352 ± 0,069	-22,2 ± 0,8

Çizelge 4.49. %100 fetal bovin serum ortamı içerisindeki nanopartikül formülasyonu

Zaman	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)
Başlangıç	208 ± 10	0,120 ± 0,021	-14,7 ± 2,8
1. gün	210 ± 8	0,331 ± 0,033	-16,6 ± 1,1
2. gün	222 ± 17	0,465 ± 0,149	-24,2 ± 0,8
3. gün	253 ± 21	0,558 ± 0,159	-22,9 ± 1,2
4. gün	281 ± 19	0,547 ± 0,099	-25,8 ± 1,0
5. gün	354 ± 20	0,447 ± 0,166	-24,3 ± 1,8

Lipozom formülasyonuna ait farklı ortamlardaki stabilite sonuçları

Pegile lipozom formülasyonunun (PEG LP2) farklı ortamlardaki partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli ölçüm sonuçları Çizelge 4.50 - Çizelge 4.52 arasında gösterilmiştir.

Çizelge 4.50. %100 fosfat tamponu içerisindeki lipozom formülasyonu

Zaman	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)
Başlangıç	186 ± 5	0,069 ± 0,019	-13,5 ± 2,0
1. gün	189 ± 6	0,092 ± 0,026	-13,0 ± 0,6
2. gün	196 ± 7	0,261 ± 0,022	-14,4 ± 0,5
3. gün	199 ± 8	0,219 ± 0,032	-16,0 ± 2,0
4. gün	203 ± 17	0,192 ± 0,025	-17,7 ± 1,5
5. gün	209 ± 8	0,253 ± 0,043	-17,9 ± 0,9

Çizelge 4.51. %90 fosfat tamponu/%10 fetal bovin serum ortamı içerisindeki lipozom formülasyonu

Zaman	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)
Başlangıç	188 ± 10	0,234 ± 0,052	-24,4 ± 1,5
1. gün	192 ± 13	0,498 ± 0,082	-23,8 ± 2,6
2. gün	203 ± 10	0,481 ± 0,073	-25,0 ± 1,1
3. gün	219 ± 10	0,619 ± 0,072	-26,2 ± 1,2
4. gün	318 ± 22	0,705 ± 0,119	-27,0 ± 0,8
5. gün	705 ± 35	0,613 ± 0,144	-23,9 ± 1,8

Çizelge 4.52. %100 fetal bovin serum ortamı içerisindeki lipozom formülasyonu

Zaman	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)
Başlangıç	217 ± 13	0,332 ± 0,067	-23,6 ± 1,5
1. gün	264 ± 78	0,561 ± 0,099	-24,1 ± 0,9
2. gün	403 ± 82	0,635 ± 0,039	-23,5 ± 0,8
3. gün	1182 ± 204	0,882 ± 0,104	-25,4 ± 0,5
4. gün	1405 ± 411	0,905 ± 0,105	-25,6 ± 1,2
5. gün	1520 ± 465	0,895 ± 0,162	-24,0 ± 1,9

LPHNP formülasyonuna ait farklı ortamlardaki stabilite sonuçları

LPHNP17 formülasyonunun farklı ortamlardaki partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli ölçüm sonuçları Çizelge 4.53 - Çizelge 4.55 arasında gösterilmiştir.

Çizelge 4.53. %100 fosfat tamponu içerisindeki LPHNP formülasyonu

Zaman	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)
Başlangıç	223 ± 13	0,149 ± 0,021	-14,4 ± 0,9
1. gün	230 ± 15	0,154 ± 0,018	-14,3 ± 1,6
2. gün	230 ± 6	0,209 ± 0,013	-18,4 ± 0,6
3. gün	240 ± 13	0,181 ± 0,026	-14,5 ± 1,9
4. gün	240 ± 16	0,166 ± 0,026	-15,5 ± 1,4
5. gün	249 ± 17	0,200 ± 0,018	-18,2 ± 1,4

Çizelge 4.54. %90 fosfat tamponu/%10 fetal bovin serum ortamı içerisindeki LPHNP formülasyonu

Zaman	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)
Başlangıç	241 ± 12	0,198 ± 0,061	-19,4 ± 1,4
1. gün	256 ± 11	0,283 ± 0,056	-19,8 ± 0,7
2. gün	255 ± 6	0,309 ± 0,033	-24,1 ± 0,8
3. gün	253 ± 26	0,350 ± 0,026	-26,3 ± 1,2
4. gün	300 ± 13	0,324 ± 0,100	-26,1 ± 1,0
5. gün	502 ± 50	0,382 ± 0,110	-27,8 ± 1,5

Çizelge 4.55. %100 fetal bovin serum ortamı içerisindeki LPHNP formülasyonu

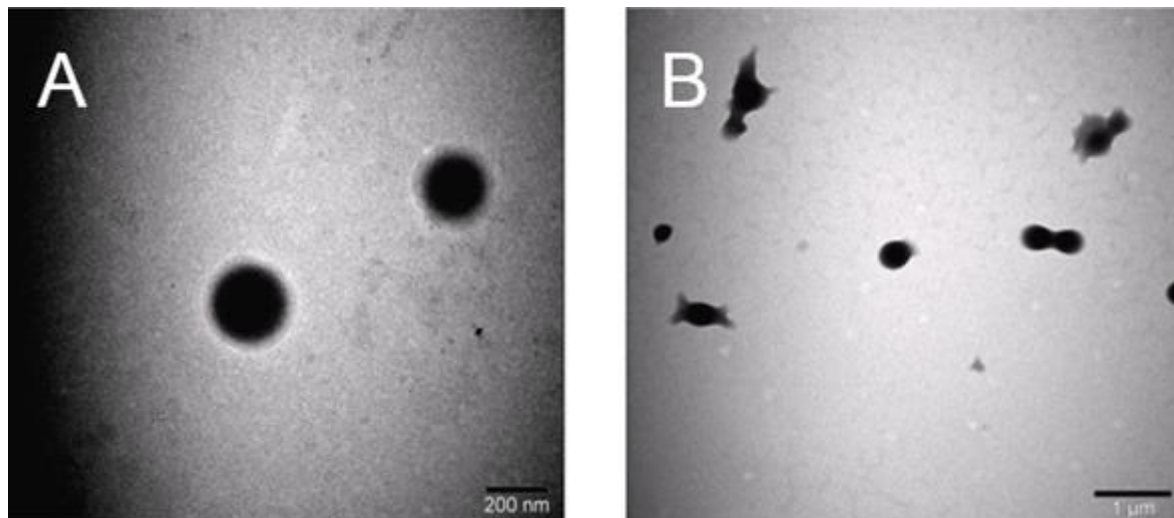
Zaman	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)
Başlangıç	248 ± 14	0,198 ± 0,061	-19,4 ± 1,4
1. gün	281 ± 41	0,421 ± 0,068	-15,5 ± 0,2
2. gün	374 ± 34	0,559 ± 0,102	-23,6 ± 0,3
3. gün	456 ± 26	0,704 ± 0,068	-23,8 ± 0,3
4. gün	493 ± 34	0,578 ± 0,118	-24,8 ± 0,9
5. gün	616 ± 92	0,636 ± 0,062	-24,4 ± 2,0

4.3.7. Formülasyonların morfolojik özelliklerinin belirlenmesi

Formülasyonların TEM görüntüleri

Ön deneme nanopartikül formülasyonlarının TEM görüntüleri

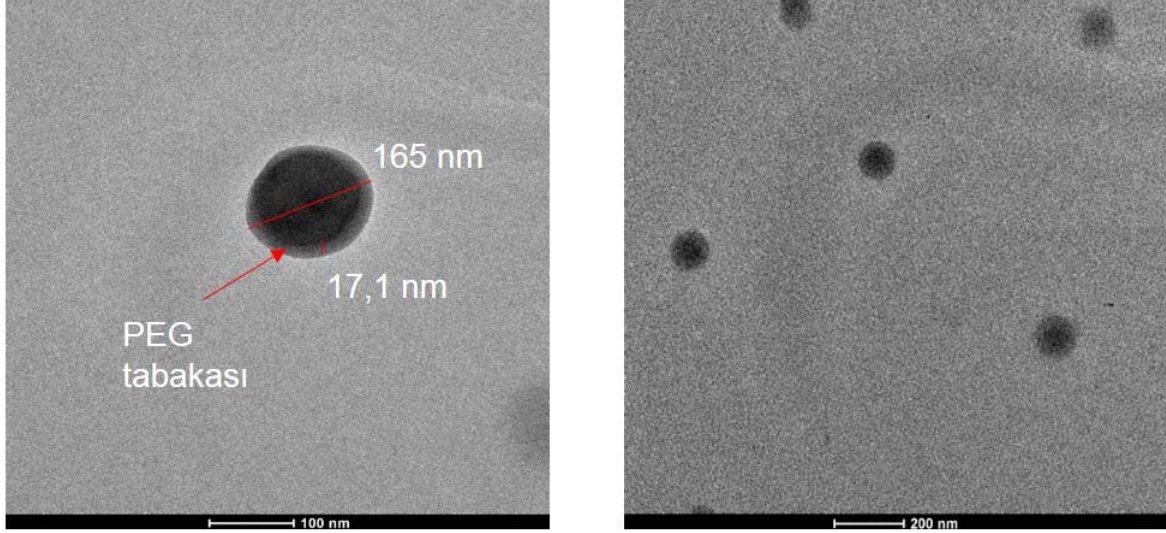
Nanopartiküllere ait ön çalışmalarda iç sulu fazda yüzey etkin madde olarak PVA 31-50 kDa kullanılan formülasyonun (Ö-NP5) ve Lutrol F-68 kullanılan formülasyonun (Ö-NP6) TEM görüntüleri alınmıştır. Resim 4.2'de bu formülasyonlara ait TEM görüntüleri gösterilmiştir.



Resim 4.2. A=Ö-NP5 ve B= Ö-NP6 formülasyonlarının TEM görüntüleri

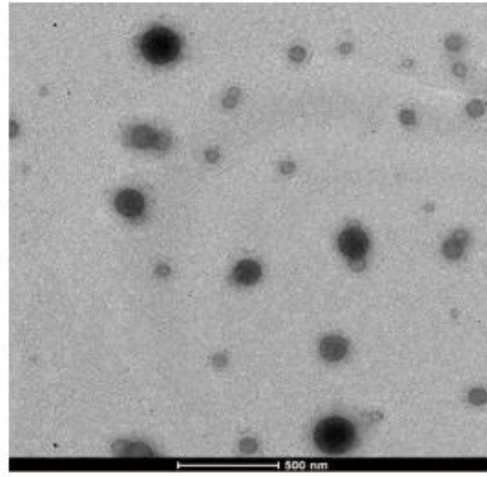
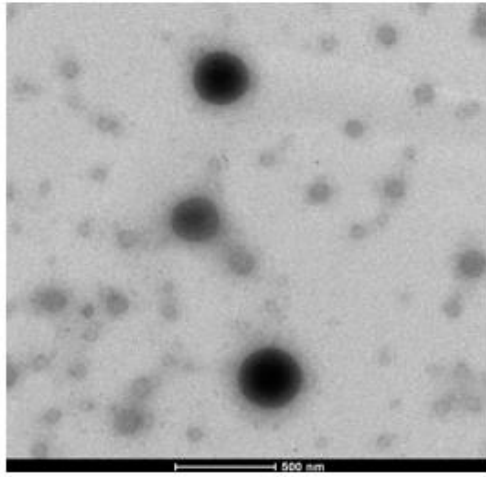
Nanopartikül formülasyonlarının stabilite deneylerine ait TEM görüntüleri

Resim 4.3'de gemitabin hidroklorür yüklü pegile nanopartikül formülasyonunun stabilite deneyinin başlangıcındaki TEM görüntüleri verilmiştir.

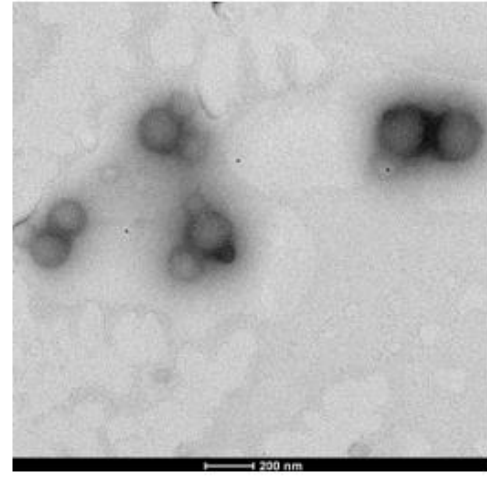
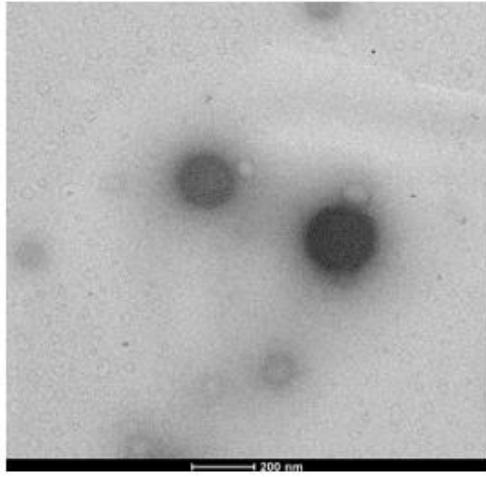


Resim 4.3. Pegile nanopartikül formülasyonunun (PEG NP21) stabilite deneyinin başlangıcındaki TEM görüntüleri

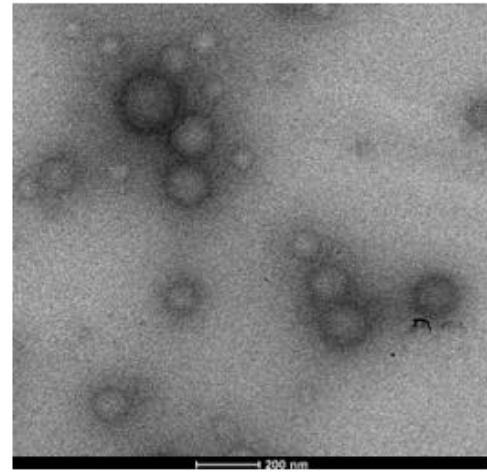
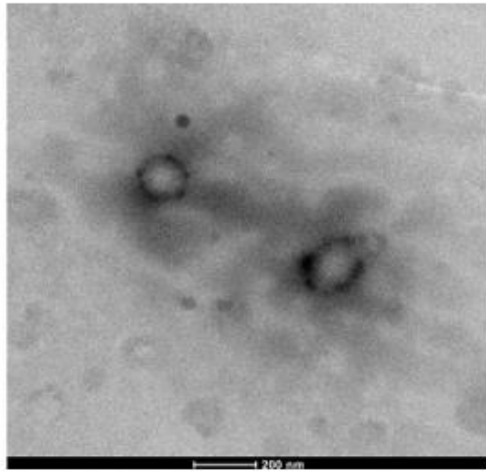
Gemitabin hidroklorür yüklü pegile nanopartikül formülasyonunun 4°C sıcaklıktaki 6 ay, 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamında 6 ay ve 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamında 3 ay saklandıktan sonra çekilen TEM görüntüleri Resim 4.4'de gösterilmiştir.



4°C sıcaklıkta 6. ay



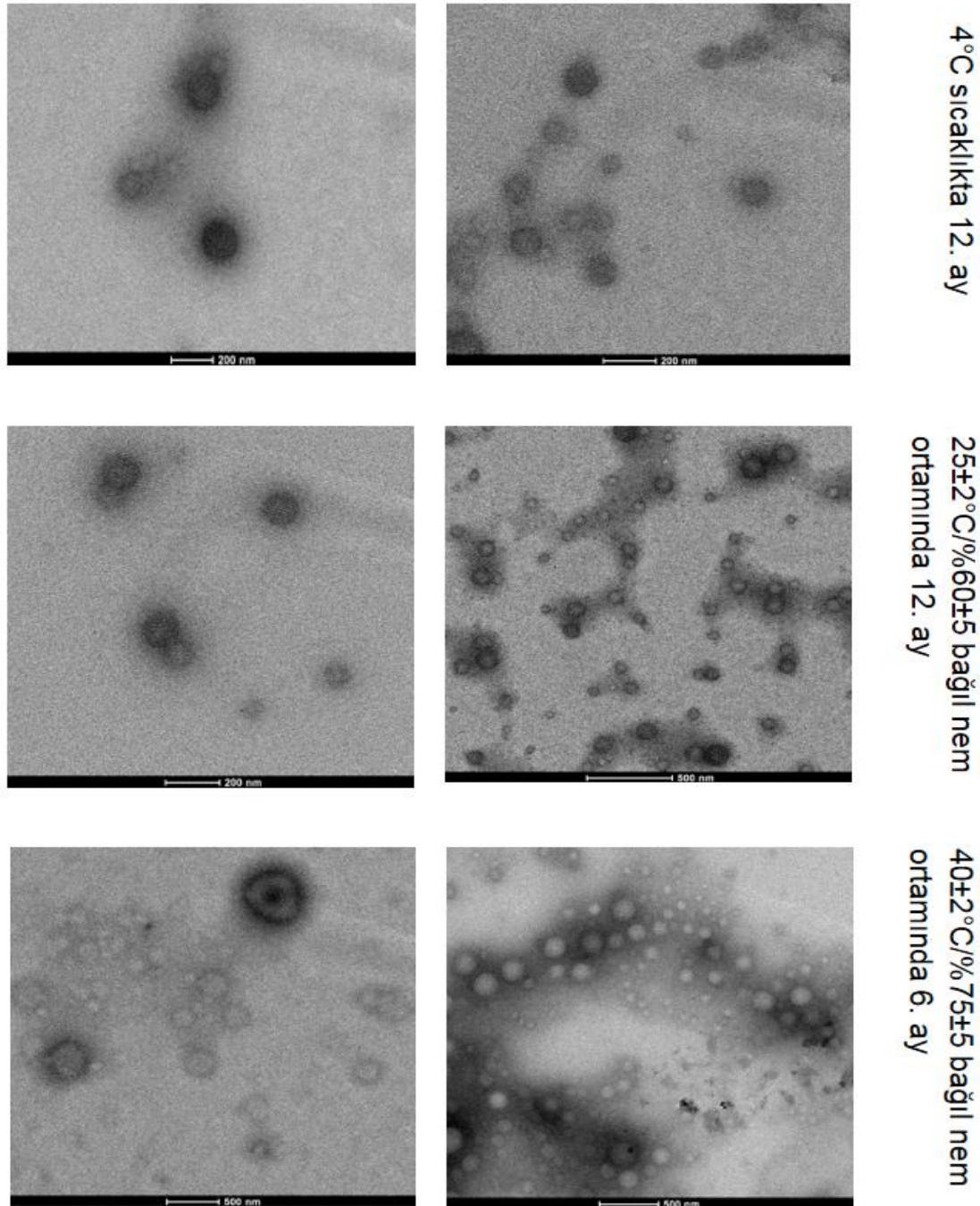
25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamında 6. ay



40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamında 3. ay

Resim 4.4. Nanopartikül formülasyonunun (PEG NP21) 4°C sıcaklıktaki 6 ay, 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamında 6 ay ve 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamında 3 ay saklandıktan sonra çekilen TEM görüntüleri

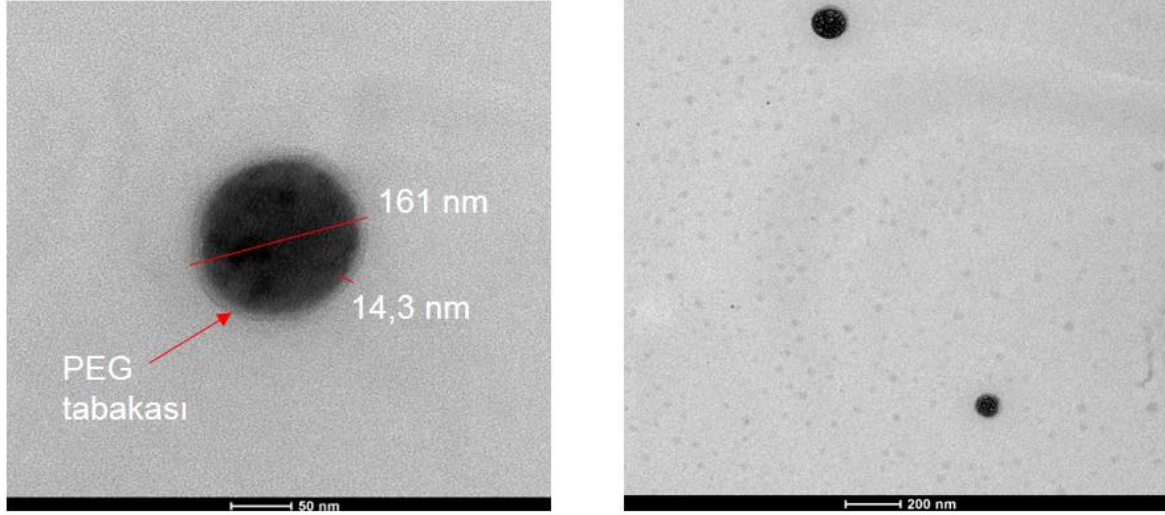
Gemsitabin hidroklorür yüklü pegile nanopartikül formülasyonunun 4°C sıcaklıktaki 12 ay, 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamında 12 ay ve 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamında 6 ay saklandıktan sonra çekilen TEM görüntüleri Resim 4.5'de gösterilmiştir.



Resim 4.5. Nanopartikül formülasyonunun (PEG NP21) 4°C sıcaklıktaki 12 ay, 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamında 12 ay ve 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamında 6 ay saklandıktan sonra çekilen TEM görüntüleri

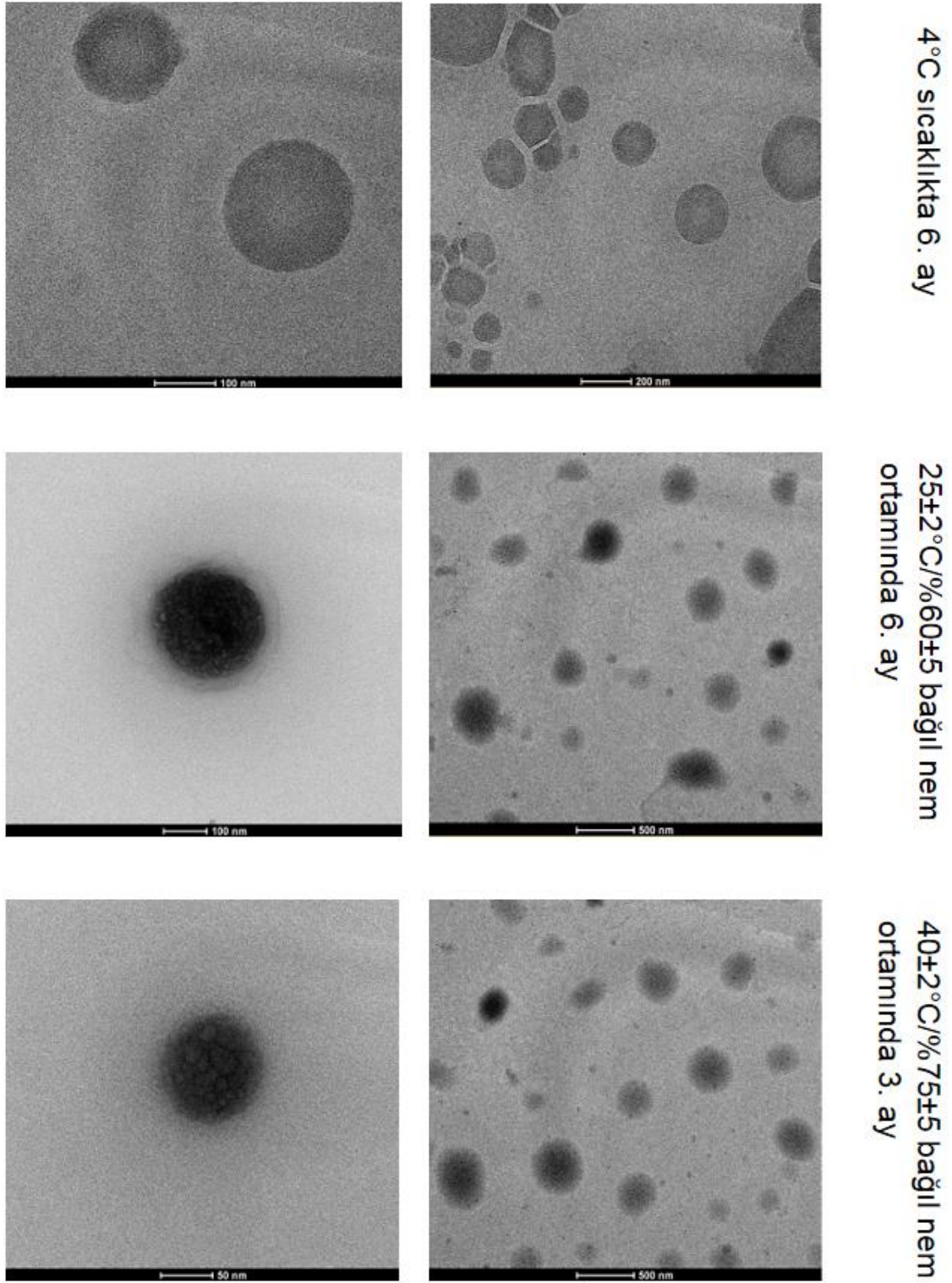
Lipozom formülasyonlarının stabilite deneylerine ait TEM görüntüleri

Gemsitabin hidroklorür yüklü pegile lipozom formülasyonunun stabilite deneyinin başlangıcındaki TEM görüntüleri Resim 4.6'da verilmiştir.



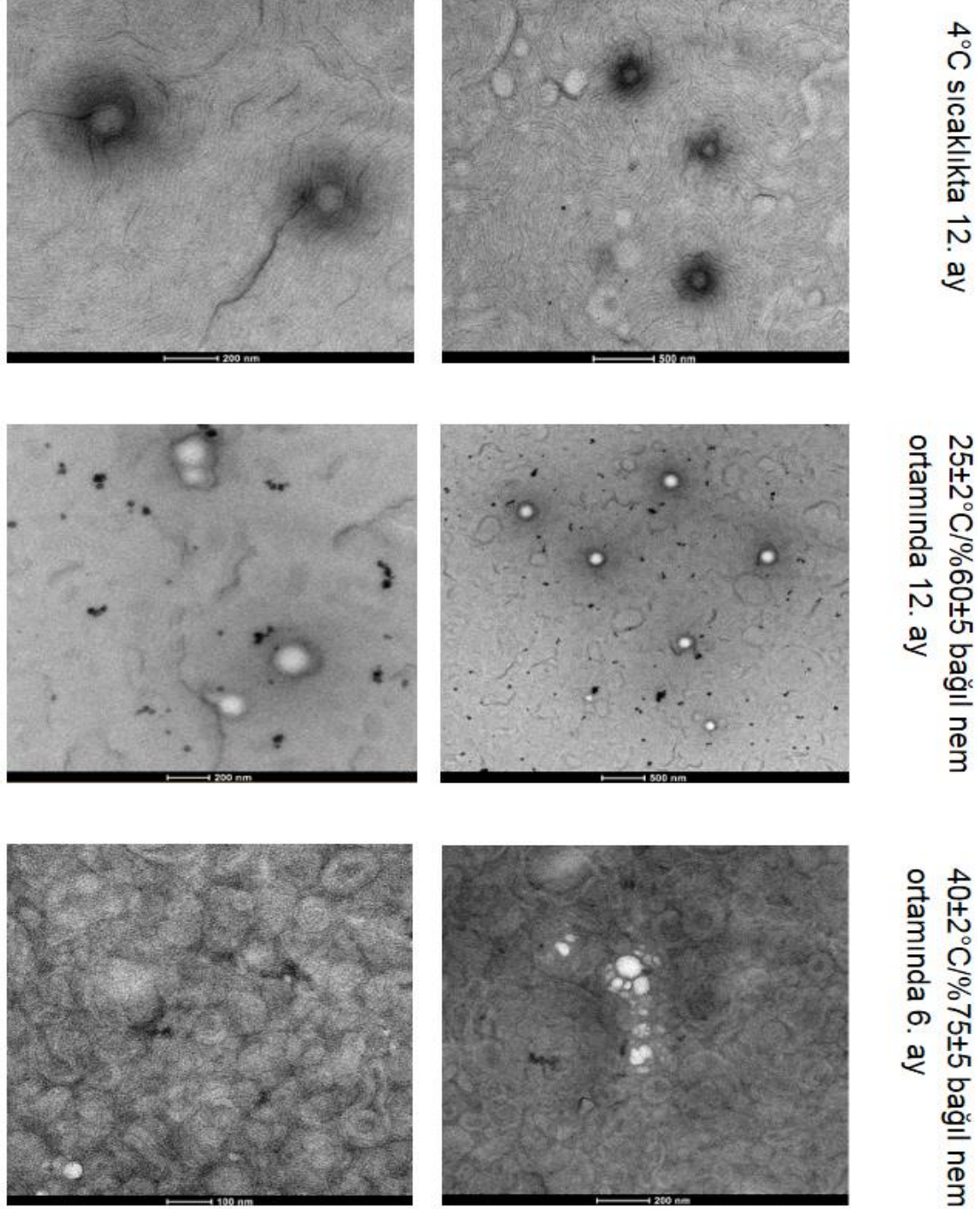
Resim 4.6. Pegile lipozom formülasyonunun (PEG LP2) stabilite deneyinin başlangıcındaki TEM görüntüleri

Gemsitabin hidroklorür yüklü pegile lipozom formülasyonunun 4°C sıcaklıktaki 6 ay, 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamında 6 ay ve 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamında 3 ay saklandıktan sonra çekilen TEM görüntüleri Resim 4.7'de gösterilmiştir.



Resim 4.7. Lipozom formülasyonunun (PEG LP2) 4°C sıcaklıktaki 6 ay, 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamında 6 ay ve 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamında 3 ay saklandıktan sonra çekilen TEM görüntüleri

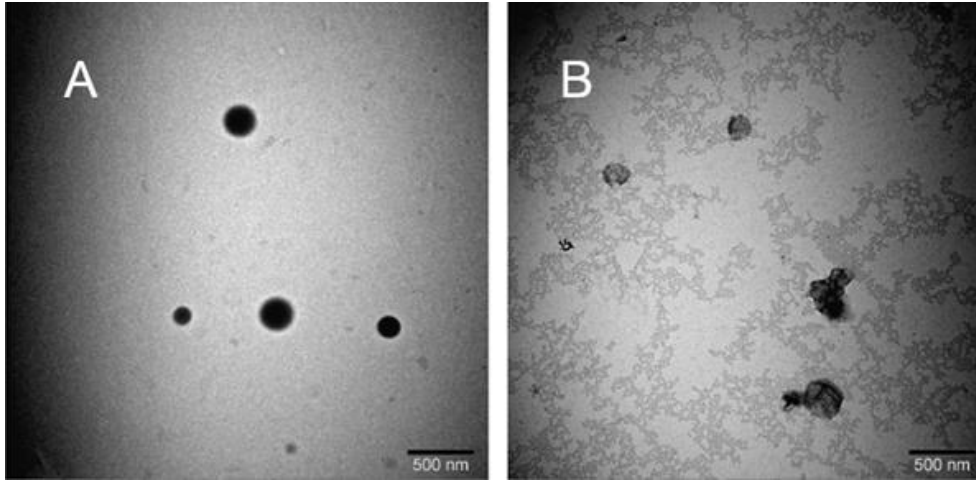
Gemsitabin hidroklorür yüklü pegile lipozom formülasyonlarının 4°C sıcaklıktaki 12 ay, $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ bağıl nem ortamında 12 ay ve $40\pm 2^{\circ}\text{C}/\%75\pm 5$ bağıl nem ortamında 6 ay saklandıktan sonra çekilen TEM görüntüleri Resim 4.8'de gösterilmiştir.



Resim 4.8. Lipozom formülasyonlarının (PEG LP2) 4°C sıcaklıktaki 12 ay, $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ bağıl nem ortamında 12 ay ve $40\pm 2^{\circ}\text{C}/\%75\pm 5$ bağıl nem ortamında 6 ay saklandıktan sonra çekilen TEM görüntüleri

Ön deneme LPHNP formülasyonlarının TEM görüntüleri

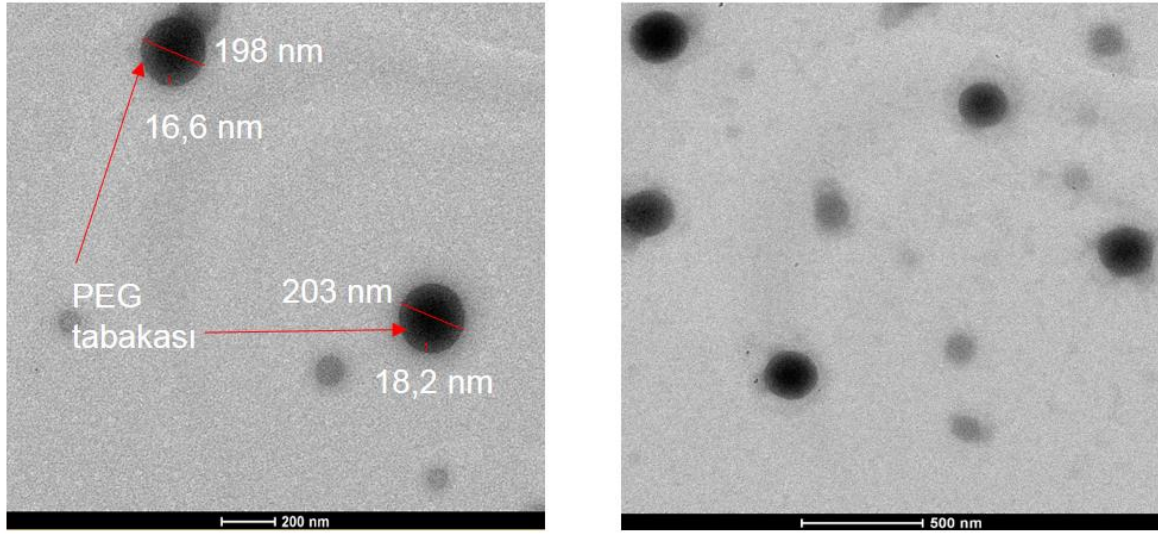
LPHNP'lere ait ön çalışmalarda soya fosfatidilkolinin yağlı faza ilave edildiği formülasyon (Ö-LPHNP2) ile soya fosfatidilkolinin dış sulu faza ilave edildiği formülasyonun (Ö-LPHNP4) TEM görüntüleri alınmıştır. Resim 4.9'da bu formülasyonlara ait TEM görüntüleri gösterilmiştir.



Resim 4.9. A=Soya fosfatidilkolinin yağlı faza ilavesiyle hazırlanan LPHNP formülasyonu (Ö-LPHNP 2) ve B=Soya fosfatidilkolinin dış sulu faza ilave edilmesiyle hazırlanan LPHNP formülasyonu (Ö-LPHNP 4) ait TEM görüntüleri

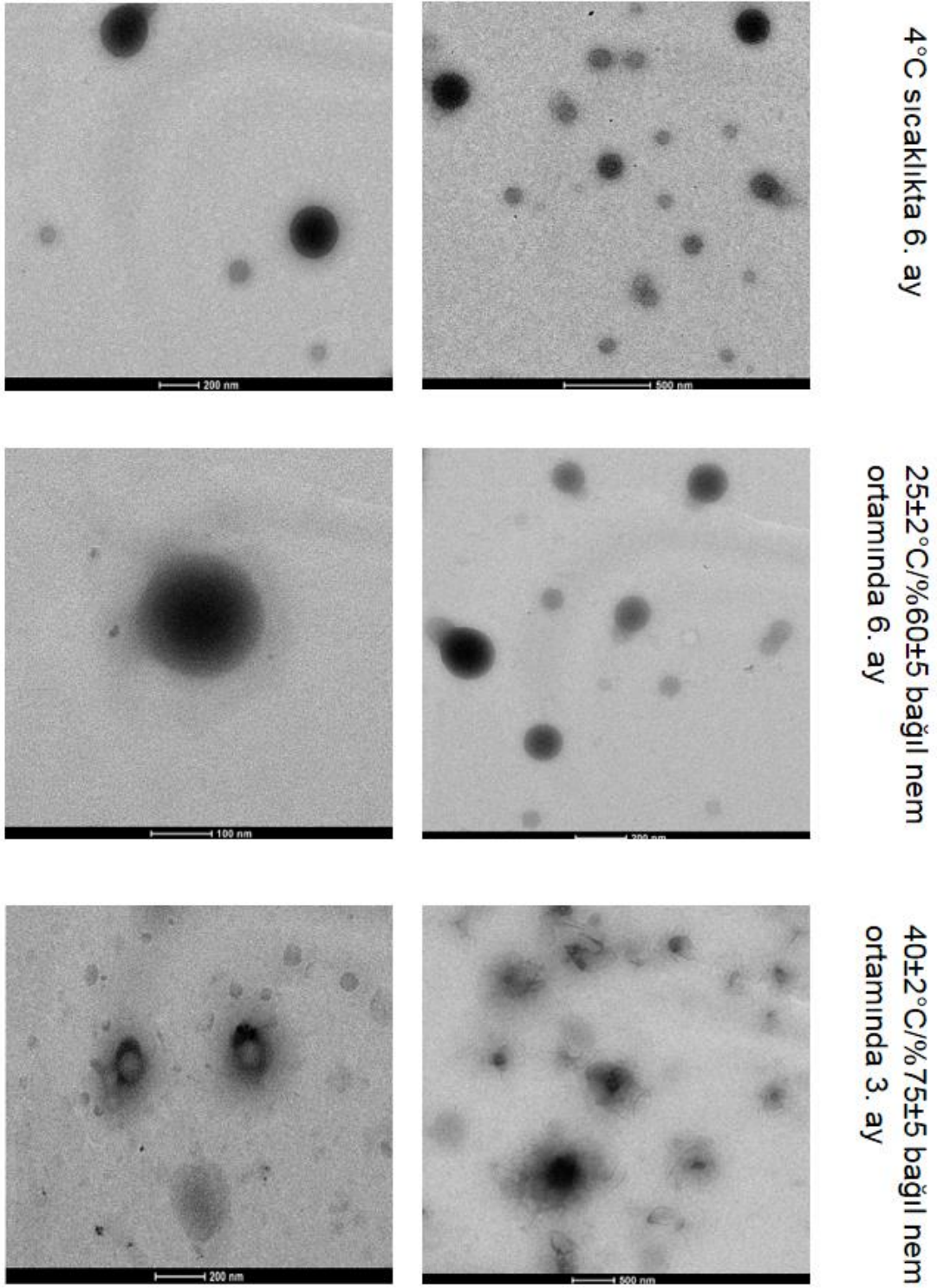
LPHNP formülasyonlarının stabilite deneylerine ait TEM görüntüleri

Gemcitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonunun (LPHNP17) stabilite deneyinin başlangıcındaki TEM görüntüleri Resim 4.10'da verilmiştir.



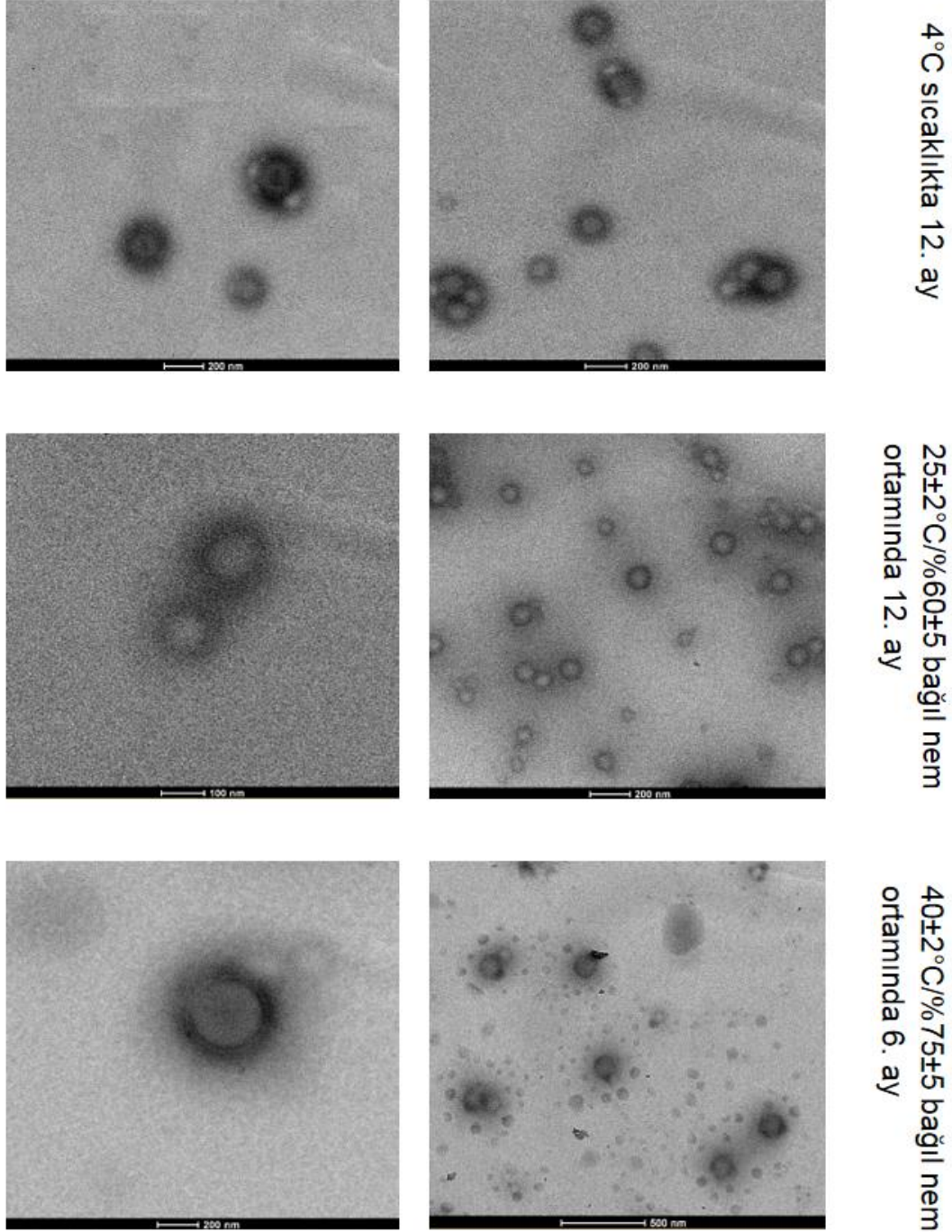
Resim 4.10. LPHNP formülasyonunun (LPHNP17) stabilite deneyinin başlangıcındaki TEM görüntüleri

Gemsitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonunun 4°C sıcaklıktaki 6 ay, 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamında 6 ay ve 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamında 3 ay saklandıktan sonra çekilen TEM görüntüleri Resim 4.11’de gösterilmiştir.



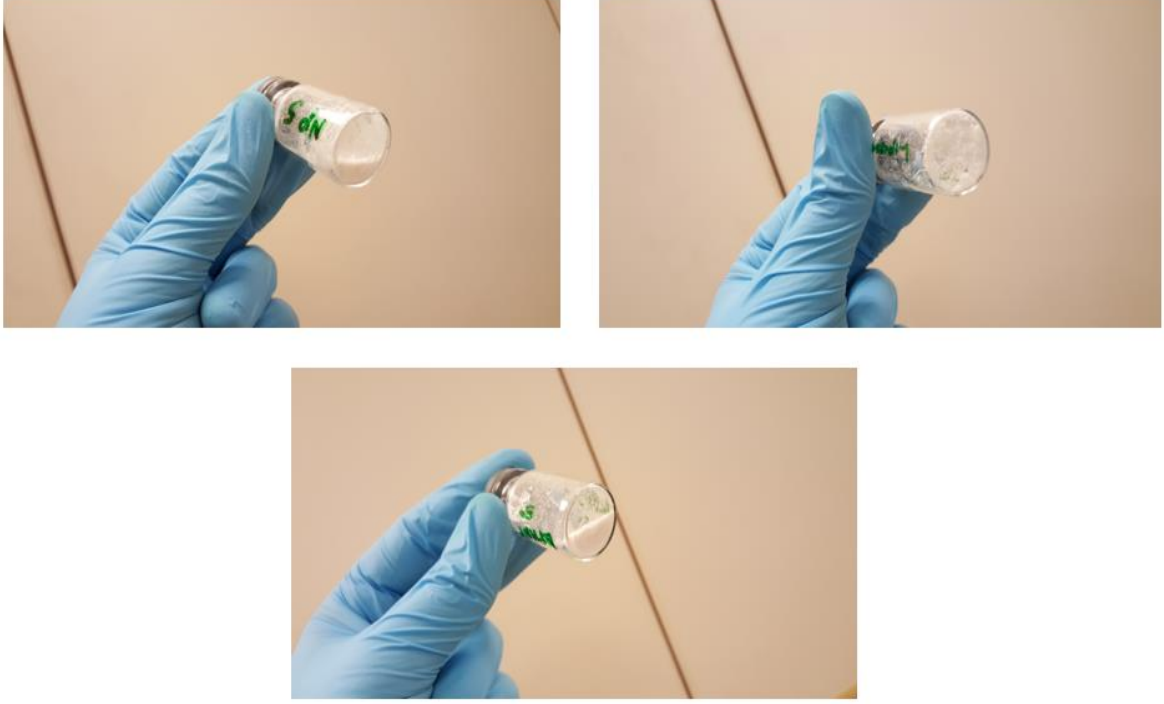
Resim 4.11. LPHNP formülasyonunun (LPHNP17) 4°C sıcaklıktaki 6 ay, 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamında 6 ay ve 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamında 3 ay saklandıktan sonra çekilen TEM görüntüleri

Gemsitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonunun 4°C sıcaklıktaki 12 ay, 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamında 12 ay ve 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamında 6 ay saklandıktan sonra çekilen TEM görüntüleri Resim 4.12'de gösterilmiştir.

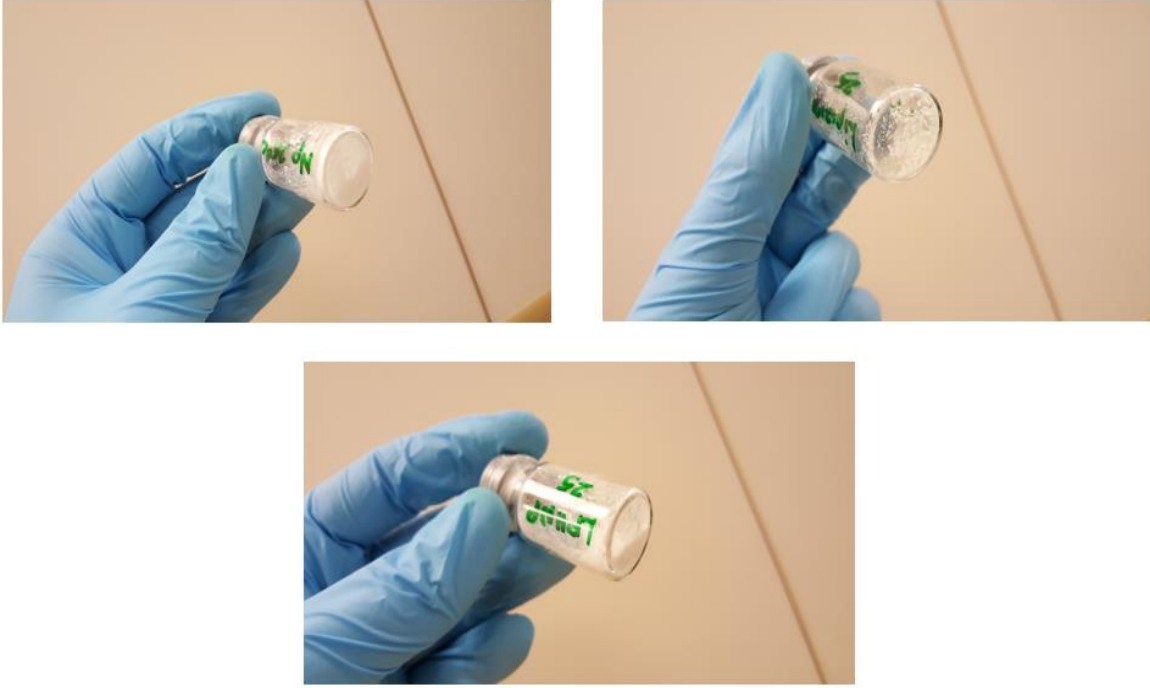


Resim 4.12. LPHNP formülasyonunun (LPHNP17) 4°C sıcaklıktaki 12 ay, 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamında 12 ay ve 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamında 6 ay saklandıktan sonra çekilen TEM görüntüleri

Stabilite kabininde bekletilen nanopartikül (PEG NP21), lipozom (PEG LP2) ve LPHNP17 formülasyonlarının 4°C sıcaklıkta 6 ay sonundaki fiziksel halleri Resim 4.13’de, 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamında 6 ay sonundaki fiziksel halleri Resim 4.14’de gösterilmiştir.



Resim 4.13. Formülasyonların 4°C sıcaklıktaki saklanmalarının 6 ay sonundaki halleri (Sol üst resim nanopartikül formülasyonu=PEG NP21, sağ üst resim lipozom formülasyonu=PEG LP2, alttaki resim LPHNP formülasyonu=LPHNP17)



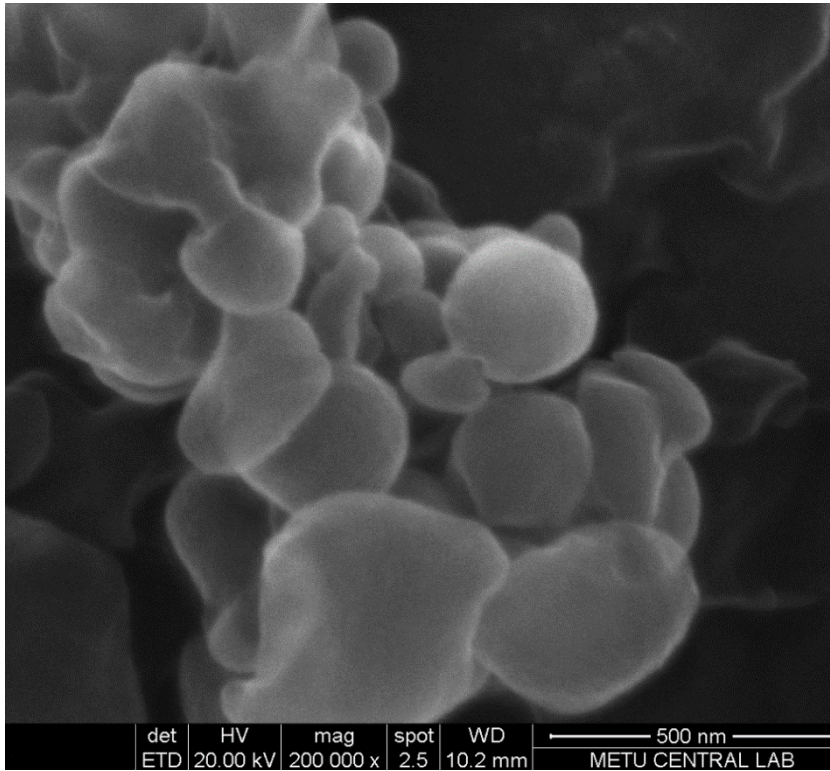
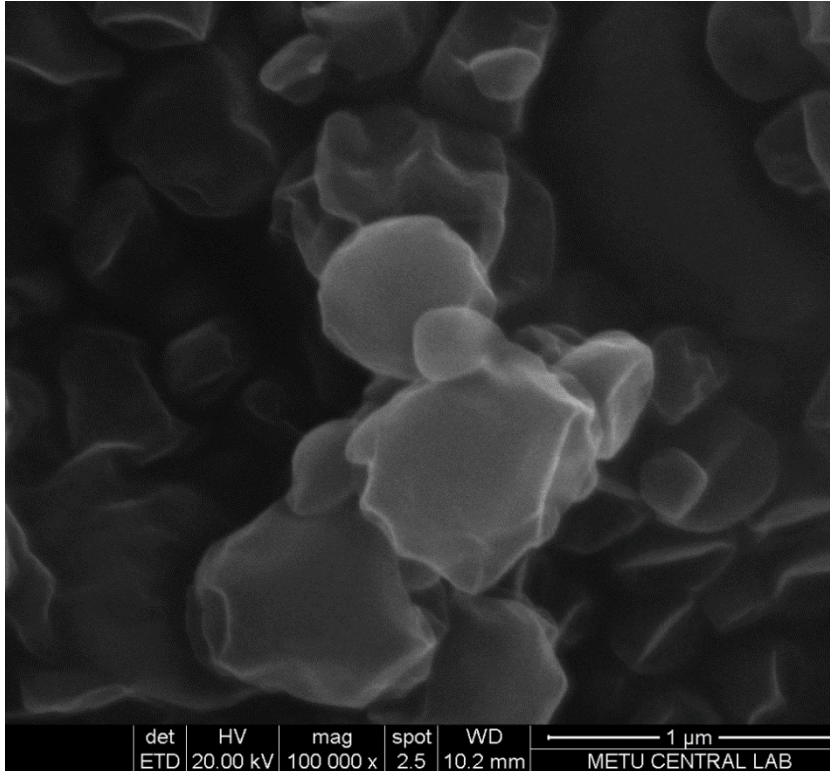
Resim 4.14. Formülasyonların $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ bağıl nem ortamında saklanmalarının 6 ay sonundaki halleri (Sol üst resim nanopartikül formülasyonu=PEG NP21, sağ üst resim lipozom formülasyonu=PEG LP2, alttaki resim LPHNP formülasyonu=LPHNP17)

Formülasyonların SEM görüntüleri

Nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarına liyoprotektan ilave edildiğinde nanotaşıyıcı sistemlerin SEM görüntüleri alınamamıştır. Bu durumun önüne geçmek için liyoprotektan içermeyen formülasyonlar hazırlanmış, kurutulmuş ve SEM görüntüleri çekilmiştir.

Nanopartikül formülasyonlarına ait SEM görüntüleri

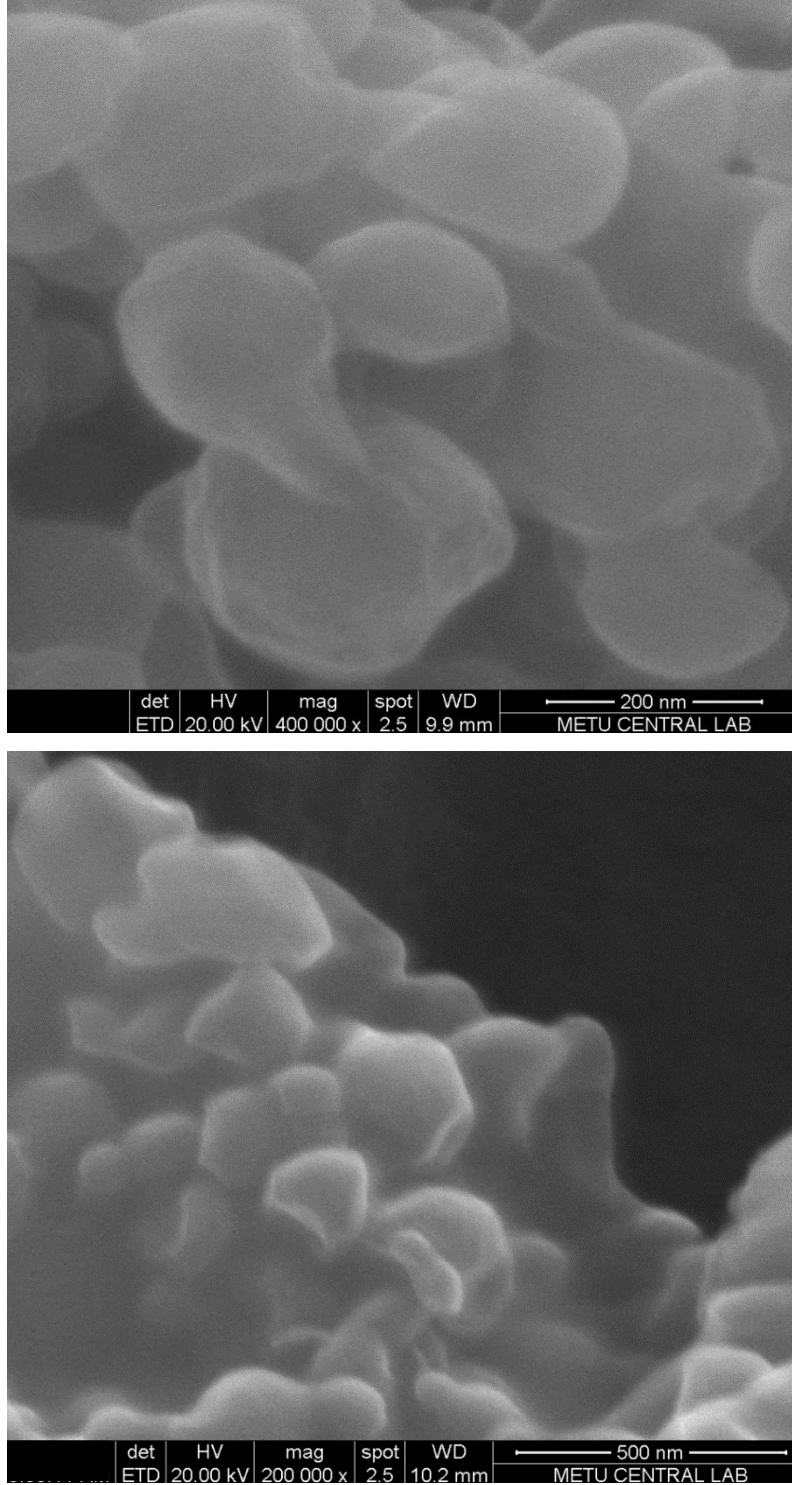
Nanopartikül formülasyonuna ait SEM görüntüleri Resim 4.15'de gösterilmiştir.



Resim 4.15. Nanopartikül formülasyonuna (PEG NP21) ait SEM görüntüleri (Üst taraftaki resim x100000) (Alt taraftaki resim x200000)

Lipozom formülasyonlarına ait SEM görüntüleri

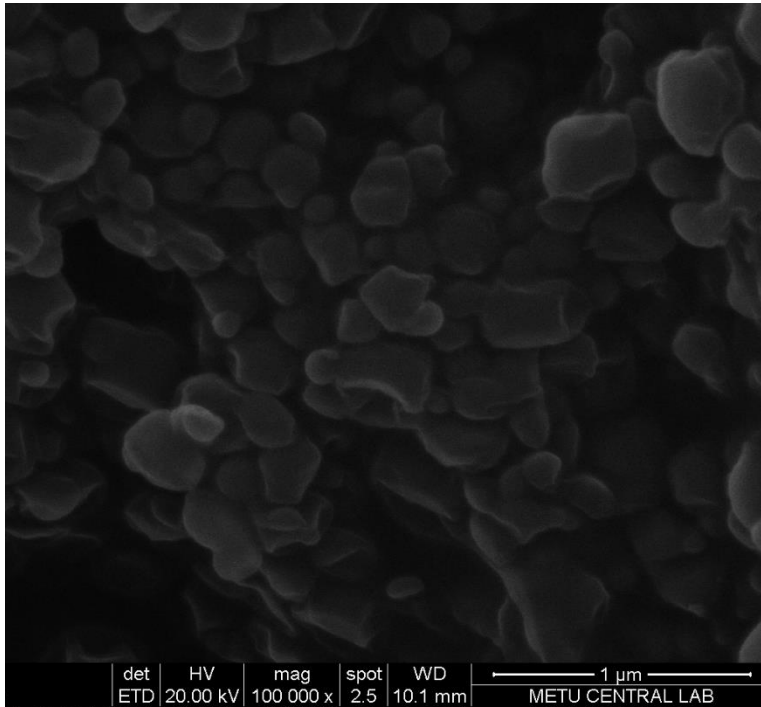
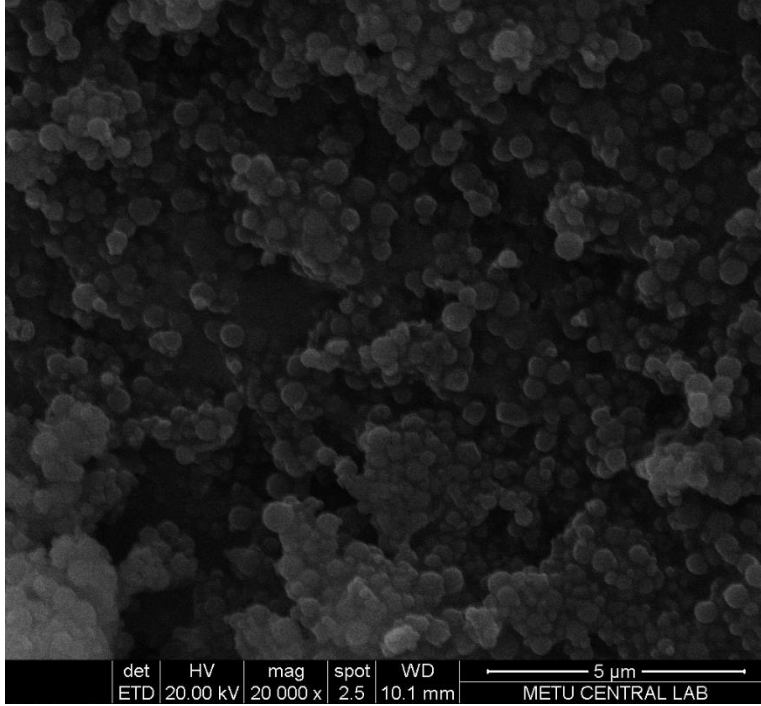
Lipozom formülasyonuna ait SEM görüntüleri Resim 4.16'da gösterilmiştir.



Resim 4.16. Lipozom formülasyonuna (PEG LP2) ait SEM görüntüleri
(Üst taraftaki resim x400000) (Alt taraftaki resim x200000)

LPHNP formülasyonlarına ait SEM görüntüleri

LPHNP formülasyonuna ait SEM görüntüleri Resim 4.17’de gösterilmiştir

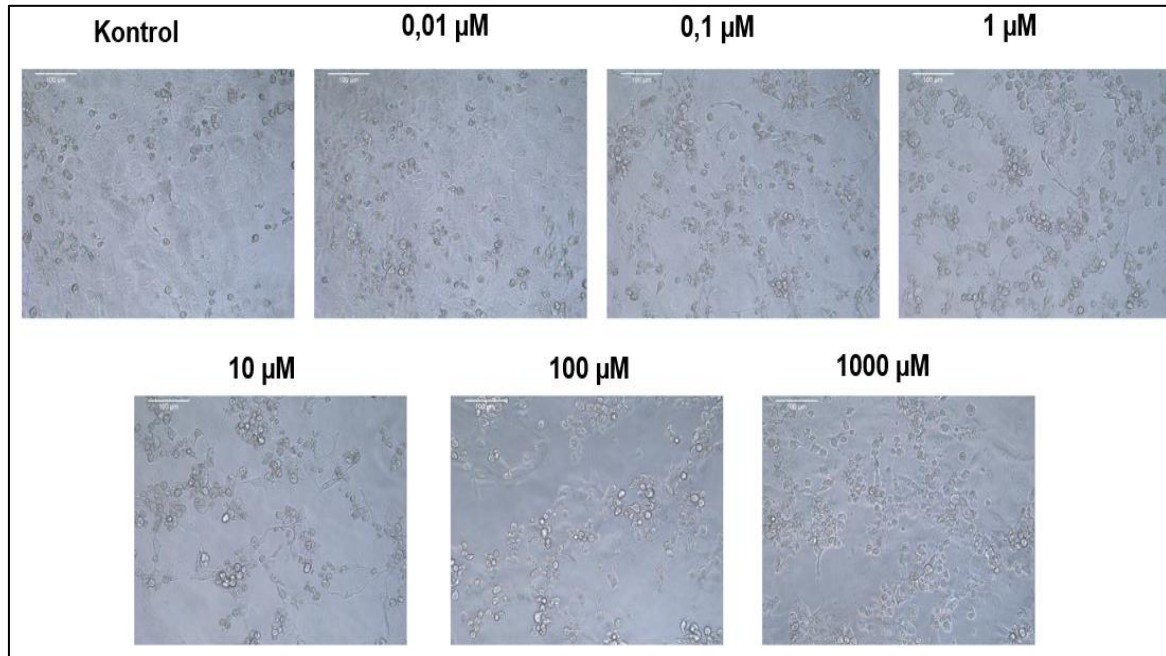


Resim 4.17. LPHNP formülasyonuna (LPHNP17) ait SEM görüntüleri
(Üst taraftaki resim x20000) (Alt taraftaki resim x100000)

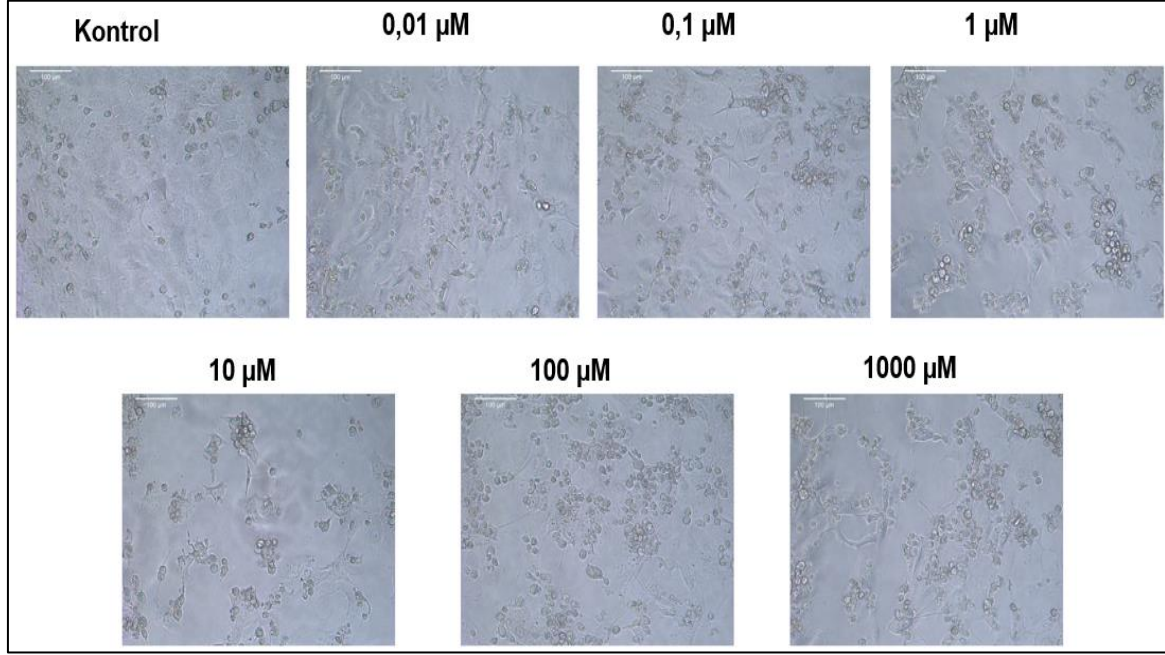
4.4. Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Sonuçlar

4.4.1. Sitotoksosite testi (MTT)

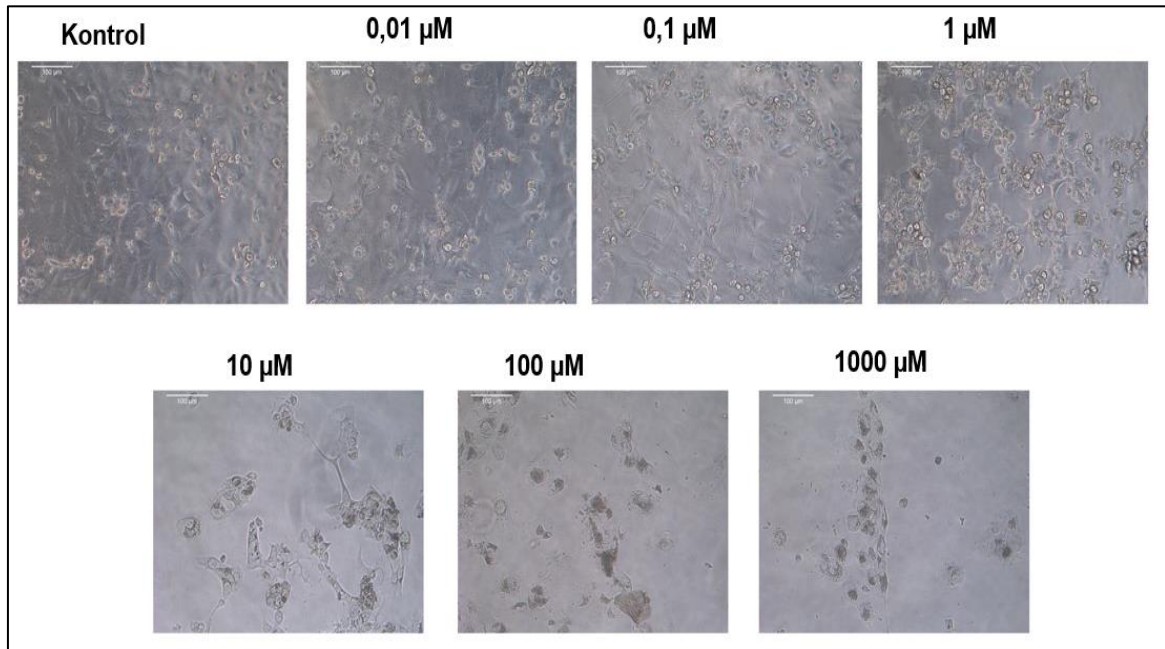
Gemsitabin hidroklorür çözeltisi, ticari ürün Gemko® çözeltisi, süspansiyon halindeki gemsitabin hidroklorür yüklü nanopartikül (PEG NP21), lipozom (PEG LP2) ve LPHNP17 formülasyonlarının MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanmaları sonucu Leica DMIL floresan mikroskop kullanılarak elde edilen görüntüler Resim 4.18- Resim 4.26 arasında gösterilmiştir.



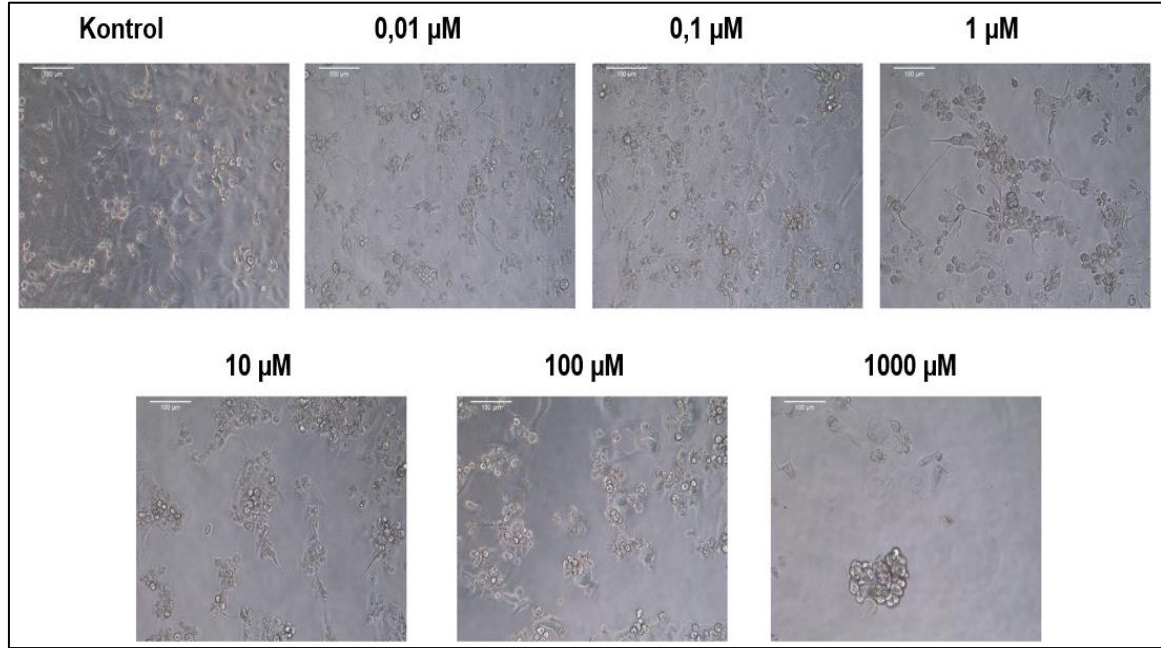
Resim 4.18. Farklı konsantrasyonlardaki gemsitabin hidroklorür çözeltisinin MCF-7 hücrelerine uygulanması sonucu elde edilen görüntüler



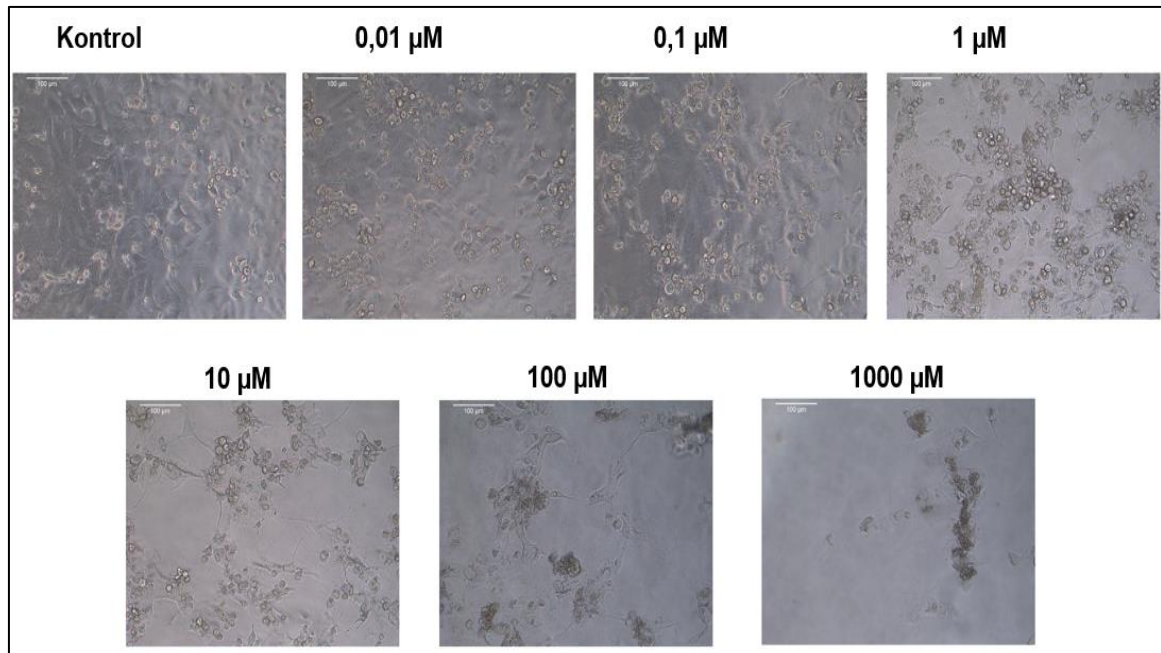
Resim 4.19. Farklı konsantrasyonlardaki Gemko® çözeltisinin MCF-7 hücrelerine uygulanması sonucu elde edilen görüntüler



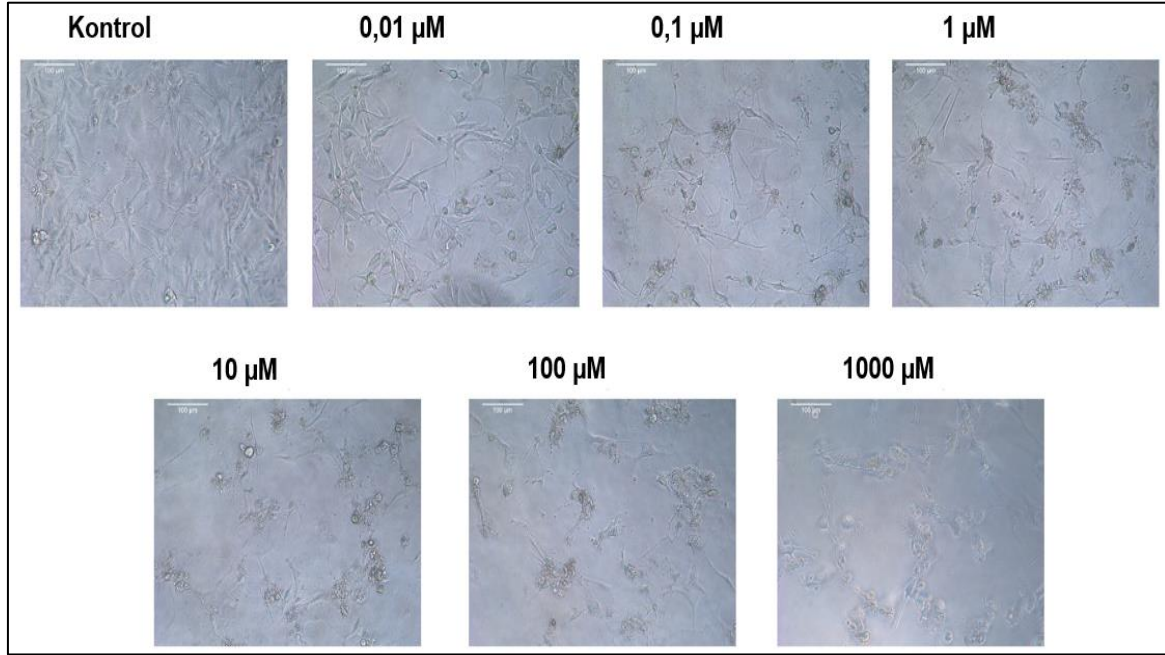
Resim 4.20. Gemsitabin hidroklorür içeren nanopartikül formülasyonunun farklı konsantrasyonlarda MCF-7 hücrelerine uygulanması sonucu elde edilen görüntüler



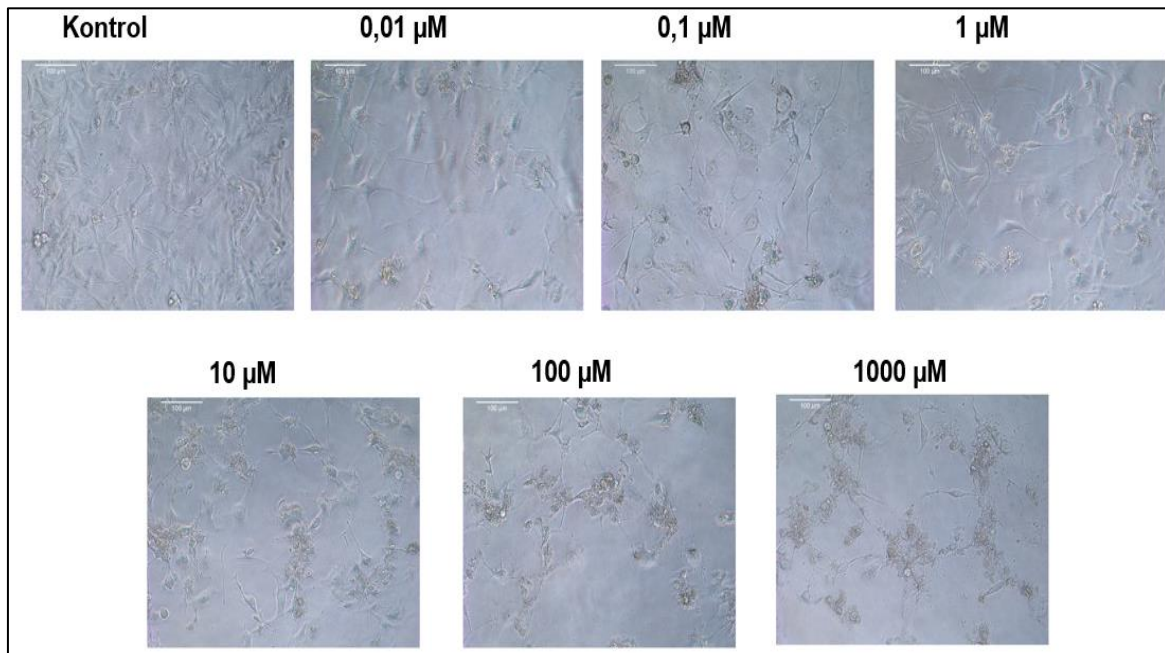
Resim 4.21. Gemcitabin hidroklorür içeren lipozom formülasyonunun farklı konsantrasyonlarda MCF-7 hücrelerine uygulanması sonucu elde edilen görüntüler



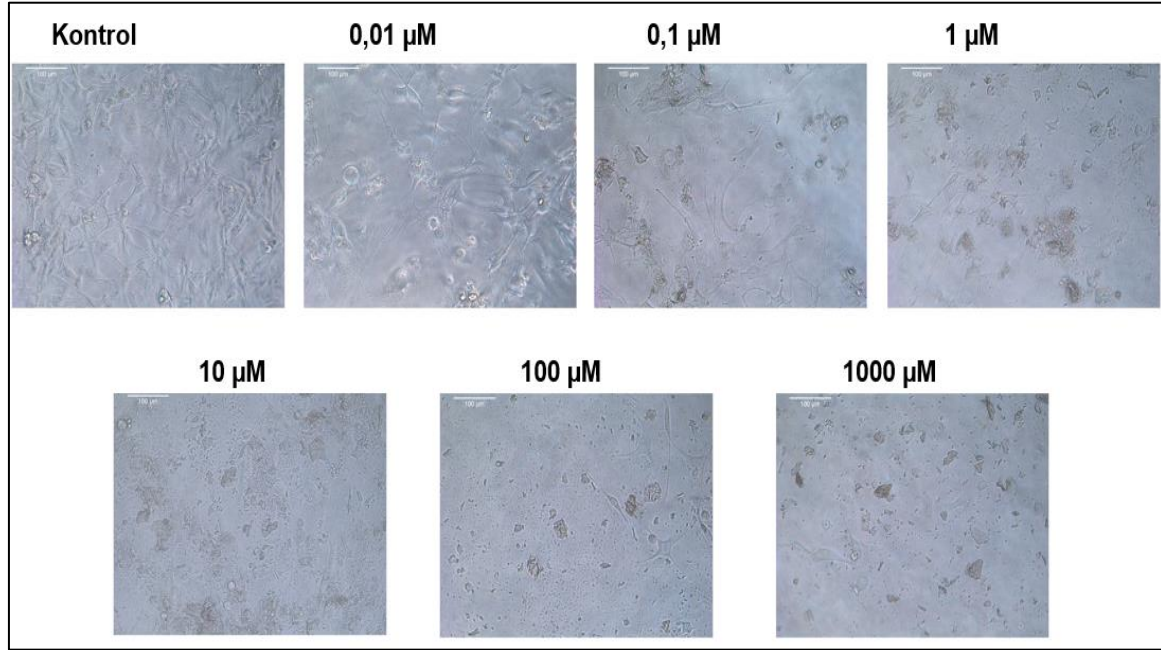
Resim 4.22. Gemcitabin hidroklorür içeren LPHNP formülasyonunun farklı konsantrasyonlarda MCF-7 hücrelerine uygulanması sonucu elde edilen görüntüler



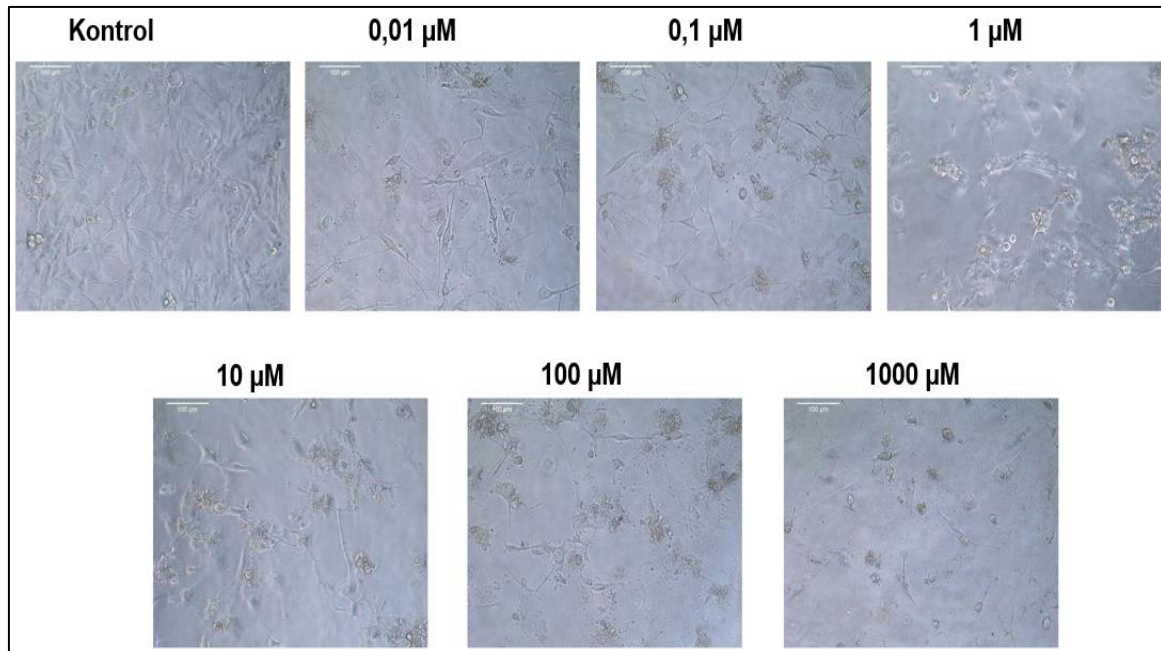
Resim 4.23. Farklı konsantrasyonlardaki gempitabin hidroklorür çözeltisinin MDA-MB-231 hücrelerine uygulanması sonucu elde edilen görüntüler



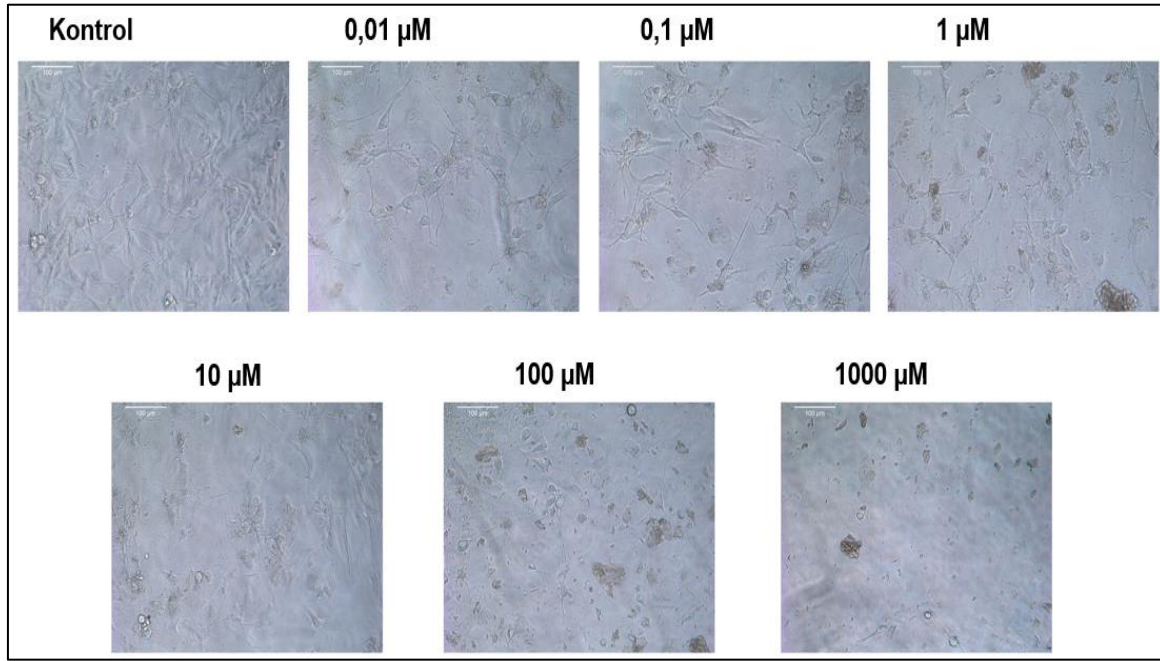
Resim 4.24. Farklı konsantrasyonlardaki Gemko® çözeltisinin MDA-MB-231 hücrelerine uygulanması sonucu elde edilen görüntüler



Resim 4.25. Gemsitabin hidroklorür içeren nanopartikül formülasyonunun farklı konsantrasyonlarda MDA-MB-231 hücrelerine uygulanması sonucu elde edilen görüntüler

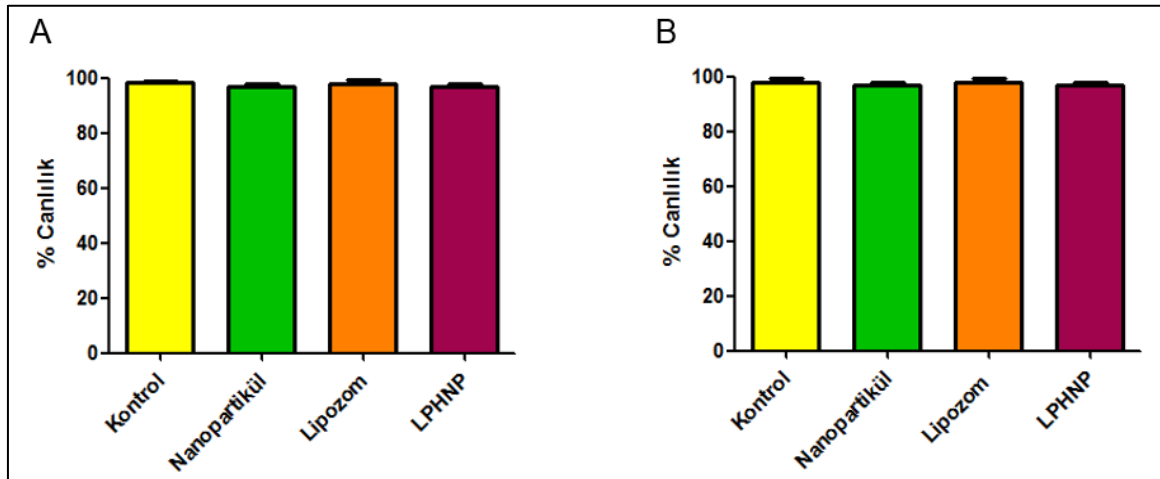


Resim 4.26. Gemsitabin hidroklorür içeren lipozom formülasyonunun farklı konsantrasyonlarda MDA-MB-231 hücrelerine uygulanması sonucu elde edilen görüntüler



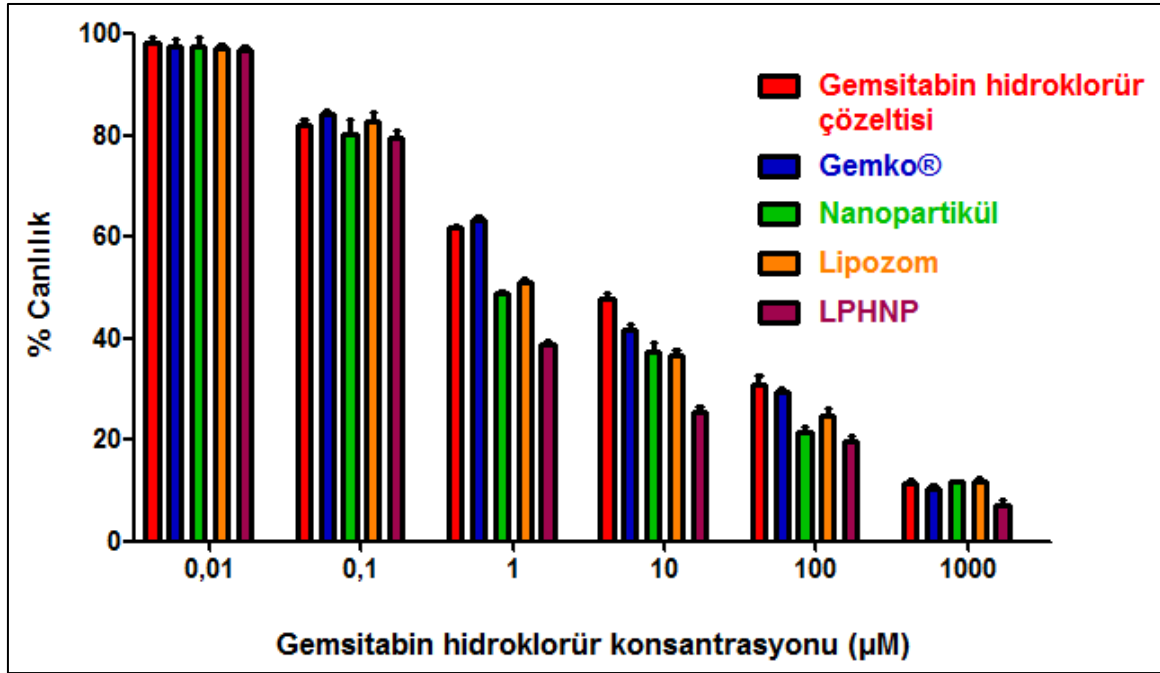
Resim 4.27. Gimsitabin hidroklorür içeren LPHNP formülasyonunun farklı konsantrasyonlarda MDA-MB-231 hücrelerine uygulanması sonucu elde edilen görüntüler

Etkin madde içermeyen lipozom, nanopartikül ve LPHNP formülasyonları ile kontrol grubuna ait MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri ile yapılan MTT testi sonucu elde edilen % canlılık grafikleri Şekil 4.48’de gösterilmiştir.



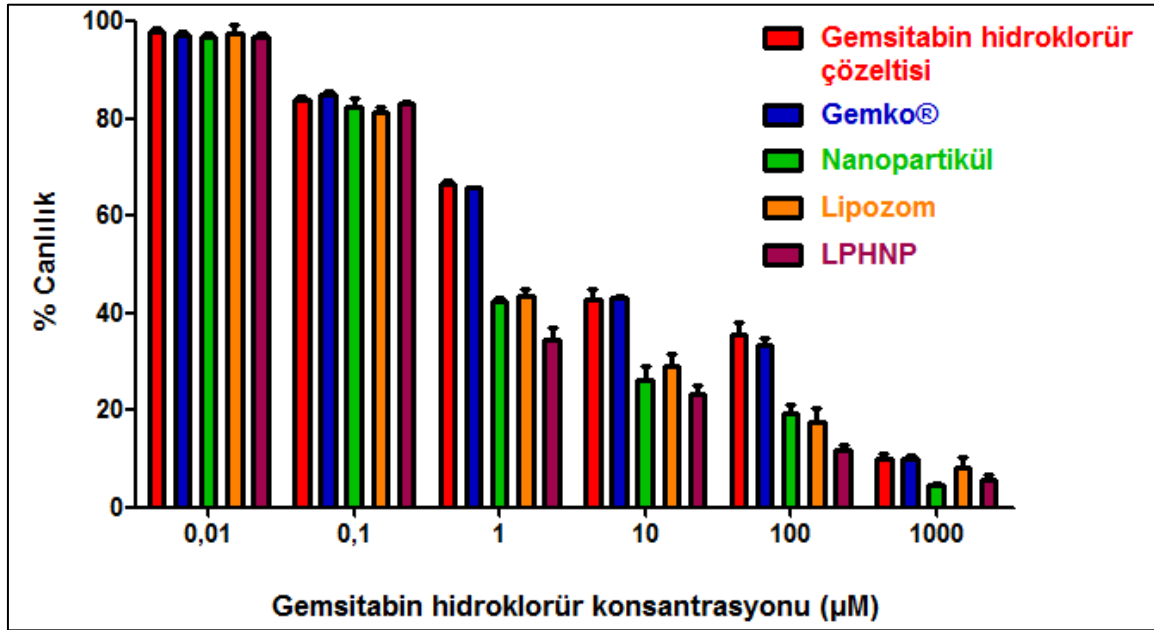
Şekil 4.48. Etkin madde içermeyen lipozom, nanopartikül ve LPHNP formülasyonları ile kontrol grubuna ait MTT testi sonucu elde edilen % canlılık grafikleri (A= MCF-7 hücreleri, B= MDA-MB-231 hücreleri)

Gemcitabin hidroklorür çözeltisi, ticari ürün Gemko® çözeltisi, süspande haldeki gemcitabin hidroklorür yüklü nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarının MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanmaları sonucu elde edilen % canlılık bar grafikleri Şekil 4.49 ve Şekil 4.50’de gösterilmiştir.



Şekil 4.49. Gemcitabin hidroklorür çözeltisi, ticari ürün Gemko® çözeltisi, süspande haldeki gemcitabin hidroklorür yüklü nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanmaları sonucu elde edilen % canlılık bar grafikleri

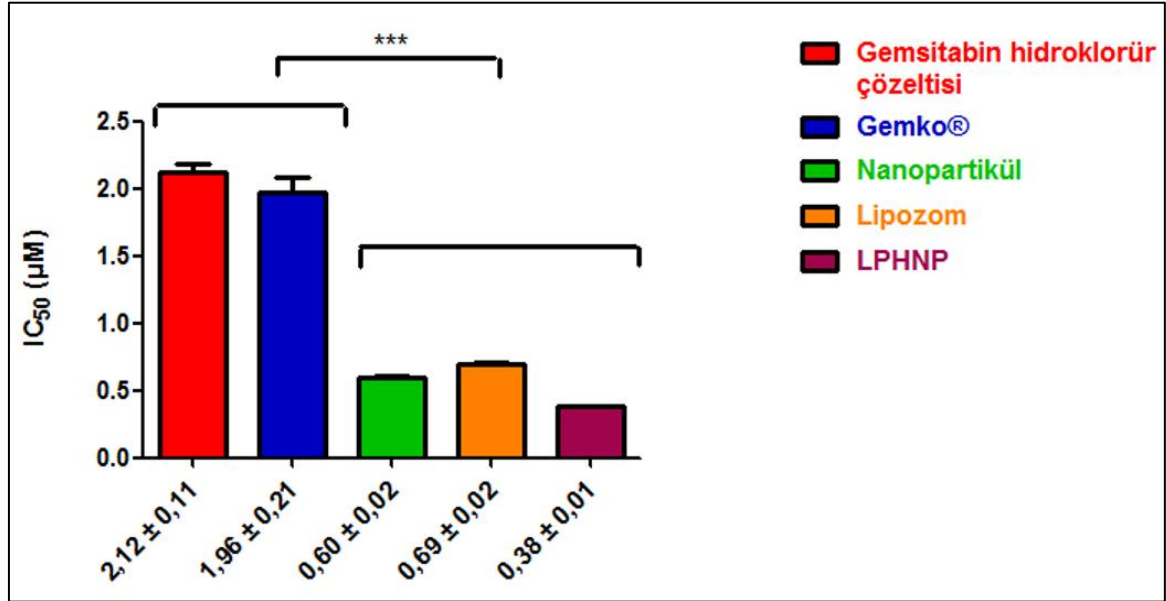
MCF-7 hücrelerine ticari ürün Gemko® ve gemcitabin hidroklorür çözeltisi 1 µM konsantrasyonda uygulandığında hücrelerin canlılık oranı sırasıyla %69,4 ve %61,8’dir. Gemcitabin hidroklorür içeren nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonları ise 1 µM konsantrasyonlarda etkin madde içerecek şekilde MCF-7 hücrelerine uygulandığında canlılık oranı sırasıyla %48,7; %51,0 ve %38,7’dir. Tüm formülasyonlarda artan konsantrasyona bağlı olarak % canlılık oranı düşmektedir. 1000 µM konsantrasyonda formülasyonlar uygulandığında % canlılık oranı yaklaşık %10 civarındadır.



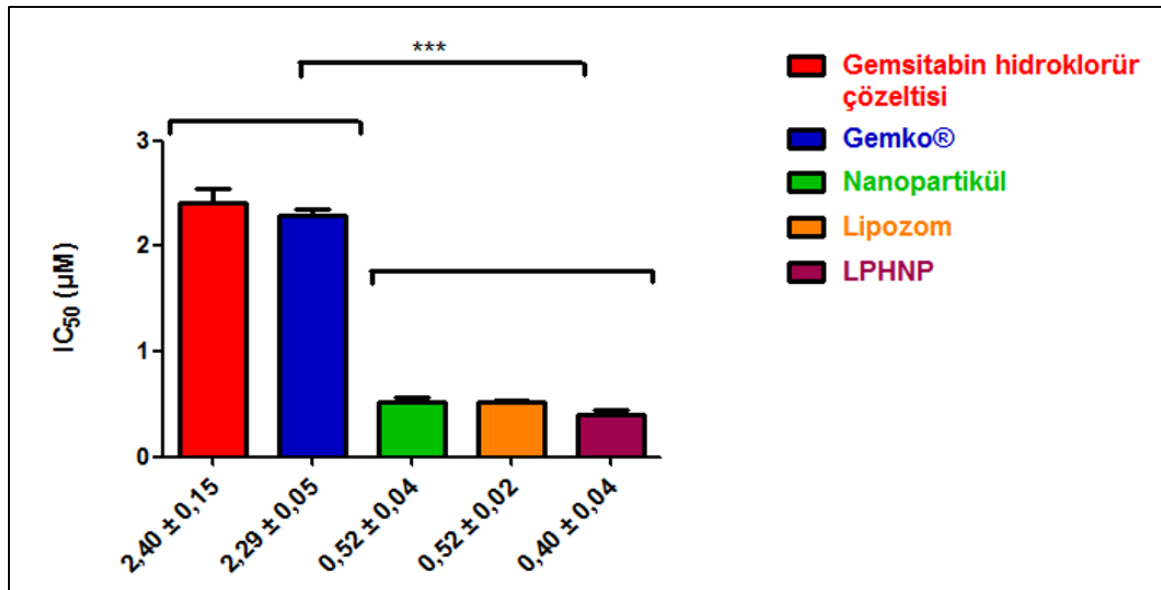
Şekil 4.50. Gemsitabin hidroklorür çözeltisi, ticari ürün Gemko® çözeltisi, süspende haldeki gemsitabin hidroklorür yüklü nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarının MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulamaları sonucu elde edilen % canlılık bar grafikleri

MDA-MB-231 hücrelerine ticari ürün Gemko® ve gemsitabin hidroklorür çözeltisi 1 µM konsantrasyonda uygulandığında hücrelerin canlılık oranı sırasıyla %65,7 ve %66,7 olarak bulunmuştur. Gemsitabin hidroklorür içeren nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonları ise 1 µM konsantrasyonlarda etkin madde içerecek şekilde MDA-MB-231 hücrelerine uygulandığında canlılık oranı sırasıyla %42,3; %43,6 ve %34,3'dür. Tüm formülasyonlarda artan konsantrasyona bağlı olarak % canlılık oranı düşmektedir. 1000 µM konsantrasyonda formülasyonlar uygulandığında % canlılık oranı %10 ve altındaki değerlerdedir.

Şekil 4.51'de MCF-7 hücrelerinden, Şekil 4.52'de MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen IC₅₀ değerleri ve grupların istatistiksel açıdan kıyaslanmaları gösterilmiştir.



Şekil 4.51. MCF-7 hücrelerinden elde edilen IC₅₀ değerleri (**p<0,0001)



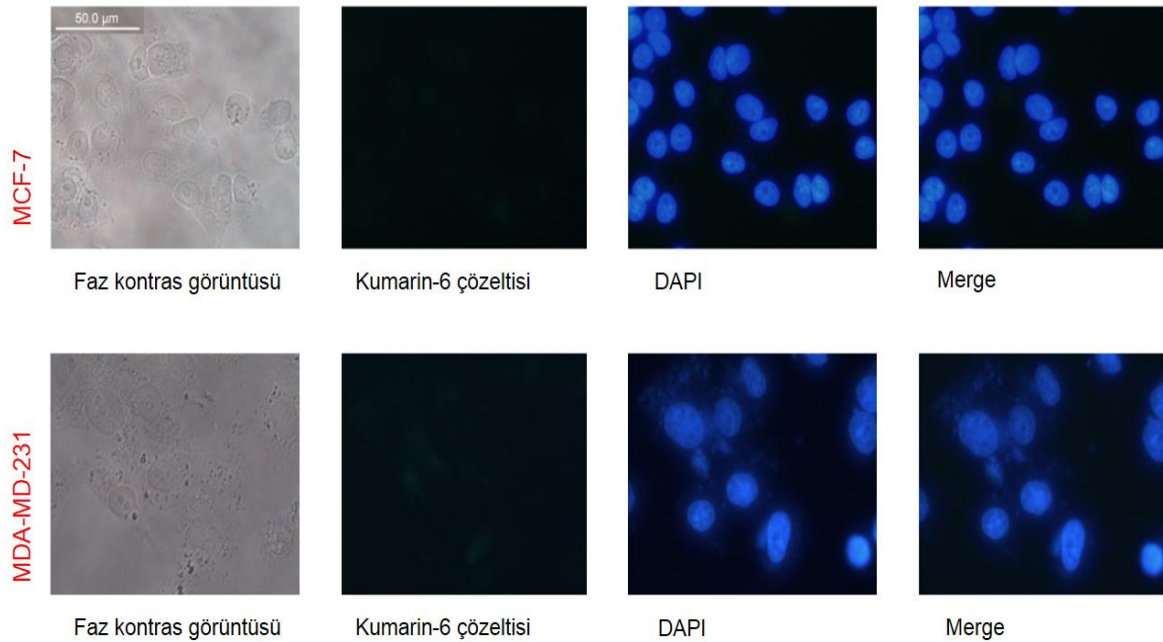
Şekil 4.52. MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen IC₅₀ değerleri (**p<0,0001)

4.4.2. Formülasyonların hücre içine geçiş deneyleri

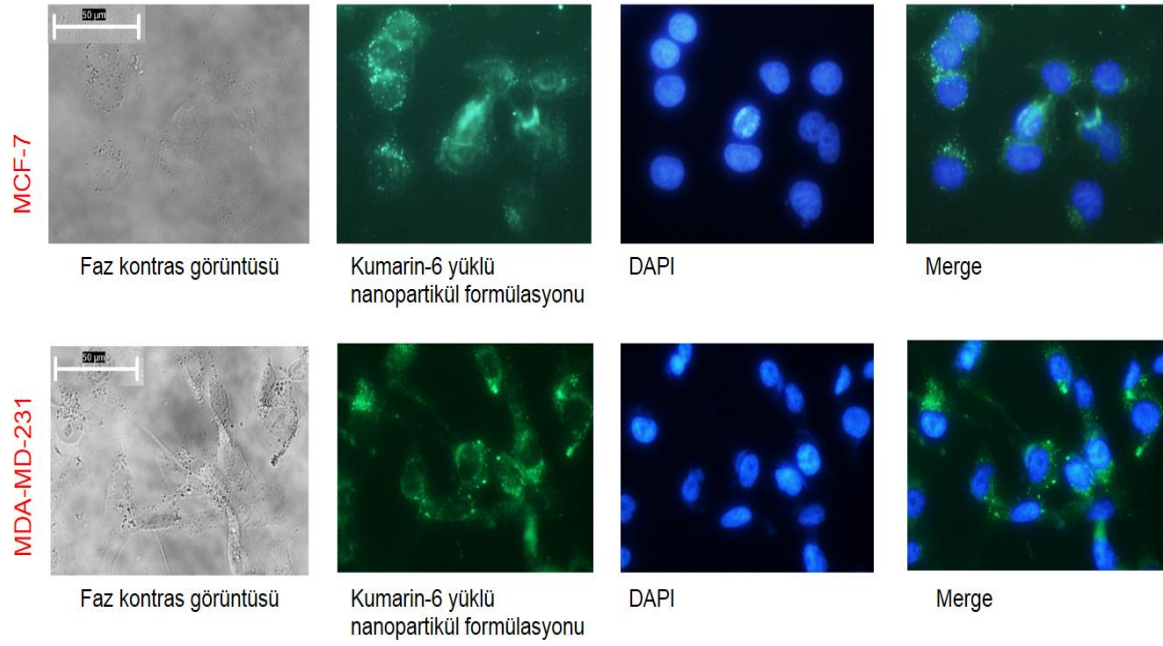
Deneyler Bölüm 3.5.2’de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

Floresan görüntüleme

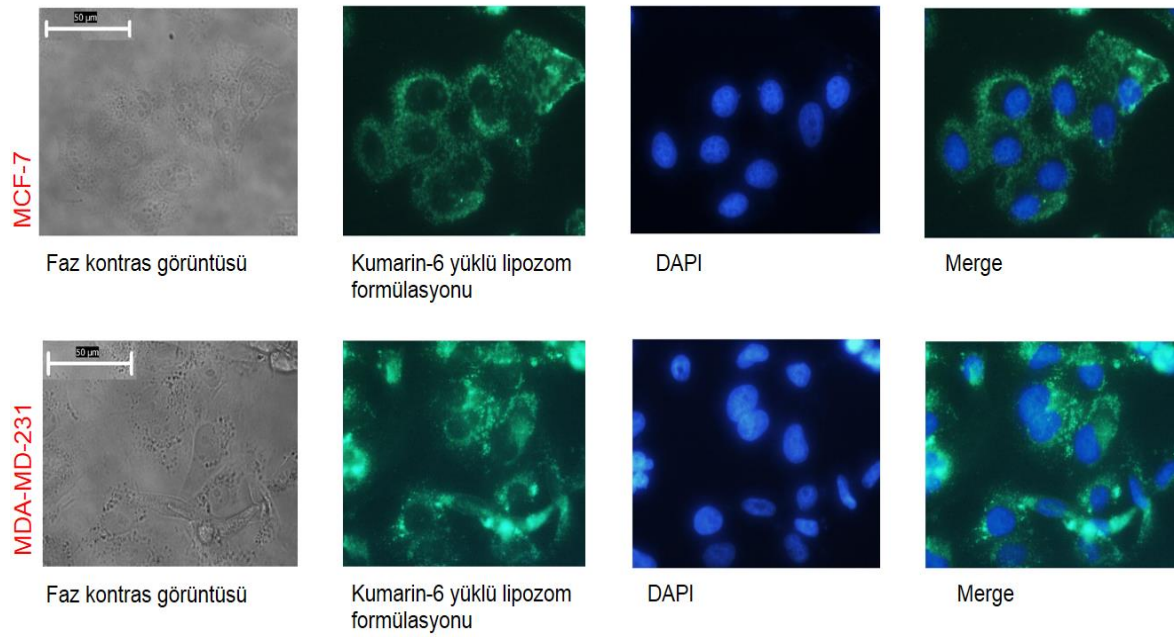
MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine kumarin-6 çözeltisi, etkin madde içermeyen kumarin-6 yüklü nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonları uygulanmış ve deney sonucu elde edilen görüntüler Resim 4.28 - Resim 4.31 arasında gösterilmiştir.



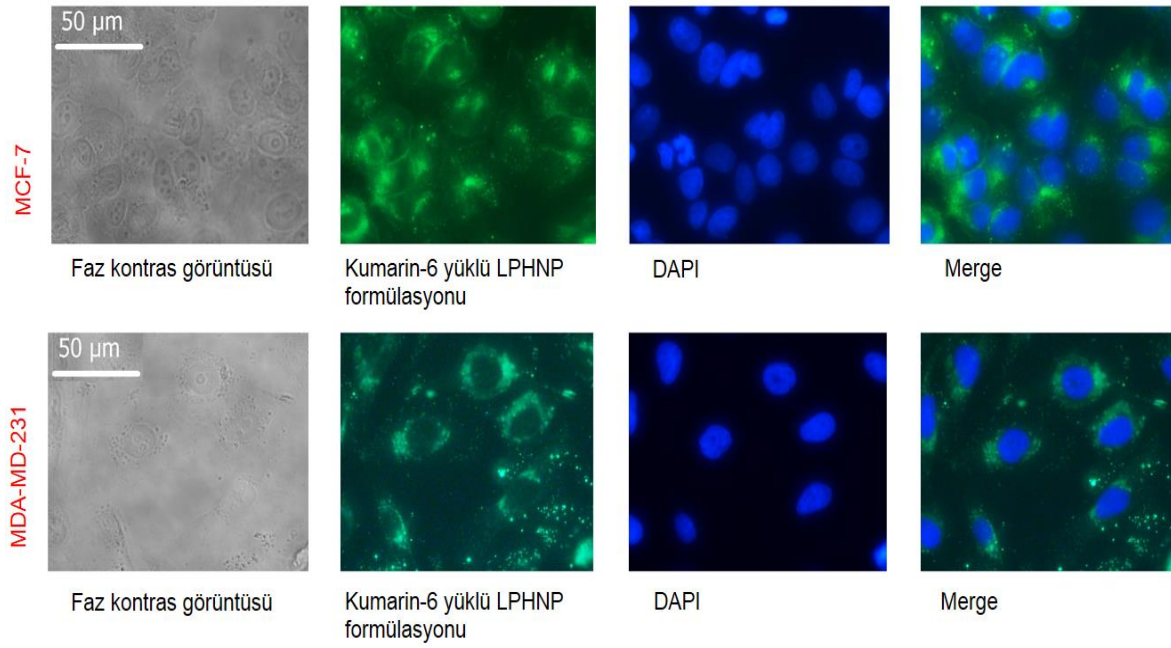
Resim 4.28. Kumarin-6 çözeltisinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerindeki floresan mikroskopundaki görüntüsü



Resim 4.29. Kumarin-6 yüklü nanopartikül formülasyonunun MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerindeki floresan mikroskopundaki görüntüsü



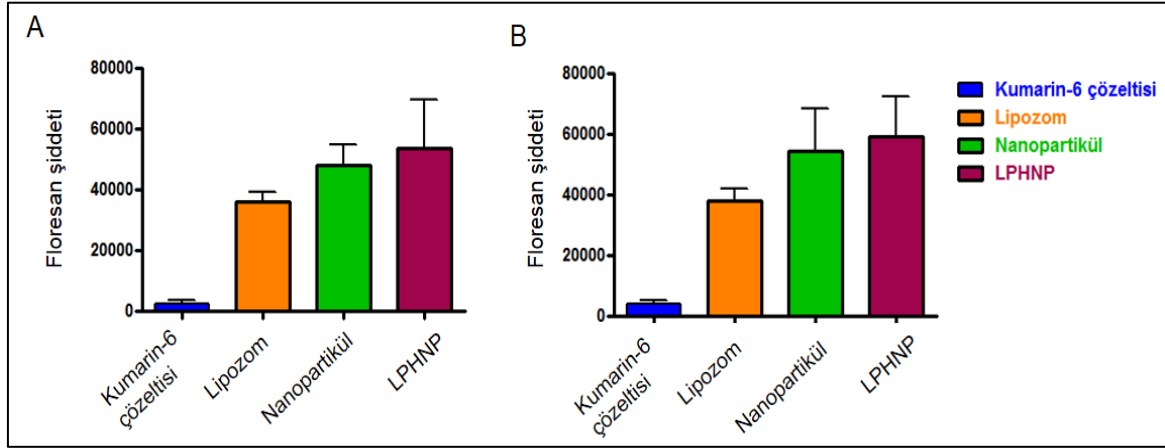
Resim 4.30. Kumarin-6 yüklü lipozom formülasyonunun MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerindeki floresan mikroskopundaki görüntüsü



Resim 4.31. Kumarin-6 yüklü LPHNP formülasyonunun MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerindeki floresan mikroskopundaki görüntüsü

Floresan şiddetinin ölçümü

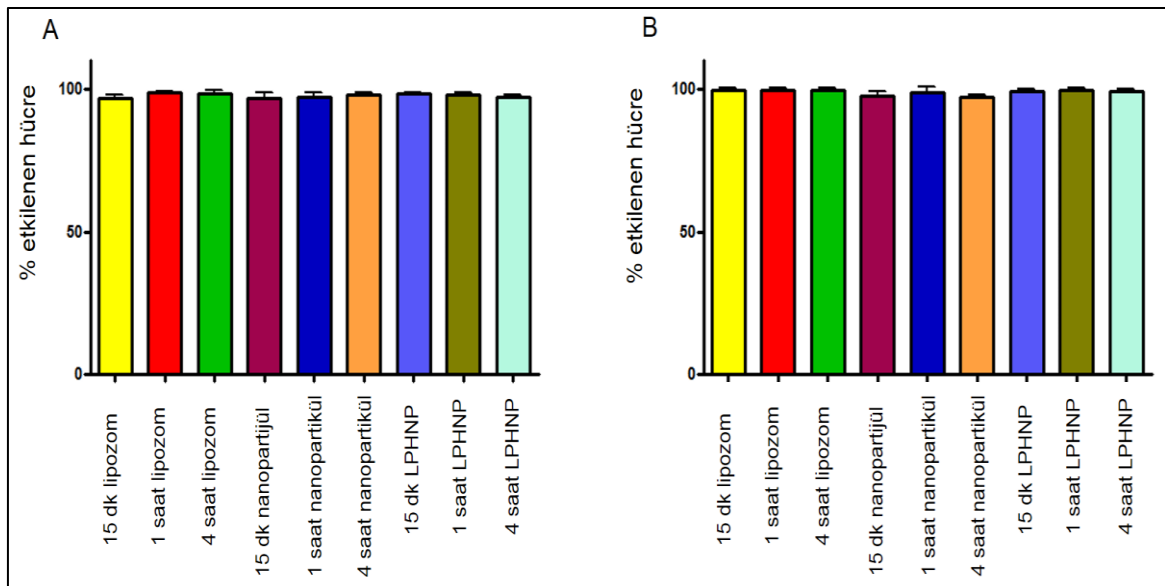
Kumarin-6 çözeltisi, etkin madde içermeyen kumarin-6 yüklü, lipozom, nanopartikül ve LPHNP formülasyonlarının 4 saat sonunda MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde gösterdikleri floresan şiddetleri Şekil 4.53'de gösterilmiştir.



Şekil 4.53. Kumarin-6 yüklü nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarının gösterdikleri floresan şiddetleri (A=MCF-7 hücreleri, B=MDA-MB-231 hücreleri)

Formülasyonlardan etkilenen % hücre oranının belirlenmesi

15 dakika, 1 saat ve 4 saat sonunda etkin madde içermeyen kumarin-6 yüklü lipozom, nanopartikül ve LPHNP formülasyonlarının hücreleri hangi oranda etkilediği incelenmiştir. Formülasyonlara ait farklı zamanlara karşı % etkilenen hücre oranı Şekil 4.54’de gösterilmiştir.



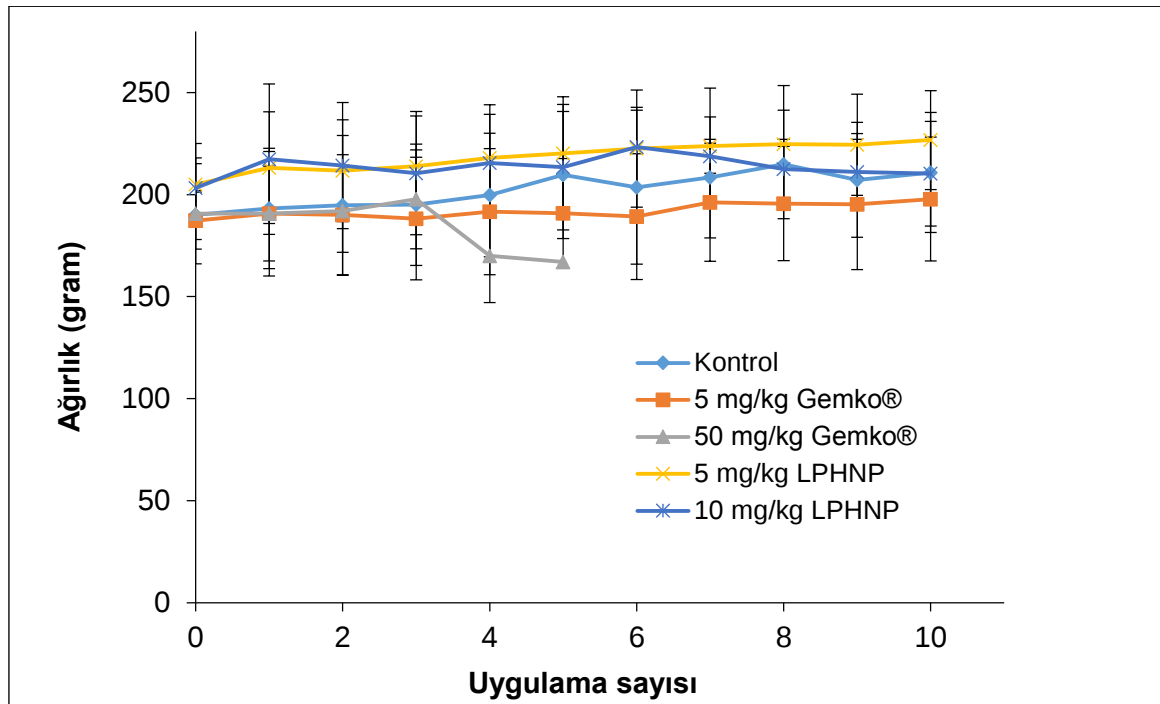
Şekil 4.54. Zamana karşı etkilenen % hücre oranı (A=MCF-7 hücreleri, B=MDA-MB-231 hücreleri)

4.5. Ticari Ürün Gemko® ve Gemsitabin Hidroklorür Yüklü LPHNP Formülasyonları ile Yapılan İn Vivo Çalışmalar

Hayvan deneyleri Bölüm 3.6'da anlatıldığı gibi yapılmıştır. Deney hayvanlarının tedavi süresi içindeki ağırlık değişimleri ve tümör hacmi değişimleri incelenmiş, istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

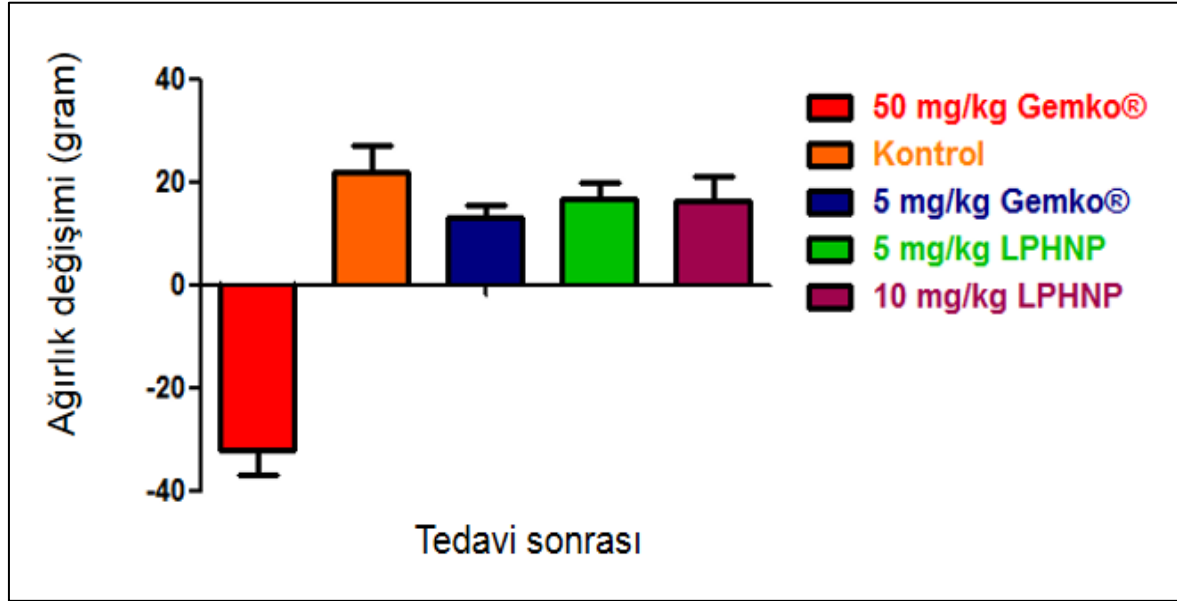
4.5.1. Hayvanların ağırlıklarının değişimi

Kontrol grubu ve ilaç verilen hayvanların tedavi süresince ağırlıklarındaki değişimler Şekil 4.55'de gösterilmiştir.



Şekil 4.55. Hayvanların tedavi süresince ağırlıklarındaki değişimler (n=6)

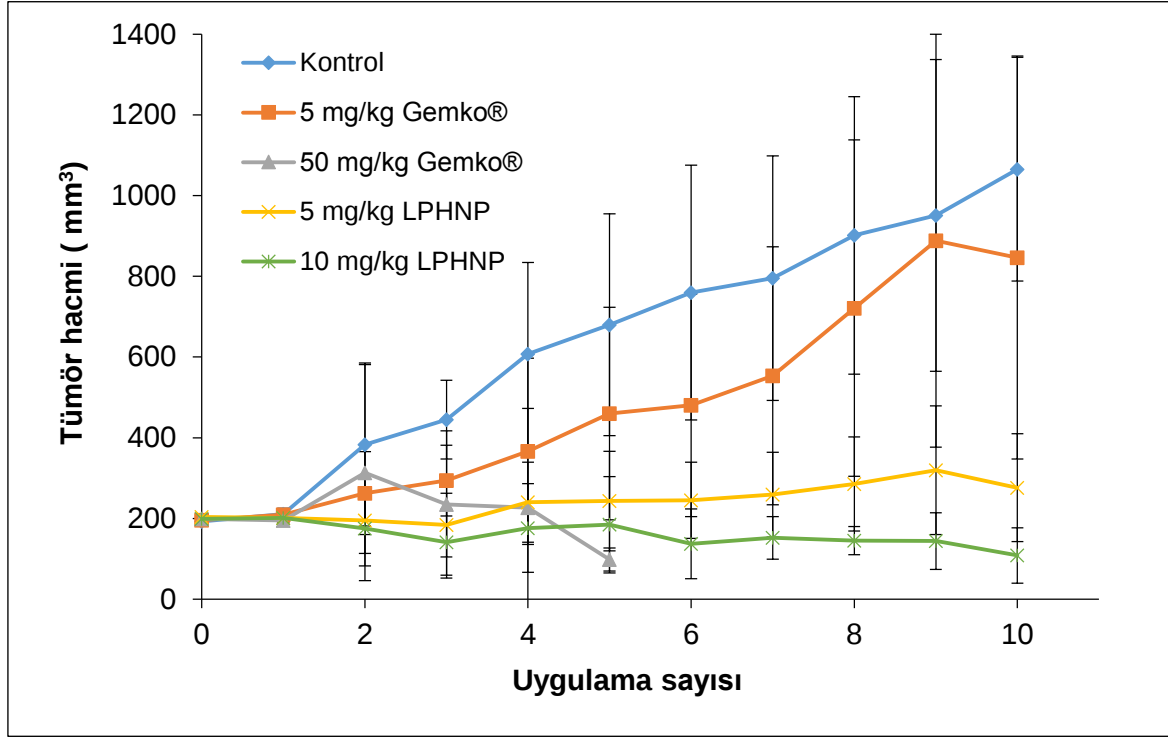
Hayvan gruplarının tedavi öncesi ve sonrası ağırlık değişimlerinin bar grafikleri Şekil 4.56'da gösterilmiştir.



Şekil 4.56. Hayvan gruplarının tedavi öncesi ve sonrası ağırlık değişimlerinin bar grafikleri

4.5.2. Tümör hacimlerinin değişimi

Hayvanların tedavi süresince tümör hacimlerinin değişimi Şekil 4.57’de gösterilmiştir. Kontrol grubundaki bir hayvanın 30 gün sonundaki görüntüsü Resim 4.32’de yer almaktadır.

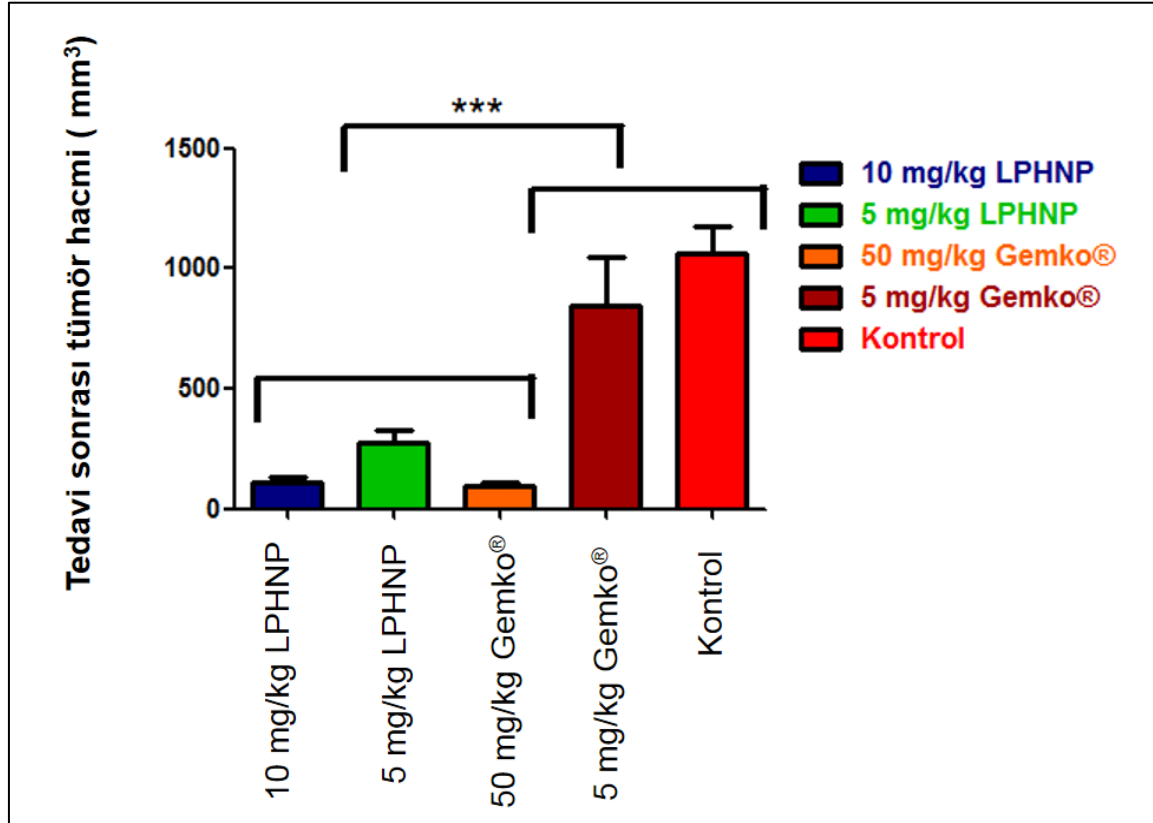


Şekil 4.57. Hayvanların tedavi süresince tümör hacimlerinin değişimi



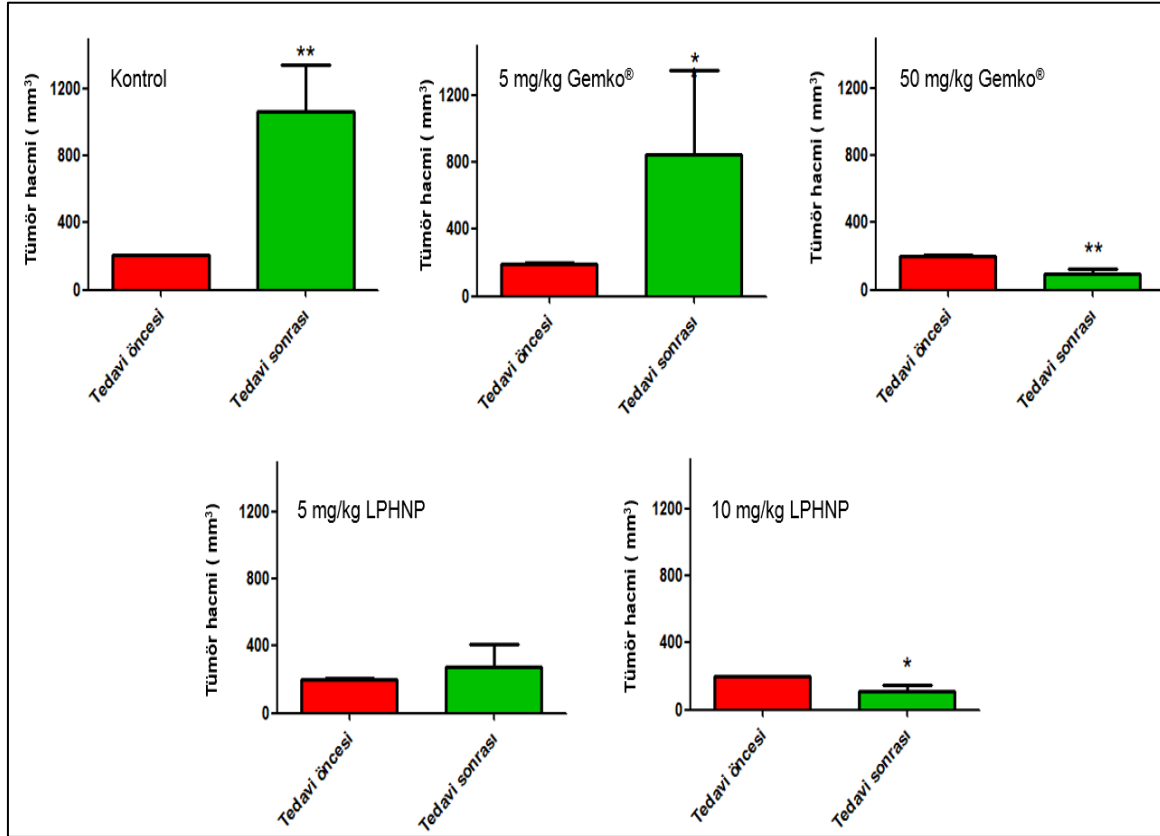
Resim 4.32. Kontrol grubundaki bir hayvanın 30. gün sonundaki görüntüsü

Tedavi sonrası hayvan gruplarının tümör hacimlerinin istatistiksel değerlendirilmesi Şekil 4.58'de gösterilmiştir.



Şekil 4.58. Tedavi sonrası hayvan gruplarının tümör hacimlerinin istatistiksel değerlendirilmesi

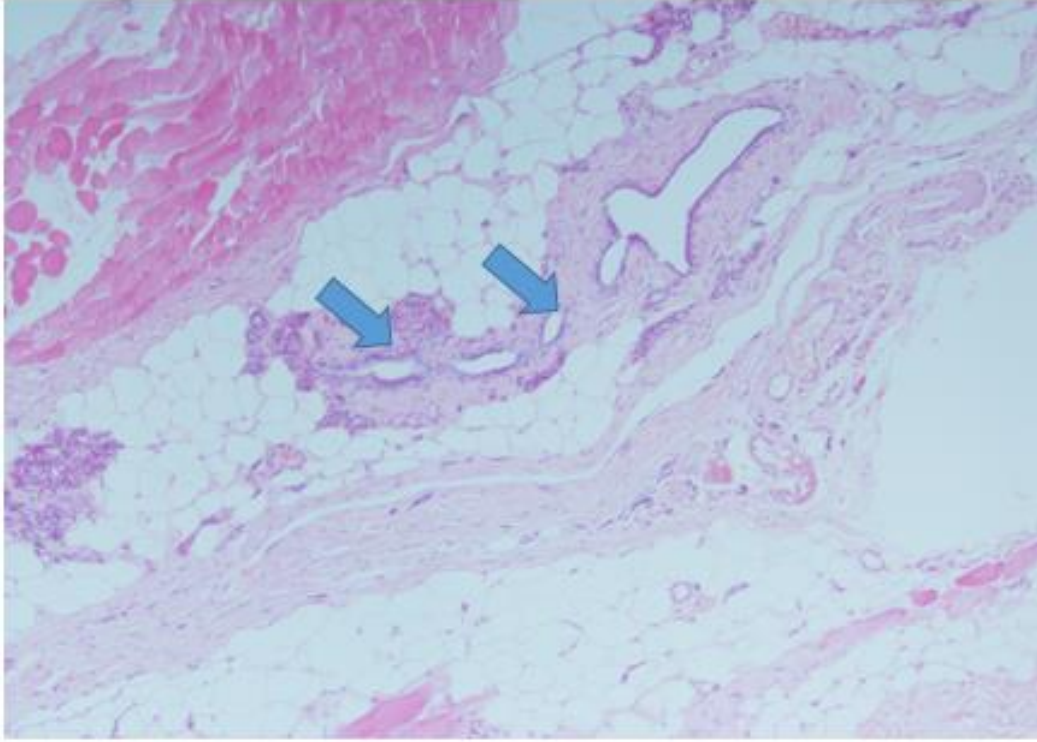
Tüm hayvan gruplarının tümör hacmi değişimlerinin tedaviye başlangıç hallerine göre istatistiksel açıdan değerlendirilmesi Şekil 4.59'da yer almıştır.



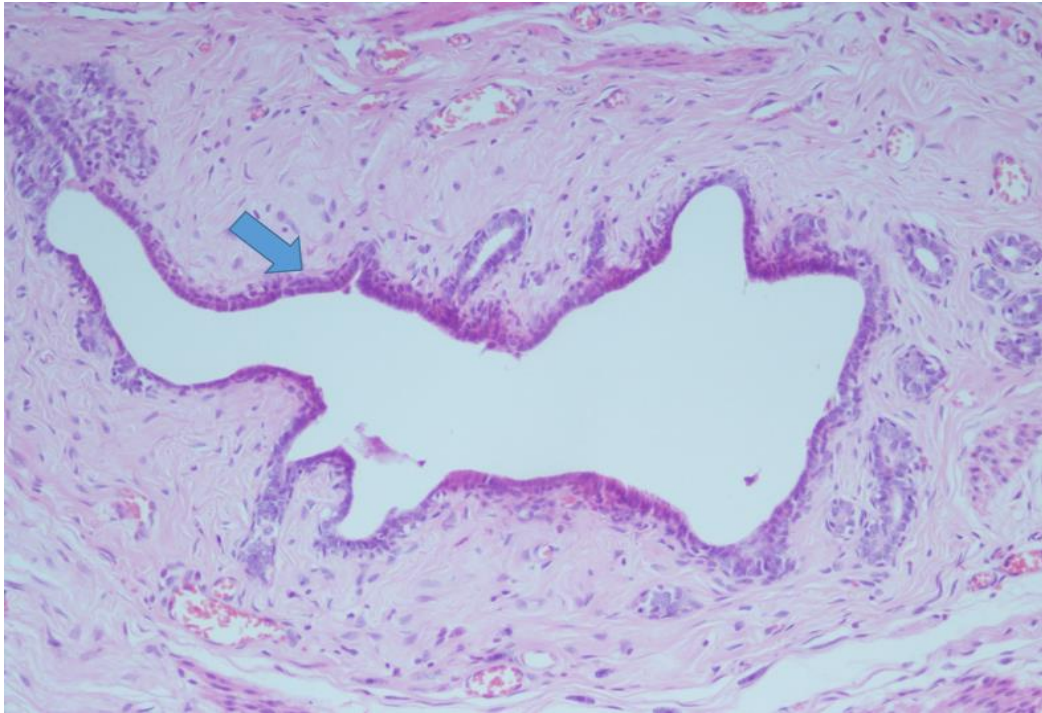
Şekil 4.59. Tüm hayvan gruplarının uygulamalar sonrası tümör hacmi değerlerinin tedavi başlangıcına göre istatistiksel açıdan değerlendirilmesi (* $p<0,05$; ** $p<0,01$)

4.5.3. Histopatolojik çalışmalar

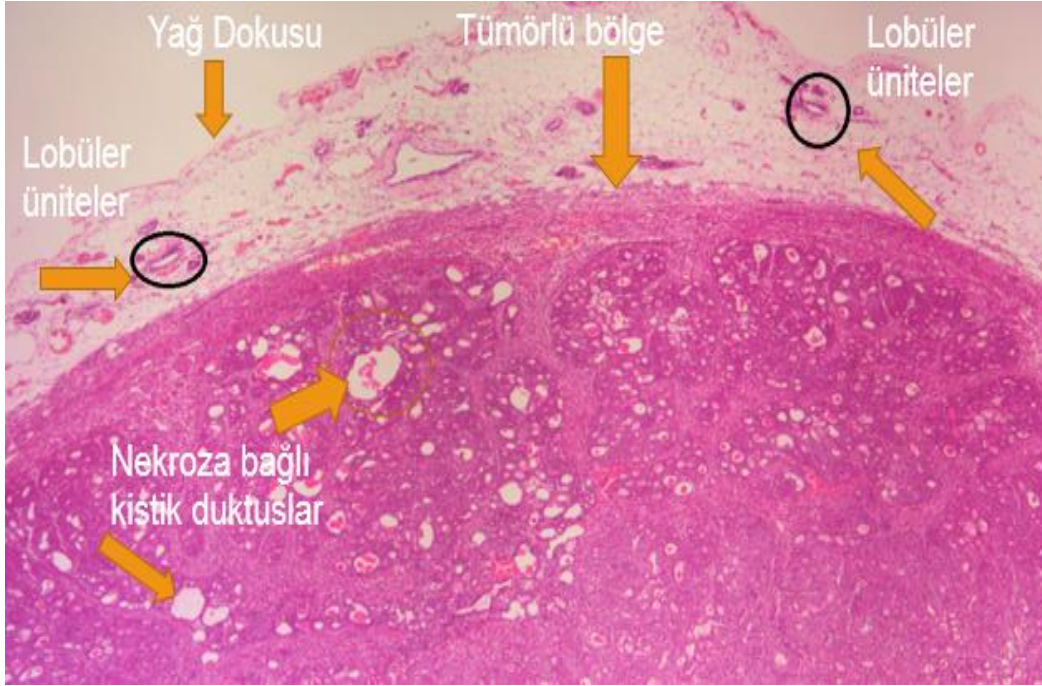
Tedavi sonucu alınan yanıtı kıyaslayabilmek için sağlıklı meme dokusundan ve tedavi uygulanmamış tümör gelişen sıçanın meme dokusundan kesitler alınıp incelenmiştir. Resim 4.33-Resim 4.34'de sağlıklı sıçan meme dokusu, Resim 4.35-Resim 4.36'da tedavi uygulanmamış kanser gelişen sıçanlardan alınan meme dokusu ve Resim 4.37-Resim 4.38'de gempitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonu ile tedavi uygulanan sıçanın meme dokusu gösterilmiştir.



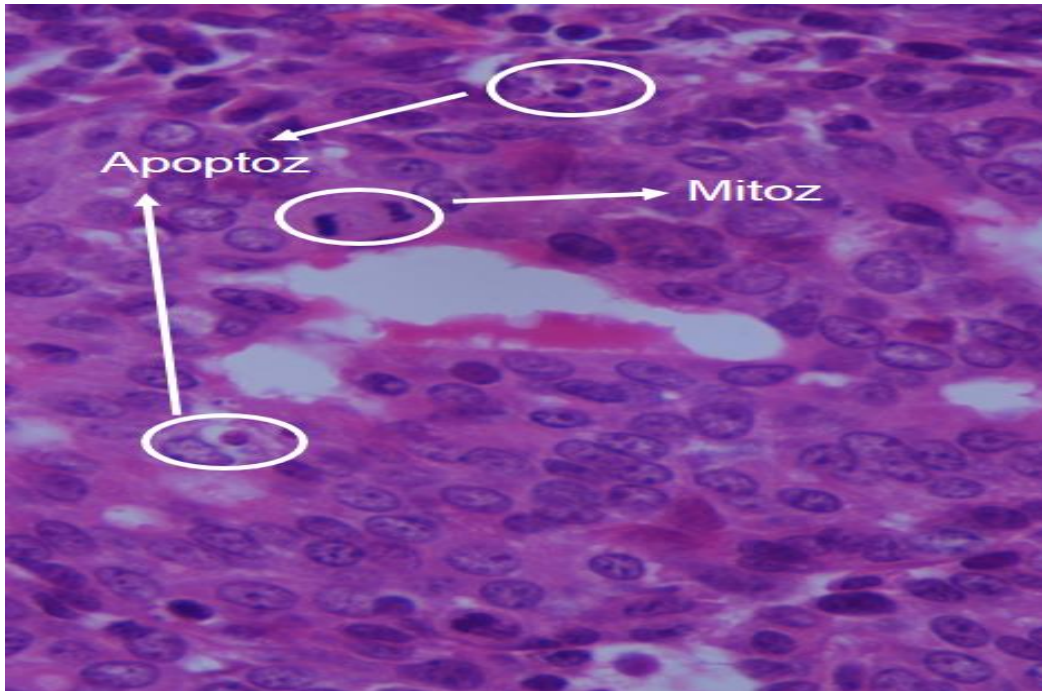
Resim 4.33. Sağlıklı sıçan meme dokusu görüntüsü (x100) (Oklar duktus yapılarını göstermektedir)



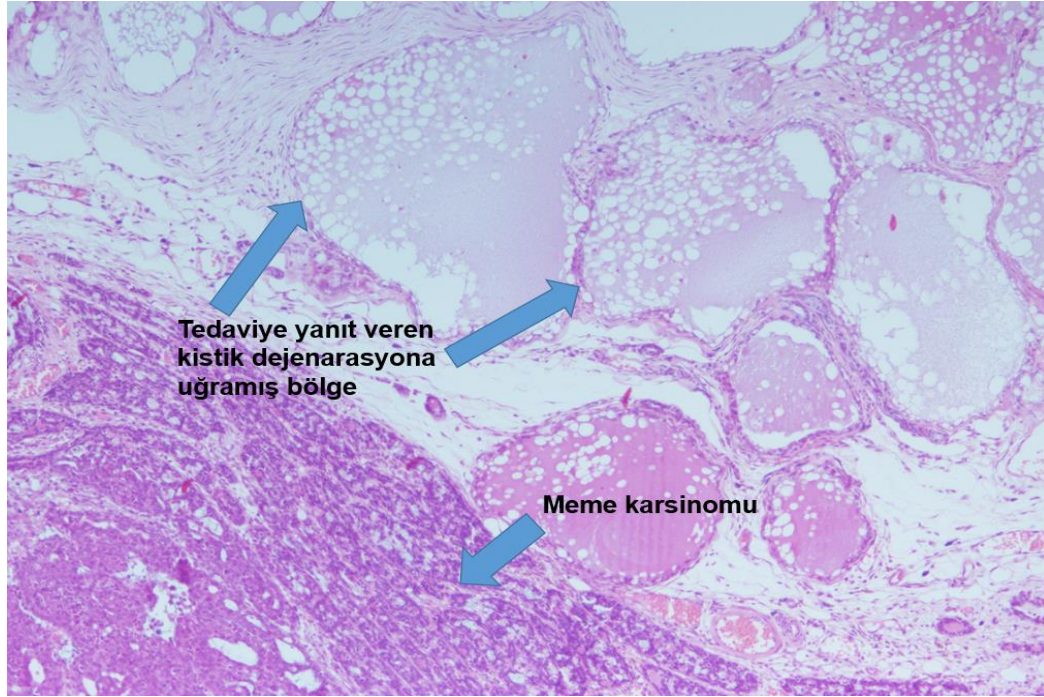
Resim 4.34. Sağlıklı sıçan meme dokusu görüntüsü (x200) (Ok duktus yapısını göstermektedir)



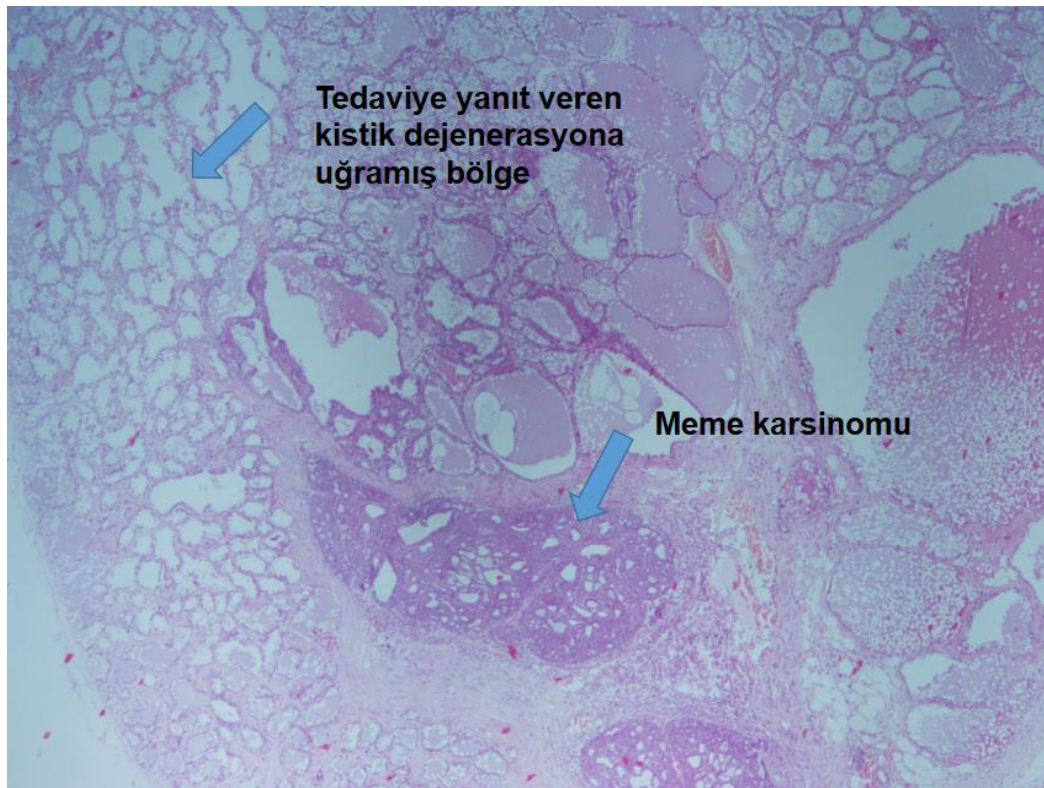
Resim 4.35. Tedavi uygulanmamış sıçanlarda meme tümörü görüntüsü (x100)



Resim 4.36. Tedavi uygulanmamış sıçanlarda meme tümörü görüntüsü (x100)



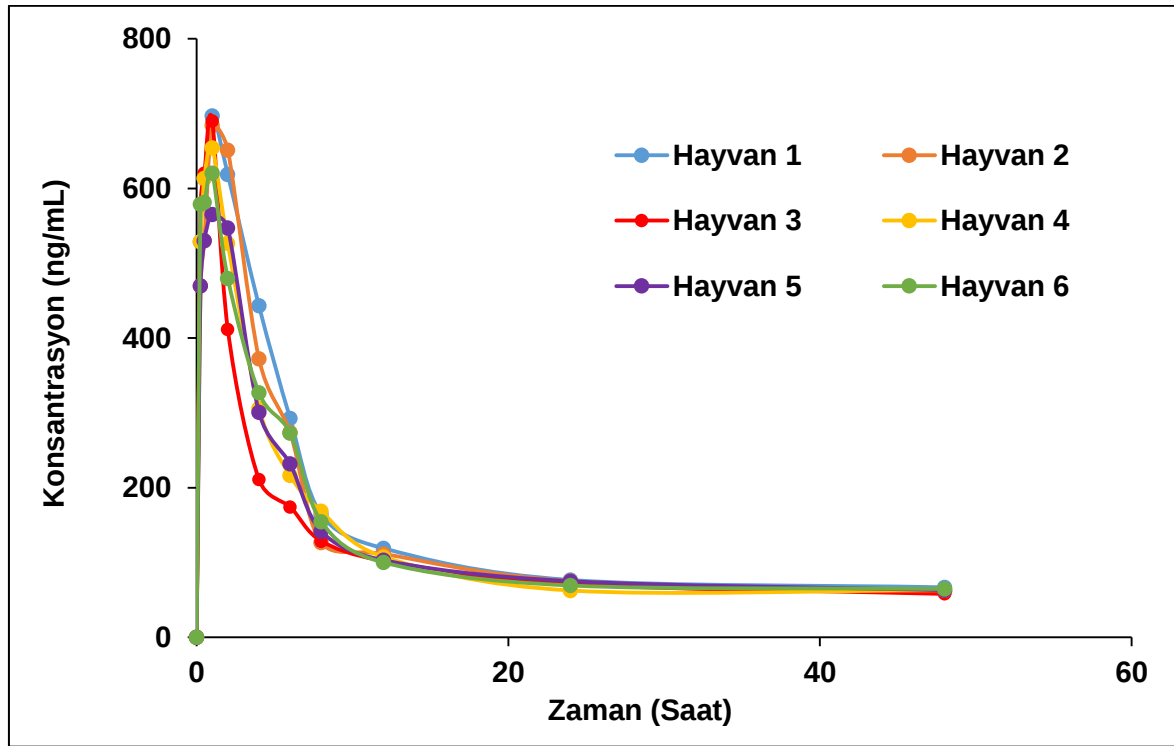
Resim 4.37. LPHNP formülasyonu ile tedavi uygulanan sıçanın meme dokusu görüntüsü (x100)



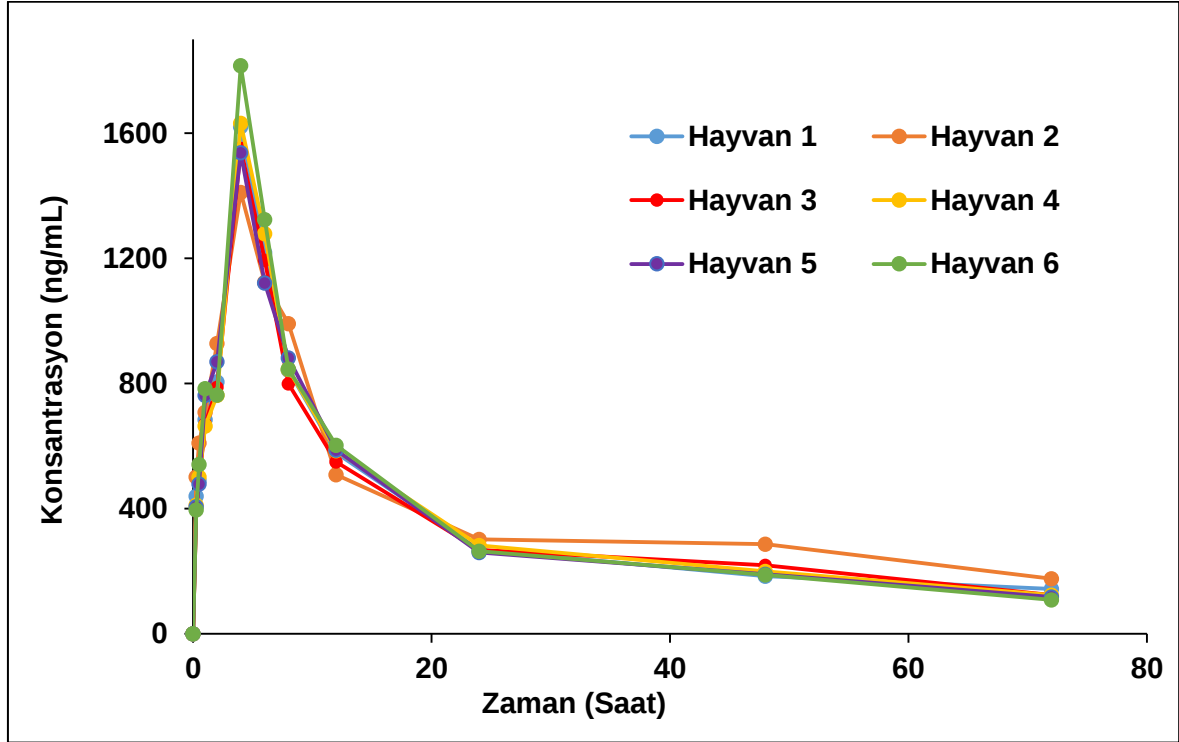
Resim 4.38. LPHNP formülasyonu ile tedavi uygulanan sıçanın meme dokusu görüntüsü (x40)

4.5.4. Farmakokinetik alışmalar

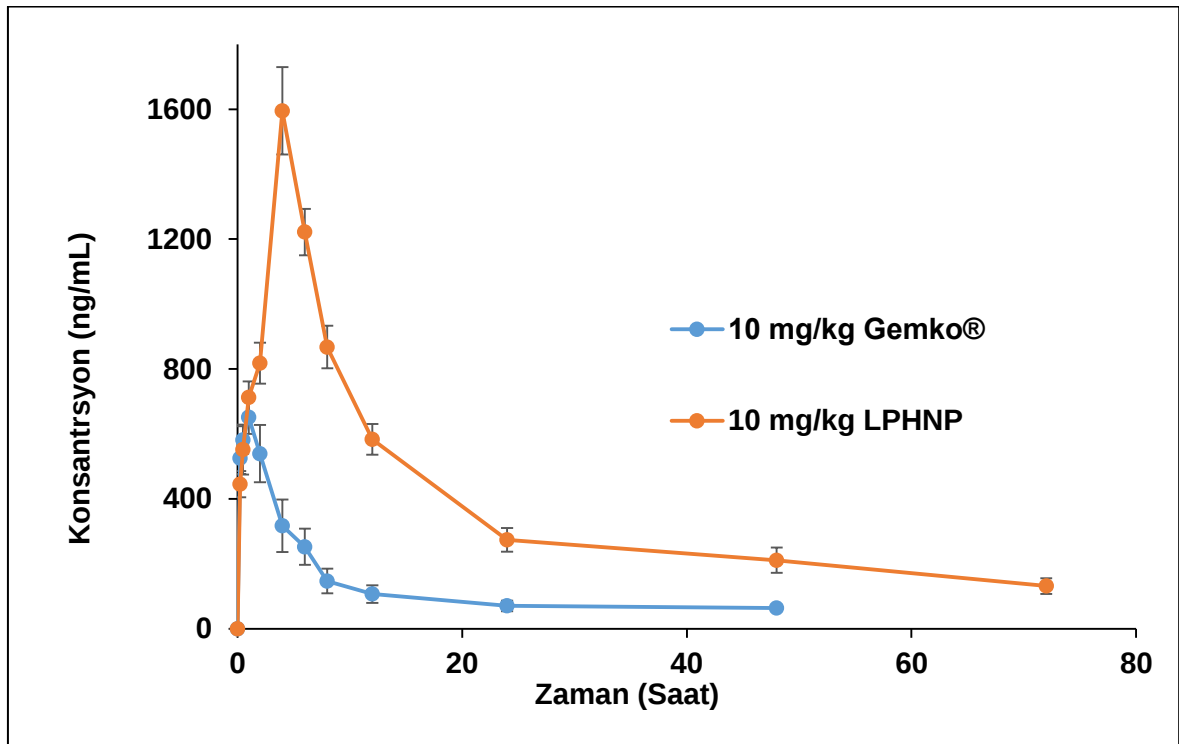
Farmakokinetik çalışmalarda sağlıklı 200 ± 10 gram ağırlığında 3-4 aylık dişi Sprague Dawley sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanlara 10 mg/kg dozda gemitabin hidroklorür içeren ticari rn Gemko® ve LPHNP formülasyonları intraperitoneal yoldan verilmiştir. Gemko® ve LPHNP formülasyonu uygulanan her bir hayvana ait zamana karşı plazmada tespit edilen gemitabin hidroklorür konsantrasyonları şekil 4.60 ve şekil 4.61'de verilmiştir. Hayvan plazmalarından zamana karşı tespit edilen ortalama gemitabin hidroklorür konsantrasyonları ise şekil 4.62'da gösterilmiştir.



şekil 4.60. Ticari rn Gemko® uygulanan hayvanlardan elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri (n=6)



Şekil 4.61. Gemsitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonu uygulanan hayvanlardan elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri (n=6)



Şekil 4.62. Sağlıklı hayvanlardan elde edilen ortalama konsantrasyon-zaman profilleri (n=6)

Plazma konsantrasyon zaman verileri kullanılarak hesaplanan farmakokinetik parametreler Çizelge 4.56'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.56. 10 mg/kg dozda gemitabin hidroklorür içeren LPHNP formülasyonu ve ticari ürün Gemko®'ya ait farmakokinetik parametreler

	Gemko®	LPHNP
C_{max} (ng/mL)	652 ± 51	1595 ± 134
t_{max} (saat)	1	4
AUC_{0-t}	2997 ± 362	21729 ± 327
$AUC_{0-\infty}$ (ng*saat/mL)	3744 ± 263	25262 ± 1107
$t_{1/2}$ (saat)	3,69 ± 0,87	15,5 ± 0,8
MRT(saat)	5,60 ± 1,01	24,3 ± 2,7
k_d (saat ⁻¹)	0,187 ± 0,048	0,045 ± 0,002

5. TARTIŞMA

Bu bölümde tez kapsamında yapılan deneysel çalışmaların sonuçları değerlendirilmiştir. Bu amaçla etkin maddenin miktar tayini için geliştirilen HPLC yöntemi ve analitik yöntemin validasyonu, teknolojik olarak uygun olan formülasyonların eldesi için gerçekleştirilen önformülasyon ve formülasyon çalışmaları tartışılmıştır. Etkin madde içeren formülasyonlara ait stabilite çalışmalarının ve hücre kültürü deneylerinin sonuçları incelenmiştir. Ayrıca geliştirilen LPHNP formülasyonunun sıçanlarda oluşturulan tümörlü doku üzerindeki etkisi ile ticari ürünün karşılaştırılması ve farmakokinetik değerlendirilmesi yapılmıştır.

5.1. Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Yapılan Çalışmalar

Etkin madde gempitabin hidroklorürün saflığının ve formülasyonlarda değişmeden kaldığının gösterilmesi için karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla formülasyon çalışmalarına başlamadan önce fizikokimyasal özellikleri incelenmiştir. Bu amaçla erime derecesi tayini, FTIR analizi, partikül büyüklüğü analizi ve etkin maddenin zeta potansiyeli ölçümü yapılmıştır.

5.1.1. Gempitabin hidroklorürün erime derecesi tayini

Erime derecesi, maddelerin saflığını da gösteren her maddeye özgü bir özelliktir. DSC termogramında gempitabin hidroklorürün erime noktası 268°C'dir (Şekil 4.1) ve bu değerin literatür ile uyumlu olduğu bulunmuştur (Dubey ve diğerleri, 2015).

5.1.2. Gempitabin hidroklorürün FTIR analizi

FTIR spektrumu sonucunda 3384 cm^{-1} 'de gözlenen amin gerilim bandı ($-\text{NH}_2$) ve 1675 cm^{-1} 'de gözlenen üreido grubuna ait karbonil grubu ($\text{C}=\text{O}$) gerilim bandı belirlenmiştir. Bu sonuçların literatür verileri ile benzer olduğu görülmüştür (Vandana ve Sahoo, 2010).

5.1.3. Gemsitabin hidroklorürün ortalama partikül boyutunun ve zeta potansiyelinin ölçülmesi

Etkin maddenin fiziksel karakterizasyonu için gemsitabin hidroklorürün partikül büyüklüğü analizi yapılmıştır. Lazer difraksiyon yöntemi ile ölçüm yapan Sympatec Helos Particle Sizer cihazında gemsitabin hidroklorürün ortalama partikül büyüklüğü 120 ± 3 μm bulunmuştur. Gemsitabin hidroklorürün sulu çözelti içerisindeki zeta potansiyeli pozitif ve $5,80 \pm 1,22$ mV olarak bulunmuştur. Gemsitabin hidroklorürün zeta potansiyeli değerinin pozitif olması literatür verileriyle de uyumludur (Reddy ve Couvreur, 2008; Arias ve diğerleri, 2009).

5.1.4. Gemsitabin hidroklorürün UV spektrofotometredeki dalga boyu taraması

Etkin maddenin pH 7,4 fosfat tamponu ve sıçan plazması ortamları içerisindeki maksimum absorbans gösterdiği dalga boyunun belirlenmesi çalışmaları sonucunda gemsitabin hidroklorürün her iki ortamda da maksimum absorbans verdiği dalga boyunun (λ_{max}) 268 nm olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar literatür verileri ile uyumludur. Das ve ark. yaptıkları bir çalışmada pH 7,4 fosfat tamponu içinde gemsitabin hidroklorürün maksimum absorbans gösterdiği dalga boyunu 268 nm olarak bulmuştur (Das ve diğerleri, 2013). Bir başka çalışmada da Pitrubhakta ve ark. sıçan plazmasında gemsitabin hidroklorürün maksimum absorbans gösterdiği dalga boyunu 268 nm olarak belirlemişlerdir (Pitrubhakta ve diğerleri, 2012).

5.2. Gemsitabin Hidroklorürün Miktar Tayini Yöntemlerinin Geliştirilmesi

Analizi yapılacak olan maddenin miktar tayini yöntemlerinin güvenilirliğini göstermek için kullanılan analitik yöntemlerin validasyonları yapılmıştır. Analitik yöntem validasyonu geliştirilen analiz yönteminin özelliklerinin istenilen amaçlara uygun olduğunu göstermek için yapılan işlemler bütünü olarak tanımlanmaktadır (FDA, 2015).

5.2.1. Miktar tayini yöntemi (Yöntem 1) validasyonu

Yöntem 1 için validasyon çalışmaları gemitabin hidroklorürün pH 7,4 fosfat tamponu içerisindeki çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Gemitabin hidroklorürün miktar tayini in vitro salım, enkapsülasyon etkinliği ve stabilite çalışmalarında kullanılmıştır. Miktar tayini HPLC aleti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan analitik yöntemin kabul edilebilirliğini sağlayan validasyon parametrelerinden; doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, saptama sınırı, duyarlılık sınırı, özgünlük ve stabilite incelenmiştir. Doğrusalılık, bir analitik yöntemin deney bulgularının örnek içindeki madde konsantrasyonu ile belirli bir aralıkta orantılı olmasıdır. 0,01-5 µg/mL aralığında konsantrasyonların pik yüksekliği cevapları ile ilişkisinin doğrusal olduğu ($r^2=0,9999$) bulunmuştur (Şekil 4.6).

Doğruluk kullanılan analitik yöntem ile elde edilen deney sonuçlarının gerçek değerlere yakınlığını ifade eder. Geri kazanım çalışmaları ile yöntem doğruluğu gösterilir. Geri kazanım % 98-102 arasında değişirken varyasyon katsayısı % 2'den küçük bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Kesinlik analitik yöntemin birbirini takip eden ölçümleri arasındaki yakınlığın derecesi olup normal deney koşulları altında analitik yöntemin tekrar elde edilebilirlik ve tekrarlanabilirlik derecesinin bir ölçüsüdür. Deney içi ve deneyler arası kesinlik sonuçları Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'de verilmiştir. Deney içi ve deneyler arası kesinlik deneylerinin varyasyon katsayıları % 2'den küçüktür. Bu veriler gemitabin hidroklorür için yöntemin tekrarlanabilirliğini göstermektedir.

Saptama sınırı (LOQ), var olan deneysel koşullar altında örnekteki etkin maddenin teşhis edilebilen, ancak tayin edilmesinin gerekli olmadığı en küçük miktarı, duyarlılık sınırı (LOD) ise örnekteki maddenin var olan deneysel koşullar altında kabul edilebilir kesinlik ve doğrulukta tayin edebildiği en küçük miktardır. Yöntem 1'in saptama sınırı (LOQ) 16,5 ng/mL ve duyarlılık sınırı (LOD) 5,43 ng/mL olarak bulunmuştur.

Gemitabin hidroklorürün stabilitesini incelemek amacıyla kalibrasyon doğrusunda yer alan 1 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan örnekler 4°C, 25°C ve 37°C sıcakta

bekledikten sonra 15 gün içerisinde belirli zamanlar örnekler alınıp analizi yapılmıştır. Bu stabilite analizleri sonucunda etkin maddenin deney şartları altında analizler boyunca stabil olduğu görülmüştür.

Özgünlük için yapılan çalışmada, analiz yönteminin, etkin madde içermeyen nanopartikül, lipozom ve LPHNP numune analizinden elde edilen kromatogramlarda Şekil 4.8-Şekil 4.10 arasında görüldüğü gibi formülasyonda kullanılan maddelere ait pikleri içermediği tespit edilmiş, yöntemin gemesitabin hidroklorüre özgün olduğu görülmüştür.

5.2.2. Miktar tayini yöntemi (Yöntem 2) validasyonu

Kullanılan biyoanalitik yöntemin kabul edilebilirliğini sağlayan validasyon parametrelerinden; doğrusallık, ekstraksiyon etkinliği, kesinlik, saptama sınırı, duyarlılık sınırı, stabilite ve özgünlük incelenmiştir. Biyoanalitik yöntem; Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından (FDA, 2013) serum, idrar gibi biyolojik bir matriks içinde çözünmüş analitin miktar tayini olarak tanımlanmıştır. Çalışmamızda plazmadan etkin madde miktar tayini yapıldığında validasyon bulguları biyoanalitik yöntem kabul kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Buna göre varyasyon katsayısının < %15 olması kabul edilebilirdir.

Doğrusallık için 0,2-10 µg/mL aralığında gemesitabin hidroklorür konsantrasyonu ile ortalama pik alanları arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu gösterilmiştir. Çizelge 4.8’de ekstraksiyon etkinliğinin % 98-103 arasında olduğu görülmüş ve varyasyon katsayısı % 15’den küçük bulunmuştur.

Deney içi ve deneyler arası kesinlik sonuçları Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10’da verilmiştir. Deney içi ve deneyler arası kesinlik deneylerinin varyasyon katsayıları %15’den küçüktür. Bu sonuçlar gemesitabin hidroklorür için yöntemin tekrarlanabilirliğini göstermektedir.

Biyoanalitik yöntem validasyonunda gemesitabin hidroklorür için yöntemin saptama sınırı (LOQ) 41,5 ng/mL ve duyarlılık sınırı (LOD) 13,6 ng/mL olarak bulunmuştur.

Farklı konsantrasyonlardaki plazma örneklerinin 60 günlük stabiliteleri incelendiğinde plazma içerisindeki etkin maddenin stabilitesini deney süresi içerisinde koruduğu sonucuna varılmıştır.

Yöntemin özgünlüğünü göstermek için etkin madde içermeyen LPHNP formülasyonu (Şekil 4.13) ve gemitabin hidroklorür içeren plazma (Şekil 4.12) HPLC'ye uygulanmıştır. Analiz süresince plazmada gemitabin hidroklorür pikiyle girişim yapan herhangi bir pike rastlanmamış olup yöntemin özgün olduğu belirlenmiştir.

5.3. Formülasyon Çalışmaları

5.3.1. Etkin madde yardımcı madde etkileşimleri

DSC analizi

Etkin madde gemitabin hidroklorürün, formülasyona ilave edilen yardımcı maddelerin tek başlarına ve etkin madde ile fiziksel karışımlarında DSC analizi gerçekleştirilmiş, etkin madde içeren liyofilize nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonları ile kıyaslanmıştır. Gemitabin hidroklorüre ait erime noktası 268°C bulunmuştur (Şekil 4.1). Etkin madde ve yardımcı madde fiziksel karışımlarına ait DSC analiz sonuçları etkin maddeye ait erime noktası pikinin değişmediğini ve fiziksel karışım içerisindeki etkin maddenin özelliğini koruduğunu göstermektedir. (Şekil 4.14-Şekil 4.16). Dolayısıyla etkin madde ve yardımcı maddeler arasında geçimsizlik olmadığı kanısına varılmıştır. Liyofilize haldeki formülasyonlara ait termogramlarda ise etkin maddeye ait endotermik pikin yaklaşık 280°C'ye kaydığı belirlenmiştir. Bu bulgular da, liyofilizasyon işleminin etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerini değiştirdiğini göstermektedir.

5.3.2. Geliştirilen nanopartikül formülasyonlarına ait sonuçların değerlendirilmesi

Gemsitabin hidroklorür içeren nanopartikül formülasyonlarında yapılan ön çalışmaların değerlendirilmesi

Gemsitabin hidroklorür içeren nanopartikül formülasyonu hazırlamak üzere ön çalışmalarda modifiye çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışmalarda PLGA miktarının ve kullanılan yüzey etkin maddenin formülasyon üzerindeki etkisi incelenmiştir. Yüksek molekül ağırlıklı PVA kullanılan formülasyonun düşük molekül ağırlıklı PVA kullanılanlara göre daha küçük partikül boyutu ve daha yüksek enkapsülasyon etkinliği gösterdiği belirlenmiştir. PVA'nın molekül ağırlığı arttıkça sulu fazın vizkozitesinin arttığı, böylece enkapsülasyon etkinliğinin arttığı düşünülmektedir. (Fang ve diğerleri, 2014). İç ve dış sulu fazda PVA (31-50 kDa) kullanılan formülasyon en yüksek enkapsülasyon etkinliği göstermiştir. Lutrol F-68 ile hazırlanan formülasyonda (Ö-NP6) agregasyon meydana geldiği hem partikül büyüklüğü ölçümünden (Çizelge 4.14) hem de TEM görüntülerinden (Resim 4.2) anlaşılmıştır. Song ve ark. yaptığı bir çalışmada da benzer sonuçlar bulmuştur. Lutrol F-68 kullanılarak hazırlanan PLGA formülasyonu PVA kullanılarak hazırlanan formülasyondan daha büyük partikül boyutu göstermiştir (Song ve diğerleri, 2006).

Nanopartikül formülasyonunda yapılan ön denemelerde liyofilizasyon işleminin partikül boyutunu artırdığı belirlenmiştir. Holzer ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada PLGA içeren nanopartikül formülasyonları hazırlanarak liyofilize edilmiş ve liyofilizasyon sonucu meydana gelen agregasyonun önüne geçebilmek için formülasyona liyoprotektan özellikteki maddelerin ilave edilmesi gerektiği belirtilmiştir (Holzer ve diğerleri, 2009). İlerleyen çalışmalarda nanopartikül formülasyonlarının liyofilizasyon işlemi sonrası partikül boyutunun büyümesini önlemek için formülasyonlara liyoprotektan ilave edilmesi gerektiğine karar verilmiştir.

Gemsitabin hidroklorür içeren nanopartikül formülasyonu geliştirme çalışmalarının değerlendirilmesi

Nanopartikül formülasyonu geliştirme çalışmalarında PLGA miktarının etkisi, etkin madde miktarının etkisi, asit veya ester yapıdaki PLGA polimerinin etkisi, organik çözücü/çözücü karışımının etkisi, PLGA polimerinin molekül ağırlığının etkisi, PLGA polimerinin laktik asit/glikolik asit oranının formülasyonların partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon verimine etkisi incelenmiştir.

PLGA miktarının etkisi

PLGA miktarının etkisini incelemek için PLGA 50:50 (7-17 kDa) asit terminal gruba sahip polimer 160 mg, 240 mg ve 320 mg formülasyonlara ilave edilerek kullanılmıştır. PLGA miktarı arttıkça % enkapsülasyon etkinliği ve partikül büyüklüğünün arttığı görülmüştür. PLGA miktarı 160 mg kullanıldığında 211 ± 5 nm ortalama partikül büyüklüğüne sahip nanopartiküller elde edilirken, PLGA miktarı 320 mg olduğunda ortalama partikül büyüklüğü 284 ± 22 nm bulunmuştur (Çizelge 4.16). Artan PLGA miktarına bağlı olarak organik fazın viskozitesi artmıştır, artan viskozitenin daha büyük partikül büyüklüğüne sahip nanopartiküllerin oluşmasına neden olabileceği düşünülmektedir. Viskozite artıkça formülasyonlara uygulanan ultrasonikasyon sonucu partiküllerin küçültülmesi daha zor hale gelmiştir (Mittal ve diğerleri, 2007). Mainardes ve Evangelista'nın yaptıkları bir çalışmada da benzer sonuçlar bulunmuş olup organik fazdaki PLGA miktarı 12,5 mg kullanıldığında ortalama partikül boyutu 243 nm bulunurken, PLGA miktarı 50 mg kullanılarak hazırlanan formülasyonların ortalama partikül boyutunun 360 nm olduğu belirtilmiştir (Mainardes ve Evangelista, 2005). Formülasyon içerisindeki PLGA miktarı 160 mg, 240 mg ve 320 mg olduğunda % enkapsülasyon etkinliği sırasıyla $4,82 \pm 0,28$; $6,47 \pm 1,21$ ve $8,29 \pm 0,04$ olarak bulunmuştur (Çizelge 4.16). PLGA miktarı artıkça artan viskoziteye bağlı olarak iç sulu fazdaki gemsitabin hidroklorür daha yüksek oranda nanopartikül içerisinde kalabilmiştir ve bu durum da daha yüksek enkapsülasyon etkinliği görülmesini sağlamıştır (Cun ve diğerleri, 2009).

Etkin madde miktarının etkisi

Formülasyonlardaki etkin madde miktarının 4 mg'dan (NP2) 2 mg'a (NP4) düşürülmesi enkapsülasyon etkinliğini istatistiksel olarak anlamlı olmayacak derecede artırırken ($p>0,05$), partikül büyüklüğünü de istatistiksel açıdan anlamlı olmayacak derecede düşürmüştür ($p>0,05$). 4 mg etkin madde kullanılarak hazırlanan formülasyonların (NP2) ortalama partikül büyüklüğü 232 nm iken, 2 mg etkin madde kullanılarak hazırlanan formülasyonun (NP4) ortalama partikül büyüklüğü 213 nm bulunmuştur (Çizelge 4.17). Benzer sonuçları Shaikh ve ark. da kurkumin yüklü PLGA nanopartikül formülasyonları hazırladıklarında elde etmiştir. Formülasyondaki kurkumin oranı %10 iken partikül büyüklüğü 253 nm ve % enkapsülasyon etkinliği %79,7 iken, curcumin oranı %15 olduğunda partikül büyüklüğü 264 nm, % enkapsülasyon etkinliği ise %76,9 olarak bulunmuştur (Shaikh ve diğerleri, 2009).

Farklı terminal gruba sahip PLGA kullanılarak hazırlanan formülasyonlar

Farklı terminal gruba sahip PLGA polimerlerinin % enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi incelenmiş ve asit fonksiyonel gruba sahip PLGA polimerlerinin daha yüksek gempitabin hidroklorür enkapsülasyon etkinliği gösterdikleri belirlenmiştir.

PLGA 50:50 (38-54 kDa) asit terminal fonksiyonel gruba sahip polimer kullanılarak hazırlanan formülasyonun (NP5) enkapsülasyon etkinliği %7,91 iken, PLGA 50:50 (38-54 kDa) ester terminal fonksiyonel gruba sahip polimer kullanılarak hazırlanan formülasyonun enkapsülasyon etkinliği %4,63 bulunmuştur. Benzer sonuçlar PLGA 50:50 (7-17 kDa) kullanılan asit ve ester terminal fonksiyonel gruba sahip polimerler kullanıldığında da elde edilmiştir (Çizelge 4.18). Bu durumun görülmesinde asit fonksiyonel gruba sahip PLGA polimerlerinin içerdiği serbest karboksil grubundan dolayı daha hidrofilik olması (Wischke ve Schwendeman, 2008) ve gempitabin hidroklorür gibi hidrofilik ilaçların polimere yüksek afinite göstermesinin etkili olduğu düşünülmektedir.

Organik çözücü/çözücü karışımlarının etkisi

Organik çözücü olarak sadece diklorometan (NP8) kullanılan formülasyonlarda partikül büyüklüğü yüksek bulunmuştur (486 nm). NP8 formülasyonun büyük partikül boyutuna sahip olmasında DCM'nin su ile karışmaması ve yüksek yüzeylerarası gerilime sahip olmasının etkili olduğu düşünülmektedir (Vineeth ve diğerleri, 2014). Bu durum partiküllerin agregasyonuna ve daha büyük boyutta partiküllerin oluşmasına neden olmuştur. Sadece aseton kullanılarak hazırlanan formülasyonda (NP9) stabil bir primer emülsiyonun hazırlanamadığı, % enkapsülasyon etkinliğinin düştüğü görülmüştür (%1,67). Aseton su ile karışabilen bir organik çözücüdür bu durum organik faz ile sulu fazın stabil şekilde primer emülsiyon oluşturmasını engellemektedir (Song ve diğerleri, 2006). Etil asetat ile hazırlanan formülasyona (NP10, 252 nm) göre DCM:EA (1:1 h/h) kullanılarak hazırlanan formülasyon (NP11) daha küçük partikül boyutu (270 nm) göstermiştir. Bu durumun görülmesinde DCM'nin varlığına bağlı olarak artan organik faz viskozitesinin ve yüzeylerarası gerilimin etkili olduğu düşünülmektedir (Sahana ve diğerleri, 2008). Sadece etil asetat kullanılarak hazırlanan formülasyon (NP10, %3,32) DCM:EA (1:1 h/h) kullanılarak hazırlanan formülasyona (NP11, %4,38) göre daha düşük enkapsülasyon etkinliği göstermesinde organik çözücülerin kaynama noktalarına bağlı olarak buharlaşma sürelerinin değişmesi etkili olmuş olabilir. Etil asetatın kaynama derecesi 77°C iken DCM'nin kaynama derecesi yaklaşık 40°C'dir (Sahana ve diğerleri, 2008). Dolayısıyla etil asetat ile hazırlanan formülasyonda organik çözücü daha uzun sürede uçarken, DCM:EA (1:1 h/h) kullanılarak hazırlanan formülasyonda organik çözücü daha kısa sürede uçmaktadır. Evaporasyon süresinin fazla olması da etkin maddenin dış sulu faza difüze olması olasılığını artırmış olabilir. Çalışmamızda farklı DCM:ACE h/h oranlarına sahip organik çözücü karışımları da kullanılmıştır. DCM:ACE 1:1 ve 1:2 (h/h) karışımları organik çözücü olarak kullanıldığında en yüksek enkapsülasyon etkinliği görülmüştür (Çizelge 4.19). Bu sonucun elde edilmesinde su ile karışabilen ACE'nin hızla dış sulu faza difüze olması, bu durumun da organik faz ve sulu faz arasında etkin madde açısından doygun bir alan oluşturmasının etkili olduğu düşünülmektedir. Polimer organik çözücünün ortamdan uzaklaşması ile katılaşıp ve etkin maddeyi dış sulu faza difüze olamadan hapseder (Liu ve diğerleri, 2010). Öte yandan DCM:ACE 1:4 (h/h) karışımında enkapsülasyon etkinliği ACE miktarının

fazla olmasına bağılı olarak düşmüştür. Literatürde yapılan çalışmalarda da yüksek enkapsülasyon etkinliğı elde etmek için DCM:ACE karışımına ait ideal bir oranın olduğı belirtilmiştir (Ruan ve diğlerleri, 2002; Manoochehri ve diğlerleri, 2013). Manoochehri ve ark. hazırladıkları nanopartikül formülasyonunda DCM:ACE oranının 90:10 (h/h)'dan 60:40 (h/h) oranına düşürüldüğünde enkapsülasyon etkinliğinin de artan ACE oranına bağılı olarak azaldığını belirtmişlerdir (Manoochehri ve diğlerleri, 2013). DCM:ACE farklı oranlarda karışımları kullanılarak hazırlanan formülasyonların partikül büyüklükleri arasında istatistiksel açıdan bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Tüm nanopartikül formülasyonları negatif zeta potansiyeli göstermiştir (Çizelge 4.19). Negatif zeta potansiyeli görölmesinde PLGA polimerinin negatif yüzey yüküne sahip olması etkili olmuştur.

Farklı molekül ağırlığına sahip PLGA kullanılarak hazırlanan formülasyonlar

Polimerin molekül ağırlığının formülasyonlar üzerindeki etkisini incelemek için organik çözücü olarak DCM:ACE (1:1 h/h) ve (1:2 h/h) karışımları kullanılmıştır. Her iki organik çözücü içerisinde kullanılan PLGA 50:50 polimerinin molekül ağırlığı 7-17 kDa'dan 38-54 kDa'a arttığı zaman enkapsülasyon etkinliğı ve partikül büyüklüğünün arttığı görölmüştür. DCM:ACE 1:2 (h/h) karışımı kullanıldığında PLGA'nın molekül ağırlığı 7-17 kDa'dan 38-54 kDa'a çıktığında partikül büyüklüğü de 231 nm'den 245 nm'ye yükselmiştir (Çizelge 4.20). Partikül büyüklüğü artışında artan molekül ağırlığına bağılı olarak organik fazın viskozitesinin artmasının da etkili olduğı düşünölmektedir. DCM:ACE (1:1 h/h) ve (1:2 h/h) oranında karışımları kullanılarak hazırlanan formülasyonlarda artan molekül ağırlığına bağılı olarak enkapsülasyon etkinliğinin arttığı görölmüştür (Çizelge 4.20). Bu durumun görölmesinde artan viskozitenin etkin maddenin dış sulu faza difüzyonunu zorlaştırdığı ve dolayısıyla etkin maddenin yüksek oranda hapsolmasını sağlamanın etkili olduğı düşünölmektedir (Mittal ve diğlerleri, 2007).

Farklı laktik asit/glikolik asit oranına sahip PLGA polimeri kullanılarak hazırlanan formülasyonlar

Farklı laktik asit/glikolik asit oranına sahip PLGA polimeri kullanılarak hazırlanan formülasyonda polimer olarak PLGA 50:50, PLGA 65:35 ve PLGA 75:25 polimerleri kullanılmıştır. PLGA 75:25 (NP18 ve NP20) kullanılarak hazırlanan formülasyonlar en düşük enkapsülasyon etkinliği gösterirken, PLGA 50:50 (NP14 ve NP15) kullanılarak hazırlanan formülasyonlar yüksek enkapsülasyon etkinliği göstermiştir. PLGA polimeri içerisinde laktik asit oranı arttıkça polimer daha hidrofobik hale gelmektedir. Bu durum hidrofilik karakterdeki gemitabin hidroklorürün hidrofobik özelliği daha yüksek olan polimerlere yüklenmesini azaltmıştır. DCM:ACE 1:2 (h/h) organik çözücü karışımı kullanılarak hazırlanan PLGA 50:50 (NP15) formülasyonunun % enkapsülasyon etkinliği %12,7 iken PLGA 75:25 kullanılarak hazırlanan formülasyonun enkapsülasyon etkinliği % 7,51 bulunmuştur (Çizelge 4.21).

Ayrıca PLGA 50:50/PLGA 65:35 1:1 (a/a) polimer karışımı ile PLGA 50:50/PLGA 75:25 1:1 (a/a) polimer karışımı kullanılarak formülasyonlar hazırlanmıştır. PLGA 50:50/PLGA 65:35 1:1 (a/a) karışımı kullanılan formülasyonda (NP21) % enkapsülasyon etkinliği yüksek bulunmuştur (%18,0) (Çizelge 4.22). Bu durumun görülmesinde PLGA 50:50 ile PLGA 65:35 kullanıldığında artan vizkoziteye bağlı olarak dış sulu faza difüze olan gemitabin hidroklorür miktarının azalmasının etkili olduğu düşünülmektedir. PLGA 50:50/PLGA 75:25 1:1 (a/a) karışımı kullanılarak hazırlanan formülasyonun (NP22) enkapsülasyon etkinliğinin (%11,1) sadece PLGA 50:50 kullanılarak hazırlanan formülasyona (NP16, %14,0) göre daha düşük olduğu görülmüştür. PLGA 50:50/PLGA 75:25 polimeri karışımı kullanıldığında PLGA 75:25 polimeri taşıyıcı sistemi çok hidrofobik hale getirmiştir ve hidrofilik karakterdeki gemitabin hidroklorürün enkapsülasyon etkinliği düşmüştür. Elde edilen optimum nanopartikül formülasyonu (NP21) pegile edilerek PEG NP21 formülasyonu hazırlanmıştır.

PEG NP21 formülasyonu en yüksek enkapsülasyon etkinliği göstermiştir (%18,8) (Çizelge 4.22) ama bu fark pegile olmayan formülasyona (NP21) göre istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Bu durumun görülmesinde hidrofilik

karakterdeki PEG'in formülasyona ilave edilmesinin etkili olduğu düşünülmektedir. Pegile formülasyonun (PEG NP21) ortalama partikül boyutu 215 nm iken pegile olmayan formülasyonun (NP21) partikül büyüklüğü 267 nm olarak bulunmuştur. Pegile formülasyonun daha küçük ortalama partikül boyutu göstermesinde pegilasyonun partiküllerin agrege olmasını önlemesinin (sterik stabilizasyon sağlaması) etkili olduğu düşünülmektedir (Maitani ve diğerleri, 2012). Tüm formülasyonlar negatif zeta potansiyeli göstermiştir. Pegile nanopartikül formülasyonu (PEG NP21, $-17,7 \pm 0,8$ mV) pegile olmayan formülasyona göre (NP21, $-13,8 \pm 0,8$ mV) daha fazla negatif zeta potansiyeli göstermiştir. Bu durumun görülmesinde negatif yüzey enerjisine sahip DSPE-PEG'in formülasyona ilave edilmesinin etkili olduğu düşünülmektedir (Kim ve diğerleri, 2012). Gemsitabin hidroklorür yüklü nanopartikül formülasyonlarının PDI değeri $<0,4$ 'tür ve bu durum da hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının homojen bir partikül boyutu dağılımı gösterdiklerini kanıtlamaktadır.

5.3.3. Geliştirilen lipozom formülasyonlarına ait sonuçların değerlendirilmesi

Lipozom formülasyonlarında yapılan ön çalışmalara ait değerlendirmeler

Lipozomlara ait ön çalışmalarda öncelikle ekstrüksiyon ve liyofilizasyon işleminin partikül büyüklüğüne etkisi incelenmiştir. Bu amaçla soya fosfotidilkolin kullanılarak etkin madde ilave edilmeden lipozom formülasyonları hazırlanmıştır ve ekstrüksiyon işleminin partikül büyüklüğü üzerine etkisi incelenmiştir. Hidrasyon işlemi sonucu lipozom formülasyonlarının oldukça büyük olduğu (>1 μ m) 200 nm altında taneciklerin elde edilmesi için ekstrüksiyon işlemin olması gerektiği sonucuna varılmıştır. Lipozom formülasyonları 10'ar defa sırasıyla 800, 400 ve 200 nm por genişliğine sahip polikarbonat membran filtrelerden geçirilmesiyle partikül boyutunun kademeli olarak azaldığı belirlenmiştir (Çizelge 4.23). Ayrıca lipozom formülasyonlarının liyofilizasyon basamağında liyoprotektan özellikteki maddenin ilavesinin gerekli olup olmadığı araştırılmıştır. Liyofilizasyon işlemi için liyoprotektan ilave edilmeyen formülasyonlarda partikül büyüklüğü ~ 200 nm'den yaklaşık 500 nm'ye yükselmiştir. Sonuçlar lipozom formülasyonlarının liyofilizasyon işlemi için oldukça hassas olduğunu göstermektedir. Resim 4.1'de liyoprotektan ilave edilen ve edilmeyen formülasyonun görüntüleri gösterilmiş, liyoprotektan ilave edilmeyen

formülasyonun agregasyona uğradığı gözlenmiştir. Glavas-Dodova ve ark. yaptıkları bir çalışmada da benzer sonuçlar elde etmiştir, liyofilizasyon işlemi sonrası liyoprotektan içermeyen lipozom formülasyonların ortalama partikül boyutu yaklaşık 7 µm iken, liyoprotektan içeren formülasyonların ortalama partikül boyutu yaklaşık 5 µm bulunmuştur (Glavas-Dodova ve diğerleri, 2005).

Gemsitabin hidroklorür içeren lipozom formülasyonları geliştirme çalışmalarına ait değerlendirmeler

Bu çalışmalarda farklı molar oranlarında SPC/kolesterol karışımı içeren gemsitabin hidroklorür yüklü formülasyonlar hazırlanmıştır. Formülasyon içerisindeki kolesterol oranı arttıkça partikül boyutunun küçüldüğü ve % enkapsülasyon etkinliğinin düştüğü gözlenmiştir (Çizelge 4.24). SPC/kolesterol molar oranı 4:1, 4:2 ve 4:4 olan formülasyonların partikül boyutları ve % enkapsülasyon etkinlikleri sırasıyla 289 ± 34 nm (%26,2 $\pm$ 1,4); 219 ± 26 nm (%23,8 $\pm$ 1,0) ve 191 ± 10 nm (%12,9 $\pm$ 0,6) olarak bulunmuştur. Sonuçlar formülasyon içerisindeki kolesterol oranının partikül büyüklüğünü ve enkapsülasyon verimini etkilediğini göstermektedir. Kolesterol lipozom formülasyonlarına stabilite sağlayan önemli bir yardımcı maddedir (Tabandeh ve Mortazavi, 2013). Formülasyon içerisindeki kolesterol membranın sağlamlığını artırarak stabiliteyi sağlamaktadır (Liu ve Park, 2009). Bu stabil yapı sayesinde partikül boyutu küçülmektedir. Formülasyonda kolesterol oranı arttıkça enkapsülasyon etkinliğinin düştüğü görülmektedir (LP3, %12,9) (Çizelge 4.24). Kolesterol miktarının fazla olmasının membranın daha sert ve suyu daha az geçiren bir yapıya ulaşmasına neden olduğu, bu durumun da iç fazdaki düşük su miktarına bağlı olarak etkin maddenin enkapsülasyonunu düşürdüğü gözlenmiştir (Achim ve diğerleri, 2017). Benzer sonuçlar Kaiser ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada da bulunmuştur. 5-Florourasil yüklü lipozom formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliğinin formülasyon içindeki artan kolesterol miktarına bağlı olarak düştüğü bildirilmiştir (Kaiser ve diğerleri, 2003). Bu bulgular sonucunda partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinliği açısından fosfatidilkolin/kolesterol 4:2 molar oranının kullanılmasına karar verilmiştir.

Çalışmamızda farklı fosfatidilkolinlerden oluşan lipozom formülasyonları da incelenmiştir. SPC (LP2), DOPC (LP4) ve DPPC (LP5) kullanılarak hazırlanan

formülasyonların partikül büyüklükleri sırasıyla 219 ± 26 nm; 225 ± 24 nm ve 203 ± 17 nm olarak bulunmuş ve partikül büyüklüğü açısından istatistiksel olarak bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Farklı fosfatidilkolinler kullanılarak hazırlanan formülasyonların PDI değerleri $0,196\pm 0,092$ ile $0,285\pm 0,080$ arasında değişmektedir ve formülasyonların homojen bir partikül büyüklüğü dağılımı gösterdiğini kanıtlamaktadır (Çizelge 4.25).

Doymamış yağlardan oluşan lipozomlar doymuş yağlar kullanılarak hazırlananlara göre daha esnek bir yapıya sahiptir ve bu durum enkapsülasyon etkinliğini de etkilemektedir (Maherani ve diğerleri, 2012). DPPC, DOPC ve SPC kullanılarak hazırlanan formülasyonların enkapsülasyon etkinlikleri sırasıyla $\%16,2\pm 2,8$; $\%22,2\pm 2,9$ ve $\%23,8\pm 1,0$ olarak bulunmuştur. Doymamış yağlardan oluşan formülasyonlar (SPC ve DOPC) doymuş yağlardan oluşan formülasyona (DPPC) göre daha yüksek enkapsülasyon etkinliği göstermiştir. SPC’de 4 tane doymamış bağ bulunurken, DOPC’de 2 tane doymamış bağ vardır. DPPC ise doymamış bağ içermemektedir. En düşük enkapsülasyon etkinliği doymuş yağ olan DPPC kullanılarak hazırlanan formülasyonda görülmüştür (LP5, $\%16,2$). Membranın esnekliği azaldıkça lipozomun hidrofobik özelliği artar ve daha az geçirgen hale gelir (El-Nesr ve diğerleri, 2010).

En yüksek enkapsülasyon etkinliği gösteren LP2 formülasyonunun pegile edilmesine karar verilmiştir (PEG LP2). Pegile edilen formülasyonun (PEG LP2) partikül boyutu pegile olmayan formülasyona (LP2) göre daha küçük bulunmuştur ($p>0,05$). PEG LP2 formülasyonun enkapsülasyon etkinliği $\%26,1\pm 0,2$ iken LP2 formülasyonun enkapsülasyon etkinliği $23,8\pm 1,0$ ’dır. PEG polimerinin hidrofilik karakterinin daha fazla gempitabin hidroklorür tutunmasına etkili olduğu düşünülmektedir. Cho ve ark. yaptıkları bir çalışmada da benzer sonuçlar elde etmiş, pegile lipozom formülasyonunun pegile olmayan lipozom formülasyonuna göre daha yüksek enkapsülasyon etkinliği ve düşük partikül boyutu gösterdiği bildirilmiştir (Cho ve diğerleri, 2014). Lipozom formülasyonlarının zeta potansiyeli $-14,3$ mV ile $-23,1$ mV arasında değişmektedir (Çizelge 4.24 ve Çizelge 4.25) ve bu değerler stabil lipozom formülasyonu için uygundur (Vijayakumar ve diğerleri, 2016). Pegile lipozom formülasyonu (PEG LP2, $-23,1$ mV) pegile olmayan formülasyona

göre (LP2, -14,7 mV) daha yüksek negatif zeta potansiyeli göstermiştir (Çizelge 4.25).

5.3.4. Gempitabin hidroklorür içeren LPHNP formülasyonlarına ait sonuçların değerlendirilmesi

LPHNP formülasyonlarında yapılan ön çalışmaların değerlendirilmesi

LPHNP formülasyonlarını hazırlamak için optimum nanopartikül ve optimum lipozom formülasyonu esas alınmıştır. LPHNP formülasyonlarında yapılan ön çalışmalarda nanoçöktürme ve modifiye çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemleri kullanılmıştır. Nanoçöktürme yöntemiyle hazırlanan formülasyon (Ö-LPHNP5) modifiye çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemleri ile hazırlanan formülasyonlara göre oldukça düşük enkapsülasyon etkinliği göstermiştir (%7,90±0,20) (Çizelge 4.27). Farklı modifiye çift emülsiyon yöntemleri kullanılarak hazırlanan formülasyonlardan Yöntem 2 (fosfotidilkolinin dış sulu faza ilave edildiği, Ö-LPHNP3 ve Ö-LPHNP4 formülasyonları) ile hazırlanan formülasyonların Yöntem 1 (fosfotidilkolinin organik faza ilave edildiği, Ö-LPHNP1 ve Ö-LPHNP2 formülasyonları) kullanılarak hazırlanan formülasyonlara göre daha büyük ortalama partikül büyüklüğü ve daha düşük enkapsülasyon etkinliği gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.27). Yöntem 1 ile hazırlanan formülasyonlar daha homojen partikül büyüklüğü dağılımı gösterirken (PDI değeri<0,3), Yöntem 2 ile hazırlanan formülasyonlarda PDI değeri yaklaşık 0,4 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde daha sonraki formülasyon çalışmalarında Yöntem 1 kullanılmasına karar verilmiştir.

Nanopartikül formülasyonlarında olduğu gibi LPHNP formülasyonlarında da PLGA 50:50 polimeri ile PLGA 65:35 formülasyonunu 1:1 (a/a) karışımı ile hazırlanan Ön. Den. LPHNP6 formülasyonunun enkapsülasyon etkinliği (%31,8) (Çizelge 4.28) sadece PLGA 50:50 polimeri kullanılarak hazırlanan Ö-LPHNP2'ye göre yüksek bulunmuştur (%24,5) (Çizelge 4.27). En yüksek enkapsülasyon etkinliği gösteren Ö-LPHNP6 formülasyonu pegile edilerek ve iki farklı liyoprotektan mannitol (Ö-LPHNP8) ve trehaloz (Ö-LPHNP9) kullanılarak formülasyonlar hazırlanmıştır. Enkapsülasyon etkinlikleri açısından iki liyoprotektan kullanılarak hazırlanan

formülasyonlar arasında bir farklılık gözlenmemiştir. Mannitol ile hazırlanan formülasyon $32,1 \pm 0,6$ bulunurken trehaloz ile hazırlanan formülasyon $33,6 \pm 1,0$ bulunmuştur ($p > 0,05$) (Çizelge 4.29). Mannitol ile hazırlanan formülasyonun (Ö-LPHNP8) ortalama partikül büyüklüğü 232 ± 24 nm iken trehaloz ile hazırlanan formülasyonun partikül büyüklüğü (Ö-LPHNP9) 213 ± 11 nm bulunmuştur. Trehaloz ile hazırlanan formülasyonun mannitol ile hazırlanan formülasyona göre daha küçük partikül boyutu ile daha düşük değerlerde PDI göstermesinde, düşük oranda su tutma yeteneğine sahip olmasının, kendi içerisinde hidrojen bağı bulundurmadığı için nanotaşıyıcı sisteme kolayca hidrojen bağı ile bağlanabilmesinin ve yüksek faz geçiş sıcaklığına sahip olmasının etkili olduğu düşünülmektedir (Abdelwahed ve diğerleri, 2006; Rampino ve diğerleri, 2013). Nem çekme kapasitesi yüksek olan mannitol gibi şekerler kullanıldığında çevredeki nemin de çekilmesiyle nanotaşıyıcı sistemin partikül boyutu daha da büyüyebilmektedir. Trehalozun camsı geçiş sıcaklığı mannitole göre daha yüksektir (Holzer ve diğerleri, 2009). Dadparvar ve ark. da albümin kullanılarak yaptıkları bir çalışmada hazırladıkları nanopartikül formülasyonlarına trehaloz ilave ettiklerinde ortalama partikül büyüklüğünü 224 nm, mannitol ilave ettiklerinde ise 274 nm bulmuşlardır (Dadparvar ve diğerleri, 2014). Formülasyon geliştirme çalışmalarına liyoprotektan olarak trehaloz ile devam edilmesine karar verilmiştir.

Deney tasarımı uygulanarak hazırlanan LPHNP formülasyonları

LPHNP formülasyonlarının hazırlanmasında DoE programı kullanılarak merkezi birleşik tasarım yöntemi ile 6 tanesi tekrarlanan merkez nokta, 6 tanesi aksiyal nokta ve 8 tanesi de faktöriyel noktalar olmak üzere toplam 20 formülasyon hazırlanmıştır. Bu formülasyonlarda % enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü ve 24 saat sonunda salınan % kümülatif etkin madde cevapları üzerine PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranı (A), % SPC/PLGA oranı (B) ve DSPE-PEG miktarı (C) bağımsız değişkenleri istatistiksel olarak (ANOVA) incelenmiştir. 2FI modelinin bağımsız değişkenlerin ve bunların ikili etkileşimlerinin cevapları tanımlamada en etkin model olduğu belirlenmiştir.

Hazırlanan LPHNP formülasyonlarında % enkapsülasyon etkinliği cevabı üzerine PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranı (A), % SPC/PLGA oranı (B), DSPE-PEG miktarının

(C) etkili olduğu bulunmuştur. % enkapsülasyon etkinliği cevabı (Y1) için model F değeri 89,5 ($<0,0001$) olmak üzere modelin etkili olduğu belirlenmiştir. Modelin determinasyon katsayısı 0,9764'dür. ANOVA tablosuna bakıldığında % enkapsülasyon etkinliği cevabı için AB, AC ve BC etkileşimleri önemli bulunmuştur (Çizelge 4.32). Modeli tanımlayan 2. derece polinomial eşitlik Eş. 4.1'de görülmektedir. Eş. 4.1'de (+) katsayılar bağımsız değişkenlerin model üzerine pozitif, (-) katsayılar bağımsız değişkenlerin negatif etkili olduğunu açıklamaktadır. Eşitlik 4.1'e göre (AB) ve (AC) etkileşimleri enkapsülasyon etkinliğini artırırken, (BC) etkileşiminin enkapsülasyon etkinliğini düşürdüğü görülmüştür (Eş. 4.1). Bu etkiler yüzey cevap grafiklerinde de görülmektedir (Şekil 4.17). Çizelge 4.32'de görülen F değerleri incelendiğinde katsayısı en yüksek olan % SPC/PLGA oranı parametresinin % enkapsülasyon etkinliği cevabı üzerinde en etkili parametre olduğu belirlenmiştir. Modelin uyum eksikliği (lack of fit) değerinin 0,05'den büyük çıkması % enkapsülasyon etkinliği (Y1) için hatanın anlamsız olduğunu göstermektedir.

LPHNP formülasyonlarında partikül büyüklüğü cevabı üzerine % SPC/PLGA oranı (B) ve DSPE-PEG miktarının (C) etkili olduğu bulunmuştur. Partikül büyüklüğü cevabı (Y2) için model F değeri 80,8 ($<0,0001$) olmak üzere modelin etkili olduğu belirlenmiştir. Modelin determinasyon katsayısı 0,9739'dur. ANOVA tablosuna bakıldığında partikül büyüklüğü cevabı için AB ve AC etkileşimleri önemli bulunmuştur (Çizelge 4.33). Modeli tanımlayan 2. derece polinomial eşitlik Eş. 4.2'de görülmektedir. Eşitlik 4.2'ye göre % SPC/PLGA oranı (B) ve DSPE-PEG miktarının artması (C) partikül büyüklüğünü artırırken (AB) ve (AC) etkileşimlerinin partikül büyüklüğünü düşürdüğü görülmüştür. Bu etkiler yüzey cevap grafiklerinde de görülmektedir (Şekil 4.18). Çizelge 4.33'de görülen F değerleri incelendiğinde katsayısı en yüksek olan DSPE-PEG miktarının partikül büyüklüğü cevabı üzerinde en etkili parametre olduğu belirlenmiştir. Modelin uyum eksikliği (lack of fit) değerinin 0,05'den büyük çıkması partikül büyüklüğü (Y2) için hatanın anlamsız olduğunu göstermektedir.

Hazırlanan LPHNP formülasyonlarında 24 saat sonunda kümülatif salınan madde yüzdesi cevabı üzerine PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranının (A) etkili olduğu belirlenmiştir. 24 saat sonunda kümülatif salınan madde yüzdesi cevabı (Y3) için

model F değeri 44,4 ($<0,0001$) olmak üzere modelin etkili olduğu bulunmuştur. Modelin determinasyon katsayısı 0,9535'dir. ANOVA tablosuna bakıldığında 24 saat sonunda % kümülatif salınan madde cevabı için BC etkileşimi önemli bulunmuştur (Çizelge 4.34). Modeli tanımlayan 2. derece polinomial eşitlik Eş. 4.3'de görülmektedir. Eşitlik 4.3'e göre PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranının (A) artması salınan madde yüzdesini artırırken, (BC) etkileşiminin % kümülatif salımı düşürdüğü görülmüştür. Bu etki yüzey cevap grafiklerinde de görülmektedir (Şekil 4.19). Çizelge 4.34'de görülen F değerleri incelendiğinde katsayısı en yüksek olan PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranının 24 saat sonunda kümülatif salınan madde yüzdesi cevabı üzerinde en etkili parametre olduğu belirlenmiştir. Modelin uyum eksikliği (lack of fit) değerinin 0,05'den büyük çıkması 24 saat sonunda % kümülatif salınan madde (Y3) için hatanın anlamsız olduğunu göstermektedir.

5.3.5. Nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarına ait in vitro salım çalışmalarının değerlendirilmesi

Gemsitabin hidroklorür yüklü nanopartikül formülasyonlarına ait sonuçlar

Nanopartikül formülasyonunda Franz difüzyon hücresi yöntemi ile diyaliz tüp yöntemi kıyaslanmıştır (Şekil 4.20). Her iki yöntem de benzer salım profilleri göstermiş ve salım çalışmalarına aynı anda çok sayıda örnek ile çalışabilme imkanı veren Franz difüzyon hücresi yöntemi ile devam edilmesine karar verilmiştir.

Farklı molekül ağırlıklarına sahip PLGA polimerleri kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının değerlendirilmesi

PLGA polimerinin laktik asit/glikolik asit oranı ile birlikte aynı zamanda molekül ağırlığının da salım profilini etkilediği literatürlerde belirtilmiştir (Makadia ve Siegel, 2011). Çalışmamızda ise PLGA 50:50 polimerinin farklı molekül ağırlığına sahip polimerleri ile hazırlanan formülasyonların salım profilleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4.21) ($p>0,05$). Bu durumun gözlenmesinde kullanılan polimerlerin molekül ağırlıklarının birbirine yakın olmasının etkili olduğu düşünülmektedir.

Farklı laktik asit/glikolik asit oranına sahip PLGA polimerleri kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının değerlendirilmesi

PLGA polimerinin içerisindeki laktik asit oranı arttıkça kümülatif salınan gempitabin hidroklorür yüzdesinin azaldığı belirlenmiştir ($p<0,05$). PLGA 50:50 (NP15), PLGA 65:35 (NP19) ve PLGA 75:25 (NP20) kullanılarak hazırlanan formülasyonlar 24 saat sonunda sırasıyla %94,0; %73,1 ve %57,5 oranında kümülatif salım göstermiştir (Şekil 4.22). NP15 formülasyonu diğer formülasyonlara göre daha düşük oranda laktik asit içermektedir ve bu durum polimeri daha hidrofilik yapmaktadır. Böylece polimer suyu daha çok çekip hızla parçalanabilmekte ve etkin maddeyi yüksek oranda salılabilmektedir (Stevanovic ve Uskokovic, 2009).

Çalışmamızda PLGA 50:50/PLGA 65:35 (NP21), PLGA 50:50/PLGA 75:25 (NP22) 1:1 (a/a) karışımından oluşan formülasyonların salım profilleri de karşılaştırılmıştır (Şekil 4.23). 24 saat sonunda NP21 formülasyonundan %81,5 NP22 formülasyonundan ise %72,4'lük etkin madde çıkışı gerçekleşmiştir. Pegile formülasyon olan PEG NP21 formülasyonu ise 24 saat sonunda pegile olmayan haline göre etkin maddeyi daha fazla saldıgı görülmüştür (%83,4). Az da olsa salınan miktarın artmasında hidrofilik karakterdeki PEG'e bağlanmış olan yüzeydeki etkin maddeler etkili olmuş olabilir. Li ve ark. yaptıkları bir çalışmada da benzer sonuçlar bulmuştur ve pegile formülasyonun sadece PLGA'dan oluşan formülasyona göre sıgır serum albüminini daha yüksek oranda saldıgını belirtilmiştir (Li ve diğerleri, 2001).

Gempitabin hidroklorür yüklü lipozom formülasyonlarına ait sonuçların değerlendirilmesi

Gempitabin hidroklorür yüklü lipozom formülasyonlarında SPC:kolesterol molar oranı (Şekil 4.24) ile farklı fosfatidilkolinler kullanılarak hazırlanan lipozom formülasyonlarının (Şekil 4.25) salım üzerine etkisi incelenmiştir. 24 saat sonunda SPC:kolesterol molar oranı 4:1 (LP1), 4:2 (LP2) ve 4:4 (LP3) olan formülasyonlardan sırasıyla %89,0; %86,7 ve %84,2'lik salım görülmüştür ($p>0,05$). Artan kolesterol molar oranına bağlı olarak salınan etkin madde yüzdesinin

azalmasında kolesterolün lipozom membranının hidrofobitesini artırmasının etkili olduğu düşünülmektedir (Briuglia ve diğerleri, 2015).

Farklı yağlar kullanılarak hazırlanan ve pegile edilen lipozom formülasyonları LP2 (SPC), LP4 (DOPC), LP5 (DPPC) ve PEG LP2 (SPC) 24. saatin sonunda sırasıyla %86,7 %97,5; %94,9 ve %91,9'luk kümülatif salım göstermiştir (Şekil 4.25). DOPC kullanılarak hazırlanan LP4 formülasyonu SPC (LP2) ve DPPC (LP5) kullanılarak hazırlanan formülasyonlara göre daha fazla salım göstermiştir. En düşük kümülatif salım oranı ise SPC kullanılarak hazırlanan LP2 formülasyonunda görülmüştür. Bu sonuçların elde edilmesinde DOPC'nin faz geçiş sıcaklığının diğer iki fosfatidilkolin türüne göre düşük olmasının (0°C'nin altında) etkili olduğu düşünülmektedir. SPC'nin faz geçiş sıcaklığı yaklaşık 45°C iken, DPPC'nin faz geçiş sıcaklığı ise yaklaşık 41°C'dir. Lipit membranın faz geçiş sıcaklığının düşük olması membranın daha yumuşak bir yapıya sahip olmasına neden olur. DOPC ile hazırlanan formülasyondan gemitabin hidroklorürün salımının SPC ve DPPC ile hazırlanan formülasyonlara göre daha yüksek olmasında DOPC'nin sahip olduğu düşük faz geçiş sıcaklığının etkili olduğu düşünülmektedir. Chen ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada da lipozom formülasyonu içerisindeki hidrojen soya fosfatidilkolin miktarı arttıkça (daha yüksek faz geçiş sıcaklığına sahip) DPPC miktarı artan formülasyona göre (daha düşük faz geçiş sıcaklığına sahip) etkin madde kalseinin salımının azaldığı belirtilmiştir (Chen ve diğerleri, 2013).

Gemitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonlarına ait sonuçların değerlendirilmesi

Çalışmamızda deney tasarımı sonucu elde edilen merkez noktalara (Şekil 4,26), aksiyal noktalara (Şekil 4.27) ve faktöriyel noktalara ait (Şekil 4.28) formülasyonların salım profilleri belirlenmiştir. Merkezi birleşik deney tasarımında deneysel işlemlerdeki hatayı (pure error) hesaplayabilmek amacıyla merkez noktalar eklenmiştir. Merkez noktalara ait formülasyonların salımları incelendiğinde (LPHNP1 - LPHNP6 arası formülasyonlar) 24 saat sonunda %55,6 ile %60,1 arasında kümülatif salım görülmüştür. Şekil 4.26'da görüldüğü gibi 6 merkez noktasına ait formülasyonların salım profillerinin üst üste gelmesi deneysel işlemlere bağlı olan hatanın çok düşük olduğunu göstermektedir.

LPHNP formülasyonlarında ANOVA analizleri sonucu PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranının etkin maddenin salımını önemli derecede etkilediği belirlenmiştir (Çizelge 4.34). Aksiyal noktalar LPHNP7-LPHNP12 arasındaki formülasyonları kapsamaktadır. Şekil 4.27'deki aksiyal noktalara ait formülasyonların salım profili incelendiğinde PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranı en yüksek (LPHNP7) ve en düşük (LPHNP10) olan formülasyonlar arasında belirgin farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Aksiyal noktalar her üç faktör için merkezi birleşik deney tasarımının vermiş olduğu maksimum (+ α), minimum (- α) ve orta (0) değerleri ifade eden formülasyonlardan oluşmaktadır. LPHNP7 formülasyonunda PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranı en yüksektir (1,84) ve bu formülasyon diğer aksiyal noktalara ait formülasyonlara göre 24 saat sonunda yüksek oranda etkin madde çıkışı göstermiştir (%73,4). Aksiyal noktalardan PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranı en düşük olan (0,16) LPHNP10 formülasyonunda ise 24 saat sonunda sadece %40,9'luk gemitabin hidroklorür salımı görülmüştür. Dolayısıyla PLGA 50:50/65:35 karışımı içerisindeki PLGA 65:35 oranının artması salımı yavaşlatmıştır. Bunda PLGA 65:35'in PLGA 50:50'ye göre daha hidrofobik yapıda olmasının ve parçalanmasının daha uzun sürmesinin etkili olduğu düşünülmektedir. LPHNP8, LPHNP9, LPHNP11 ve LPHNP12 formülasyonlarında PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranı birbirine eşit ve 1'dir. Bu formülasyonların 24 saat sonunda kümülatif salınan madde yüzdeleri istatistiksel olarak benzer bulunmuştur ($p>0,05$) (Şekil 4.27).

Faktöriyel noktaların oluşturduğu formülasyonlar (LPHNP13-LPHNP20 arasındaki) bağımsız değişkenler için kendi belirlediğimiz minimum (-1) ve maksimum (+1) noktaları içermektedir. Deney tasarımı sonucu elde edilen faktöriyel noktalara ait formülasyonlardan PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranı 0,5 olan formülasyonların (LPHNP13 %39,7; LPHNP14 %58,9; LPHNP15 %58,4 ve LPHNP16 %46,0) etkin maddeyi 24 saat sonunda düşük oranda saldıkları görülürken, PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranı 1,5 olan formülasyonların (LPHNP17 %62,3; LPHNP18 %73,9; LPHNP19 %73,7 ve LPHNP20 % 68,1) etkin maddeyi daha yüksek oranda saldıkları görülmüştür. Bu sonucun görülmesinde polimer karışımı içerisindeki hidrofilik karakteri daha yüksek olan PLGA 50:50 polimerinin oranının artmasının etkili olduğu düşünülmektedir (Şekil 4.28).

Gemsitabin hidroklorür çözeltisi ve optimum formülasyonlara ait salım profillerinin değerlendirilmesi

Gemsitabin hidroklorür çözeltisi ve pegile nanopartikül, lipozom ve optimum LPHNP formülasyonlarına ait salım profilleri Şekil 4.29'da gösterilmiştir. Gemsitabin hidroklorür çözeltisinin 6 saat sonunda tamamının reseptör kompartmanda toplandığı görülmüştür. Gemsitabin hidroklorür yüklü pegile lipozom (PEG LP2), nanopartikül (PEG NP21) ve LPHNP (LPHNP17) formülasyonları yaklaşık 2 saatlik ani salımı takiben daha yavaş bir salım göstermiş ve bifazik salım profilleri elde edilmiştir. Literatürlerde de gemsitabin hidroklorür yüklü lipozom ve nanopartikül formülasyonlarından bifazik salım profili elde edildiği belirtilmektedir (Cosco ve diğerleri, 2012; Martín-Banderas ve diğerleri, 2013). 2 saat sonunda PEG LP2, PEG NP21 ve LPHNP17 formülasyonlarından etkin madde salımı sırasıyla %47, %53 ve %36 bulunmuştur. Tüm formülasyonlarda görülen ani salımda taşıyıcı sistemlerin yüzeyine adsorbe olan etkin maddelerin etkili olduğu düşünülmektedir. 24 saat sonunda ise PEG LP2, PEG NP21 ve LPHNP17 formülasyonlarından etkin madde salımı sırasıyla %91,9; %83,4 ve %62,3 bulunmuştur. Nanopartikül formülasyonunda 24 saate kadar devam eden yavaş ve sürekli salımda etkin maddenin difüzyonunun ve polimerin parçalanmasının etkili olduğu (Holgado ve diğerleri, 2008), lipozom formülasyonundaki yavaş ve sürekli salımdan ise etkin maddenin lipit tabakadan difüzyonunun etkili olduğu (Bian ve diğerleri, 2015) düşünülmektedir. LPHNP formülasyonunda ise etkin maddenin salımında öncelikle etkin maddenin polimerden ve lipit tabakadan difüzyonu daha sonra ise difüzyonla birlikte polimerin parçalanması sonucu etkin maddenin açığa çıkması etkilidir. Lipozom formülasyonunda nanopartikül formülasyonuna göre daha yüksek oranda salım elde edilmesinde, lipozomun yüksek oranda parçalanıp etkin maddeyi açığa çıkarması, buna karşılık polimerik nanopartikülün parçalanmasının daha geç olmasının etkili olduğu düşünülmektedir. LPHNP formülasyonunda ise en düşük oranda salım görülmesinde lipit ve PEG tabakasının etkin maddeyi çekirdek içerisinde daha uzun süre tutmasının etkili olduğu düşünülebilir (Zhang ve diğerleri, 2008). Nanopartikül formülasyonuna (PEG NP21) göre SPC ve DSPE-PEG tabakasına sahip olan LPHNP formülasyonunun (LPHNP17) salımı daha yavaştır. Çalışmamızdan elde edilen ANOVA analizi sonuçları da % SPC/PLGA oranı X

DSPE-PEG oranının (BC) etkileşiminin salımı yavaşlattığını göstermektedir (Eş 4.3).

PEG LP2, PEG NP21 ve LPHNP17 formülasyonlarının salım kinetikleri incelendiğinde r^2 , AIC ve MSC değerleri açısından üç formülasyonda Weibull ve Korsmeyer-Peppas salım modellerine uyum gösterdiği belirlenmiştir. Salım modelinin uygunluğunun belirlenmesinde r^2 ve MSC değerinin büyük, AIC değerinin küçük olması önemlidir. Formülasyonların Weibull modeli için β değerleri ve Korsmeyer-Peppas modeli için n değerleri hesaplanmıştır. Formülasyonların β değeri 0,75 ile 1 arasındadır (Çizelge 4.36). β değerinin 0,75 ile 1 arasında olması etkin maddenin salımında difüzyonla beraber taşıyıcı sistemin parçalanmasının etkili olduğunu göstermektedir (Papadopoulou ve diğerleri, 2006). Formülasyonların n değerleri ise 0,45 ile 0,89 arasında bulunmuştur. Korsmeyer-Peppas modeline göre n değerinin 0,45 ile 0,89 arasında olması da non Fickian difüzyonun görüldüğünün yani etkin maddenin taşıyıcı sistemden difüzyonu ve taşıyıcı sistemin parçalanmasının salım üzerinde etkili olduğunu göstermektedir (Pimple ve diğerleri, 2012). Formülasyonların hem β hem de n değerleri birbirini desteklemektedir.

5.3.6. Stabilite çalışmaları

İn vitro stabilite deneylerine ait bulguların değerlendirilmesi

Gemsitabin hidroklorür yüklü nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarının 4°C, 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamlarında 12 ay ve 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamlarında 6 ay süreyle bekletilmiş ve stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Nanopartikül ve LPHNP formülasyonları partikül büyüklüğü açısından 4°C sıcaklıkta 9 ay stabil kalırken, lipozom formülasyonlarının ise 3 ay stabil kaldığı görülmüştür ($p>0,05$). 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamında başlangıç partikül boyutları yaklaşık 200 nm olan optimum nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarının 12 ay sonunda sırasıyla 341 nm, 991 nm ve 334 nm ortalama partikül büyüklüğüne sahip oldukları gözlenmiştir (Çizelge 4.38, Çizelge 4.41 ve Çizelge 4.44). 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamında 6 ay sonunda nanopartikül formülasyonu 360 nm, lipozom formülasyonu 1294 nm ve LPHNP formülasyonu ise 336 nm ortalama partikül

büyükülüğü göstermiştir. LPHNP formülasyonu ve nanopartikül formülasyonu 4°C sıcaklık ve 25±2°C/%60±5 bağıl nem şartlarında partikül büyüklükleri açısından benzer stabilite gösterirken, lipozom formülasyonuna göre bu saklama şartlarında daha stabil oldukları gözlenmiştir.

Formülasyonlardaki % kalan ilaç oranları incelendiğinde 4°C sıcaklıkta tüm formülasyonların 25±2°C/%60±5 bağıl nem ve 40±2°C/%75±5 bağıl nem saklama şartlarına göre daha stabil kaldığı gözlenmiştir. 4°C sıcaklıkta nanopartikül formülasyonunda yaklaşık 9 ay ve lipozom formülasyonunda ise yaklaşık 6 ay sonunda % kalan ilaç %50 civarındadır. LPHNP formülasyonunda ise 4°C sıcaklıkta 12 ayın sonunda %80'nin üzerinde ilacın formülasyon içerisinde kaldığı görülmüştür (Çizelge 4.43). LPHNP formülasyonunun 4°C ve 25±2°C/%60±5 bağıl nem şartlarında gerçekleştirilen stabilite deneylerinde hem lipozom hem de nanopartikül formülasyonuna göre % kalan etkin madde içeriğinin daha fazla olduğu görülmektedir. Birinci derece kinetiğe göre gemesitabin hidroklorür bozunması gözlemlenen nanotaşıyıcı sistemlerde 4°C'de saklanan LPHNP formülasyonunun raf ömrü 7 ay iken, nanopartikül formülasyonunun raf ömrü 1,6 ay, lipozom formülasyonun raf ömrü 1,3 ay bulunmuştur. 25±2°C/%60±5 bağıl nem ve 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamında her üç ilaç taşıyıcı sisteminde raf ömürlerinin 4°C'deki raf ömürlerine göre düştüğü gözlenmiştir (Çizelge 4.46). 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamında tüm formülasyonların hem partikül büyüklüğü hem de kalan ilaç yüzdeleri açısından stabilitelerini çok çabuk kaybettikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.39, Çizelge 4.42 ve Çizelge 4.45). 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamında her üç ilaç taşıyıcı sistemin raf ömrü yaklaşık 0,5 ay bulunmuştur. Tüm saklama şartlarında lipozom formülasyonu nanopartikül ve LPHNP formülasyonuna göre daha düşük stabilite göstermiştir. Tüm stabilite şartlarında LPHNP formülasyonun nanopartikül ve lipozom formülasyonuna göre raf ömrünün daha uzun olması ve yüzde kalan ilaç miktarının daha yüksek olmasında LPHNP sistemdeki çekirdek kabuk yapısının taşıyıcı sistem stabilitesinin artmasında etkili olduğu düşünülmektedir (Hadinoto ve diğerleri, 2013).

Formülasyonların in vivoyu taklit eden farklı ortamlardaki stabilite testlerinin değerlendirilmesi

Nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonları %100 fosfat tamponu içerisinde daha uzun süre partikül büyüklüğü açısından stabil kalırken, %100 fetal bovin serumu ortamında partikül büyüklükleri kısa sürede artmıştır. %100 fetal bovin serumu ortamında nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarının başlangıçtaki partikül büyüklükleri sırasıyla 208 nm, 217 nm ve 248 nm bulunmuştur. %100 fetal bovin serumu ortamında 5 gün bekletildikten sonra nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarının partikül boyutu sırasıyla 354 nm, 1520 nm ve 616 nm olarak bulunmuştur. Lipozom ve LPHNP formülasyonlarındaki partikül büyüklüğü artışının fazla olmasında fetal bovin serumu içerisindeki proteinlerin lipid yapısına adsorbe olmasının taşıyıcı sistemlerin agregasyonuna neden olduğu düşünülmektedir (Jones ve Nicholas, 1991).

5.3.7. Formülasyonların morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesi

Formülasyonların TEM görüntüleri

Ön deneme nanopartikül formülasyonlarının TEM görüntüleri

Nanopartiküllere ait ön çalışmalarda iç sulu fazda yüzey etkin madde olarak PVA 31-50 kDa kullanılan formülasyon (Ö-NP5) ve iç sulu fazda Lutrol F-68 kullanılan formülasyonun (Ö-NP6) TEM görüntüleri Resim 4.2’de gösterilmiştir. Bu görüntülerden de anlaşılacağı üzere iç sulu fazda Lutrol F-68 kullanılan formülasyon daha büyük partikül büyüklüğüne sahiptir ve partikül büyüklüğü dağılımı kötüdür. Bu sonuçlar Malvern Zetasizer ile elde edilen partikül büyüklüğü ve dağılımı sonuçları ile de uyumludur (Çizelge 4.14).

Nanopartikül formülasyonlarının stabilite deneylerine ait TEM görüntüleri

Nanopartikül formülasyonu (PEG NP21) TEM görüntülerinden anlaşılacağı üzere yuvarlak ve birbiriyle agregat olmamıştır (Resim 4.3). Nanopartiküllerin etrafındaki açık renkteki yapının PEG tabakası olduğu düşünülmektedir. Stabilite deneylerinde

başlangıçta içlerinin dolu olduğu görülen taneciklerin $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ bağıl nem ortamında 6 ay ve $40\pm 2^{\circ}\text{C}/\%75\pm 5$ bağıl nem ortamında 3 ay bekletildikten sonra ki TEM görüntülerinden anlaşılabacağı üzere içlerinin kısmen boşaldığı görülmüştür (Resim 4.4). Bu durum stabilite deneylerinden elde edilen % kalan ilaç sonuçları ile de uyumludur (Çizelge 4.38 ve Çizelge 4.39).

Lipozom formülasyonlarının stabilite deneylerine ait TEM görüntüleri

Lipozom formülasyonuna (PEG LP2) ait TEM görüntüleri Resim 4.3'de görülmektedir. Lipozom formülasyonlarının etrafında da PEG tabakası gözlenmiştir. Stabilite deneylerinde başlangıçta içlerinin dolu olduğu görülen lipozomların $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ bağıl nem ortamında 6 ay ve $40\pm 2^{\circ}\text{C}/\%75\pm 5$ bağıl nem ortamında 3 ay bekletildikten sonra ki TEM görüntülerinden anlaşılabacağı üzere içlerinin kısmen boşaldığı belirlenmiştir (Resim 4.7). Ancak $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ bağıl nem ortamında 12 ay bekledikten sonra elde edilen görüntülerde taneciklerin içlerinin neredeyse tamamen boşaldığı görülmektedir. $40\pm 2^{\circ}\text{C}/\%75\pm 5$ bağıl nem ortamında 6 ay bekletildikten sonra lipozomların agrege olduğu ve yapılarının oldukça bozulduğu gözlenmiştir (Resim 4.8).

Ön deneme LPHNP formülasyonlarının TEM görüntüleri

LPHNP formülasyonlarına ait ön çalışmalarda SPC'nin organik fazda yer almasının partikül büyüklüğü ve dağılımı için daha elverişli olduğu TEM görüntüleri ile ispatlanmıştır (Resim 4.9). SPC'nin dış sulu faza ilave edilmesiyle hazırlanan formülasyonlarda (Ö-LPHNP4) partiküllerin agrege olduğu ve yuvarlak yapıya sahip olmadıkları gözlenmiştir. Bu sonuçlar Malvern Zetasizer ile elde edilen partikül büyüklüğü ve dağılımı sonuçları ile de uyumludur.

LPHNP formülasyonlarının stabilite deneylerine ait TEM görüntüleri

LPHNP formülasyonuna (LPHNP17) ait TEM görüntüleri incelendiğinde yaklaşık 200 nm boyutunda, yuvarlak, agrege olmamış taneciklerin elde edildiği görülmektedir (Resim 4.10). Taneciklerin etrafında yaklaşık 15 nm kalınlığa sahip PEG tabakasının varlığı belirlenmiştir. $40\pm 2^{\circ}\text{C}/\%75\pm 5$ bağıl nem ortamında 3 ay

bekletildiğinde taneciklerinin içlerinin boşaldığı ve yuvarlak yapısını kaybettiği gözlenmiştir.

Nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarının TEM görüntüleri ile DLS yöntemiyle ölçüm yapan Malvern Zetasizer aletiyle elde edilen ortalama partikül boyutu verileri iyi bir uyum göstermektedir. TEM görüntülerinde DLS yöntemine göre az bir farkla da olsa daha küçük partiküllerin varlığı gözlenmiştir. Bu duruma DLS yönteminde hidrodinamik boyut ölçümünün gerçekleşmesinin ve DLS yönteminde kuru haldeki örnekten ölçüm yapan TEM'e göre genellikle daha büyük değerlerin elde edilmesinin etkili olduğu düşünülmektedir (Hou ve diğerleri, 2017).

Resim 4.13 ve Resim 4.14'de görüldüğü üzere 4°C ve 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamında 6 ay bekletilen formülasyonlardan nanopartikül ve LPHNP formülasyonları akıcılıklarını koruduğu, lipozom formülasyonunun ise agregate olduğu ve akıcılığını kaybettiği belirlenmiştir.

Formülasyonların SEM görüntüleri

Liyoprotektan içeren nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarında SEM görüntüleri alınamamıştır. Bu durumun önüne geçmek için liyoprotektan içermeyen formülasyonlar hazırlanmış, kurutulmuş ve SEM görüntüleri çekilmiştir. Nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarının yüzeylerinin pürüzsüz olduğu ve genellikle yuvarlak yapıya sahip oldukları belirlenmiştir (Resim 4.15-Resim 4.17).

5.4. Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Sonuçlar

5.4.1. Sitotoksikite testi (MTT) sonuçlarının değerlendirilmesi

Gemsitabin hidroklorür çözeltisi, ticari ürün Gemko® çözeltisi, süspande haldeki gemsitabin hidroklorür yüklü nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarının sitotoksikite testleri için MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri kullanılmıştır. Bu hücreler farklı antikanser maddeleri içeren çözeltilerin sitotoksikite testlerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Seeger ve diğerleri, 2004; Abu ve diğerleri, 2013). MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan tüm

formülasyonlarda artan konsantrasyonlara (0,01 μM 'dan 1000 μM 'a kadar) karşı ölen hücre sayısı artmıştır (Resim 4.18-Resim 4.27). Bu konsantrasyonlar literatürde gemitabin hidroklorür yüklü PLGA nanopartikül formülasyonu ve çözelti formu için kullanılan konsantrasyonlarla uyumludur (Joshi ve diğerleri, 2014).

Etkin madde içermeyen nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonları MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine uygulandığında formülasyonların tek başlarına sitotoksik etki göstermedikleri belirlenmiştir (Şekil 4.48). MCF-7 hücrelerine 1 μM konsantrasyonda Gemko®, gemitabin hidroklorür, nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonları uygulandığında canlı hücre yüzdeleri sırasıyla %61,8; %69,4; %48,7; %51,0 ve %38,7 olarak bulunmuştur (Şekil 4.49). MDA-MB-231 hücrelerine 1 μM konsantrasyonda Gemko®, gemitabin hidroklorür, nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonları uygulandığında canlı hücre yüzdeleri sırasıyla %66,7; %65,7; %42,3; %43,6 ve %34,3 olarak bulunmuştur (Şekil 4.50). Her iki hücrede de 1000 μM konsantrasyonda formülasyonlar uygulandığında canlı hücre yüzdesinin yaklaşık %10 civarında olduğu belirlenmiştir.

MCF-7 (Şekil 4.51) ve MDA-MB-231 (Şekil 4.52) hücrelerine uygulanan formülasyonlardan nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarının Gemko® ve gemitabin hidroklorür çözeltisine göre çok daha düşük IC_{50} değerlerine sahip olduğu gözlenmiştir ($p < 0,0001$). Nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarında aynı dozda daha yüksek sitotoksik etki elde edilmesinde formülasyonların pegile edilmesi sonucu etkin maddenin etkinliğinin artmasının (Mehrabi ve diğerleri, 2016) ve nanoboyuttaki taşıyıcı sistemlerin hücre içine geçişi artırmasının etkili olduğu düşünülmektedir (Gandhi ve diğerleri, 2015; Kadari ve diğerleri, 2017). Bu sonuçlar literatür verileriyle de uyum göstermektedir. Vandana ve Sahoo'nun yaptıkları bir çalışmada da pankreas kanseri hücreleri MIA PaCa 2 ve PANC 1 hücrelerinde pegile gemitabinin, pegile olmayan haline göre aynı konsantrasyonlarda uygulandığında daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Vandana ve Sahoo, 2010).

5.4.2. Formülasyonların hücre içine geçiş deneyleri

Floresan görüntülerinin değerlendirilmesi

Etkin madde içermeyen kumarin-6 yüklü nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarının MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin çekirdekleri (DAPI ile mavi renge boyanmış) etrafında biriktikleri floresan mikroskobu görüntüleri ile belirlenmiştir (Resim 4.29-Resim4.31). Bulgular nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarının hücre içine geçişi arttırdığının ve kanser tedavisinde hücreye yönelik hedeflemede kullanılabileceğini göstermektedir. Çözelti halindeki kumarin-6 ise MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine uygulandığında çok az sinyal alınmıştır (Resim 4.28).

Floresan şiddetinin ölçülmesi

Etkin madde içermeyen kumarin-6 yüklü nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonları hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücrelerinde birbirine yakın floresan şiddetleri göstermiştir ve formülasyonlar arasında istatistiksel açıdan fark olmadığı görülmüştür ($p>0,05$) (Şekil 4.53). Lipozom formülasyonu hem nanopartikül hem de LPHNP formülasyonuna göre daha düşük floresan şiddeti göstermesinde lipozomların kumarin-6 floresan maddesini diğer formülasyonlara göre daha hızla salmasının etkili olduğu düşünülmektedir. LPHNP formülasyonu ise hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücrelerinde yüksek floresan şiddeti göstermiştir. Bu durumun görülmesinde de LPHNP formülasyonun kumarin-6'yı daha uzun süre taşıyıcı sistem içerisinde tutabilmesinin etkili olduğu düşünülmektedir. Kumarin-6 çözeltisi ise oldukça düşük floresan şiddeti göstermiştir ve bu sonuç floresan görüntüleri ile de uyumludur. Akbari ve Wu da yaptıkları hücre içine geçiş çalışmalarında kumarin-6 çözeltisi ile anlamlı sinyal alamadıklarını bildirmiştir (Akbari ve Wu, 2016). Bir başka çalışmada ise Acharya ve ark. kumarin-6 yüklü PLGA nanopartikül formülasyonunun kumarin-6 çözeltisine göre MCF-7 hücrelerinde nanotaşıyıcı sistemin hücre içine geçişi arttırmasına bağlı olarak çok daha yüksek floresan şiddeti gösterdiğini belirtmiştir (Acharya ve diğerleri, 2009).

Formülasyonlardan etkilenen hücre sayısının belirlenmesi

Bu çalışmada nanotaşıyıcı sistemlerin zamana karşı etkilenen hücre oranları incelenmiştir. Etkin madde içermeyen kumarin-6 yüklü nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonlarının 15. dakikadan itibaren MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin neredeyse tamamına girdikleri belirlenmiştir. Her iki hücrede de 15. dakika, 1. saat ve 4. saat arasında istatistiksel açıdan bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Sonuçlar kullanılan nanotaşıyıcı sistemlerin en geç 15 dakika içerisinde hücreleri etkilediğini göstermektedir.

5.5. Ticari Ürün Gemko® ve Gemsitabin Hidroklorür Yüklü LPHNP Formülasyonları ile Yapılan İn Vivo Çalışmalar

Yaklaşık 200 gram ağırlığında Sprague Dawley cinsi dişi sıçanlara 50 mg/kg dozda nitrozo metil üre (NMU) verilerek meme kanseri modeli oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu hayvanlarda meme kanseri modeli geliştirilemeyince imbred dişi Sprague Dawley sıçanlara doğumlarının 21. gününde 50 mg/kg dozda NMU intaperitonel olarak uygulanmıştır. İmbred hayvanlar aynı soydan gelmektedir ve kanser çalışmalarında kullanılmaktadır. Yaklaşık 3 ay sonra bu hayvanların % 60'ında meme kanseri geliştiği belirlenmiştir.

5.5.1. Hayvanların ağırlıklarının değişimi

Sıçanlara 200 mm³ tümör hacmine sahip olduklarında tedaviye başlanmıştır. Bu hayvanların tedavi başlangıcında ağırlıklarının yaklaşık 200 gram olduğu belirlenmiştir. Uygulamalar sonrasında kontrol, 5 mg/kg Gemko®, 5 mg/kg LPHNP ve 10 mg/kg LPHNP gruplarının ağırlıklarında artış gözlenmiştir (Şekil 4.56). 50 mg/kg Gemko® grubundaki hayvanlar ise 4. veya 5. uygulama sonrası aşırı ağırlık kaybıyla beraber öldükleri belirlenmiştir. 50 mg/kg Gemko® dozu insan dozundan hayvan dozuna çevrilerek bulunmuş olup (Nair ve Jacob, 2016), literatürdeki uygulamalarla benzerdir (Paolino ve diğerleri, 2010). Bu gruptaki hayvanların ölmesinde tedavinin yan etkiler oluşturmalarının ve imbred hayvanların hassas yapıya sahip olmalarının etkili olduğu düşünülmektedir. 50 mg/kg dozda Gemko®

uygulanan hayvanlarda tüy dökülmesi ve yaklaşık olarak 3. uygulama sonrası diyare de görülmüştür. Bu yan etkiler diğ r gruptaki hayvanlarda gözlenmemiştir.

5.5.2. Tümör hacimlerinin değişimi

Hayvanlarda meme tümör hacmi 200 mm³ olduğunda tedaviye başlanmıştır. 5 mg/kg LPHNP grubundaki hayvanların ortalama tümör hacimleri tedavi sonrasında 276 mm³ olmuştur ve bu değer başlangıç tümör hacmi (yaklaşık 200 mm³) ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık göstermemiştir ($p>0,05$) ancak hayvanlarda tümör b y mesininin yavaşladığı belirlenmiştir. 5 mg/kg LPHNP grubundaki hayvanların tümör büyümesindeki yavaşlama tedavi sonrası kontrol grubu ve 5 mg/kg Gemko[®] grubundaki hayvanlarda gözlemlenen tümör hacimlerinin karşılaştırılmasıyla anlaşılmaktadır. 10. uygulama sonrası kontrol grubu ve 5 mg/kg Gemko[®] grubundaki hayvanların ortalama tümör hacimlerinin sırasıyla 1064 mm³ ve 846 mm³ olduğu belirlenmiştir ve istatistiki açıdan tümör hacimlerinin arttığı g r lm ştir ($p<0,05$). Tedavi sonrası 50 mg/kg Gemko[®] grubundaki hayvanların ortalama tümör hacimleri 98 mm³'e düşmüş olsa da bu gruptaki hayvanların yaklaşık 5. uygulama sonrası öldükleri gözlenmiştir. 10 mg/kg LPHNP grubundaki hayvanların ortalama tümör hacmi ise 30 günün sonunda 108 mm³'e d şm ştir bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Tümör hacminin hiçbir grupta sıfırlanmamasında uygulanan tedavinin sadece 1 ay devam etmesinin etkili olduğu düşünülmektedir. İnsanlarda gemitabin hidroklorür ile yapılan kanser tedavisinde 2 haftalık uygulama sonrasında 1 hafta ara verilmekte ve bu aradan sonra 2. k rle tedaviye devam edilmektedir. Sonuçlar LPHNP ile uygulanan tedavinin ticari  r n Gemko[®]'ya göre düşük dozda daha etkili olduğunu göstermektedir. Paolino ve ark. yaptıkları bir çalışmada da benzer sonuçlar elde etmiş hazırladıkları gemitabin hidroklorür yüklü lipozom formülasyonlarının ticari preparat Gemzar[®]'a göre 10 kat daha düşük dozda kanser tedavisinde benzer etkinlik gösterdiğini belirtmiştir (Paolino ve diğerleri, 2010).

5.5.3. Histopatolojik alışmalar

NMU uygulayarak hayvanlarda meme kanseri modeli oluşturulmaya çalışılmıştır. Uygulamadan yaklaşık 3 ay sonra hayvanların meme bölgesinde oluşan şişlikten

örnek alınmış bu yapının tümör olup olmadığı incelenmiştir. Histopatolojik inceleme sonucu nekroza bağlı kistik duktusların gözlenmesi (Resim 4.35) ve apoptoz ile mitoz bölünmenin aynı anda gerçekleşmesi meme kanseri modelinin oluşturulduğunu göstermiştir (Resim 4.36).

10 mg/kg LPHNP uygulanan gruptaki hayvanlardan tedavi sonrası alınan meme dokusu örneğindeki kistik dejenerasyona uğramış bölge tedavinin kısmen gerçekleştiği, meme karsinomunun varlığı ise tümörün sıfırlanmadığını göstermektedir (Resim 4.37-Resim 4.38).

5.5.4. Farmakokinetik çalışmalar

Farmakokinetik veriler değerlendirildiğinde AUC ve C_{max} değerlerinin LPHNP formülasyonunda ticari ürün Gemko®'ya göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Gemsitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonunun eğri altında kalan alanı ($AUC_{0-∞}$) 25262 ng*saat/mL bulunmuş ticari ürün Gemko®'nın ise 3744 ng*saat/mL bulunmuştur (Çizelge 4.56). LPHNP formülasyonunun Gemko®'ya göre eğri altında kalan alanları kıyaslandığında yaklaşık 6,8 katlık artış gösterdiği görülmüştür. LPHNP formülasyonu için ortalama C_{max} değeri 1594 ng/mL iken, ticari ürün için 652 ng/mL bulunmuştur. Gemko® 1 saatte maksimum konsantrasyona ulaşırken (t_{max}) LPHNP formülasyonunun t_{max} değeri 4 saattir. LPHNP formülasyonunda Gemko®'ya göre yüksek C_{max} ve t_{max} değerleri elde edilmesinde nanotaşıyıcı sistemin etkin maddeyi enzimatik ataklardan korumasının ve LPHNP formülasyonunun pegile yapısının nanotaşıyıcı sistemin dolaşımında daha uzun süre kalmasını sağlamasının etkili olduğu düşünülmektedir.

Gemsitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonu ticari ürüne göre 4,2 kat düşük uzaklaşma hız (k_d) sabitine sahiptir. Uzaklaşma hız sabitinin daha düşük olmasında etkin maddenin nanotaşıyıcı sistemden çözelti halindeki ticari ürüne göre daha uzun sürede salınmasının etkili olduğu düşünülmektedir (Shavi ve diğerleri, 2016). LPHNP formülasyonu Gemko®'ya göre daha uzun MRT (4 kat) ve daha uzun yarılanma ömrüne ($t_{1/2}$) (4 kat) sahiptir. Bu sonuçların elde edilmesinde hidrofilik yapıdaki PEG'in LPHNP formülasyonunun kan proteinleriyle etkileşimini azaltarak daha uzun süre dolaşım sisteminde kalmasını sağlaması etkili olmuş olabilir (Kumar

ve diğlerleri, 2013). Benzer sonuçları gemitabin hidroklorür yüklü PLGA nanopartikül hazırlayıp oral yoldan sıçanlara uygulayan Joshi ve ark.'da bulmuştur (Joshi ve diğlerleri, 2014). Joshi ve ark. bu çalışmada aynı dozda oral yoldan gemitabin hidroklorür yüklü PLGA nanopartikül ve gemitabin hidroklorür çözeltisini hayvanlara uyguladıklarında taşıyıcı sistemin yarılanma ömrünün ve AUC değerin gemitabinin çözelti haline göre arttığını belirtmiştir. Sonuç olarak gemitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonu ticari preparat Gemko®'ya göre daha iyi farmakokinetik profil göstermiştir.

6. SONUÇ

Tez çalışması sonucunda; meme kanseri tedavisinde kullanılmak üzere gemitabin hidroklorür içeren lipozom, nanopartikül ve bu iki taşıyıcı sistemi birlikte içeren LPHNP formülasyonları geliştirilmiştir. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır:

- ✓ Formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddeler ile etkin maddenin fiziksel karışımı sonucu elde edilen DSC termogramlarından etkin madde ile yardımcı maddelerin geçimli olduğu anlaşılmıştır.
- ✓ İn vitro ve in vivo analizlerde kullanılan yöntemlerin gemitabin hidroklorürün miktar tayini için uygun yöntemler olduğu görülmüştür.
- ✓ Gemitabin hidroklorür yüklü nanopartikül formülasyonlarında kullanılan organik çözücü/çözücü karışımının, polimerin miktarının, molekül ağırlığının, laktik asit/glikolik asit oranının ve sahip olduğu terminal fonksiyonel grubun enkapsülasyon etkinliğini ve partikül büyüklüğünü etkilediği belirlenmiştir.
- ✓ Farklı soya fosfotidilkolin:kolesterol molar oranı ve farklı fosfotidilkolin türleri kullanılarak hazırlanan gemitabin hidroklorür içeren lipozom formülasyonlarının partikül büyüklüğü, enkapsülasyon etkinliği ve salım profili özelliklerinin farklı olduğu görülmüştür.
- ✓ LPHNP formülasyonları deney tasarımı uygulanarak hazırlandığında PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranı, % SPC/PLGA oranı ve DSPE-PEG miktarının partikül büyüklüğü, % enkapsülasyon etkinliği ve 24 saat sonunda % kümülatif salınan etkin madde cevaplarına etkileri istatistiksel olarak (ANOVA) incelenmiştir. Bağımsız parametreler limitler içerisinde değiştirildiğinde LPHNP ilaç taşıyıcı sistemlerin partikül büyüklüğünün, enkapsülasyon etkinliklerinin ve kümülatif salınan madde miktarlarının istatistiksel açıdan etkilendiği görülmüştür.
- ✓ LPHNP formülasyonlarında % SPC/PLGA (B) oranı artıkça enkapsülasyon veriminin düştüğü gözlenmiştir. Ancak PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranı X %

SPC/PLGA oranı etkileşiminin (AB) enkapsülasyon verimliliğini arttırdığı belirlenmiştir.

✓ Partikül büyüklüğü cevabına LPHNP formülasyonlarında en çok DSPE-PEG miktarı (C) etkilemiştir. DSPE-PEG miktarının artması partikül büyüklüğünü artırırken, PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranı X DSPE-PEG miktarının (AC) etkileşiminin partikül büyüklüğünü azalttığı belirlenmiştir.

✓ LPHNP formülasyonlarında 24 saat sonunda salınan etkin madde miktarını en çok PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranı etkilemektedir. PLGA 50:50/PLGA 65:35 oranı arttıkça salınan madde miktarı da artmıştır.

✓ Optimum nanopartikül, lipozom ve LPHNP formülasyonun 4°C ve 25±2°C/%60±5 bağıl nem ortamlarında 12 ay boyunca gerçekleştirilen stabilite deneyleri sonucu LPHNP formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve formülasyonda % kalan ilaç miktarı açısından nanopartikül ve lipozom formülasyonlarına göre daha stabil olduğu belirlenmiştir. 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamlarında 6 ay süreyle gerçekleştirilen stabilite testlerinde ise LPHNP, nanopartikül ve lipozom formülasyonlarının stabilitelerini koruyamadıkları gözlenmiştir.

✓ Formülasyonların morfolojilerini belirlemeye yönelik gerçekleştirilen SEM görüntülerinde lipozom, nanopartikül ve LPHNP formülasyonlarının yüzeylerinin pürüzsüz olduğu belirlenmiştir. TEM görüntülerinden ise formülasyonların etrafının PEG tabakası ile kaplandığı görülmüştür.

✓ Gemsitabin hidroklorür yüklü lipozom, nanopartikül ve LPHNP formülasyonları MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde gerçekleştirilen sitotoksikite deneyleri sonucu ticari ürün Gemko® ve gemsitabin hidroklorür çözeltisine göre daha düşük IC₅₀ değeri göstermiştir. Bu durum taşıyıcı sistem içerisindeki gemsitabin hidroklorürün çözelti haline göre daha etkili olduğunu ispatlamaktadır. Hücre içine geçiş testi sonucu kumarin-6 yüklü lipozom, nanopartikül ve LPHNP formülasyonlarının hücre içine girebildikleri belirlenmiştir.

✓ Histopatolojik sonuçlar hayvanlarda meme kanseri modelinin geliştirildiğini doğrulamaktadır. Gemcitabin hidroklorür yüklü LPHNP formülasyonları ticari ürün Gemko®'ya göre çok daha düşük dozda sıçanlara uygulandığında sıçanların yaşam sürelerinin arttığı ve tümör çaplarının belirgin şekilde küçüldüğü görülmüştür. Ayrıca histopatolojik sonuçlar LPHNP formülasyonunun hayvanlara uygulandığında kısmi tedavinin gerçekleştiğini göstermiştir.

✓ Farmakokinetik çalışmalarda, optimum LPHNP formülasyonunun pegilasyon sayesinde ticari ürün göre MRT ve yarılanma ömrünün arttığı, ayrıca C_{max} ve AUC değerlerinin de yükseldiği gözlenmiştir. Bu nedenle LPHNP formülasyonunun kontrollü bir şekilde ve daha uzun bir süre boyunca etkin maddeyi saldığı düşünülmüştür.

Tez çalışmasında ticari preparata kıyasla daha düşük dozla etkili bir tedavi sağlayan LPHNP formülasyonu geliştirilmiş, etkinliği in vitro ve in vivo olarak kanıtlanmıştır.

KAYNAKLAR

- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S. and Fessi, H. (2006). Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(15), 1688-1713.
- Abe, K. and Matsuki, N. (2000). Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neuroscience Research*, 38, 325-329.
- Abu, N., Akhtar, M. N., Ho, W. Y., Yeap, S. K. and Alitheen, N. B. (2013). 3-Bromo-1-hydroxy-9,10-anthraquinone (BHAQ) inhibits growth and migration of the human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB231. *Molecules*, 18, 10367-10377.
- Acharya, S., Dilnawaz, F. and Sahoo, S. K. (2009). Targeted epidermal growth factor receptor nanoparticle bioconjugates for breast cancer therapy. *Biomaterials*, 30, 5737-5750.
- Achim, M., Tomuta, I., Muntean, D., Porfire, A., Tefas, L. R., Patras, L., Licarete, E., Alupe, M. C., Vlase, L. and Banciu, M. (2017). Optimization and In Vitro Evaluation of 5-Fluorouracil-Loaded Long – Circulating Liposomes. *Farmacia*, 65, 82-91.
- Ahmed, A. B., Konwar, R. and Sengupta, R. (2015). Atorvastatin calcium loaded chitosan nanoparticles: in vitro evaluation and in vivo pharmacokinetic studies in rabbits. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51(2), 467-477.
- Akbari, A. and Wu, J. (2016). Cruciferin coating improves the stability of chitosan nanoparticles at low pH. *Journal of Materials Chemistry B*, 4, 4988-5001.
- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M. and Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 1-9.
- Alinaghi, A., Rouini, M., Daha, F. J. and Moghimi, H. (2014). The influence of lipid composition and surface charge on biodistribution of intact liposomes releasing from hydrogel-embedded vesicles. *International Journal of Pharmaceutics*, 459(1), 30-39.
- Allen, T. M. and Cullis, P. R. (2013). Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1), 36-48.
- An, K. C. (2016). Selective Estrogen Receptor Modulators. *Asian Spine Journal*, 10(4), 787-791.
- Anselmo, A. C. and Mitragotr, S. (2016). Nanoparticles in the clinic. *Bioengineering & Translational Medicine*, 1, 10-29.

- Antoni, D., Burckel, H., Josset, E. and Noel, G. (2015). Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 5517-5527.
- Anwekar, H., Patel, S. and Singhai, A. K. (2011). Liposome- as drug carriers. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, 2(7), 945-951.
- Arias, J. L., Reddy, L. H. and Couvreur, P. (2009). Polymeric nanoparticulate system augmented the anticancer therapeutic efficacy of gemcitabine. *Journal of Drug Targeting*, 17, 586-598.
- Avanti Polar Lipids. (2017). Liposome Preparation. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Favantilipids.com%2Ftech-support%2Fliposome-preparation%2F&date=2017-06-06>, Son Erişim Tarihi: 6 Haziran 2017.
- Avelar-Freitas, B. A., Almeida, V. G., Pinto, M. C., Mourão, F. A., Massensini, A. R., Martins-Filho, O. A., Rocha-Vieira, E. and Brito-Melo, G. E. (2014). Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 47, 307-315.
- Aydıntuğ, S. (2004). Meme kanserinde erken tanı. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*, 13(6), 226-229.
- Bae, Y. H. and Park, K. (2011). Targeted drug delivery to tumors: myths, reality and possibility. *Journal of Controlled Release*, 153(3), 198-205.
- Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N. and Farokhzad, O. C. (2014). Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 66, 2-25.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S. and Escalera, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977.
- Bian, Y., Gao, D., Liu, Y., Li, N., Zhang, X., Zheng, R. Y., Wang, Q., Luo, L. and Dai, K. (2015). Preparation and study on anti-tumor effect of chitosan-coated oleanolic acid liposomes. *The Royal Society of Chemistry*, 5, 18725-18732.
- Bibi, S., Lattmann, E., Mohammed, A. R. and Perrie, Y. (2012). Trigger release liposome systems: local and remote controlled delivery. *Journal of Microencapsulation*, 29(3), 262-276.
- Bose, R. J. C., Lee, S. H. and Park, H. (2016). Lipid-based surface engineering of PLGA nanoparticles for drug and gene delivery applications. *Biomaterials Research*, 20(34), 1-9.
- Bray, F., Jemal, A., Grey, N., Ferlay, J. and Forman, D. (2012). Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *The Lancet Oncology*, 13(8), 790-801.

- Brigger, I., Dubernet, C. and Couvreur, P. (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(5), 631-651.
- Briuglia, M. L., Rotella, C., McFarlane, A. and Lamprou, D. A. (2015). Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Delivery and Translational Research*, 5, 231-242.
- Chan, J. M., Zhang, L., Yuet, K. P., Liao, G., Rhee, J. W., Langer, R. and Farokhzad, O. C. (2009). PLGA–lecithin–PEG core–shell nanoparticles for controlled drug delivery. *Biomaterials*, 30(8), 1627-1634.
- Chang, H. I. and Yeh, M. K. (2012). Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 49-60.
- Chen, C., Han, D., Cai, C. and Tang, X. (2010). An overview of liposome lyophilization and its future potential. *Journal of Controlled Release*, 142(3), 299-311.
- Chen, J., Cheng, D., Li, J., Wang, Y., Guo, J. X., Chen, Z. P., Cai, B. C. and Yang, T. (2013). Influence of lipid composition on the phase transition temperature of liposomes composed of both DPPC and HSPC. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 39, 197-204.
- Chen, M., He, M., Song, Y., Chen, L., Xiao, P., Wan, X., Dai, F. and Shen, P. (2014). The cytoprotective role of gemcitabine-induced autophagy associated with apoptosis inhibition in triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 34(1), 276-282.
- Chen, Y., Wu, Q., Zhang, Z., Yuan, L., Liu, X. and Zhou, L. (2012). Preparation of curcumin-loaded liposomes and evaluation of their skin permeation and pharmacodynamics. *Molecules*, 17(5), 5972-5987.
- Cheow, W. S. and Hadinoto, K. (2011). Factors affecting drug encapsulation and stability of lipid–polymer hybrid nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), 214-220.
- Chetoni, P., Monti, D., Tampucci, S., Matteoli, B., Ceccherini-Nelli, L., Subissi, A. and Burgalassi, S. (2015). Liposomes as a potential ocular delivery system of distamycin A. *International Journal of Pharmaceutics*, 492(1), 120-126.
- Cho, H. Y., Lee, C. K. and Lee, Y. B. (2014). Preparation and Evaluation of PEGylated and Folate-PEGylated Liposomes Containing Paclitaxel for Lymphatic Delivery. *Journal of Nanomaterials*, 2015, 1-10.
- Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z. and Shin, D. M. (2008). Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(5), 1310-1316.

- Chung, W. G., Sandoval, M. A., Sloat, B. R., Lansakara-P, D. S. and Cui, Z. (2012). Stearoyl gemcitabine nanoparticles overcome resistance related to the over-expression of ribonucleotide reductase subunit M1. *Journal of Controlled Release*, 157(1), 132-140.
- Clawson, C., Ton, L., Aryal, S., Fu, V., Esener, S. and Zhang, L. (2011). Synthesis and Characterization of Lipid–Polymer Hybrid Nanoparticles with pH-Triggered Poly (ethylene glycol) Shedding. *Langmuir*, 27(17), 10556-10561.
- Cohen-Sela, E., Teitlboim, S., Chorny, M., Koroukhov, N., Danenberg, H. D., Gao, J. and Golomb, G. (2009). Single and double emulsion manufacturing techniques of an amphiphilic drug in PLGA nanoparticles: formulations of mithramycin and bioactivity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98:1452-1462.
- Conniot, J., Silva, J. M., Fernandes, J. G., Silva, L. C., Gaspar, R., Brocchini, S., Florindo, H. F. and Barata, T. S. (2014). Cancer immunotherapy: nanodelivery approaches for immune cell targeting and tracking. *Frontiers in Chemistry*, 2(105), 1-27.
- Cosco, D., Paolino, D., Cilurzo, F., Casale, F. and Fresta, M. (2012). Gemcitabine and tamoxifen-loaded liposomes as multidrug carriers for the treatment of breast cancer diseases. *International Journal of Pharmaceutics*, 422, 229-237.
- Cun, D., Foged, C., Yang, M., Frøkjaer, S. and Nielsen, H. M. (2009). Preparation and characterization of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles for siRNA delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 390, 70-75.
- Dadparvar, M., Wagner, S., Wien, S., Worek, F., von Briesen, H. and Kreuter, J. (2014). Freeze-drying of HI-6-loaded recombinant human serum albumin nanoparticles for improved storage stability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 88, 510-517.
- Daraee, H., Etemadi, A., Kouhi, M., Alimirzalu, S. and Akbarzadeh, A. (2016). Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(1), 381-391.
- Das, S., Desai, J. L. and Thakkar, H. P. (2013). Gemcitabine hydrochloride-loaded functionalised carbon nanotubes as potential carriers for tumour targeting. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75, 707-715.
- De Jong, W. H. and Borm P. J. (2008). Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*, 3(2), 133-149.
- Dehaini, D., Fang, R. H., Luk, B. T., Pang, Z., Hu, C. M. J., Kroll, A. V., Yu, C. L., Gao, W. and Zhang, L. (2016). Ultra-small lipid–polymer hybrid nanoparticles for tumor-penetrating drug delivery. *Nanoscale*, 8(30), 14411-14419.

- Demir, Ö., Aksu, B. ve Özsoy, Y. (2017). İlaç Formülasyonu Geliştirilmesinde Deney Tasarımı (DoE) Seçimi ve Kullanımı. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 21(2), 211-222.
- Derakhshandeh, K. and Fathi, S. (2012). Role of chitosan nanoparticles in the oral absorption of Gemcitabine. *International Journal of Pharmaceutics*, 437(1), 172-177.
- Devrim, B., Kara, A., Vural, İ. and Bozkır, A. (2016). Lysozyme-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles: preparation, characterization and colloidal stability evaluation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 42(11), 1865-1876.
- Dubey, R. D., Alam, N., Saneja, A., Khare, V., Kumar, A., Vaidh, S., Mahajan, G., Sharma, P. R., Singh, S. K., Mondhe, D. M. and Gupta, P. N. (2015). Development and evaluation of folate functionalized albumin nanoparticles for targeted delivery of gemcitabine. *International Journal of Pharmaceutics*, 492, 80-91.
- Duddu, S. P. and Monte, P. R. D. (1997). Effect of Glass Transition Temperature on the Stability of Lyophilized Formulations Containing a Chimeric Therapeutic Monoclonal Antibody. *Pharmaceutical Research*, 14, 591-595.
- Dünya Sağlık Örgütü. (2017). Cancer. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.who.int%2Fmediacentre%2Ffactsheets%2Ffs297%2Fen%2F&date=2017-05-01>, Son Erişim Tarihi: 1 Mayıs 2017.
- El-Nesr, O. H., Yahiya, S. A. and El-Gazayerly, O. N. (2010). Effect of formulation design and freeze-drying on properties of fluconazole multilamellar liposomes. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18, 217-224.
- Eloy, J. O., Petrilli, R., Topan, J. F., Antonio, H. M. R., Barcellos, J. P. A., Chesca, D. L., Serafini, L. N., Tiezzi, D. G., Lee, R. J. and Marchetti, J. M. (2016). Co-loaded paclitaxel/rapamycin liposomes: Development, characterization and in vitro and in vivo evaluation for breast cancer therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 141, 74-82.
- Fan, J.-B., Huang, C., Jiang, L. and Wang, S. (2013). Nanoporous microspheres: from controllable synthesis to healthcare applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 1, 2222-2235.
- Fang, D. L., Chen, Y., Xu, B., Ren, K., He, Z. Y., He, L. L., Lei, Y., Fan, C. M. and Song, X. R. (2014). Development of lipid-shell and polymer core nanoparticles with water-soluble salidroside for anti-cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 3373-3388.
- FDA. (2013). Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.fda.gov%2Fdownloads%2FDrugs%2FGuidances%2Fucm368107.pdf&date=2017-07-04>, Son Erişim Tarihi: 4 Temmuz 2017.

- FDA. (2015). Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.fda.gov%2Fdownloads%2Fdrugs%2Fguidances%2Fucm386366.pdf&date=2017-07-30>, Son Erişim Tarihi: 30 Temmuz 2017.
- Ferreira, D., Adega, F. and Chaves, R. (2013). The importance of cancer cell Lines as in vitro models in cancer methylome analysis and anticancer drugs testing. Lopez-Camarillo, C. (Eds). *Intech*, pp:139-166.
- Frézard, F., Silva-Barcellos, N. M. and Dos Santos, R. A. (2007). A novel approach based on nanotechnology for investigating the chronic actions of short-lived peptides in specific sites of the brain. *Regulatory Peptides*, 138(2), 59-65.
- Galindo-Rodriguez, S., Allemann, E., Fessi, H. and Doelker, E. (2004). Physicochemical Parameters Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-out, Emulsification-Diffusion, and Nanoprecipitation Methods. *Pharmaceutical Research*, 21(8), 1428-1439.
- Gandhi, M., Pandya, T., Gandhi, R., Patel, S., Mashru, R., Misra, A. and Tandel, H. (2015). Inhalable liposomal dry powder of gemcitabine-HCl: Formulation, in vitro characterization and in vivo studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 496, 886-895.
- Ganta, S., Devalapally, H., Shahiwala, A. and Amiji, M. (2008). A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 126(3), 187-204.
- Garg, N. K., Singh, B., Sharma, G., Kushwah, V., Tyagi, R. K., Jaind, S. and Katare, O. P. (2015). Development and characterization of single step self-assembled lipid polymer hybrid nanoparticles for effective delivery of methotrexate. *Royal Society of Chemistry*, 5, 62989-62999.
- Gemzar. (2017). Highlights of Prescribing Information. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fpi.lilly.com%2Fus%2Fgemzar.pdf&date=2017-07-31>, Son Erişim Tarihi: 31 Temmuz 2017.
- Ghanbarzadeh, S., Valizadeh, H. and Zakeri-Milani, P. (2013). The effects of lyophilization on the physico-chemical stability of sirolimus liposomes. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3(1), 25-29.
- Giordano, K. F. and Jatoi, A. (2005). The cancer anorexia/weight loss syndrome: therapeutic challenges. *Current Oncology Reports*, 7(4), 271-276.
- Glavas-Dodova, M., Fredro-Kumbaradzi, E, Goracinova, K., Simonoska, M., Calis, S., Trajkovic-Jolevska S. and Hincal A. A. (2005). The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU. *International Journal of Pharmaceutics*, 291, 79-86.

- Govender, T., Stolnik, S., Garnett, M. C., Illum, L. and Davis, S. S. (1999). PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *Journal of Controlled Release*, 57(2), 171-185.
- Guterres, S. S., Alves, M. P. and Pohlmann, A. R. (2007). Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. *Drug Target Insights*, 2, 147-157.
- Hadinoto, K., Sundaresan, A. and Cheow, W. S. (2013). Lipid–polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85(3), 427-443.
- Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R. and Bullock, P. (2004). Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in Vitro*, 18, 703-710.
- Hines, D. J. and Kaplan, D. L. (2013). Poly(lactic-co-glycolic) acid-controlled-release systems: experimental and modeling insights. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 30(3), 257-276.
- Holgado, M. A., Arias, J. L., Cózar, M. J., Alvarez-Fuentes, J., Gañán-Calvo, A. M. and Fernández-Arévalo, M. (2008). Synthesis of lidocaine-loaded PLGA microparticles by flow focusing. Effects on drug loading and release properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 358, 27-35.
- Holliday, D. L. and Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*, 13 (215), 1-7.
- Holzer, M., Vogel, V., Mäntele, W., Schwartz, D., Haase, W. and Langer, K. (2009). Physico-chemical characterisation of PLGA nanoparticles after freeze-drying and storage. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72, 428-437.
- Hoogevest, P. V. and Wendel, A. (2014). The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116, 1088-1107.
- Hou, Y., Yao, C., Ling, L., Du, Y., He, R., Ismail, M., Zhang, Y., Fu, Z. and Li, X. (2017). Novel dual VES phospholipid self-assembled liposomes with an extremely high drug loading efficiency. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 156, 29-37.
- Hsin-I, C. and Ming-Kung, Y. (2012). Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 49-60.
- Hu, C. M., Zhang, L., Aryal, S., Cheung, C., Fang, R. H. and Zhang, L. (2011). Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(27), 10980-10985.

- Huang, X., Caddell, R., Yu, B., Xu, S., Theobald, B., Lee, L. J. and Lee, R. J. (2010). Ultrasound-enhanced Microfluidic Synthesis of Liposomes. *Anticancer Research*, 30 (2), 463-466.
- Imen, A., Amal, K., Ines, Z. and Habib, G. (2006). Bullous dermatosis associated with gemcitabine therapy for non-small-cell lung carcinoma. *Respiratory Medicine*, 100(8), 1463-1465.
- Immordino, M. L., Dosio, F. and Cattel, L. (2006). Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International Journal of Nanomedicine*, 1(3), 297-315.
- Jahanzeb, M., Frankel, C., Elkersh, M., Koletsky, A., Radice, P. and Vogel, C. (1997). Rationale for trials studying pegylated liposomal doxorubicin in metastatic breast cancer. *Oncology*, 11(10 SUPPL. 11), 45-53.
- James, N., Coker, R., Tomlinson, D., Harris, J., Gompels, M., Pinching, A. and Stewart, J. (1994). Liposomal doxorubicin (Doxil): an effective new treatment for Kaposi's sarcoma in AIDS. *Clinical Oncology*, 6(5), 294-296.
- Jiang, Y. and Stenzel, M. (2016). Drug Delivery Vehicles Based on Albumin-Polymer Conjugates. *Macromolecular Bioscience*, 16(6), 791-802.
- Jones, M. N. and Nicholas, A. R. (1991). The effect of blood serum on the size and stability of phospholipid liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1065, 145-152.
- Joshi, G., Kumar, A. and Sawant, K. (2014). Enhanced bioavailability and intestinal uptake of Gemcitabine HCl loaded PLGA nanoparticles after oral delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60, 80-89.
- Kadari, A., Gudem, S., Kulhari, H., Bhandi, M. M., Borkar, R. M., Kolapalli, V. R. and Sistla, R. (2017). Enhanced oral bioavailability and anticancer efficacy of fisetin by encapsulating as inclusion complex with HP β CD in polymeric nanoparticles. *Drug Delivery*, 24, 224-232.
- Kaiser, N., Kimpfler, A., Massing, U., Burger, A. M., Fiebig, H. H., Brandl, M. and Schubert, R. (2003). 5-Fluorouracil in vesicular phospholipid gels for anticancer treatment: entrapment and release properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 256, 123-131.
- Kamalı Polat, A. ve Soran, A. (2010). Metastatik meme kanseri tanısı alanlarda primer tümör cerrahisinin yeri. *Ulusal Cerrahi Dergisi*, 26(4), 185-191.
- Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J. and Farokhzad, O. C. (2016). Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: Mechanisms of controlling drug release. *Chemical reviews*, 116(4), 2602-2663.
- Karahan. H. and Kelicen, E. P. (2011). Aromatase Inhibitors in Breast Cancer Therapy. *The Journal of Breast Health*, 7(2), 90-95.

- Kerlikowske, K. (1997). Efficacy of screening mammography among women aged 40 to 49 years and 50 to 69 years: comparison of relative and absolute benefit. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, (22), 79-86.
- Khan, I., Gothwal, A., Sharma, A. K., Kesharwani, P., Gupta, L., Iyer, A. K. and Gupta, U. (2016). PLGA nanoparticles and their versatile role in anticancer drug delivery. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 33(2), 159-93.
- Khuri, A. I. and Mukhopadhyay, S. (2010). Response surface methodology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2(2), 128-149.
- Kim, C. E., Lim, S. K. and Kim, J. S. (2012). In vivo antitumor effect of cromolyn in PEGylated liposomes for pancreatic cancer. *Journal of Controlled Release*, 157, 190-195.
- Klippstein, R., Wang, J. T., El-Gogary, R. I., Bai, J., Mustafa, F., Rubio, N., Bansal, S., Al-Jamal, W. T. and Al-Jamal, K. T. (2015). Passively Targeted Curcumin-Loaded PEGylated PLGA Nanocapsules for Colon Cancer Therapy In Vivo. *Small*, 11(36), 4704-4722.
- Kollipara, S., Bende, G., Movva, S. and Saha, R. (2010). Application of rotatable central composite design in the preparation and optimization of poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for controlled delivery of paclitaxel. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 36(11), 1377-1387.
- Kumar, R., Kulkarni, A., Nabulsi, J., Nagesha, D. K., Cormack, R., Makrigiorgos, M. G. and Sridhar, S. (2013). Facile Synthesis of PEGylated PLGA Nanoparticles Encapsulating Doxorubicin and its In Vitro Evaluation as Potent Drug Delivery Vehicle. *Drug Delivery and Translational Research*, 3, 299-308.
- Kumari, A., Yadav, S. K. and Yadav, S. C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1), 1-18.
- Kumari, P., Ghosh, B. and Biswas, S. (2016). Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. *Journal of Drug Targeting*, 24(3), 179-191.
- Kwon, H. Y., Lee, J. Y., Choi, S. W., Jang, Y. and Kim, J. H. (2001). Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification–diffusion method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 182(1), 123-130.
- Ladjemi, M. Z., Jacot, W., Chardès, T., Pèleguin, A. and Navarro-Teulon, I. (2010). Anti-HER2 vaccines: new prospects for breast cancer therapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 59(9), 1295-1312.

- Lansakara, D. S., Rodriguez, B. L. and Cui, Z. (2012). Synthesis and in vitro evaluation of novel lipophilic monophosphorylated gemcitabine derivatives and their nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 429(1), 123-134.
- Lee, S. M., Chen, H., Dettmer, C. M., O'Halloran, T. V. and Nguyen, S. B. T. (2007) Polymer-caged liposomes: a pH-responsive delivery system with high stability. *Journal of the American Chemical Society*, 129(49), 15096-15097.
- Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang C., Huang, Z., Luo, X. and Yihui Deng, Y. (2015). A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(2), 81-98.
- Li, Y., Pei, Y., Zhang, X., Gu, Z., Zhou, Z., Yuan, W., Zhou, J., Zhu, J. and Gao, X. (2001). PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *Journal of Controlled Release*, 71, 203-211.
- Lian, T. and Ho, R. J. (2001). Trends and developments in liposome drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90(6), 667-680.
- Lim, S. B., Banerjee, A. and Önyüksel, H. (2012). Improvement of drug safety by the use of lipid-based nanocarriers. *Journal of Controlled Release*, 163(1), 34-45.
- Liu, J., Qiu, Z., Wang, S., Zhou, L. and Zhang S. (2010). A modified double-emulsion method for the preparation of daunorubicin-loaded polymeric nanoparticle with enhanced in vitro anti-tumor activity. *Biomedical Materials*, 5(6), 1-10.
- Liu, N. and Park, H. J. (2009). Chitosan-coated nanoliposome as vitamin E carrier. *Journal of Microencapsulation*, 26, 235-242.
- Liu, W., Pan, H., Zhang, C., Zhao, L., Zhao, R., Zhu, Y. and Pan, W. (2016). Developments in Methods for Measuring the Intestinal Absorption of Nanoparticle-Bound Drugs. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1-20.
- Lo, Y., Tsai, J. and Kuo, J. (2004). Liposomes and disaccharides as carriers in spray-dried powder formulations of superoxide dismutase. *Journal of Controlled Release*, 94(2), 259-272.
- Longmire, M., Choyke, P. L. and Kobayashi, H. (2008). Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. *Nanomedicine (Lond)*, 3(5), 703-717.
- Lopes, S. C. A., Giuberti, C. S., Rocha, T. G. R., Ferreira, D. S., Leite, E. A. and Oliveira, M. C. (2013). Liposomes as Carriers of Anticancer Drugs. Rangel, R. (Eds). *Intech*, pp:85-124.

- Maherani, B., Arab-tehrany, E., Kheirilomoom, A., Reshetov, V., Stebe, M. J. and Linder, M. (2012). Optimization and characterization of liposome formulation by mixture design. *Analyst*, 137, 773-786.
- Mainardes, R. M. and Evangelista, R. C. (2005). PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. *International Journal of Pharmaceutics*, 290(1), 137-144.
- Maitani, Y., Nakamura, A., Tanaka, T. and Aso, Y. (2012). Hydration of surfactant-modified and PEGylated cationic cholesterol-based liposomes and corresponding lipoplexes by monitoring a fluorescent probe and the dielectric relaxation time. *International Journal of Pharmaceutics*, 427, 372-378.
- Makadia, H. K. and Siegel, S. J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)*, 3(3), 1377-1397.
- Maksimenko, O., Pavlov, E., Toushov, E., Molin, A., Stukalov, Y., Prudskova, T., Feldman, V., Kreuter, J. and Gelperina, S. (2008). Radiation sterilisation of doxorubicin bound to poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 356, 325-332.
- Malvern. (2017). Zetasizer Nano ZS. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.malvern.com%2Fen%2Fproducts%2Fproduct-range%2Fzetasizer-range%2Fzetasizer-nano-range%2Fzetasizer-nano-zs%2F&date=2017-06-08>, Son Erişim Tarihi: 8 Haziran 2017.
- Mandal, B., Bhattacharjee, H., Mittal, N., Sah, H., Balabathula, P., Thoma, L. A. and Wood, G. C. (2013). Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 9(4), 474-491.
- Mandal, B., Mittal, N. K., Balabathula, P., Thoma, L. A. and Wood, G. C. (2016). Development and in vitro evaluation of core-shell type lipid-polymer hybrid nanoparticles for the delivery of erlotinib in non-small cell lung cancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81, 162-171.
- Manoochchhri, S., Darvishi, B., Kamalinia, G., Amini, M., Fallah, M., Ostad, S.N., Atyabi, F. and Dinarvand, R. (2013). Surface modification of PLGA nanoparticles via human serum albumin conjugation for controlled delivery of docetaxel, *Daru*, 21(1), 1-10.
- Marin, E., Briceño, M. and Caballero-George, C. (2013). Critical evaluation of biodegradable polymers used in nanodrugs. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 3071-3090.

- Martín-Banderas, L., Sáez-Fernández, E., Holgado, M. Á., Durán-Lobato, M. M., Prados, J. C., Melguizo, C. and Arias, J. L. (2013). Biocompatible gemcitabine-based nanomedicine engineered by Flow Focusing® for efficient antitumor activity. *International Journal of Pharmaceutics*, 443(1), 103-109.
- Masareddy, R. S., Joshi, V. G., Sutar, R. S. and Yellanki, S. K. (2011). Nano Drug Delivery Systems - A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(2), 203-216.
- Md, S., Ali, M., Baboota, S., Sahni, J. K., Bhatnagar, A. and Ali, J. (2014). Preparation, characterization, in vivo biodistribution and pharmacokinetic studies of donepezil-loaded PLGA nanoparticles for brain targeting. *Drug development and industrial pharmacy*, 40(2), 278-287.
- Mehrabi, M., Esmailpour, P., Akbarzadeh, A., Saffari, Z., Farahnak, M., Farhangi, A. and Chiani, M. (2016). Efficacy of pegylated liposomal etoposide nanoparticles on breast cancer cell lines. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 46, 567-571.
- Miladi, K., Ibraheem, D., Iqbal, M., Sfar, S., Fessi, H. and Elaissari, A. (2014). Particles from preformed polymers as carriers for drug delivery. *EXCLI Journal*, 13, 28-57.
- Mini, E., Nobili, S., Caciagli, B., Landini, I. and Mazzei, T. (2006). Cellular pharmacology of gemcitabine. *Annals of Oncology*, 17(5), 7-12.
- Mishima, K. (2008). Biodegradable particle formation for drug and gene delivery using supercritical fluid and dense gas. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(3), 411-432.
- Mittal, G., Sahana, D., Bhardwaj, V. and Kumar, M. R. (2007). 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*, 119(1), 77-85.
- Moen, M. D. and Wellington, K. (2005). Gemcitabine. *American Journal of Cancer*, 4(5), 327-333.
- Mondal, J., Panigrahi, A. K. and Khuda-Bukhsh, A. R. (2014). Conventional Chemotherapy: Problems and Scope for Combined Therapies with Certain Herbal Products and Dietary Supplements. *Austin Journal of Molecular and Cellular Biology*, 1(1), 1-10.
- Mondalek, F. G., Lawrence, B. J., Kropp, B. P., Grady, B. P., Fung, K. M., Madihally, S. V. and Lin H. K. (2008). The incorporation of poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles into porcine small intestinal submucosa biomaterials. *Biomaterials*, 29(9), 1159-1166.

- Muhamad, I. I., Selvakumaran, S. and Lazim, N. A. M. (2014). Designing Polymeric Nanoparticles for Targeted Drug Delivery System. Seifalian, A. Mel, A. and Kalaskar, D. M. (Eds), *Nanomedicine*, İngiltere. One Central Press, pp:287-313.
- Mundargi, R. C., Babu, V. R., Rangaswamy, V., Patel, P. and Aminabhavi, T. M. (2008). Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly (D, L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *Journal of Controlled Release*, 125(3), 193-209.
- Nag, O. K. and Awasthi, V. (2013). Surface engineering of liposomes for stealth behavior. *Pharmaceutics*, 5(4), 542-569.
- Nagavarma, B., Yadav, H. K., Ayaz, A., Vasudha, L. and Shivakumar, H. (2012). Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles—a review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(3), 16-23.
- Nair, A. B. and Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 7, 27-31.
- Natarajan, J. and Meyyanathan, S. N. (2012). Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting: A comprehensive review. *International Journal of Health & Allied Sciences*, 1(4), 217-223.
- National Breast Cancer Foundation. (2017). URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.nationalbreastcancer.org%2F&date=2017-05-01>, Son Erişim Tarihi: 1 Mayıs 2017.
- National Cancer Institute. (2013). FDA Approval for Gemcitabine Hydrochloride. 2017-07-31. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.cancer.gov%2Fabout-cancer%2Ftreatment%2Fdrugs%2Ffda-gemcitabine-hydrochloride&date=2017-07-31>, Son Erişim Tarihi: 31 Temmuz 2017.
- National Cancer Institute. (2017). Drugs Approved for Breast Cancer. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.cancer.gov%2Fabout-cancer%2Ftreatment%2Fdrugs%2Fbreast&date=2017-07-31>, Son Erişim Tarihi: 31 Temmuz 2017.
- NIST. (2013). Choosing an experimental design. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.itl.nist.gov%2Fdiv898%2Fhandbook%2Fpri%2Fsection3%2Fpri3.htm&date=2017-07-31>, Son Erişim Tarihi: 31 Temmuz 2017.
- Noble, G. T., Stefanick, J. F., Ashley, J. D., Kiziltepe, T. and Bilgicer, B. (2014). Ligand-targeted liposome design: challenges and fundamental considerations. *Trends in Biotechnology*, 32(1), 32-45.

- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. and Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267, 5421-5426.
- Ong, S. G., Chitneni, M., Lee, K. S., Ming, L. C. and Yuen, K. H. (2016). Evaluation of Extrusion Technique for Nanosizing Liposomes. *Pharmaceutics*, 8(36), 1-12.
- Pal, S. L., Jana, U., Manna, P. K., Mohanta, G. P. and Manavalan, R. (2011). Nanoparticle: An overview of preparation and characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(6), 228-234.
- Panta, P., Kim, D. Y., Kwon, J. S., Son, A. R., Lee, K. W. and Kim, M. S. (2014). Protein Drug-Loaded Polymeric Nanoparticles. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 7, 825-832.
- Panyam, J. and Labhasetwar, V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(3), 329-347.
- Panzarini, E., Inguscio, V., Tenuzzo, B. A., Carata, E. and Dini L. (2013). Nanomaterials and autophagy: new insights in cancer treatment. *Cancers*, 5(1), 296-319.
- Paolino, D., Cosco, D., Racanicchi, L., Trapasso, E., Celia, C., Iannone, M., Puxeddu, E., Costante, G., Filetti, S. and Russo, D. (2010). Gemcitabine-loaded PEGylated unilamellar liposomes vs GEMZAR®: biodistribution, pharmacokinetic features and in vivo antitumor activity. *Journal of Controlled Release*, 144(2), 144-150.
- Papadopoulou, V., Kosmidis, K., Vlachou, M. and Macheras, P. (2006). On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*, 309, 44-50.
- Parveen, S., Misra, R. and Sahoo, S. K. (2012). Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine*, 8(2), 147-166.
- Pattni, B. S., Chupin, V. V. and Torchilin, V. P. (2015). New developments in liposomal drug delivery. *Chemical Reviews*, 115(19), 10938-10966.
- Pérez-Herrero, E. and Fernández-Medarde, A. (2015). Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 93, 52-79.
- Permegear. (2017). Franz Cell. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fpermegear.com%2Ffranz-cells%2F&date=2017-06-09>, Son Erişim Tarihi: 9 Haziran 2017.

- Pimple, S., Manjappa, A. S., Ukawala, M. and Murthy, R. S. (2012). PLGA nanoparticles loaded with etoposide and quercetin dihydrate individually: in vitro cell line study to ensure advantage of combination therapy. *Cancer Nanotechnology*, 3, 25-36.
- Pitrubhakta, A. B., Shinde, A. J. and Jadhav, N. R. (2012). Design, Development and Characterization of PEGylated Liposomes of Gemcitabine Hydrochloride. *Der Pharmacia Lettre*, 4(1), 314-329.
- Prabhu, R. H., Patravale, V. B. and Joshi, M. D. (2015). Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 1001-1018.
- Prasad, P., Shuhendler, A., Cai, P. Rauth, A. M. and Wu, X. Y. (2013). Doxorubicin and mitomycin C co-loaded polymer-lipid hybrid nanoparticles inhibit growth of sensitive and multidrug resistant human mammary tumor xenografts. *Cancer Letters*, 334(2), 263-273.
- Rahimpour, Y. and Hamishehkar, H. (2012). Liposomes in cosmeceutics. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9(4), 443-455.
- Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P., Bellich, B. and Cesàro, A. (2013). Chitosan nanoparticles: preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 455, 219-228.
- Rao, J. P. and Geckeler, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 36(7), 887-913.
- Reddy, L. H. and Couvreur, P. (2008). Novel approaches to deliver gemcitabine to cancers. *Current Pharmaceutical Design*, 14, 1124-1137.
- Ruan, G., Feng, S. S. and Li, Q. T. (2002). Effects of material hydrophobicity on physical properties of polymeric microspheres formed by double emulsion process. *Journal of Controlled Release*, 84(3), 151-160.
- Sadat, S. M., Jahan, S. T. and Haddadi, A. (2016). Effects of Size and Surface Charge of Polymeric Nanoparticles on in Vitro and in Vivo Applications. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 7, 91-108.
- Sahana, D. K., Mittal, G., Bhardwaj, V. and Kumar, M. N. (2008). 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*, 97, 1530-1542.
- Salter, J. T. and Miller, K. D. (2007). Antiangiogenic agents in breast cancer. *Cancer investigation*, 25(7), 518-526.

- Samad, A., Sultana, Y. and Aqil, M. (2007). Liposomal drug delivery systems: an update review. *Current Drug Delivery*, 4(4), 297-305.
- Scully, O. J., Bay, B. H., Yip, G. and Yu, Y. (2012). Breast cancer metastasis. *Cancer Genomics & Proteomics*, 9, 311-320.
- Seeger, H., Huober, J., Wallwiener, D. and Mueck, A. O. (2004). Inhibition of Human Breast Cancer Cell Proliferation with Estradiol Metabolites is as Effective as with Tamoxifen. *Hormone and Metabolic Research*, 36(5), 277-280.
- Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S. Y., Sood, A. K. and Hua, S. (2015). Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Frontiers in Pharmacology*, 6(286), 1-13.
- Shaikh, J., Ankola, D. D., Beniwal, V., Singh, D. and Kumar, M. N. (2009). Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37, 223-230.
- Sharma, A. and Sharma, U. S. (1997). Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*, 154 (2), 123-140.
- Shavi, G. V., Sreenivasa Reddy, M., Raghavendra, R, Nayak, U. Y, Kumar, A. R., Deshpande, P. B., Udupa, N., Behl, G., Dave, V. and Kushwaha, K. (2016). PEGylated liposomes of anastrozole for long-term treatment of breast cancer: in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Liposome Research*, 26, 28-46.
- Shi, J., Xiao, Z., Votruba, A. R., Vilos, C. and Farokhzad, O. C. (2011). Differentially Charged Hollow Core/Shell Lipid-Polymer-Lipid Hybrid Nanoparticle for Small Interfering RNA Delivery. *Angewandte Chemie*, 50(31), 7027-7031.
- Shi, L., Wang, X., Zhao, F., Luan, H., Tu, Q., Huang, Z., Wang, H. and Wang, H. (2013). In vitro evaluation of 5-aminolevulinic acid (ALA) loaded PLGA nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 2669-2676.
- Shim, G., Kim, M.-G., Park J. Y. and Oh, Y. K. (2013). Application of cationic liposomes for delivery of nucleic acids. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8, 72-80.
- Siegel, R. L., Miller, K. D. and Jemal, A. (2017). Cancer Statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67, 7-30.
- Singh, J. (2016). Natural Polymers Based Drug Delivery Systems. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(4), 805-816.
- Sinha, V. R. and Trehan, A. (2003). Biodegradable microspheres for protein delivery. *Journal of Controlled Release*, 90, 261-280.

- Siswanto, A., Fudholi, A., Nugroho, A. K. and Martono, S. (2015). In Vitro Release Modeling of Aspirin Floating Tablets Using Ddsolver. *Indonesian Journal of Pharmacy*, 26(2), 94-102.
- Śliwka, L., Wiktorska, K., Suchocki, P., Milczarek, M., Mielczarek, S., Lubelska, K., Cierpień, T., Łyżwa, P., Kiełbasiński, P., Jaromin, A., Flis, A. and Chilmonczyk, Z. (2016). The Comparison of MTT and CVS Assays for the Assessment of Anticancer Agent Interactions. *PLOS ONE*, 11(5), 1-17.
- Sloat, B. R., Sandoval, M. A., Li, D., Chung, W. G., Lansakara-P D. S., Proteau, P.J. Kiguchi, K., DiGiovanni, J. and Cui, Z. (2011). In vitro and in vivo anti-tumor activities of a gemcitabine derivative carried by nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 409(1-2), 278-88.
- Song, K. C., Lee, H. S., Chounga, Y., Choa, K. I., Ahn, Y. and Choi, E.J. (2006). The effect of type of organic phase solvents on the particle size of poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 276, 162-167.
- Soni, N., Jain, K., Gupta, U. and Jain, N. (2015). Controlled delivery of Gemcitabine Hydrochloride using mannosylated poly (propyleneimine) dendrimers. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(11), 1-17.
- Stevanovic, M. and Uskokovic, D. (2009). Poly (lactide-co-glycolide)-based micro and nanoparticles for the controlled drug delivery of vitamins. *Current Nanoscience*, 5,1-14.
- Tabandeh, H. and Mortazavi, S. A. (2013). An Investigation into Some Effective Factors on Encapsulation Efficiency of Alpha-Tocopherol in MLVs and the Release Profile from the Corresponding Liposomal Gel. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 12, 21-30.
- Taluja, A., Youn, Y. S. and Bae, Y. H. (2007). Novel approaches in microparticulate PLGA delivery systems encapsulating proteins. *Journal of Materials Chemistry*, 7(38), 4002-4014.
- Tani, M., Marchi, E., Fina, M., Alinari L., Stefoni V. and Zinzani, P. L. (2006). Gemcitabine. *Haematologica Report*, 2(13), 61-64.
- Thevenot, J., Troutier, A. L., David, L., Delair, T. and Ladavie`re, C. (2007). Steric Stabilization of Lipid/Polymer Particle Assemblies by Poly(ethylene glycol)-Lipids. *Biomacromolecules*, 8, 3651-3660.
- Torchilin, V. (2011). Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(3), 131-135.
- Torchilin, V. P. (2007). Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *The AAPS Journal*, 9(2), 128-147.

- Toschi, L., Finocchiaro, G., Bartolini, S., Gioia, V. and Cappuzzo, F. (2005). Role of gemcitabine in cancer therapy. *Future Oncology*, 1(1), 7-17.
- Tripathy, D. (2002). Overview: Gemcitabine as Single-Agent Therapy for Advanced Breast Cancers. *Clinical Breast Cancer*, 3, 8-11.
- Troutier, A. L., Delair, T., Pichot, C. and Ladavière, C. (2005). Physicochemical and interfacial investigation of lipid/polymer particle assemblies. *Langmuir*, 21(4), 1305-1313.
- Tsukada, Y., Hara, K., Bando, Y., Huang, C. C., Kousaka, Y., Kawashima, Y., Morishita, R. and Tsujimoto, H. (2009). Particle size control of poly(dl-lactide-co-glycolide) nanospheres for sterile applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 370, 196-201.
- Tsukatani, T., Higuchi, T., Suenaga, H., Akao, T., Ishiyama, M., Ezoe, T. and Matsumoto, K. (2009). Colorimetric microbial viability assay based on reduction of water-soluble tetrazolium salts for antimicrobial susceptibility testing and screening of antimicrobial substances. *Analytical Biochemistry*, 393, 117-125.
- Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. (2016). Türkiye Kanser İstatistikleri. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fkanser.gov.tr%2FDosya%2Fkayitcilik%2F2009kanseraporu.pdf&date=2017-05-01>, Son Erişim Tarihi: 1 Mayıs 2017.
- van Rijt, S. H., Bein, T. and Meiners, S. (2014). Medical nanoparticles for next generation drug delivery to the lungs. *European Respiratory Journal*, 44, 765-774.
- Vandana, M. and Sahoo, S. K. (2010). Long circulation and cytotoxicity of PEGylated gemcitabine and its potential for the treatment of pancreatic cancer. *Biomaterials*, 31(35), 9340-9356.
- Vaze, O. S. (2016). Pharmaceutical Nanocarriers (Liposomes and Micelles) in Cancer Therapy. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 7, 1-2.
- Vetten, M. A., Yah, C. S., Singh, T. and Gulumian, M. (2014). Challenges facing sterilization and depyrogenation of nanoparticles: Effects on structural stability and biomedical applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 10, 1391-1399.
- Vijayakumar, M. R., Kosuru, R., Vuddanda, P. R., Singh, S. K. and Singh, S. (2016). Trans resveratrol loaded DSPE PEG 2000 coated liposomes: An evidence for prolonged systemic circulation and passive brain targeting. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 33, 125-135.

- Vineeth, P., Vadaparthi, P., Kumar, K., Babu, B., Rao, A. and Babu, K. S. (2014). Influence of Organic Solvents on Nanoparticle Formation and Surfactants on Release Behaviour In-Vitro Using Costunolide As Model Anticancer Agent. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(4), 638-645.
- Von Woedtke, T. and Kramer, A. (2008). The limits of sterility assurance. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär*, 3(3), 1-10.
- Wagner, A. and Vorauer-Uhl, K. (2010). Liposome Technology for Industrial Purposes. *Journal of Drug Delivery*, 2011, 1-9.
- Wang, H., Cheng, H., Wang, F., Wei, D. and Wang, X. (2010). An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of *Escherichia coli* cells. *Journal of Microbiological Methods*, 82, 330-333.
- Wang, S., Yu, H. and Wickliffe, J. K. (2011). Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. *Toxicology in Vitro*, 25, 2147-2151.
- Wang, W. (2000). Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, 203, 1-60.
- Wang, X., Yang, L., Chen, Z. G. and Shin, D. M. (2008). Application of Nanotechnology in Cancer Therapy and Imaging. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 58(2), 97-110.
- Wang, Y., Fan, W., Dai, X., Katragadda, U., Mckinley, D., Teng, Q. and Tan, C. (2014). Enhanced tumor delivery of gemcitabine via PEG-DSPE/TPGS mixed micelles. *Molecular Pharmaceutics*, 11(4), 1140-1150.
- Wang, Y., Kho, K., Cheow, W. S. and Hadinoto K. (2012). A comparison between spray drying and spray freeze drying for dry powder inhaler formulation of drug-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 424(1-2), 98-106.
- Weigelt, B., Peterse, J. L. and Van't Veer, L. J. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature Reviews Cancer*, 5(8), 591-602.
- Wischke, C. and Schwendeman, S. P. (2008). Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 364, 298-327.
- Wong, H., Bendayan, R., Rauth, A. and Wu, X. (2006). Simultaneous delivery of doxorubicin and GG918 (Elacridar) by new polymer-lipid hybrid nanoparticles (PLN) for enhanced treatment of multidrug-resistant breast cancer. *Journal of Controlled Release*, 116, 275-284.

- Wong, S. Y. and Hynes, R. O. (2006). Lymphatic or hematogenous dissemination: How does a metastatic tumor cell decide. *Cell Cycle*, 5(8), 812-817.
- Xu, X., Khan, M. A. and Burgess, D. J. (2012). Predicting hydrophilic drug encapsulation inside unilamellar liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 423(2), 410-418.
- Yang, F., Jin, C., Jiang, Y., Li, J., Di, Y., Ni, Q. and Fu, D. (2011). Liposome based delivery systems in pancreatic cancer treatment: from bench to bedside. *Cancer Treatment Reviews*, 37(8), 633-642.
- Yang, Z., Luo, X., Zhang, X., Liu, J. and Jiang, Q. (2013). Targeted delivery of 10-hydroxycamptothecin to human breast cancers by cyclic RGD-modified lipid-polymer hybrid nanoparticles. *Biomedical Materials*, 8,1-11.
- Yerlikaya, F., Ozgen, A., Vural, I., Guven, O., Karaagaoglu, E., Khan, M. A. and Capan, Y. (2013). Development and Evaluation of Paclitaxel Nanoparticles Using a Quality-by-Design Approach. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102(10), 3748-3761.
- Young, T. J., Johnston, K. P., Pace, G. W. and Mishra, A. K. (2003). Phospholipid-stabilized nanoparticles of cyclosporine A by rapid expansion from supercritical to aqueous solution. *AAPS Pharmscitech*, 5(1), 70-85.
- Zhang, L. and Zhang, L. (2010). Lipid-polymer hybrid nanoparticles: Synthesis, characterization and applications. *World Scientific*, 1(1-2), 163-173.
- Zhang, L., Chan, J. M., Gu, F. X., Rhee, J. W., Wang, A. Z., Radovic-Moreno, A. F., Alexis, F., Langer, R. and Farokhzad, O. C. (2008). Self-Assembled Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles: A Robust Drug Delivery Platform. *ACS Nano*, 2(8), 1696-1702.
- Zhao, S., Li, W. and Gu, L. (2012). Biomechanical prediction of abdominal aortic aneurysm rupture risk: Sensitivity analysis. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 5, 664-671.
- Zhao, Y., Lin, D., Wu, F., Guo, L., He, G., Ouyang, L., Song, X., Huang, W. and Li, X. (2014). Discovery and in Vivo Evaluation of Novel RGD-Modified Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles for Targeted Drug Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 17565-17576.
- Zolgharnein, J., Shahmoradi, A. and Ghasemi, J. B. (2013). Comparative study of Box-Behnken, central composite, and Doehlert matrix for multivariate optimization of Pb (II) adsorption onto Robinia tree leaves. *Journal of Chemometrics*, 27(1-2), 12-20.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı

HİZMETE ÖZEL

T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ KOMUTANLIĞI
ANKARA



17 Ekim 2014

HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

Toplantı Tarihi : 17 Ekim 2014
Toplantı Sayısı : 2014-7
Etik Kurul Kayıt Numarası : Etik-2014-42
Karar Numarası : 14/188
Araştırma Yürütücüsü : Prof.Dr.Sevgi TAKKA
Onaylanan Hayvan Türü Ve Sayısı : Rat: 72 (6 Adet Ön Çalışma)
Bilimsel Kurullara Başvuru Süresi : 12 Ay
Etik Onayı Geçerlilik Süresi : 24 Ay

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi/Eczacılık Teknolojisi Bölümünden Prof.Dr.Sevgi TAKKA'nın 13.10.2014 gün ve ETİK-2014/42 no'lu "Gemsitabin HCL içeren lipit polimer hibrit nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin in vivo antitümör etkisi ve farmakokinetik parametrelerin değerlendirilmesi" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliğiyle kabul edilmiştir.

Ömer AZAL
Prof. Hv.Tbp.Tuğgenaral.
GATA Hayvan Deneyleri Etik Krl.
Başkanı

HİZMETE ÖZEL

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı :YALÇIN, Tahir Emre
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 1987-KONYA
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 312 202 30 41
 Faks : 312 212 79 58
 e-mail : emreyalcin@gazi.edu.tr



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Eczacılık/Farmasötik Teknoloji	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2011
Lise	Kocaeli Anadolu Lisesi	2006

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2012-devam ediyor	Gazi Üniversitesi	Araştırma görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Yalcin, T. E., Ilbasimis-Tamer, S. and Takka, S. (2017). Effect of Organic Solvents on Gemcitabine Loaded PLGA Nanoparticles. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42, 15-19.

Yalcin, T. E, Ilbasimis-Tamer, S., Ibisoglu, B., Özdemir, A., Ark, M. and Takka, S. Gemcitabine hydrochloride-loaded liposomes and nanoparticles: comparison of encapsulation efficiency, drug release, particle size, and cytotoxicity. *Pharmaceutical Development and Technology*, doi:10.1080/10837450.2017.1357733.

Uluslararası Sempozyum, Kongre veya Konferans Bildirileri

Yalcin, T. E., Ilbasmis-Tamer, S. and Takka, S. Development and Evaluation of Gemcitabine HCl Loaded PLGA Nanoparticles. 17th International Pharmaceutical Technology Symposium (IPTS), September 8-10, Antalya, Turkey, 2014.

Yalcin, T. E., Ilbasmis-Tamer, S. and Takka, S. Effect of Polymer Characteristics on Particle Size and Encapsulation Efficiency. 6th BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences, September 10-12, Helsinki, Finland, 2015.

Yalcin, T. E., Ilbasmis-Tamer, S. and Takka, S. Development and Characterization of Gemcitabine Hydrochloride Loaded Liposomes. American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS), October 25-29, Orlando, Florida, USA, 2015.

Yalcin, T. E., Ilbasmis-Tamer, S. and Takka, S. The Effect of Type of Organic Solvents on The Characteristics of Gemcitabine HCl Loaded Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles. 1st International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS), November 12-15, Antalya, Turkey, 2015.

Yalcin, T. E., Ilbasmis-Tamer, S. and Takka, S. Preparation and Characterization of Gemcitabine HCl Loaded Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles, 14th European Symposium on Controlled Drug Delivery, April 13-15, Egmond aan Zee, The Netherlands, 2016.

Hobiler

Spor yapmak, seyahat etmek, kitap okumak



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...

