

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

**RİVASTİGMİNİN LİPOZOM FORMÜLASYONUNUN GELİŞTİRİLMESİ
VE HÜCRE KÜLTÜRLERİNDEN GEÇİŞİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. N. Başaran MUTLU

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Zelihağül DEĞİM

ANKARA
Aralık 2007

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

**RİVASTİGMİNİN LİPOZOM FORMÜLASYONUNUN GELİŞTİRİLMESİ
VE HÜCRE KÜLTÜRLERİNDEN GEÇİŞİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. N. Başaran MUTLU

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Zelihağül DEĞİM

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Araştırma Fonundan
02/2006-17 kodlu proje olarak desteklenmiştir.

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul G.Ü.E.T-07.011
sayılı etik kurul kararıyla kabul edilmiştir.

ANKARA
Aralık 2007

*En zor zamanlarımda yanımda olan, her
kararımda beni destekleyen, benden ilgi
ve sabırlarını esirmeyen sevgisi
ANNEM ve BABAMA...*

İÇİNDEKİLER	Sayfa no
Kabul ve onay	
İçindekiler	I
Şekiller, Resimler, Grafikler	XI
Tablolar	XIX
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. Alzheimer Hastalığı	4
2.1.1. Alzheimer Hastalığında Tedavi Yaklaşımları	5
2.2. Kolinesteraz İnhibitörleri	8
2.3. Rivastigmin Hidrojen Tartarat	9
2.3.1. Yapısı ve Özellikleri	9
2.3.2.Kullanım Alanları	10
2.3.3.Etki Mekanizması	10
2.3.4.Farmakokinetiği	12
2.3.4.1. Absorbsiyon	12
2.3.4.2. Dağılım	13
2.3.4.3. Metabolizasyon-Eliminasyon	14
2.3.4.4. Yan Etkileri	15
2.3.4.5. Miktar Tayini Yöntemleri	16
2.3.4.6. Ticari Piyasa Preparatları	17
2.4. Lipozomlar	17
2.4.1. Lipozomların Başlıca Avantajları	18
2.4.2. Lipozom – Hücre Etki Mekanizmaları	19
2.4.3.Lipozomların Sınıflandırılması	19
2.4.4.Lipozom Hazırlanmasında Kullanılan Fosfolipitler	22
2.4.5. Lipozom Hazırlama Yöntemleri	23
2.4.6. Lipozomların Tedavide Kullanılışı	25
2.4.7. Lipozomların Özellikleri (Karakterizasyonu)	27
2.4.8. Lipozom Davranışlarını Etkileyen	
Fizikokimyasal Parametreler	27

2.4.9. Lipozomların Fiziksel	
Karaterizasyonunda Kullanılan Teknikler	28
2.4.10 .Lipozomal Bileşenlerin Kimyasal Analizi	28
2.4.11 .Lipozomlarda Kalite Kontrolleri	29
2.5. Hücre Kültürleri	31
2.5.1. Hücre Kültür Sistemlerinin Hayvan	
Deneylerine Üstünlükleri	31
2.5.2 Hücre Kültürü Çalışmalarında	
Genel Olarak Önemli Olan Noktalar	32
2.5.3. Hücre Kültür Çalışmalarında Ortam Seçimi	33
2.5.4. Kültür Ortamının Fizikokimyasal Özellikleri	33
2.5.5. Hücre Kültür Ortamlarının Bileşenleri	34
2.5.6. Hücre Kültürlerinde Kullanılan Membranlar	36
2.5.7. Geçiş Çalışmalarında Kullanılan	
Sistemlere Örnekler	38
2.6. Caco-2(Kolon Karsinoma)Hücreleri ve Özellikleri	39
2.6.1. Caco-2 Hücrelerinin Kullanım Alanları	41
2.6.2. İnce Barsaktan Geçiş	42
2.6.3. İntestinal Dokulardan İlaç Geçişinin	
Hücre Tek Tabakalarıyla Kıyaslanması	43
2.6.4. Caco-2 Hücrelerinden İlaç	
Absorpsiyonunun Değerlendirilmesinde	
Kullanılabilecek İlaça Ait Moleküler Özellikler	45
2.6.5. Caco-2 Hücrelerinin Bütünlüğünün ve	
Canlılığının Değerlendirilmesi	45
2.7. MDCK (Madin Darby Canine Kidney)	
Hücre Özellikleri	45
2.8. Kan-Beyin Engeli	46
2.8..1 Kan-Beyin Engelinde Transport Mekanizmaları	47
2.8.2. Kan-Beyin Engelini Taklit Eden İn Vitro Modeller	49
3. GEREÇ VE YÖNTEM	50

3.1.GEREÇ	50
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	50
3.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler	51
3.2 YÖNTEM	52
3.2.1. Rivastigmin Tartaratın Miktar Tayini	
Yönteminin Geliştirilmesi	52
3.2.2.Rivastigminin HPLC ile Miktar	52
Tayini Yönteminin Validasyonu	
3.2.2.1. Doğrusallık	53
3.2.2.2. Doğruluk ve Geri Elde	54
3.2.2.3. Kesinlik	54
3.2.2.4.Özgünlük ve Seçicilik	56
3.2.2.5.Duyarlılık ve Saptama Sınırı	56
3.2.3. HPLC’de Sodyum Taurokolat Miktar	
Tayini Metot Validasyonu	56
3.2.3.1.Doğrusallık	57
3.2.3.2. Doğruluk ve Geri Elde	57
3.2.3.3. Kesinlik	58
3.2.3.4. Özgünlük ve Seçicilik	58
3.2.3.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı	58
3.2.4. Dimetil-β-Siklodekstrin’e Ait Spektrofotometrik	
Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu	59
3.2.4.1 Doğrusallık	60
3.2.4.2. Doğruluk ve Geri Elde	60
3.2.4.3. Kesinlik	60
3.2.4.4. Özgünlük ve Seçicilik	61
3.2.4.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı	61
3.2.5. MTT Testi	61
3.2.6. İn vitro ve in vivo Çalışmalarda Kullanılan	
Formülasyonlar	65

3.2.6.1. İn vitro ve in vivo Çalışmalarda	
Kullanılan Lipozomların Hazırlanması	66
3.2.6.2. İn vitro ve in vivo Çalışmalarda	
Kullanılan Lipozomların Karakterizasyonu	67
3.2.6.2.1. Lipozomların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı	67
3.2.6.2.2. Lipozomların Şekli	68
3.2.6.2.3. Lipozom İçinde Hapsedilen Rivastigmin,	
Dimetil- β -CD ve Sodyum Taurokolat Miktar Tayinleri	68
3.2.6.2.4. Lipozomların Zeta Potansiyelleri	69
3.2.6.3 .Lipozom Formülasyonlarına Ait	
Stabilite Çalışmaları	69
3.2.6.3.1. Lipozom Formülasyonlarında	
Rivastigmin Miktar Tayini	69
3.2.6.3.2. Lipozom Formülasyonlarında	
Sodyum Taurokolat Miktar Tayini	69
3.2.6.3.3. Lipozom Formülasyonlarında	
Dimetil- β -CD Miktar Tayini	70
3.2.6.3.4. Lipozomların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımları	70
3.2.6.3.5. Lipozomların Zeta Potansiyeli Ölçümleri	70
3.2.7. İn vitro Geçiş Çalışmaları	70
3.2.7.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	71
3.2.7.1.1. Caco-2 ve MDCK Hücrelerinin Üretilmesi	71
3.2.7.1.2. Caco-2 ve MDCK Hücrelerinden Geçiş Çalışmaları	71
3.2.7.1.2.1. Rivastigminin Geçirgenlik	
Katsayısının (log k) Hesaplanması	73
3.2.7.1.2.2. Hücrelerin Elektriksel Dirençlerinin Ölçülmesi	74
3.2.7.1.3. Geçiş Çalışmalarında Kullanılan Üzerinde	
Hücre Bulunmayan Filtrelerden Geçiş Çalışmaları	74
3.2.7.2. Diyaliz Membran Geçişleri	74
3.2.8. İn vivo Çalışmalar	75
3.2.8.1. İn vivo Çalışmalarda Kullanılan Deney Hayvanları	75

3.2.8.2. İn vivo Deney Tasarımı	76
3.2.8.3. Hayvanlara Uygulanacak Formülasyonların Hazırlanması	78
3.2.8.4 Hayvanlara Uygulanan Formülasyonlarda Rivastigmin Dozu	79
3.2.8.5. İn vivo (Fare) Deneyler için Metot Validasyonu	79
3.2.8.5.1. Kan Numuneleri İçin Spektrofotometrik Metot Validasyonu	81
3.2.8.5.1.1. Doğrusallık	81
3.2.8.5.1.2. Doğruluk ve Geri Elde	81
3.2.8.5.1.3. Kesinlik	82
3.2.8.5.1.4. Özgünlük ve Seçicilik	82
3.2.8.5.1.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı	82
3.2.8.5.2. Beyin Numuneleri İçin Spektrofotometrik Metot Validasyonu	83
3.2.8.5.2.1. Doğrusallık	83
3.2.8.5.2.2. Doğruluk ve Geri Elde	83
3.2.8.5.2.3. Kesinlik	84
3.2.8.5.2.4. Özgünlük ve Seçicilik	84
3.2.8.5.2.5 Duyarlılık ve Saptama Sınırı	84
3.2.8.5.3. Hayvan Gruplarının Beyinlerinin Histolojik Olarak Değerlendirilmesi	85
3.2.9. Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	86
4. BULGULAR	87
4.1. Rivastigmin Tartarat'a Ait Çalışmalarla İlgili Bulgular	87
4.1.1. UV Spektrumuna Ait Bulgular	87
4.1.2. HPLC Yöntemiyle Rivastigmin Miktar Tayini Yönteminin Validasyonuna Ait Bulgular	88
4.1.2.1. Rivastigmin'in Serumlu DMEM İçinde Validasyonuna Ait Bulgular	88

4.1.2.1.1. Doğrusallık	89
4.1.2.1.2 Doğruluk ve Geri Elde	90
4.1.2.1.3. Kesinlik	91
4.1.2.1.4. Özgünlük ve Seçicilik	93
4.1.2.1.5. Duyarlılık ve saptama sınırı	94
4.1.2.2 .Rivastigmin'in pH 7.4 Fosfat Tamponu İçinde Validasyonuna Ait Bulgular	94
4.1.2.2.1. Doğrusallık	94
4.1.2.2.2. Doğruluk ve Geri Elde	95
4.1.2.2.4. Özgünlük ve Seçicilik	97
4.1.2.2.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı	98
4.2. HPLC Yöntemiyle Sodyum Taurokolat Miktar Tayini Yönteminin Validasyonuna Ait Bulgular	98
4.2.1. Doğrusallık	98
4.2.2. Doğruluk ve Geri Elde	99
4.2.3. Kesinlik	100
4.2.4. Özgünlük ve Seçicilik	100
4.2.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı	101
4.3. Dimetil- β -CD'nin Spektrofotometrik Miktar Tayini Validasyonu	101
4.3.1. Doğrusallık	101
4.3.2 .Doğruluk ve Geri Elde	102
4.3.3. Kesinlik	103
4.3.4. Özgünlük ve Seçicilik	103
4.3.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı	104
4.4. MTT Testine Ait Bulgular	104
4.5. Lipozom Formülasyonlarına Ait Bulgular	112
4.5.1. Lipozomların Karakterizasyonuna Ait Bulgular	112
4.5.1.1. Lipozomların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular	112

4.5.1.1.1. Rivastigmin Lipozomlarının Partikül Büyükülüğü ve Dağılımına Ait Bulgular	112
4.5.1.1.2 Rivastigmin ve Dimetil- β -CD Lipozomlarının Partikül Büyükülüğü ve Dağılımına Ait Bulgular	113
4.5.1.1.3 Rivastigmin ve Sodyum Taurokolat Lipozomlarının Partikül Büyükülüğü ve Dağılımına Ait Bulgular	114
4.5.1.2. Lipozomların Zeta Potansiyel Ölçümlerine Ait Bulgular	115
4.5.1.2.1. Rivastigmin Lipozomlarının Zeta Potansiyel Ölçümlerine Ait Bulgular	115
4.5.1.2.2 Rivastigmin ve Dimetil- β -CD Lipozomlarının Zeta Potansiyel Ölçümlerine Ait Bulgular	116
4.5.1.2.3. Rivastigmin ve Sodyum Taurokolat Lipozomlarının Zeta Potansiyel Ölçümlerine Ait Bulgular	117
4.5.1.3. Lipozomların Şekilleri	118
4.5.1.4. Lipozomlarda Hapsedilen Rivastigmin Miktar Tayini	119
4.5.1.4.1 Lipozomlarda Hapsedilen Sodyum Taurokolat Miktar Tayini	119
4.5.1.4.2 Lipozomlarda Hapsedilen Dimetil- β -CD Miktar Tayini	119
4.5.1.5. Rivastigminin Lipozom Formülasyonları İçindeki Stabilitesine Ait Bulgular	119
4.6. Hücre Kültüründen Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular	123
4.6.1. Hücre İçermeyen Membran Geçişleri	123
4.6.2. Caco-2 Hücrelerinden Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular	124
4.6.2.1. Caco-2 Hücrelerinden Geçiş Çalışmalarında log k Değerlerinin Hesaplanması	126
4.6.2.2 Caco-2 Hücrelerinin Elektrik Dirençlerine Ait Bulgular	129
4.6.3. MDCK Hücre Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular	129

4.6.3.1. MDCK Hücrelerinden Geçiş Çalışmalarında log k Değerlerinin Hesaplanması	131
4.6.3.2. MDCK Hücrelerinin Elektrik Dirençlerine Ait Bulgular	134
4.6.4. Diyaliz Membrandan Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular	135
4.6.5. Caco-2, MDCK ve Diyaliz Membranlardan Geçiş Çalışmalarının Karşılaştırılması	138
4. 7. İN VİVO SONUÇLAR	141
4.7.1 Validasyon Bulguları (KAN)	141
4.7.1.1. Doğrusallık	141
4.7.1.2. Doğruluk ve Geri Elde	142
4.7.1.3. Kesinlik	142
4.7.1.4. Özgünlük ve Seçicilik	143
4.7.1.5. Duyarlılık ve saptama sınırı	143
4.7.2. Validasyon Bulguları (BEYİN)	144
4.7.2.1. Doğrusallık	144
4.7.2.2 .Doğruluk ve Geri Elde	144
4.7.2.3. Kesinlik	145
4.7.2.4. Özgünlük ve Seçicilik	145
4.7.2.5.Duyarlılık ve Saptama Sınırı	145
4.7.3. Hayvan Deneyleri Kan Sonuçları	146
4.7.4. Hayvan Deneyleri Beyin İnceleme Sonuçları	148
4.7.5. İn vivo-İn vitro Korelasyon Çalışmaları	149
4.7.6. Histolojik Bulgular	154
5. TARTIŞMA	164
5.1. Analiz Yöntemlerinin Seçimi	164
5.1.1. Rivastigmin için Analiz Yönteminin Seçimi	164
5.1.2. Sodyum Taurokolat için Analiz Yönteminin Seçimi	164
5.1.3.Dimetil-β-CD için Analiz Yönteminin Seçimi	165
5.2. MTT Yöntemine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	165
5.4. Rivastigminin Hücre Kültürlerinden Geçiş Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	169

5.4.1. Rivastigminin Caco-2 Hücrelerinden Geçiş Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	170
5.4.1.1. Rivastigminin Caco-2 Hücrelerinden Geçirgenlik Katsayısına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	172
5.4.1.2. Caco-2 Hücrelerinin Elektriksel Dirençlerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	173
5.4.2. Rivastigminin MDCK Hücrelerinden Geçiş Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	173
5.4.2.1. Rivastigminin MDCK Hücrelerinden Geçirgenlik Katsayısına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	175
5.4.2.2. MDCK Hücrelerinin Elektriksel Dirençlerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	176
5.5. Diyaliz Membrandan Salım Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	177
5.5.1. Hücre Kültürü ve Diyaliz Membran Geçiş Çalışmalarının Birlikte Değerlendirilmesi	179
5.6. Lipozom Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	180
5.6.1. Lipozom Formülasyonuna Ait Karakterizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi	180
5.6.2. Lipozom Formülasyonuna Ait Zeta Potansiyeli Ölçümlerinin Değerlendirilmesi	181
5.6.3. Lipozomlar İçine Hapsedilen Rivastigmin Miktarının Değerlendirilmesi	182
5.6.4. Lipozomlar İçine Hapsedilen Sodyum Taurokolat Miktarının Değerlendirilmesi	183
5.6.5. Lipozomlar İçine Hapsedilen Dimetil- β -CD Miktarının Değerlendirilmesi	183
5.6.6. Rivastigminin Lipozom Formülasyonu İçindeki Stabilitésinin Değerlendirilmesi	183
5.7. İn vivo Hayvan Deneylerinin Değerlendirilmesi	185

5.7.1. İn vivo deneylerde Kullanılan Yöntem	
Seçiminin Değerlendirilmesi	185
5.7.2. Deney Hayvanlarının Seçimi	185
5.7.3. Hayvan Deneylerinde Kan Bulgularının Değerlendirilmesi	185
5.7.4. İn vitro-in vivo Korelasyon Çalışmasının Değerlendirilmesi	188
5.7.5. Hayvan Deneylerinde Beyin Bulgularının Değerlendirilmesi	189
5.7.6. Hayvan Deneylerinde Beyin Örneklerinin TEM Mikroskobu Görüntülerinin Değerlendirilmesi	190
6. SONUÇ	193
7. ÖZET	195
8. SUMMARY	197
9. KAYNAKLAR	199
10. EKLER	222
10.1 TEŞEKKÜR	222
11. ÖZGEÇMİŞ	223

ŞEKİLLER

Şekil

Sayfa no

1. Sağlıklı bir insan ile Alzheimer hastası bir insanın beyin kabukları karşılaştırılması	5
2. Alzheimer hastalığında değişen nörotransmisyonun şematik gösterimi	7
3. Kolinerjik sistemin fonksiyonel özellikleri	8
4. Rivastigmin hidrojen tartratın kimyasal yapısı	9
5. Rivastigminin asetilkolinesteraz üzerindeki etki mekanizması	11
6. Rivastigminin asetilkolinesteraza bağlanması	12
7. Rivastigminin aç karnına ve yemeklerle birlikte alındığında ortaya çıkan AUC 'ler	13
8. Rivastigmin tartratın dekarbamillenmiş ana metabolitine (NAP 226-90) hidrolizi	15
9. Konvansiyonel çok tabakalı lipozomun şematik görüntüsü	18
10. MLV 'nin şematik görünüşü	22
11. Bir fosfolipidin genel yapısı ve bazı fosfolipitlerin kimyasal yapılarının şematik gösterimi	23
12. Lipozom hazırlama yöntemlerinin şematik gösterimi	25
13. a,b Hücre kültüründen geçiş çalışmalarında yaygın olarak kullanılan sistemler	38
14. İntestinal epitelin şematik görünüşü	42
15. Barsak ve Caco-2 hücrelerinin anatomik yapıları	44
16. Kan-beyin engelini oluşturan hücre tiplerinin üç boyutlu ve enine kesit olarak gösterimi	47
17. Kan-beyin engelinde transport mekanizmaları	48
18. MTT reaksiyonunun kimyasal gösterimi	62
19. Farklı konsantrasyonlardaki maddelerin DMEM içinde hücrelere tatbik edilmesi	64
20. MTT testinde kullanılan Caco-2 hücrelerinin kontrol gruplarının inverted mikroskop görüntüleri	64

21.MTT testinde kullanılan L-929 hücrelerinin kontrol gruplarının inverted mikroskop görüntüleri	65
22.MTT testinde kullanılan MDCK hücrelerinin kontrol gruplarının inverted mikroskop görüntüleri	65
23.Lipozomların(MLV tipi) hazırlanması	67
24.Hücre geçiş çalışmalarında kullanılan diffüzyon hücresi	73
25.Farelere oral ve intraperitoneal ilaç uygulaması	77
26.Farelerden intrakardiyak olarak kan alınması	77
27.Farelerin beyinlerinin çıkarılışı	78
28.Beyinleri çıkarılmış fareler	78
29.Rivastigmin tartarata ait 200-300 nm arası dalga boyu taraması	88
30.DMEM içerisinde 12.5 µg/mL ve 24 ng/mL derişimlerde rivastigmin pikleri	89
31.Rivastigminin DMEM'li ortamda HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği	90
32.Sodyum taurokolat enjeksiyonu ile elde edilen pik(a), dimetil-β-CD enjeksiyonu ile elde edilen pik(b)	92
33.Rivastigminin HPLC yöntemiyle pH 7.4 fosfat tamponu içerisinde elde edilen kalibrasyon grafiği	94
34.Rivastigminin özgünlük ve seçicilik deneyi sonuç piki	97
35.Sodyum taurokolatın HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği	98
36.Bidistile su içerisinde 50 µg/mL derişimde sodyum taurokolat piki	99
37.Sodyum taurokolatın özgünlük ve seçicilik deneyi sonuç piki	101
38.Dimetil-β-CD'nin spektrofotometrik yöntemle elde edilen kalibrasyon grafiği	102
39.MTT testi sonucunda MDCK hücrelerinde meydana gelen değişim	104
40.MTT testi sonucunda L-929 hücrelerinin kontrol	

grubunda meydana gelen değişim	105
41. Rivastigminin MDCK hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	105
42. Rivastigminin L-929 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	106
43. Rivastigminin Caco-2 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	106
44. Sodyum taurokolatın MDCK hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	107
45. Sodyum taurokolatın L-929 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	107
46. Sodyum taurokolatın Caco-2 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	108
47. Dimetil- β -CD'nin MDCK hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	108
48. Dimetil- β -CD'nin L-929 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	109
49. Dimetil- β -CD'nin Caco-2 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	109
50. Boş lipozom formülasyonunun kullanılan lipitlerin MDCK hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	110
51. Boş lipozom formülasyonunun L-929 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	110
52. Boş lipozom formülasyonunun Caco-2 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	111
53. Rivastigmin lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları	113
54. Rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren lipozomlara ait partikül büyüklüğü sonuçları	114
55. Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomlara ait partikül büyüklüğü sonuçları	115

56. Rivastigmin lipozomlarına ait zeta potansiyeli sonuçları	116
57. Rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren lipozomlara ait zeta potansiyeli sonuçları	117
58. Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomlara ait zeta potansiyeli sonuçları	118
59. MLV tipi rivastigmin lipozomlarının elektron mikroskobu görüntüsü	118
60. Stabilit� çalışmalarında rivastigmin lipozomlarının içindeki rivastigmin miktarının zamana göre değişimi	120
61. Stabilit� çalışmalarında rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren lipozomların içindeki rivastigmin miktarının zamana göre değişimi	121
62. Stabilit� çalışmalarında rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomların içindeki rivastigmin miktarının zamana göre değişimi	122
63. Hücre içermeyen membranlardan lipozom geçişlerine ait %k�m�latif geçen rivastigmin miktarları	123
64. Hücre içermeyen membranlardan rivastigmin çözeltisi geçişine ait %k�m�latif geçen rivastigmin miktarı	124
65. Caco-2 hücrelerinden çözelti geçişleri	125
66. Caco-2 hücrelerinden lipozom geçişleri	125
67. Caco-2 hücrelerinde Rivastigmin lipozomlarına ait log k değerlerinin hesaplandığı grafikler	127
68. Caco-2 hücrelerinde Rivastigmin çözeltilerine ait log k değerlerinin hesaplandığı grafikler	128
69. MDCK hücrelerinden lipozom geçişleri	130
70. MDCK hücrelerinden çözelti geçişleri	130
71. MDCK hücrelerinde Rivastigmin lipozomlarına ait log k değerlerinin hesaplandığı grafikler	132
72. MDCK hücrelerinde Rivastigmin çözeltilerine ait log k değerlerinin hesaplandığı grafikler	134
73. Rivastigminin lipozomlardan pH 7.4 fosfat tamponunda 37�0.5 �C'deki salım profili	136

74. Rivastigmin ve absorpsiyon artırıcı içeren çözeltilerin pH 7.4 fosfat tamponunda 37±0.5 °C'deki geçişi	138
75. Rivastigmin çözeltisine ait % kümülatif geçen miktarlar	138
76. Rivastigmin+Dimetil-β-CD çözeltisine ait % kümülatif geçen miktarlar	139
77. Rivastigmin+Sodyum taurokolat çözeltisine ait % kümülatif geçen miktarlar	139
78. Rivastigmin lipozomuna ait % kümülatif geçen miktarlar	140
79. Rivastigmin+Dimetil-β-CD lipozomuna ait % kümülatif geçen miktarlar	140
80. Rivastigmin+Sodyum taurokolat lipozomuna ait % kümülatif geçen miktarlar	141
81. Rivastigminin kanda doğrusallık sonuçları	142
82. Rivastigminin beyinde doğrusallık sonuçları	144
83. Oral verilen formülasyonlar sonucunda hesaplanan %AChE inhibisyonu sonuçları	147
84. İntraperitoneal verilen formülasyonlar sonucunda hesaplanan %AChE inhibisyonu sonuçları	147
85. Oral verilen formülasyonlar sonucunda hesaplanan %AChE inhibisyonu sonuçları	148
86. İntraperitoneal yoldan verilen formülasyonlar sonucunda hesaplanan % AChE inhibisyonu sonuçları	149
87. Sodyum taurokolat lipozomlarının Caco-2 geçişi sonucunda elde edilen %kümülatif geçen miktarın oral yolla hayvanlara uygulanan taurokolat lipozomlarının % AChE inhibisyonu(kan) değerleri arasındaki ilişki	150
88. Sodyum taurokolat lipozomlarının Caco-2 geçişi sonucunda elde edilen %kümülatif geçen miktarın intraperitoneal yolla hayvanlara uygulanan taurokolat lipozomlarının % AChE inhibisyonu(kan) değerleri arasındaki ilişki	150

89. Sodyum taurokolat lipozomlarının MDCK geçişi sonucunda elde edilen %kümülatif geçen miktarın oral yolla hayvanlara uygulanan taurokolat lipozomlarının % AChE inhibisyonu(kan) değerleri arasındaki ilişi	151
90. Sodyum taurokolat lipozomlarının MDCK geçişi sonucunda elde edilen %kümülatif geçen miktarın intraperitoneal yolla hayvanlara uygulanan taurokolat lipozomlarının % AChE inhibisyonu(kan) değerleri arasındaki ilişi	151
91. Sodyum taurokolat lipozomlarının Caco-2 geçişi sonucunda elde edilen %kümülatif geçen miktarın oral yolla hayvanlara uygulanan taurokolat lipozomlarının % AChE inhibisyonu(beyin) değerleri arasındaki ilişi	152
92. Sodyum taurokolat lipozomlarının Caco-2 geçişi sonucunda elde edilen %kümülatif geçen miktarın intraperitoneal yolla hayvanlara uygulanan taurokolat lipozomlarının % AChE inhibisyonu (beyin) değerleri arasındaki ilişi	152
93. Sodyum taurokolat lipozomlarının MDCK geçişi sonucunda elde edilen %kümülatif geçen miktarın oral yolla hayvanlara uygulanan taurokolat lipozomlarının % AChE inhibisyonu (beyin) değerleri arasındaki ilişi	153
94. Sodyum taurokolat lipozomlarının MDCK geçişi sonucunda elde edilen %kümülatif geçen miktarın intraperitoneal yolla hayvanlara uygulanan taurokolat lipozomlarının % AChE inhibisyonu(beyin) değerleri arasındaki ilişi	153
95. Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozom uygulanmış(oral yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü	154
96. Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozom uygulanmış(oral yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü	155

97. Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren çözelti uygulanmış (oral yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü	155
98. Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozom uygulanmış(ip yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü	156
99. Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren çözelti uygulanmış(ip yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü	156
100. Rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren lipozom uygulanmış(ip yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü	157
101. Rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren lipozom uygulanmış(oral yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü	157
102. Rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren çözelti uygulanmış(ip yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü	158
103. Rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren çözelti uygulanmış(oral yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü	158
104. Rivastigmin çözeltisi uygulanmış(ip yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü	159
105. Rivastigmin çözeltisi uygulanmış(ip yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü	159
106. Rivastigmin çözeltisi uygulanmış(ip yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü	160
107. Boş lipozom uygulanmış(oral yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü	160
108. Hiç bir formülasyon uygulanmayan(kontrol grubu) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü	161

109. Hiç bir formülasyon uygulanmayan(kontrol grubu) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü	161
110. Boş lipozom uygulanmış(ip yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü	162
111. Rivastigmin lipozomu uygulanmış(ip yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü	162
112. Rivastigmin lipozomu uygulanmış(oral yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü	163
113. Rivastigmin lipozomu uygulanmış(oral yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü	163

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa no
1. Bir firmanın hücre kültürü membranlarının özellikleri	37
2. Rivastigmin tartaratin HPLC ile miktar tayini koşulları	53
3. Sodyum taurokolatın HPLC ile miktar tayini koşulları	57
4. Tayin edilmek istenen siklodekstrin miktarına göre değişen fenolftalein derişimleri	59
5. Hayvan grupları	76
6. Rivastigminin DMEM içinde çözeltisinden geri elde ile hesaplanan miktarları	90
7. DMEM içinde rivastigminin sadece rivastigmin içeren lipozomdan geri elde ile hesaplanan miktarları	91
8. DMEM içinde rivastigminin rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren lipozomdan geri elde ile hesaplanan miktarları	91
9. DMEM içinde rivastigminin rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomdan geri elde ile hesaplanan miktarları	91
10. Rivastigminin DMEM içindeki deney içi kesinlik sonuçları	92
11. Rivastigminin DMEM içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları	92
12. Rivastigminin pH 7.4 fosfat tamponu içinde çözeltisinden geri elde ile hesaplanan miktarları	95
13. pH 7.4 fosfat tamponu içinde rivastigminin sadece rivastigmin içeren lipozomdan geri elde ile hesaplanan miktarları	95
14. pH 7.4 fosfat tamponu içinde rivastigminin rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren lipozomdan geri elde ile hesaplanan miktarları	95
15. pH 7.4 fosfat tamponu içinde rivastigminin rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomdan geri elde ile hesaplanan miktarları	96
16. Rivastigminin pH 7.4 fosfat tamponu içindeki deney içi kesinlik sonuçları	96

17. Rivastigminin pH 7.4 fosfat tamponu içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları	97
18. Sodyum taurokolatın bidistile su içinde çözeltiden geri elde ile hesaplanan miktarları	99
19. Sodyum taurokolatın bidistile su içinde lipozomdan geri elde ile hesaplanan miktarları	99
20. Sodyum taurokolatın bidistile su içindeki deney içi kesinlik sonuçları	100
21. Dimetil- β -CD'nin çözeltiden geri elde ile hesaplanan miktarları	102
22. Dimetil- β -CD'nin lipozomdan geri elde ile hesaplanan miktarları	102
23. Dimetil- β -CD'nin deney içi kesinlik sonuçları	103
24. Rivastigmin lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları	112
25. Rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren lipozomlara ait partikül büyüklüğü sonuçları	113
26. Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomlara ait partikül büyüklüğü sonuçları	114
27. Rivastigmin lipozomlarına ait zeta potansiyeli sonuçları	115
28. Rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren lipozomlara ait zeta potansiyeli sonuçları	116
29. Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomlara ait zeta potansiyeli sonuçları	117
30. Rivastigminin lipozom formülasyonu içindeki stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri	120
31. Rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren lipozomlarda rivastigminin stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri	121
32. Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomlarda rivastigminin stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri	122
33. Caco 2 hücrelerinde formülasyonlara ait log k değerleri	126

34. Caco-2 hücrelerinin geçiş deneylerinden sonraki elektriksel direnç değerlerinin ölçülmesi	129
35. MDCK hücrelerinde formülasyonlara ait log k değerleri	131
36. MDCK hücrelerinin geçiş deneylerinden sonraki elektriksel direnç değerlerinin ölçülmesi	134
37. Rivastigmin lipozom formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, rivastigminin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	135
38. Rivastigmin-Dimetil-B-CD lipozom formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, rivastigminin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	136
39. Rivastigmin-Sodyum taurokolat lipozom formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, rivastigminin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	136
40. Rivastigmin çözeltisinin pH 7.4 fosfat tamponunda 37 ± 0.5 °C’de diyaliz membrandan geçişinin kinetik değerlendirilmesi	137
41. Rivastigmin ve Dimetil-B-CD çözeltisinin pH 7.4 fosfat tamponunda 37 ± 0.5 °C’de diyaliz membrandan geçişinin kinetik değerlendirilmesi	137
42. Rivastigmin ve Sodyum taurokolat çözeltisinin pH 7.4 fosfat tamponunda 37 ± 0.5 °C’de diyaliz membrandan geçişinin kinetik değerlendirilmesi	137
43. Rivastigminin kanda doğruluk ve geri elde sonuçları	142
44. Rivastigminin kanda kesinlik sonuçları	143
45. Rivastigminin beyinde doğruluk ve geri elde sonuçları	144
46. Rivastigminin beyinde kesinlik sonuçları	145
47. Kan numuneleri incelenerek elde edilen AChE inhibisyon sonuçları	146
48. Beyin numuneleri incelenerek elde edilen AChE inhibisyon sonuçları	148

1. GİRİŞ

Alzheimer hastalığı, hafıza ve kavrama özelliklerini, günlük yaşam faaliyetlerini ve davranışları etkileyen bir hastalıktır. Günümüzde, tüm demans vakaları içinde en sık rastlanılanıdır.

Rivastigmin, hafif ve orta dereceli Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan, karbamat türevi bir ilaçtır. Asetilkolinesteraz ve butirilkinesteraz enzimlerini yalancı geri dönüşsüz (pseudo-irreversible) olarak inhibe ederek, asetil kolin ve butiril kolinin yıkımını engeller. Asetilkolin (ACh), öğrenmeyi ve dikkat toplamayı sağlamakta görevli primer nörotransmitter maddedir. Alzheimer hastalarında beyindeki ACh miktarı azalmaktadır. Bu nedenle AChE inhibitörleri, ACh'nin yıkımını engellemek için tedavide geniş yer tutar.

Lipozomlar, sulu kısmı lipit molekülleri tarafından oluşturulan membranla çevrilmiş mikropartiküler veya kolloidal lipit keseciklerdir. Lipozom oluşturmak için genellikle fosfolipitler kullanılır. Lipozom veziküllerinin çapları nanometre ile mikrometre boyutları arasında değişiklik gösterir. Lipozomlar, biyogeçimli ve biyoparçalanan özellikteki lipit içerikleri sayesinde hücre membran yapısına benzerlik gösterirler.

Bu çalışmanın amacı, rivastigminin lipozom formülasyonunun geliştirilmesi ve rivastigminin hücre kültürlerinden geçiş mekanizmasının incelenerek lipozom formülasyonlarının daha uzun süre AChE inhibisyonu sağlamasını gerçekleştirmektir. Lipozom formülasyonunun hücre kültürlerinden geçişini artırmak amacıyla absorpsiyon artırıcı maddeler formülasyonlarda kullanılarak geçiş etkisi araştırılmıştır. Formülasyonun geçiş özelliklerini kıyaslamak amacıyla lipozom formülasyonlarının yanı sıra çözelti formülasyonlarının da geçişleri incelenmiştir.

Hücre kültürleri, günümüzde ilaç absorpsiyonunun in vitro değerlendirilmesi için yaygın olarak kullanılan sistemlerdir. Hücre kültürleri, canlılardan alınıp canlı özelliklerini koruyacak şartlar altında yetiştirilen sistemler oldukları için, in vivo-in vitro arası özellik göstermeleri söz konusudur. Bu durumda, ilaç-absorpsiyon çalışmalarında rahatlıkla kullanılabilirler. Ayrıca, elde edilen sonuçların in vivo korelasyonlarının yüksek olması hücre kültürü sistemlerinin bir diğer avantajıdır. Bu açıdan absorpsiyon çalışmalarına amaca uygun hücre kültür sistemi ile başlayıp, yüksek absorpsiyon gösteren ilaçların deney hayvanlarına uygulanması hem deneylerde kullanılan hayvan sayısını azaltmak açısından hem de yapılan çalışmaları hafifletmek açısından faydalı olacaktır.

Bu çalışmada rivastigminin üç tip lipozom formülasyonu hazırlanmıştır. Bu lipozomlardan ilki sadece etkin madde, diğer ikisi etkin maddenin yanı sıra absorpsiyon artırıcı madde içermektedir. Absorpsiyon artırıcı olarak sodyum taurokolat ve dimetil- β -siklodekstrin kullanılmıştır.

Hücre kültürlerinden geçiş çalışmalarına başlamadan önce formülasyonlarda kullanılacak etkin ve yardımcı maddelerin, kullanılacak besi ortamı içinde bulunan serumun, hücre canlılığı üzerine etkilerini incelemek amacıyla sitotoksite çalışması yapılmıştır. Formülasyonlarda kullanılacak madde derişimlerine bu şekilde karar verilmiştir.

Hazırlanan lipozom formülasyonlarının:

- Caco-2 (Kolon Karsinoma) hücrelerinden geçişleri, çözelti formülasyonlarıyla kıyaslamalı olarak incelenmiştir.
- MDCK (Madin Darby Canine Kidney) hücrelerinden geçişleri, çözelti formülasyonlarıyla kıyaslamalı olarak incelenmiştir.

- Diyaliz membrandan geçişi, çözelti formölasyonlarıyla kıyaslamalı olarak incelenmiştir. Lipozomlardan rivastigminin salım kinetik özellikleri araştırılmıştır.
- Hazırlanan lipozom formölasyonlarının stabilite özellikleri incelenmiştir.

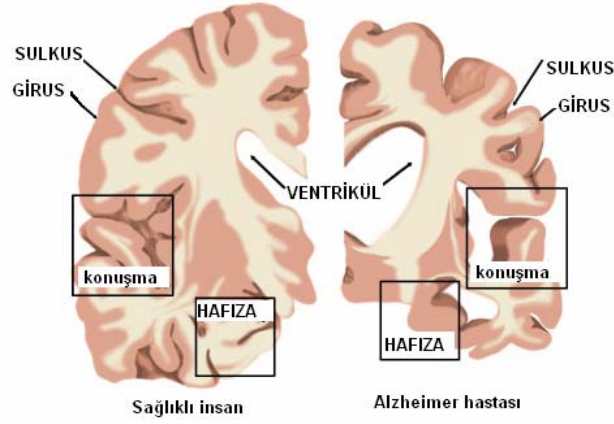
Ayrıca, hazırlanan lipozom ve çözelti formölasyonları farelere uygulanmış (in vivo), kandan ve beyinden AChE inhibisyon yüzdeleri hesaplanmıştır. Sonuçlar histolojik olarak da desteklenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı, gitgide artan nörodejeneratif bozulmaya bağlı olarak gelişen; hafıza ve kavrama özelliklerini, günlük yaşam faaliyetlerini ve davranışları etkileyen bir hastalıktır. Günümüzde, % 50-70 görülme sıklığı ile tüm demans vakaları içinde en sık rastlanılandır^{1,2}. Hastalık, özellikle yaşlı nüfusun arttığı toplumlarda oldukça önemli bir sağlık sorunudur³.

Alzheimer hastalığı gelişiminde birçok faktörün etkili olduğu düşünülse de, hastalığın sebebi ile ilgili kesin bir sonuca varılamamıştır. Hastaların beyin görüntüleri incelendiğinde, beynin hafıza ve öğrenme işlevlerinde önemli rol oynayan bölgelerinde dejenerasyonlar olduğu görülmüştür. Şekil 1’de beyin kıvrımlarını oluşturan sulkus ve giruslarda küçülmeler, ventiküllerde genişlemeler, beyin kabuğunda hafıza konuşma merkezlerindeki kıvrımların azalması ve bu alanların küçülmesi görülmektedir. Hastalığın ilerleyen zamanlarında beynin frontal lobunda da dejenerasyonlar gözlenmiştir. Frontal lop dejenerasyonuna bağlı olarak; hastalarda ilişkilendirme ve planlama, dikkatini toplama, karar verme yeteneklerinde azalma meydana gelmektedir. Hastalarda hırçınlık, asabiyet ve kayıtsızlık dikkati çeken diğer özelliklerdir⁴.



Şekil 1. Sağlıklı bir insan ile Alzheimer hastası bir insanın beyin kabukları karşılaştırılması ⁵

2.1.1. Alzheimer Hastalığında Tedavi Yaklaşımları

Alzheimer hastalığı tedavisinde diğer dejeneratif hastalıklarda olduğu gibi başlıca iki yol vardır. İlk yol, Alzheimer hastalığına bağlı primer veya sekonder olarak ortaya çıkan belirtilere yönelik tedavilerden oluşmaktadır (ör; bellek bozukluğu, depresyon veya ajitasyon). Bu tedavilerin temelini nörotransmitter kökenli tedaviler oluşturur. Bunların altta yatan nörodejeneratif süreç üzerinde bir etkileri olmamakla birlikte, semptomatik iyileştirmeyi amaçlar. İkinci yol ise hastalık sürecini yavaşlatmaya veya hastalığın ortaya çıkmasını ertelemeye yönelik tedavilerden oluşur⁶.

a. Semptomatik Tedaviler

Nörotransmitterler ve nöropeptidler

Asetilkolinesteraz inhibitörü ilaçlar

Beyindeki muskarinik reseptörlerin selektif antagonistleri

Bioaminerjik sistemlere yönelik tedavi

b. Hastalığın Seyrini Yavaşlatan veya Başlamasını Geciktirmeye Yönelik Tedaviler

Amiloid prekürsör protein ve beta-amiloid

Apolipoprotein E

Tau proteini

Östrojenler

Nörotrofik faktörler

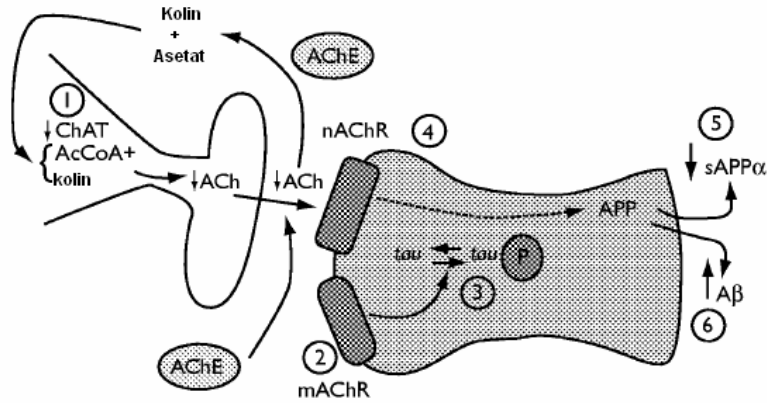
Antienflamatuar ilaçlar

Serbest radikal inhibitörleri

Kalsiyum kanal blokörleri

Diğer ajanlar⁶

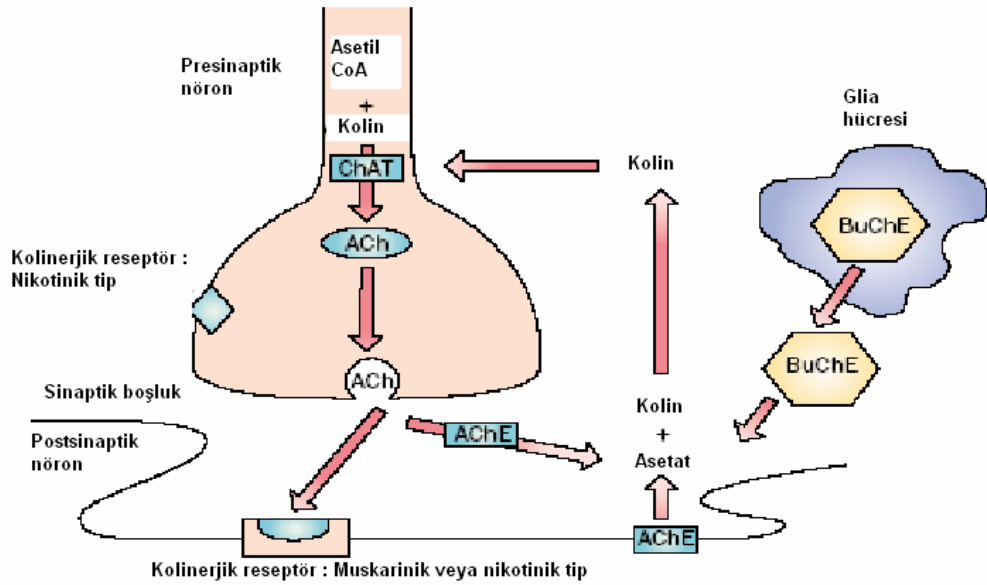
Alzheimer hastalığının tamamiyle iyileştirici bir tedavi yöntemi yoktur. Sistemdeki temel sorun, kolinerjik azalma ve glutamat artışı sonucunda nöron kaybı meydana gelmesidir. Kolinerjik faaliyetin artırılması ve meydana gelen glutamat toksisitesinin azaltılması hastanın yaşam kalitesini artırır, hastalığın ilerlemesini yavaşlatır; fakat meydana gelen nöron kaybı geri döndürülemez⁷. Asetilkolin (ACh), öğrenmeyi ve dikkat toplamayı sağlamakta görevli primer nörotransmitter maddedir. Alzheimer hastalığında görülen ACh eksikliği kolinerjik hipotezin ortaya çıkmasına ışık tutmuştur. Kolinerjik hipotez, nörolojik impulsların beyin sinapslarındaki iletim yetersizliğine bağlı olarak gelişen fonksiyon bozukluklarını ifade etmektedir⁸.



Şekil 2. Alzheimer hastalığında değişen nörotransmisyonun şematik gösterimi [1- Asetilkoenzim A (AcCoA) ve kolinden, asetilkolin esteraz sentezlemekte görevli kolinasetil transferaz (ChAT) enziminin yapısındaki korteks kaynaklı önemli hasar- bu yüzden sinaptik cebe salınan asetilkolin miktarı azalır 2- İkincil mesajcılarının muskarinik asetilkolin reseptörlerine (mAChR) bağlanması azalır 3-Azalan bağlanma tau proteinin hiperfosforile şekline dönüşümünü sağlar ki, hiperfosforile tau proteini nörofibril düğümlerin prekürsörüdür. 4-Nikotinik asetilkolin reseptörünün (nAChR), amiloid- β ($A\beta$) ile etkileşimi 5-Bu etkileşim çözünür özellikteki amiloid prekürsör proteininin salgılanmasını azaltır 6-Bu etkileşim ayrıca amiloid- β ($A\beta$) üretimini artırır. AChE = Asetilkolinesteraz APP = Amiloid prekürsör protein]⁸

Alzheimer hastalığı'nda beyin bazı kısımlarında asetil kolin yetersizliğinin saptanması bu nörotransmitterin miktarının artırılması veya kolinesterazın inhibe edilmesinin hastalığı tedavi edeceğinin düşünülmeye sebep olmuştur⁹. Şekil 3'de asetilkolinin oluşum ve yıkım süreci görülmektedir. Sinir hücresi içine sinaptik boşluktan alınan kolin, hücre içinde bulunan asetil koenzim A (Asetil CoA) ile kolinasetil transferaz enzimi sayesinde birleşir ve asetil kolin sentezi gerçekleşir. Asetil kolin (ACh), hücre içinden sinaptik boşluğa çıktığında, burada bulunan asetilkolin esteraz enzimi ile kolin ve asetata parçalanır. Glia hücrelerinden sentezlenip sinaptik boşluğa bırakılan butirikolin esteraz (BuChE) da asetilkolinin parçalanmasını az bir miktar gerçekleştirir.

Sinaptik boşlukta bulunan kolin asetilkolin sentezinde kullanılmak üzere sinaptik boşluktan hücre içine geri alınır¹⁰.



Şekil 3. Kolinergik sistemin fonksiyonel özellikleri

2.2. Kolinesteraz İnhibitörleri

Kolinesteraz inhibitörleri Alzheimer hastalığı tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaç gruplarından biridir¹¹.

Kolinesteraz inhibitörleri, geri dönüşlü, geri dönüşsüz veya pseudo (yalancı)-geri dönüşsüz olarak asetilkolinesterazı (AChE), butiril kolinesterazı (BuCh) veya ikisini birden inhibe ederler. Böylece endojen asetil kolin ve butiril kolinin yıkımını engellerler. Bu inhibisyon yarışmalı veya yarışmasız olabileceği gibi sadece asetil kolinesteraz için, sadece butiril kolinesteraz için ya da her ikisini de inhibe edecek şekilde olabilir¹².

Alzheimer tedavisinde kullanılan kolinesteraz inhibitörleri^{9,13}:

1. Yalancı geri dönüşsüzler

Karbamatlar (Rivastigmin)

2.Geri dönüşlü olanlar

Takrin

Donepezil, Galantimin

3.Geri dönüşsüz olanlar

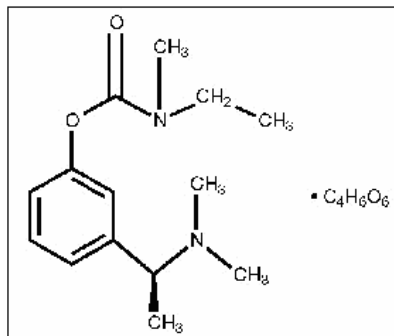
Organofosfor bileşikler (Metrifonat)

2.3. Rivastigmin Hidrojen Tartarat

2.3.1 Yapısı ve Özellikleri

Rivastigmin hidrojen tartrat, karbamat türevi bir kolinesteraz inhibitörüdür^{8,9}. Kimyasal yapısı şekil 4 de gösterilmiştir.

Ampirik formülü: $C_{14}H_{22}N_2O_2 \cdot C_4H_6O_6$, molekül ağırlığı 440.43 g, erime noktası 123-125°C dir. Suda, etanolde ve asetonitrilde iyi çözünür, n-oktanolde az çözünür, etil asetatteki çözünürlüğü ise çok azdır. Etanolden kristallendirilir^{14,15}.



Şekil 4. Rivastigmin hidrojen tartratın kimyasal yapısı

Rivastigmin tartrat için 37°C de, pH 7 n-oktanol/fosfat tamponu içindeki dağılım katsayısı 3.0 dır ^{15,16}.

2.3.2. Kullanım Alanları

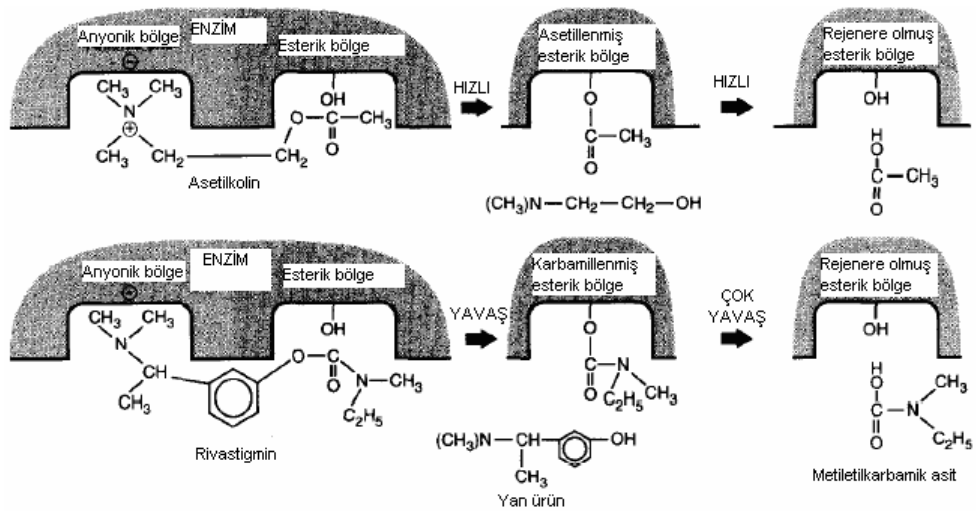
Rivastigmin, hafif ve orta dereceli Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan, karbamat türevi bir ilaçtır^{8,16-18}. Diğer kolinesteraz inhibitörleri gibi, Alzheimer hastalığının fonksiyonel ve davranışsal semptomlarında yararlı etki sağlamaktadır^{19,20}. Asetilkolinesteraz ve butiril kolinesteraz enzimlerini yalancı geri dönüşsüz(pseudo-irreversible) olarak inhibe ederek, asetil kolin ve butiril kolinin yıkımını engeller ^{8,19}.

Rivastigmin, Alzheimer hastalığı dışında ilerlemiş Parkinson hastalığında nöropsikiatrik komplikasyonları gidermek için ve Parkinson hastalığına bağlı olarak gelişen demans tedavisinde kolinerjik eksikliği tamamlamak için kullanılabilir ²¹⁻²³. Multiple Sclerosis (MS)'li hastalarda da anlama yeteneğindeki fonksiyonel değişiklikleri inhibe etmek amacıyla denenmektedir²⁴. Şizofreni tedavisinde kullanılması amacıyla da klinik çalışmalar yapılmaktadır²⁵.

2.3.3. Etki Mekanizması

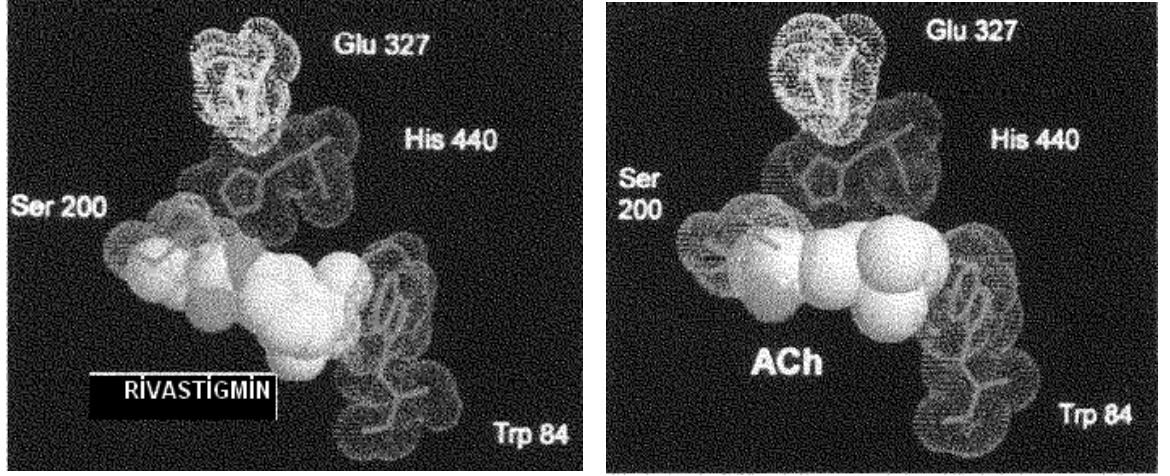
Alzheimer hastalığında, beyindeki en önemli nörokimyasal anomali, kortikal kolinerjik maddelerdeki azalmadır. Beyin kabuğundaki kolinerjik uyarımın azalması, hastalığın başlangıcında meydana gelir ve diğer nörotransmitter-spesifik sistemlerin kaybıyla devam eder. Bu sebeple, Alzheimer hastalığında, kolinerjik eksikliği gidermek için kolinesteraz inhibitörleri kullanılmaktadır ²⁶.

Rivastigmin tartaratin, santral sinir sisteminde bulunan AChE üzerine olan inhibisyon etkisi, periferdekine göre daha yüksektir²⁸. Hem asetil kolin esterazı hem de butiril kolin esterazı inhibe etme özelliğine sahiptir^{8,27,28}. Asetilkolinesterazın hem iyonik hem de esterik bölgesine bağlanarak asetilkolin esterazı inhibe eder^{8,27} (Şekil 5). Enzime bağlandıktan sonra yavaşça ayrılır. Asetilkolinesterazın monomerik (G1) tipine olan etkisi diğer tiplerinden 4-6 kat daha fazladır²⁷. Monomerik tip Alzheimer hastalarının beyinlerinde diğer tiplere göre daha çok bulunan tiptir^{27,29}. İdeal bir ajanın, monomerik tipteki enzimi inhibe etme özelliğinin, tetramerik tipteki enzimi (G4) inhibe etme özelliğinden daha fazla olması istenir^{8,27}.



Şekil 5. Rivastigminin asetilkolinesteraz üzerindeki etki mekanizması²⁷

Rivastigmin tartaratin AChE'nin hem esteratik hem de iyonik bölgelerine bağlanma özelliği sayesinde, vücutta bulunan doğal substratlara benzerlik gösterir. Şekil 6'da rivastigminin enzime bağlanma şekli ile ACh'nin enzime bağlanış şekli arasındaki benzerlik görülmektedir.²⁷

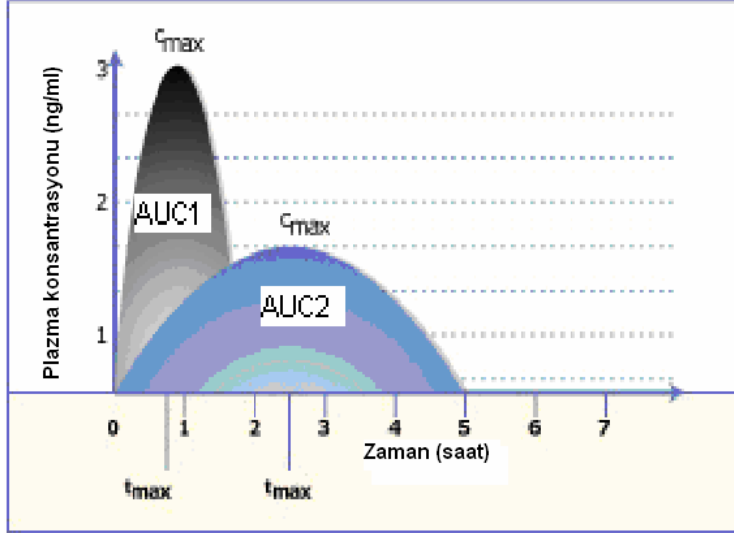


Şekil 6. Rivastigminin asetilkolinesteraza bağlanması ²⁷

2.3.4. Farmakokinetiği

2.3.4.1. Absorbsiyon

Rivastigmin oral yolla uygulandıktan sonra % 96-97 oranında hızla absorbe olur^{8,30}. İlacın biyoyararlanımı ise uygulama yolundan etkilenir³⁰. Oral uygulamadan sonra biyoyararlanım azalır; bunun sebebi karaciğerde ilk geçiş etkisine sahip olmasıdır ^{8,30}. Üç mg dozda rivastigminin oral yolla verilmesinden sonra biyoyararlanım % 36'dır ^{8,28,30}. Maksimum kan konsantrasyonuna ulaşması için geçen süre(t_{max}) 0.5-2 saat arasında değişir. Rivastigminin yemeklerle alınması absorpsiyon hızını azaltmakla birlikte t_{max} 'ın 90 dakika gecikmesine neden olur ^{8,30,31}. Bunun yanı sıra maksimum kan konsantrasyonu (C_{max}), % 30 oranda azalır ve AUC ise % 30 oranda artar^{28,30,32}. Şekil 7'de rivastigminin aç karnına ve yemeklerle birlikte alındığında ortaya çıkan AUC değerleri görülmektedir. Buna rağmen rivastigminin yemeklerle alınması önerilir; çünkü gastrointestinal yan etkilerin azaltılması açısından bu önemlidir ^{8,16,27,30}.



Şekil 7. Rivastigminin aç karnına ve yemeklerle birlikte alındığında ortaya çıkan AUC 'ler ³².

AUC1- Rivastigmin aç karnına alındığında ortaya çıkan profil

AUC2- Rivastigmin yemekle birlikte alındığında ortaya çıkan profil

Böbrek sorunları olan hastalarda rivastigmin ve ana metabolitine ait eliminasyon yarı ömürleri ve AUC değerleri daha yüksektir. Karaciğer rahatsızlığı olan hastalarda rivastigmin için yüksek, ana metaboliti için düşük AUC değerleri elde edilmiştir ^{8,27}.

Rivastigminin farmakokinetik yarı ömrü 1.5 saat, farmakodinamik yarıömrü 10 saattir. Bu farkın temel nedeni, rivastigminin AChE enzimine bağlanması ve ACh'e göre daha yavaş ayrılmasıdır. Rivastigminin absorpsiyon süresinde yaşın belirgin bir etkisi olmadığı bilinmektedir ^{8,27}.

2.3.4.2. Dağılım

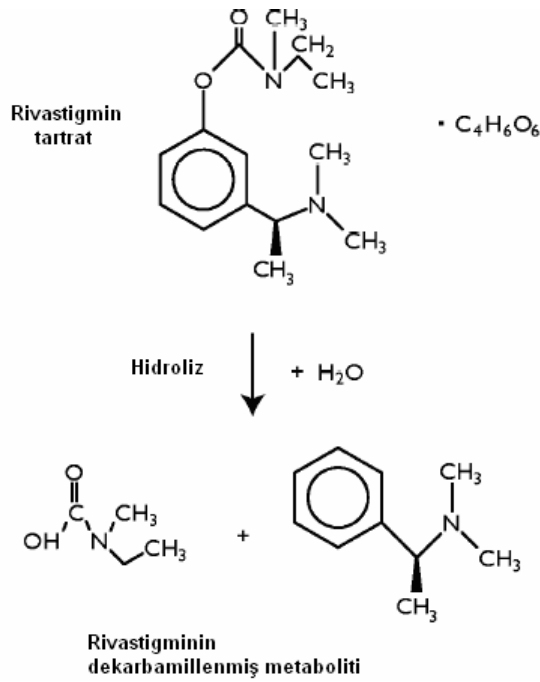
Rivastigmin vücutta geniş dağılım gösterir. Kan-beyin engelini geçer, santral sinir sistemine ulaşır ⁸.

Rivastigmin 48 sağlıklı gönüllüye uygulanmış ve görünür dağılım hacmi 1.8-2.7 L/kg olarak bulunmuştur^{27,28}. Rivastigminin ana metaboliti, NAP 226-90'dır. NAP 226-90'nın dağılım hacmi ise 4.3-5.9 L/kg dır^{16,27}.Görünür klirens ve dağılım hacminin ise sırasıyla 120 L/h ve 236 L olduğu hesaplanmıştır³³.

Rivastigmin % 40 oranda^{16,27,28,30}, 1-400 ng/mL konsantrasyonlarda plazma proteinlerine bağlanır¹⁶.

2.3.4.3. Metabolizasyon-Eliminasyon

Rivastigminin temel metabolize oluş şekli hidrolizdir. Hidroliz kolinesterazlar tarafından gerçekleştirilir^{8,28} (Şekil 8) ve dekarbamillenmiş metabolit (NAP 226-90) oluşur⁸. NAP 226-90'ın oluşumundan sonra metabolizasyon işlemi N-demetilasyon, sülfat konjugasyonu veya iki reaksiyonun gerçekleşmesiyle devam edebilir⁸. Vücuttan neredeyse tamamı (% 97)²⁸. idrarla atılır İdrarda en çok rastlanan metabolit sülfat konjugatıdır. Metabolizasyonu hızlı renal eliminasyon takip eder. Eliminasyon yarı ömrü 1.5-2 saattir. Feçeste analiz edilen ilaç miktarı % 1'den azdır^{8,27,30}.



Şekil 8. Rivastigmin tartratın dekarbamilenmiş ana metabolitine (NAP 226-90) hidrolizi

Rivastigminin hepatik metabolizasyonu ihmal edilebilecek kadar azdır (çok az miktarda sitokrom P450 enzimi ile). Bu nedenle hepatik yolla metabolize olan ilaçlarla etkileşmez^{8,16,27,28,30}.

Alzheimer hastaları ile sağlıklı gönüllerin rivastigmini metabolize etme özellikleri kıyaslandığında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir²⁷.

2.3.4.4. Yan Etkileri

Rivastigmin kullanımında en sık gastrointestinal yan etkiler ortaya çıkar. Bunların başında; bulantı, kusma, karın ağrısı, iştahsızlık, kilo kaybı, peptik ülser/gastrointestinal kanamalar gelir^{16,24}. Yan etkileri en aza indirmek için, ilacın en düşük dozla kullanılmaya başlanması ve dozun yavaş yavaş artırılması önerilmektedir³¹.

Hamilelik kategorisi B'dir. Hamilelik döneminde anne sütüne geçip geçmediği konusunda yeterli çalışma olmadığı için emzirme döneminde kullanımı önerilmez^{8,16}.

2.3.4.5. Miktar Tayini Yöntemleri

Kromatografi ve kütle spektroskopisi metodları rivastigminin analizini yapmakta yaygın olarak kullanılmaktadır.

Rivastigminin dozaj formlarından veya plazma/beyin homojenatlarından analizini yapmak için kullanılan başlıca metodlar³⁴⁻³⁷:

1. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)

Revers faz sıvı kromatografisi^{35,36}

2. Gaz kromatografisi-Kütle spektroskopisi (GC-MS)³⁴

3. Sıvı kromatografisi-Kütle spektroskopisi (LC-MS)³⁷

RPLC, rivastigmin ve ilgili bileşiklerin miktar tayinlerinin yapılmasında kullanılır³⁵. Rivastigmin tartrat ve en çok rastlanan safsızlığı ((S)-3-(1-dimetilaminoetil) fenol) ile arasındaki kromatografik ayırım 4 kattan fazladır. RPLC entegre elektrosprey iyonizasyon kütle kromatografisi de rivastigmin ve ana metaboliti NAP 226-90'ı sıçan plazma ve beyin homojenatlarından tayin için kullanılmıştır³⁶.

Rivastigmin ve ana metaboliti NAP 226-90'ın plazmadan analizini LC-MS-MS metoduyla yapmak da mümkündür³⁷. Bunun yanı sıra GC-MS metodu da rivastigmin ve ana metabolitini çok küçük saptama sınırı değerlerinde analiz etmek için geliştirilmiş ve kullanılmıştır³⁴.

2.3.4.6. Ticari Piyasa Preperatları

Türkiye ve dünya ilaç piyasasında rivastigmin tartaratın aynı firma tarafından üretilen iki farklı farmasötik formu ve birkaç farklı dozaj şekli bulunmaktadır. Bunlar: Exelon® (1.5, 3, 4.5, 6 mg kapsül – Novartis) ve Exelon® (2 mg/ml oral solüsyon – Novartis)'dir^{16,38}.

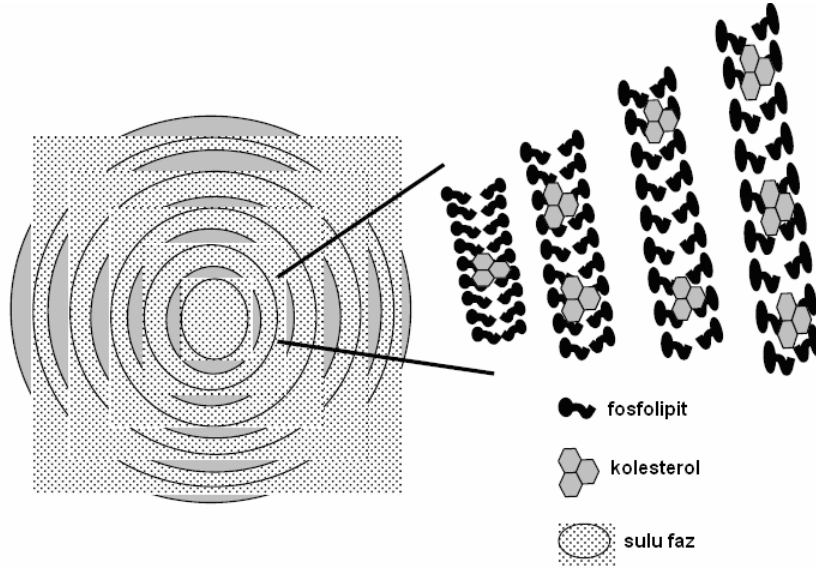
2.4. Lipozomlar

Lipozomlar, yaklaşık 40 yıl önce Bangham ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. Fosfolipitler hidrate edildiğinde veya sulu ortamda dağıtıdıklarında oluşan mikroskobik, küresel kesecikler olarak tanımlanmıştır³⁹. İlk keşfedildiği yıllarda biyolojik membran özellikleri ile ilgili çalışmalarda kullanılmış olan lipozomlar, günümüzde başta ilaç taşıyıcı sistem olmak üzere birçok bilim dalında farklı kullanım alanlarına sahiptir⁴⁰.

Lipozomlar, sulu kısmı lipit molekülleri tarafından oluşturulan membranla çevrilmiş mikropartiküler veya kolloidal lipit keseciklerdir(Şekil 9). Lipozom oluşturmak için genellikle fosfolipitler kullanılır. Lipozom veziküllerinin çapları nanometre ile mikrometre boyutları arasında değişiklik gösterir. Lipozomlar, biyogeçimli ve biyoparçalanan özellikteki lipit içerikleri sayesinde hücre membran yapısına benzerlik gösterir ve benzerlik derecesi çeşitli kimyasal modifikasyonlarla artırılabilir. Bu özellikleri sayesinde, ilaç hedeflendirme çalışmalarında ve immun modülasyonunda yaygın olarak kullanılırlar^{41,42}.

Lipozomların içine hapsedilen ilacı taşıyabilecek üç bölgesi mevcuttur. İlaç molekülü fosfolipit tabakaya(lipofilik etkin maddeler), sulu kısma(hidrofilik etkin maddeler) veya su-lipit arayüzeyine(peptid ve küçük proteinler) hapsedilerek taşınabilir. Bu sayede hem lipofilik hem de

hidrofilik etkin maddeler hatta orta derecede lipofiliteye sahip etkin maddeler lipozom şeklinde formüle edilebilir^{39,43,44}. Şekil 9'da çok tabakalı konvansiyonel lipozomlar gösterilmiştir.



Şekil 9. Konvansiyonel çok tabakalı lipozomun şematik görüntüsü ³⁹

2.4.1. Lipozomların Başlıca Avantajları

1. Lipozomlar fosfolipit yapısında olduklarından, biyomembranlara benzerlik gösterir. Bu sayede biyogeçimli ve biyoparçalanabilir özelliktedirler, immunojenite ve toksisite söz konusu değildir.
2. Düşük dozlarla terapötik etkinin elde edilmesine olanak sağlarlar
3. Plazma etkin madde seviyesini istenen süre boyunca terapötik düzeyde tutabilirler; bu sayede dozlama aralığı uzatılmış olur
4. Yan ve toksik etkileri azaltabilirler veya tamamiyle ortadan kaldırabilirler.
5. Etkin maddenin enzimatik etkilerden korunmasını sağlarlar.
6. Kısa yarı ömre sahip maddelerin yarılanma ömrünü uzatırlar
7. Hem lipofilik hem de hidrofilik özellikteki maddeleri taşıma özelliğine sahiptirler

8. İlacı hedeflendirmek için kullanılabilirler.
9. Lipozomlar, içine hapsedilmiş etkin maddelerin farmakokinetik özelliklerini değiştirirler. Lipozom içine hapsedilmiş etkin maddenin, absorpsiyon, dağılım ve eliminasyon özellikleri serbest etkin maddeden tamamiyle farklıdır⁴⁵.

2.4.2. Lipozom – Hücre Etki Mekanizmaları

1. Füzyon: Lipozomun en dış tabakasının hücre membranıyla birleşmesidir.
2. Adsorbsiyon: Lipozomun hücre yüzeyine sıkıca tutunmasıdır.
3. Lipit değişimi: Hücre membran yapısındaki lipitlerin, lipozom yapısında bulunan lipitlerle karşılıklı değişimidir.
4. Endositoz: Hücre yüzeyine temasta bulunan lipozomların fagositoz yoluyla hücre içine alınmasıdır.
5. Hücre içine lipozom sızıntısı: Hücre ve lipozomun birebir temasının sonucu olarak lipozomların hücre içine girişi söz konusu olur. Bu giriş lipozomların serum albumini ve lipoproteinler ile etkileşimi sonucunda meydana gelir⁴⁶.

2.4.3. Lipozomların Sınıflandırılması

Lipozomların bileşimlerine ve ilaç taşıma özelliklerine göre sınıflandırılması⁴⁷:

<u>Tip</u>	<u>Bileşim</u>	<u>Özellikler</u>
1.Konvansiyonel Lipozomlar (CL)	Nötral veya negatif yüklü fosfolipitler ve kolesterol	Kısa yarı ömür (Retikulo endotelyal sistem-RES- tarafından hızla alınır) RES'e hedeflendirme için uygun Doza bağlı farmakokinetik
2.pH-duyarlı Lipozomlar	Fosfatidil etanolamin (PE) veya dioleoil fosfatil etanol amin (DOPE) gibi fosfolipitler ayrıca kolesterol hemisüksinat (CHEMS) veya oleik asit (OA)	Zayıf bazların ve makromoleküllerin hücre içine taşınması için uygun Dağılımı ve farmakokinetiği CL'ye benzer
3. Katyonik Lipozomlar	Katyonik lipitler DDAB (dioktodesil dimetilamonyumbromid), DOGS (dioktodesil amigdoglisin spermin), DOSPA (2,3-dioleiloksi-N-[2(spermin-karboksiamido)etil]-N,N-dimetil-1-propan aminyumtrifloroasetat)-,vb)	Negatif yüklü makromoleküllerin taşınması için uygun (DNA, RNA,vb) Yapısal olarak stabil değil Yüksek dozlarda toksik Lokal kullanımı sınırlı
4. Dolaşımda	Nötral yüksek camsı	Hidrofilik yüzey

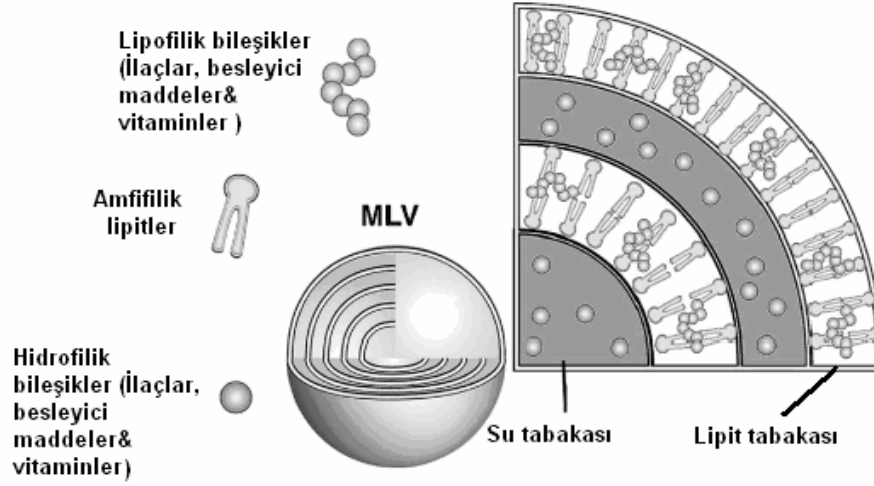
uzun süre kalan lipozomlar (LCL)	geçiş sıcaklığına sahip lipitler Kolesterol+%5-10 PEG (poli etilen glikol)-DSPE (kuru katı polimer elektroliti), GM1 (galaktozil-N- asetilgalaktozaminil-(N- asetilnöroaminil)- galaktozilglikozil seramid) veya HPI (hidrojene fosfatidil inozitol)	kaplama RES tarafından alımı zor Dolaşımda kalış süresi uzun Doza bağlı farmakokinetik
-------------------------------------	--	--

5. Immunolipozomlar	Antikora bağlı CL veya LCL	Hücreye spesifik bağlanma Hedef doku çevresinde salım
---------------------	-------------------------------	--

Lipozomların yapısal özelliklerine göre sınıflandırılması^{47,48}:

MLV	MULTİLAMELER BÜYÜK KESECİKLER, > 0.5 MM
OLV	Oligolameler kesecikler, 0.1-1 µm
UV	Tek tabakalı kesecikler (her boyutta olabilir)
SUV	Küçük tek tabakalı kesecikler, 20-100 nm
MUV	Orta büyüklükte tek tabakalı kesecikler
LUV	Büyük tek tabakalı kesecikler, > 100 nm
GUV	Çok büyük tek tabakalı kesecikler (çapları 1 µm'den büyük)
MVV	Çok veziküllü kesecikler (genellikle 1 µm'den büyük)

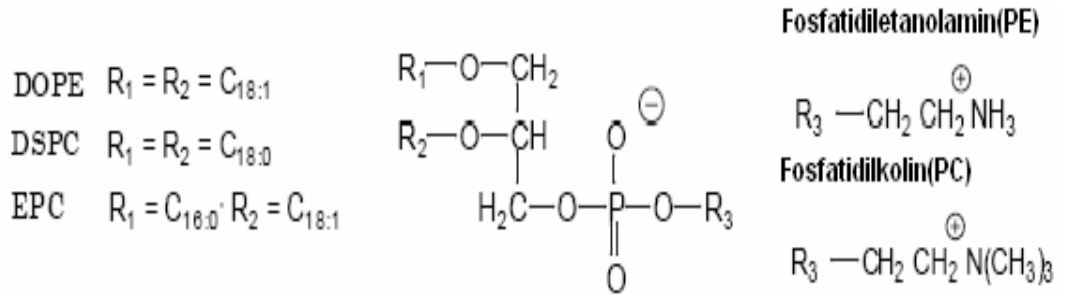
Şekil 10'da MLV tipi lipozomların şematize hali görülmektedir.



Şekil 10. MLV'nin şematik görünüşü⁴⁹

2.4.4. Lipozom Hazırlanmasında Kullanılan Fosfolipitler:

1. Kolin içeren fosfolipitler:
 - Lesitin
 - Sfingomiyelin
 - Eter bağlanmış fosfatidilkolin
2. Yapısında doğal olarak fosfatidil bulunan fosfolipitler
 - Fosfatidilkolin(PC)
 - Fosfatidiletanolamin(PE)
 - Fosfatidilserin(PS)
 - Fosfatidilgliserol(PG)
 - Fosfatidilasit(PA)
 - Fosfatidilinozitol(PI)
3. Değişik yağ asitleri içeren fosfolipitler
 - Lizolesitin
 - Kardiyolipin^{41,50}



Şekil 11. Bir fosfolipidin genel yapısı ve bazı fosfolipitlerin kimyasal yapılarının şematik gösterimi

DOPE: Dioleoilfosfatidil-etanolamin

DSPC: Disteroil fosfatidil kolin

EPC: Yumurta sarısı lesitini

2.4.5. Lipozom Hazırlama Yöntemleri

1. Mekanik dispersiyon

- Elle çalkalama yöntemi: Cam balonun çeperlerinde oluşan lipit film, sulu faz eklendikten sonra elle çalkalanarak süspande edilir.

Bu yöntemle MLV'ler hazırlanır.

- Çalkalamadan hazırlama: Lipit film kuruduktan sonra, 15 dk boyunca suyla doymuş azot püskürtülür, böylece çalkalamadan sulu ortamda şişmesi sağlanır.

Bu yöntemle LUV'ler hazırlanır.

- Pro-lipozom hazırlama yöntemi

Bu yöntemle MLV'ler hazırlanır.

- Dondurup-kurutma yöntemi

Bu yöntemle MLV'ler hazırlanır.

- Lipit hidrasyon yöntemi

f. Mikro-fluidizer yöntemi

Bu yöntemle mikroemülsifiye lipozomlar (MEL) hazırlanır

g. Sonikasyon yöntemi

Bu yöntemle SUV'ler hazırlanır.

Probe sonikasyon

Sonikasyon banyosu

h. Membran ekstrüzyon yöntemi

i. Kurutulmuş-rekonstitüe lipozom hazırlama yöntemi(DRV)

j. Dondurma-çözme sonikasyon yöntemi(FTS)

k. pH ile indüklenen vezikül oluşumu

l. Kalsiyum ile indüklenen füzyon

Bu yöntemle LUV'ler hazırlanır.

2. Solvan dispersiyon yöntemi

a. Etanol enjeksiyon yöntemi

Bu yöntemle SUV'ler hazırlanır.

b. Eter enjeksiyon yöntemi

c. s/y emülsiyonu oluşturma yöntemi

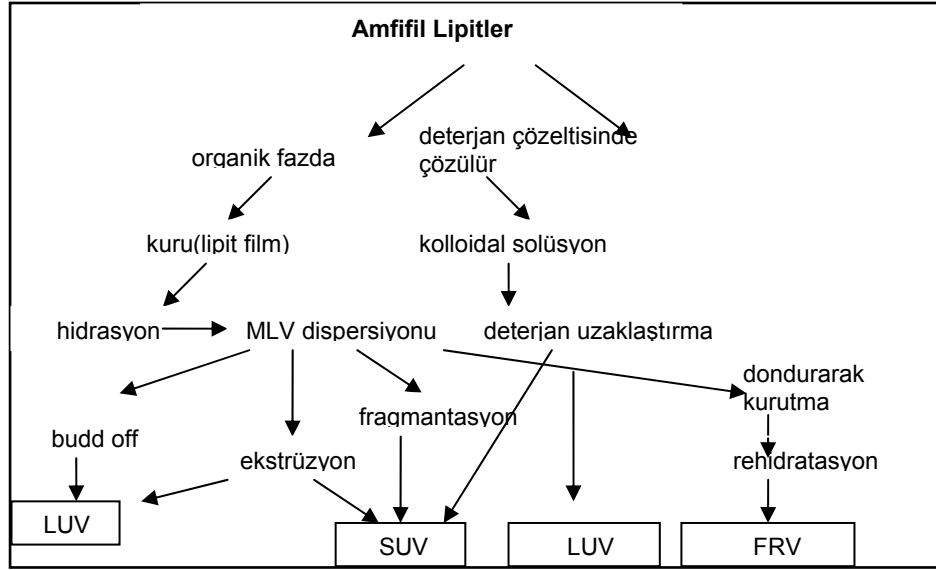
Bu yöntemle hücre büyüklüğünde veziküller ve MVL'ler hazırlanabilir.

d. Ters faz buharlaştırma yöntemi

Bu yöntemle REV'ler hazırlanabilir.

3. Deterjanda çözme yöntemi^{41,48}

Lipozom hazırlama yöntemleri, genel olarak Şekil 12'de gösterilmiştir.



Şekil 12. Lipozom hazırlama yöntemlerinin şematik gösterimi⁵⁰

2.4.6 Lipozomların Tedavide Kullanılışı

Lipozomlar günümüzde teşhis ve tedavide geniş klinik kullanım alanlarına sahiptir^{41,45,48}.

1. Diagnostik görüntülemeye

Bilgisayarlı tomografi: Suda ve yağda çözünen iyot bileşikleri kontrast bileşik olarak kullanılarak MLV, LUV ve MEL tipte lipozomlar hazırlanır.

Manyetik rezonans görüntüleme: Paramanyetik elementler ya da lipozomal lipitler kontrast bileşik olarak kullanılarak MLV tipte lipozomlar hazırlanır.

Radyonüklid görüntüleme: Gama(γ) ışını ya da pozitron yayan maddeler kontrast madde olarak kullanılarak MLV tipte lipozomlar hazırlanır⁵¹.

2. Göz hastalıklarının tedavisinde: Etkin maddelerin, lipozomdan salımı, gözyaşı gibi biyolojik sıvılardaki stabilitesi, lipozomla birleşim şekli, elektrostatik özellikleri, partikül büyüklüğü dağılımı ile lipozomların yüzey özellikleri gibi değişkenler optimize edilerek oftalmik hastalıkların tedavisinde gayet olumlu sonuçlar alınabilmektedir⁵².
3. Kanser tedavisinde: Kanser tedavisinde kullanılan farklı etkin maddelerin lipozom formülasyonları hazırlanmakta ve bu sayede etkin maddenin tümör bölgesinde yoğunlaşması amaçlanmaktadır^{53,54}. Örneğin, beyin tümörlerinin tedavisinde ilaçları lipozom içine hapsedmek ve böylelikle kan-beyin engelini geçmelerini sağlamak üzere çalışmalar yapılmıştır⁵⁵.
4. Enzim çalışmalarında: Lipozom membranının hücre membranına benzerliğinden faydalanarak enzimlerin hücre içine girişi sağlanmaktadır⁵⁶.
5. Paraziter hastalıkların tedavisinde: Lipozomlar özellikle mononükleer fagosit sisteminde lokalize enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır⁵⁷.
6. Aşılar: Katyonik lipozomlar DNA'nın ve protein yapısındaki aşıların vücuda verilmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca lipozom formülasyonları, hücresel bağışıklığı ve buna karşılık olarak immün cevabı artırmak için kullanılmaktadır^{58,59,60}.
7. Kozmetik ürünlerde: Lipozomların tabakalı yapısı vücuttaki doğal membranlara benzerlik göstermektedir. Bu sayede, hücre membranlarının akıcılık özelliklerini değiştirerek, hücrelerle etkileşebilmektedirler. MLV lipozomları taşıdıkları etkin maddeleri

30 dakika içinde derinin stratum korneum, epidermis ve dermis tabakalarına hızla geçirerek konvansiyonel preperatlara üstünlük sağlarlar⁶¹.

8. Gen tedavisinde: Lipozomlar gen tedavisinde terapötik aktiviteyi artırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır^{62,63}.

Lipozomların vücuda birçok yoldan verilmesi mümkündür. Bu yolların başlıcaları: Parenteral yol (intravenöz, intraperitoneal, intramüsküler, subkütan), oküler yol, nazal yol, pulmoner yol, oral yol, transdermal yol, rektal ve vajinal yol olarak sayılabilir^{45,48}.

2.4.7. Lipozomların Özellikleri (Karakterizasyonu)

Lipozomların fiziksel ve kimyasal özellikleri, hem in vivo hem de in vitro davranışlarını etkilediği için oldukça önemlidir. Bu sebeple karakterizasyonun hazırlamadan hemen sonra tam ve doğru olarak yapılması gerekmektedir^{44,46}.

2.4.8. Lipozom Davranışlarını Etkileyen Fizikokimyasal Parametreler

1. Büyüklük
2. Lamel sayısı, internal morfoloji
3. Yük
4. Tabakaların akışkanlık özellikleri^{47,48}

2.4.9. Lipozomların Fiziksel Karakterizasyonunda Kullanılan Teknikler⁴⁸

<u>Parametre</u>	<u>Teknik</u>
Büyükölük	Elektron mikroskobisi Dinamik ışık saçılımı Ultrasantrifüj Moleköler elek kromatografisi Coulter counter
Lamel sayısı	NMR(Nükleer Manyetik Rezonans) spektroskopisi Dar açılı x-ışını saçılımı Elektron mikroskobisi
Tabaka akışkanlığı	Floresan polarizasyonu ESR(Electron Spin Rezonans) spektroskopisi
Yük	Mikroelektroforez

Bu parametrelerin yanı sıra ;

1. Lipozom içinde tutulan madde miktarı(%) belirlenmesi
2. Lipozomdan salınan madde miktarı(%) belirlenmesi
3. Etkin maddenin hapsedilme hacminin belirlenmesi
4. Zeta potansiyel ölçümleri (Photon Correlation Spectroscopy – PCS ile) de fiziksel karakterizasyon için yapılan çalışmalardandır ⁵⁰.

2.4.10. Lipozomal Bileşenlerin Kimyasal Analizi

1. Fosfolipitlerin spektroskopik miktar tayini
2. Lipitlerin ince tabaka kromatografisi
3. Fosfolipitlerin HPLC analizi
4. Kolesterol ve α - tokoferol'ün HPLC ile analizi
5. Yağ asitlerinin GLC(Gaz-sıvı kromatografisi) ile analizi
6. Lipozomal fosfolipitlerin bozunma analizleri⁵⁰

2.4.11. Lipozomlarda Kalite Kontroller⁵⁰

<u>Temel Karakterizasyon Deneyleri</u>	<u>Yöntem</u>
pH	pH metre
Osmolarite	Osmometre
Hapsedilen hacim	Lipozom içi sulu faz ölçümü
Fosfolipit konsantrasyonu	Lipit fosfor içeriği ölçümü, HPLC, enzimatik ölçüm
Fosfolipit açıl zinciri kompozisyonu	GC(Gaz Kromatografisi)
Fosfolipit kompozisyonu	İnce Tabaka Kromatografisi(İTK), HPLC
Kolesterol konsantrasyonu	Enzimatik ölçüm, HPLC
Etkin madde miktar tayini	
Organik solvan atığı ve ağır metaller	Nükleer Manyetik Rezonans(NMR), GC, farmakope kontrolleri
Aktif bileşik/fosfolipit oranı	Aktif bileşik ve fosfolipit konsantrasyonlarının tayini
Hidrojen iyonu veya iyon gradyanı yüklemeyen önce ve sonra	Florasana indikatörleri, ESR indikatörleri, ³¹ P, ¹⁹ F NMR, lipozom içi iyon konsantrasyonu
<u>Kimyasal Stabilité</u>	
Fosfolipit hidrolizi	İTK, HPLC
Esterleşmemiş yağ asidi konsantrasyonu	HPLC veya enzimatik ölçüm
Fosfolipit açıl zinciri otooksidasyonu	Konjuge dienler, lipit peroksitleri, TBA(terciyer butil alkol) reaktif türleri ve yağ asidi kompozisyonu(GC)

Kolesterol otooksidasyonu	İTK, HPLC
Antioksidan degradasyonu	İTK, HPLC
Aktif bileşik degradasyonu	
Fiziksel Karakterizasyon	
Görünüş	Farmakope protokolleri
Vezikül büyüklüğü dağılımı	
Submikron boyutu	Dinamik ışık saçılımı(DLS), statik ışık saçılımı(SLS), mikroskopi, jel-çıkarma kromatografisi, turbidite
Mikron boyutu	Coulter counter, ışık mikroskobisi, lazer difraksiyonu, SLS ve ışık karartması
Elektriksel yüzey potansiyeli, yüzey pH'sı	Membrana bağlı elektrik alanlı problemler ve pH duyarlı problemlerin kullanımı
Zeta potansiyeli	Elektroforetik mobilite
Termotropik davranış, faz dönüşümü, faz ayrışması	DSC(diferansiyel taramalı kromatografi), NMR, floresan metodlar, FTIR(fourier transform infrared), Raman spektroskopisi, ESR, spesifik turbidite
Serbest ilaç yüzdesi(%)	Jel çıkarma kromatografisi, iyon değiştirme kromatografisi, polielektrolitlerle çöktürme, ultra santrifüj
<u>Mikrobiyolojik Deneyler</u>	
Sterilite	Farmakope protokolleri
Pirojenite (endotoksin derecesi)	Farmakope protokolleri

2.5. Hücre Kültürleri

Hücre kültürü terimi temel olarak, orjinal bir dokudan alınan disperse hücrelerden, primer kültürlerden veya bir hücre serisinden/soyundan, enzimatik, mekanik veya kimyasal disagregasyonla elde edilen hücrelerin çoğaltılması işlemi olarak ifade edilebilir ⁶⁴.

Hücre kültürleri kullanılarak yapılan ilaç geçiş (transport) çalışmalarının uygulaması kolay ve in vivo korelasyonu yüksek olması, yapı-absorbsiyon çalışmalarında kullanımını her geçen gün artırmaktadır⁶⁵.

2.5.1. Hücre Kültür Sistemlerinin Hayvan Deneylerine Üstünlükleri

1. Çok daha fazla sayıda madde örneğini inceleme olanağı vardır.
2. Deneyler için ihtiyaç duyulan ilaç miktarı azdır
3. İşlemler hızlı gerçekleştirilebilmektedir
4. Daha fazla sayıda maddenin çalışılmasına imkan sağlamaktadır
5. Geçiş mekanizması değerlendirilebilir
6. Geçiş çalışmaları sırasında metabolizma olayları değerlendirilebilir
7. Hücre toksisitesi erken teşhis edilebilir
8. Patolojik koşullar yaratılarak moleküler mekanizmalar aydınlatılabilir
9. Yapı - geçiş özellikleri arasındaki ilişkilerin geliştirilmesi sağlanabilir
10. Önformülasyon aşamasında formülasyona eklenen yardımcı maddelerin, absorbsiyon arttırıcıların absorbsiyon üzerine etkileri incelenebilir ⁶⁵.
11. Analitik çalışmalar kolaylaşır ⁶⁶

2.5.2. Hücre Kültürü Çalışmalarında Genel Olarak Önemli Olan Noktalar ⁶⁷

Bir hücre kültürü sisteminin in vivo özellikleri yansıtmada yeteri kadar başarılı olabilmesi için dikkat edilmesi gereken noktalar aşağıda belirtilmiştir:

1. Kullanılacak hücrelerin/hücre dizinlerinin seçimi
2. Hücre serisinin primer kültür, pasaj yapılmış dizin, veya değiştirilmiş dizin olması
3. Hücrelerin pasajlanma sayısı
4. Hücrelerin fenotipik stabilitesi
5. Hücre dizininin heterojenitesi
6. Hücre dizininin farklılaşabilme özelliği

Çalışılacak hücre dizini seçildikten sonra, hücre özellikleri bazı şartlara bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Bunlar:

1. Hücrelerin ekilme yoğunluğu,
2. Hücrelerin istenilen sonucu verip vermeme durumu,
3. Hücrelerin farklılaşma oluşumu,
4. Gerekli besin maddelerinin, büyüme faktörlerinin varlığı ya da yokluğudur.

Geçiş mekanizması çalışmalarında ortamda bulunan maddeler dikkatlice seçilmelidir; çünkü hücre özelliklerini etkileyebilirler. Bu yüzden kullanılan çözeltinin konsantrasyonu, sıcaklık, pH, metabolik enerji kaynaklarının varlığı/yokluğu, ortamdaki iyonlar, çözücülerle etkileşebilecek proteinlerin varlığı/yokluğu ve çözeltinin tek tabakanın apikal veya basolateral kısmına eklendiği çok önemlidir ⁶⁷.

2.5.3. Hücre Kültür Çalışmalarında Ortam Seçimi

Hücre kültürleri ile yapılan ilk çalışmalarda dokulardan elde edilen doğal ortamlar veya vücut sıvıları kullanılmıştır (tavuk yumurtası embriyo ekstraktı, serum, lenf). Hücre serileri oluşturuldukça daha fazla ortama ihtiyaç duyulmuş ve bu da kimyasal yollarla ortamlar hazırlama ve bu ortamları kullanmayı gerektirmiştir ⁶⁴.

Günümüzde hücre kültürü çalışmalarında yaygın olarak kullanılan ortamlar: MEM (Eagle's Minimum Essential Medium), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), F12, DMEM/F12, α MEM, CMRL 1066, RPMI(Rapid Prototyping&Manufacturing Institute) 1640, M199, L15, McCoy's 5A, Fischer, MB752/1, NCTC 135, Ham's F-10'dur ^{64,68}.

2.5.4. Kültür Ortamının Fizikokimyasal Özellikleri

1. pH: Optimum pH değerleri hücre soylarının tiplerine ve özelliklerine göre değişiklik göstermektedir. Optimum pH genellikle özel deneylerle belirlenir. Hücrelerin ihtiyaç duyduğu pH değerleri genellikle 7.4'tür.
2. CO₂ ve Bikarbonat: Gaz fazındaki karbondioksit ortamda çözünmüş halde bikarbonatla denge halinde bulunur ve pH'yı düşürür. Çözünmüş CO₂, HCO₃⁻ ve pH birbirleriyle ilişkili olduklarından karbondioksitin direkt etkisini belirlemek zordur. Kültürün açık veya kapalı kaplarda yapılıyor oluşu, hücrelerin konsantrasyonlarının düşük veya yüksek oluşu, havalandırmanın bulunup bulunmaması gibi faktörler CO₂ ve HCO₃⁻ miktarlarını belirler.
3. Tamponlama: Tamponlama pH'nın sabit tutulmasını sağlar. Özellikle iki durumda mutlaka tamponlama yapılmalıdır.

Açık kaplarda çalışılıyorsa(CO₂ ortam pH'sını düşürür) tamponlama yapılmalıdır.

Eğer ortamda kültür sırasında laktik asit ve CO₂ ortaya çıkıyorsa tamponlama yapılmalıdır.

4. Oksijen: Kültürde kullanılan hücrelerin aerob veya anaerob özellikte olmalarına göre kültürlerin oksijen ihtiyaçları değişkenlik gösterir.
5. Osmolalite: Kültürü yapılan hücreler genellikle osmotik basınca dayanıklı özelliktedirler. Pratikte 260 mOsm/kg $\pm$ 10 mOsm/kg ile 320 mOsm/kg $\pm$ 10 mOsm/kg arasında osmololite değerleri çoğu hücre için idealdir.
6. Sıcaklık: Hücre kültürlerinin sıcaklıkları bazı faktörlere bağlı olarak değişir:
Hücrelerin sağlandığı hayvanın vücut sıcaklığı, vücut sıcaklığındaki anatomik değişiklikler ve kullanılan inkübatörün güvenlik ayarına bağlı olarak değişir.
Genellikle tüm insan ve sıcakkanlı hayvanlardan sağlanan hücrelerle oluşturulan seriler için 37°C ve güvenlik için biraz daha düşük sıcaklıklar uygundur.
7. Viskozite: Ortamın viskozitesi genellikle serum içeriğine bağlı olarak değişir ve çoğu zaman hücre büyümesi açısından önem arz etmez. Ancak çalkalama, karıştırma, tripsinizasyon sonrası hücre ayrışması gibi durumlarda önem kazanır.
8. Yüzey gerilimi ve Köpük Oluşumu: Köpük oluşumunun etkileri tam olarak tanımlanmamakla birlikte protein denatürasyonunu arttırdığı, gazların difüzyon hızını sınırladığı düşünülmektedir ⁶⁴.

2.5.5. Hücre Kültür Ortamlarının Bileşenleri ⁶⁴

- a. Aminoasitler (sistein, tirozin, vb)
- b. Vitaminler (biotin, folik asit, vb)

- c. Tuzlar (Na^+ K^+ Ca^{2+} Cl^- PO_4^{3-} vb)
- d. Glukoz
- e. Organik bileşikler
- f. Hormonlar ve büyüme faktörleri
- g. Antibiyotikler (Gentamisin, Eritromisin, Amfoterisin B,vb)

Antibiyotikler, kontaminasyon riskini azaltmak için ortama ilave edilmekle birlikte laminar hava akımı altında çalışmak, aseptik koşulların sağlanması antibiyotik kullanımını gereksiz kılmaktadır. Çünkü antibiyotik kullanımının dezavantajları vardır:

1. Antibiyotiğe dirençli mikroorganizmaların gelişimini sağlayabilirler
2. Antibiyotik varlığında etkili olamayan ortamda düşük miktarda bulunan bazı kontaminasyon ajanlarının varlığını maskeleyebilirler.
3. Mikoplazma enfeksiyonlarını gizleyebilirler
4. Memeli hücreleriyle çapraz reaksiyona girerek antimetabolik etkilere neden olabilirler
5. Aseptik koşulların disiplinsiz uygulanmasına neden olabilirler

h. Serum

Serum, büyüme faktörleri, hücrelerin büyümesini sağlayan maddeler, adezyon faktörleri, antitripsin aktiviteye sahip maddeler ve hücrelerin birbirine bağlanmasını sağlayan maddeler içeren zengin bir bileşiktir. Bunların yanısıra zengin bir mineral, lipid ve hormon kaynağıdır. Hücre kültürlerinde en çok kullanılan serum türleri; fetal sığır (FCS, FBS), at ve insan serumlarıdır. Kültür ortamlarında serum kullanmanın avantajları ve dezavantajları vardır.

Avantajlar⁶⁹

1. Serum içeren ortamda büyüme daha hızlı gerçekleşir

2. Serum içermeyen ortamdaki hücrelerde fenotipik değişimler meydana gelebilir.

Dezavantajlar^{64,69}

1. Serum bileşenlerinin fizyolojik değişkenliği
2. Farklı parti serumlar raf ömrü ve davranış farklılıkları gösterebilir. Genel olarak serumun raf ömrü kısadır(max. 1 yıl)
3. Her farklı parti serumun öncekiyle benzerliğini kanıtlamak için birçok farklı teste ihtiyaç duyulur.
4. Birden fazla tip hücre tiplerinin birlikte kullanıldığı(kökültür) çalışmalarında her hücre tipi için farklı parti serum kullanılabilir ve bu sorunlara yol açabilir.
5. Serum kaynakları bazı nedenlerden dolayı kısıtlı olabilir
6. Serumla çalışıldığında saflaştırma zor olabilir ve bu ürün farmasötik kriterlere uymayabilir
7. Serum viruslerle kontamine olmuş olabilir veya kaynağı bilinmeyen sorunlarla hücre kültürü işlemi olumsuz etkilenebilir
8. Pahalıdır
9. Hem hücre büyümesini sağlayan hem de inhibe eden maddeler içerdiği için net etki her zaman bilinemeyebilir
10. Serumla yapılan çalışmaların standardizasyonu zordur

2.5.6. Hücre Kültürlerinde Kullanılan Membranlar

Spesifik bir biyolojik bariyeri taklit etmek için bir hücre kültürü modeli oluştururken iyi bir hücre soyunun yanı sıra mikroporlu bir membrana ihtiyaç duyulur. Bu membran hücrelerin birbirine bağlanmasını ve büyümelerini sağlayacak bir matriks materyali (örneğin kolajen) içerebilir ya da matriks materyal ayrıca membrana uygulanabilir. Günümüzde farklı

yüzey alanlarına ve por büyüklüğüne sahip, değişik materyallerden yapılmış membranlar (nitroselüloz, polikarbonat) piyasada bulunmaktadır^{67,70}. Tablo 1'de değişik materyallerden yapılmış membranların özellikleri görülmektedir.

Tablo 1- Bir firmanın hücre kültürü membranlarının özellikleri ⁷¹

KARAKTERİSTİKLER	POLİESTER (PET)	POLİKARBONAT	PTFE/ KOLAJEN
Optik Özellikler	Berrak	Yarısaydam	Islakken berrak
Hücrelerin görünürlüğü	İyi	Zayıf	Hücreler anahatları ile görünür
Kültür uygulaması	Evet	Evet	Hayır
Membran kalınlığı	10 µm	10 µm	50 µm
Matriks/ECM kaplanabilirlik	Evet	Evet	Evet
Kolajen uygulaması	Hayır	Hayır	Evet
Por çapları (µm)	0.4, 3.0	0.1, 0.4, 3.0, 5.0, 8.0, 12.0	0.4, 3.0

İdeal bir mikroporlu membranın göstermesi gereken özellikler ⁶⁷:

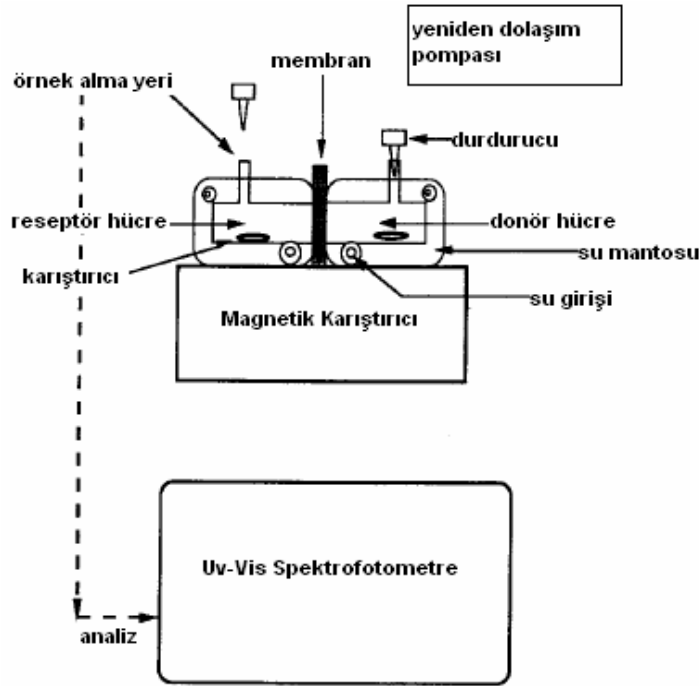
1. Saydam olmalı ki hücre tek tabakasının gelişimi mikroskopik tekniklerle tam olarak gözlenebilsin
2. Hem hidrofilik hem de hidrofobik çözeltiler için geçirgen olmalı
3. Hem düşük hem de yüksek molekül ağırlıklı çözeltiler için geçirgen olmalı

Uygun membranın seçimi geçiş çalışmalarında tutarlı sonuçlar alabilmek açısından önemlidir. Membran seçiminde, membranın fiziksel ve kimyasal özellikleri, por büyüklüğü, yüzey alanı, yapıldığı materyal, destek materyalinin kalınlığı dikkatlice incelenerek değerlendirilmelidir⁶⁷.

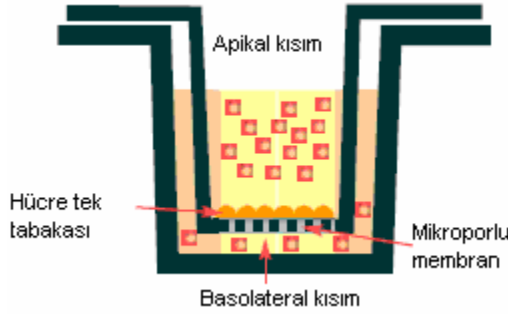
Geçiş çalışmalarında membranın üstünde hücre tek tabakası oluşturulmadan önce, boş mikroporlu membrandan geçiş kontrol edilir. Ardından destek materyaliyle kaplı membrandan geçiş izlenir. Bunun amacı difüzyon bariyerini membranın veya destek materyalinin değil sadece hücre tek tabakası tarafından oluşturulduğunu doğrulamaktır⁶⁷.

2.5.7 Geçiş Çalışmalarında Kullanılan Sistemlere Örnekler

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan sistemlere örnekler Şekil 13'de görülmektedir.



Şekil 13a. Yanyana difüzyon hücresi⁷²



Şekil 13b. Membran ile ayrılmış sistem ⁷³

Şekil 13. Hücre kültüründen geçiş çalışmalarında yaygın olarak kullanılan sistemler

2.6. Caco-2 (Kolon Karsinoma) Hücreleri ve Özellikleri

Caco-2 hücreleri insan kolon karsinoma hücreleridir. Caco-2 hücreleri aynı kaynaktan elde edilen diğer hücre serilerinden farklı özellik gösterirler. Bu hücreler plastik kaplarda veya filtrelerde yetiştirildiğinde düzgün bir tek tabaka oluşturarak ince barsak normal enterositlerin morfolojik özelliklerini kazanırlar⁷⁴⁻⁷⁷. Oluşan tek tabakalar morfolojik polarite gösterir ve hücrelerin apikal kısmında fırça yüzey membranı oluşur^{75,78}. Hücreler, 2-3 hafta içinde tek tabaka haline gelir, yüksek seviyede fırça yüzey membran yüzey enzimleri(aminopeptidaz, alkalın fosfataz, sükröz, dipeptil aminopeptidaz, γ -glutamil trans peptidaz, sitozolik faz II enzimleri), mikrozomal sitokrom P450 izozimleri ve iyi bağlantı kompleksleri oluştururlar^{76,79}. Ayrıca, Caco-2 hücrelerinde ince barsakta var olan pek çok aktif taşıma sisteminin (şekerler, aminoasitler, dipeptidler, safra tuzları ve kobalamin intrinsik faktör) varlığı gösterilmiştir⁷⁹.

Caco-2 hücreleri dışında farklı tip kolon karsinoma hücreleri de vardır. Bu hücreler: HT-29, SW-480, SW-116, LS-174T, HRT-18, HCT-8R, Vaco 9P, HCT-ALA, HCT-CBS, HCT-EB, HCT-FET, HCT-FRI, HCT-GEO,

HCT-GLY, HCT-Moser, HCT-R, HCT-RCA, HCT-116a, ve Co-115'dir ⁸⁰. Bu kolon karsinoma hücrelerini farklılaşma özelliklerine göre dört gruba ayırmak mümkündür^{70,80}:

Tip 1: Bu gruptaki hücreler, apikal fırça yüzey membranının oluşumu ile polarize olan ve kendiliğinden enterositik değişime uğrarlar. (Örnek: Caco-2 hücreleri)

Tip 2: Bu gruptaki hücreler, ortamda glukoz varlığında kültüre alındıklarında değişime uğramazlarken, ortamda glukoz yoksa değişime uğrama yeteneğine sahiptirler. (Örnek: HT-29, HCT-EB, HCT-GEO)

Tip 3: Bu gruptaki hücreler, tümsekler oluşturarak bir polarize tek tabaka meydana getirebilirler; ancak kültür koşulları ne olursa olsun enterositik farklılaşma kabiliyetine sahip değildirler. (Örnek: HCT-GLY, HCT-FET, HCT-FRI, HCT-CBS, HCT-ALA, Co-115, HRT-18, SW-116).

Tip 4: Bu gruptaki hücreler, kültür koşulları ne olursa olsun hiçbir epitelyal polarite ve enterositik polarite özelliği göstermeksizin çok tabakalı gelişirler. (Örnek: HCT-116a, HCT-R, HCT-RCA, HCT-Moser, HCT-8R, SW-480, LS-174T, Vaco-9P)

Kültürü yapılan Caco-2 hücrelerinin geçiş ve metabolik özellikleri; pasaj sayısı ve hücre dizisinin heterojenitesi ile yakından ilişkilidir ⁷⁵.

Caco-2 modeli ile çalışılırken; bazolateral kısımdan apikal kısma veya hem bazolateral kısımdan apikal kısma, hem de apikal kısımdan bazolateral kısma ilaç geçişi incelenebilir ⁸¹⁻⁸³.

2.6.1. Caco-2 Hücrelerinin Kullanım Alanları

Caco-2 hücreleri intestinal ilaç geçişi ve metabolizmasının incelenmesinde, yeni bilgilerin elde edilmesinde in vitro bir model olarak kullanılmaktadır. Bu modelle elde edilen sonuçların in vivo yapı-absorpsiyon çalışmalarıyla elde edilen sonuçlarla yüksek korelasyon sağlaması^{65,74,76}, modelin yapı-absorpsiyon çalışmalarında kullanımına olanak sağlar.

İlaçların oral absorpsiyonlarının başarılı bir şekilde değerlendirilmesi ilaç geliştirme çalışmalarının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Günümüzde ilaç firmalarınca, ilaç geliştirme çalışmalarında ve önformülasyon aşamasında yardımcı maddelerin özellikle absorpsiyon artırıcıların⁸⁴, kosolvanların seçiminde Caco-2 hücrelerinden yararlanılmaktadır⁶⁵.

İlaçların absorpsiyonlarının gerçekleşmesi için optimum luminal pH'nın belirlenmesinde Caco-2 hücrelerinden yararlanılır^{79,85}.

Küçük ilaç moleküllerinin ve peptid benzer terapötik ajanların intestinal absorpsiyon mekanizmalarını aydınlatmak için kullanılır^{79,85}.

Geliştirilen bir formülasyonun oral kullanıma uygun olup olmadığına karar vermekte kullanılırlar^{79,85}.

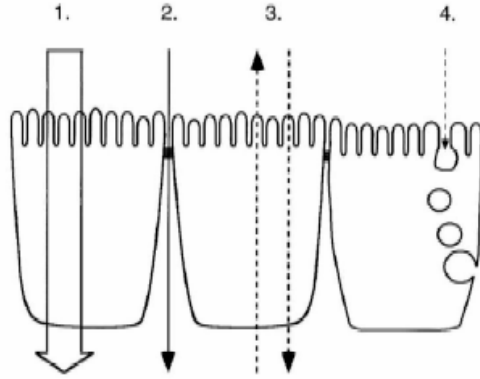
Çözünme hızı ile ilişkili absorpsiyon problemlerinin değerlendirilmesinde kullanılırlar^{79,85}.

Terapötik ajanların mukozal toksisitelerinin değerlendirilmesinde kullanılırlar^{79,85}.

2.6.2. İnce Barsaktan Geçiş

İntestinal epitel dokuda ilaç transportu dört farklı yolla gerçekleşebilir (Şekil 14)^{70,86}:

1. Pasif transselüler yol (1)
2. Pasif paraselüler yol (2)
3. Taşıyıcı sistemler aracılığıyla (3)
4. Transitoz (4)



Şekil 14. İntestinal epitelin şematik görünüşü

Lipofilik ilaçlar intestinal epitelden hızla ve tamamiyle absorbe olarak intestinal epitelin hücre membranlarına dağılırlar. Lipofilik ilaçların pasif transselüler yol ile taşındığı söylenebilir^{70,86}.

Hidrofilik ilaçlar ve peptidler yavaş absorbe olurlar ve pasif absorpsiyon göstermezler, hücre membranlarına dağılımları azdır. Bu ilaçların paraselüler yolun su dolu porlarından geçtiği varsayılır; ancak bu tam bir kesinlik kazanmamıştır. Kimyasal yapıları farklı, besin maddelerine benzeyen bazı hidrofilik bileşiklerin geçişi taşıyıcı sistemler ile sağlanabilir^{70,86}.

Paraselüler yolda sıkı bağlantıların varlığı, bu yoldan geçişi sınırlamakla birlikte hız sınırlayıcı basamak olarak kabul edilir⁸⁶⁻⁸⁹.

Transitozda mukozal membrandan serozal membrana geçişin düşük kapasiteli oluşu bu yolu ilaç taşınması açısından daha az cazip kılmaktadır. Bu yolun başka bir dezavantajı da geçişin genellikle membran veziküllerinde gerçekleşmesi ve bu veziküllerin çok miktarda proteolitik enzim içermesidir. Sonuç olarak eksojen proteinlerin çoğu, in situ çalışmalarda ve hücre tek tabakalarında transitoz esnasında büyük ölçüde bozunmaya uğramaktadırlar^{86,90,97-99}.

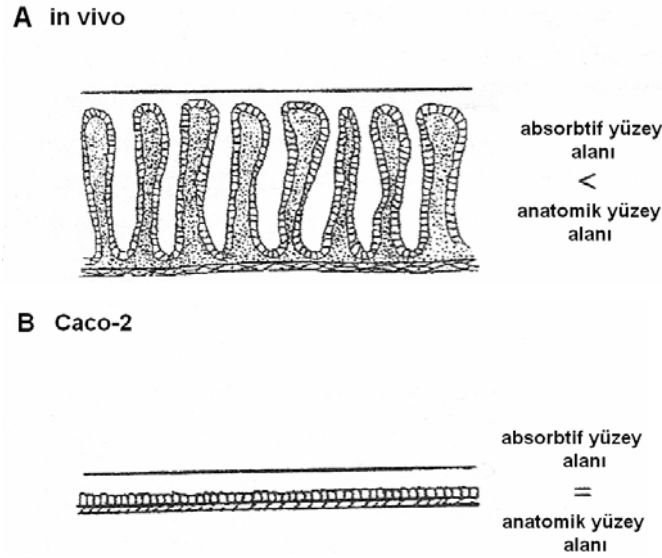
2.6.3. İntestinal Dokulardan İlaç Geçişinin Hücre Tek Tabakalarıyla Kıyaslanması

Caco-2 tek tabakalarından tamamiyle absorbe olan ilaçlar yüksek permeabilite katsayılarına sahiptirler ($P_{app} > 1 \times 10^{-6}$ cm / s). Absorbsiyonu tam olarak gerçekleşmeyen ilaçlar için ise düşük permeabilite katsayıları söz konusudur ($P_{app} < 1 \times 10^{-7}$ cm / s)⁸⁶. Yapılan başka bir çalışmada ise tamamiyle absorbe olan ilaçlar için $P_{app} > 7 \times 10^{-5}$ cm / s, absorbsiyonu tam olarak gerçekleşmeyen ilaçlar için ise $P_{app} < 1 \times 10^{-5}$ cm / s olarak bulunmuştur⁹¹.

Konu ile ilgili literatürler incelendiğinde Caco-2 tek tabakalarının intestinal geçişin ilaç taşınması için en yaygın yolu olan pasif transselüler yol için çok iyi bir model olduğu sonucuna varılmaktadır^{86,92-94}.

Caco-2 hücrelerinden absorbsiyonu yavaş ve tam olarak gerçekleşmeyen bileşikler için Caco-2 hücre tek tabakaları ve insan jejunumundan elde edilen sonuçlar arasındaki korelasyonun kantitatif değil kalitatif olduğu görülür. Bu tür ilaçlar Caco-2 tek tabakasındaki geçişi jejunumdan geçişlerinden 30-80 kat daha yavaştır. Bu farklılık absorbsiyonun gerçekleştiği yüzey alanlarının farklı olmasından kaynaklanabilir. Böylece elektrofizyolojik ve geçirgenlik verileri

değerlendirildiğinde Caco-2 tek tabakalarındaki sıkı bağlantıların geçirgenliklerinin in vivo barsak hücrelerine göre daha az olduğu sonucuna varılabilir. Şekil 15 'de barsak hücreleri ile Caco-2 hücrelerinin anatomik yapıları görülmektedir⁸⁶.



Şekil 15A. Barsak hücreleri anatomik yapısı

B. Caco-2 hücreleri anatomik yapısı

Caco-2 tek tabakalarıyla in vivo sistem arasındaki korelasyonlar değişik ilaç grupları için farklılık gösterebilir. Bunun nedeni absorpsiyonun gerçekleştiği yüzey alanı farklılıkları, luminal içerik veya ekstraselüler mukus tabakalarının farklılıkları olabileceği gibi deney koşulları ya da hücre dizisinin özellikleri de olabilir^{86,95,96}.

2.6.4. Caco-2 Hücrelerinden İlaç Absorpsiyonunun Değerlendirilmesinde Kullanılabilecek İlaça Ait Moleküler Özellikler

1. Oktanol/su partiyon katsayısı
2. Hidrojen bağlama kapasitesi
3. Desolvasyon enerjisi

4. Fizikokimyasal özellikler (Yüzey alanı, yüzey aktivitesi)^{86,89,90,100-}

103

Oktanöl/su partiyon katsayısı (P_{oct}) ilaç absorpsiyon çalışmalarıda en yaygın olarak yararlanılan parametredir. Oktanolun lipofilitesi hücre membranlarıyla kıyaslanabilecek düzeydedir. İyonize olan ilaçlar için pH 7.4'teki dağılım katsayısı (D_{oct}) yerine (P_{oct}) değeri kullanılabilir⁸⁶.

2.6.5. Caco-2 Hücrelerinin Bütünlüğünün ve Canlılığının Değerlendirilmesi

Hücrelerin bütünlüklerinin değerlendirilmesinde en yaygın olarak kullanılan yöntem TEER (Transendotelyal Elektrik Rezistansı) değeri ölçülmesidir¹⁰⁴⁻¹¹².

Hücrelerin canlılıklarının değerlendirilmesinde en yaygın olarak kullanılan yöntem MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazoliumbromit) testi'dir^{108-110,113-116}.

2.7. MDCK (Madin Darby Canine Kidney) Hücre Özellikleri

MDCK hücreleri köpek böbrek hücrelerinden elde edilen epitel kaynaklı hücrelerdir. Caco-2 hücreleri gibi, MDCK hücreleri de yarı geçirgen (semipermeabl) membranlar üzerinde yetiştirildiklerinde, kolon epitel hücrelerine dönüşürler ve sıkı bağlantılar oluştururlar¹¹⁷. MDCK hücreleri, transepitelyal geçiş çalışmalarında, renal, gastrointestinal, intranazal, rektal ve vücuttaki diğer epitel dokuların modeli olarak kullanılabilir¹¹⁸.

Bilinen iki tip MDCK hücresi vardır . Tip 1 MDCK hücrelerinin TEER değerlerinin Tip 2'ye göre daha yüksek olduğu bilinmektedir ^{118,119} . MDCK Tip 1 hücreleri 3 gün içinde 2000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 'lik TEER değerine ulaşırken Tip 2 hücreleri 100-200 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 'lik TEER değerine ulaşmaktadır. Tip 1 hücreleri için sümkroz geçirgenliğı $\leq 0.5 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ iken Tip 2 hücreleri için bu değeri $3 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ olarak belirtilmiştir ¹²⁰ .

MDCK tip 2 (wild type) hücrelerinden hareketle MDCK-mdr(multi drug resistance gene) rekombinant hücre serisi hazırlanmış ve santral sinir sistemine ilaç geçişı incelenmesinde kullanılmaktadır ^{120,121} .

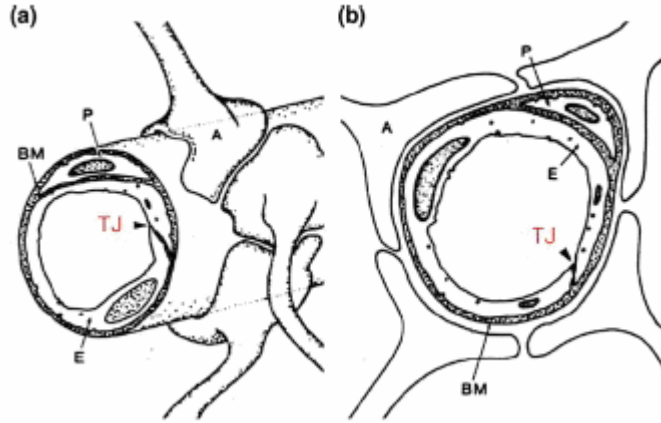
2.8 Kan-Beyin Engeli

Kan-beyin engeli (blood-brain barrier, BBB), santral sinir sistemi ile sistemik dolaşıım arasındaki fiziksel ve metabolik bariyerdur ^{122,123} . Kan-beyin engeli, santral sinir sisteminin normal fonksiyonlarını yerine getirmesinde hayati önem taşıyan ve kanda bulunan pek çok maddenin beyine geçişini engelleyen bir difüzyon bariyeri olarak da düşünölebilir ^{123,124} .

Yapısal olarak, transendotelyal rezistansı (TEER) 1500-2000 ohm.cm² olan sıkı bağlantılar ve düşük paraselöler permeabilite ile karakterizedir. Endotel hücre sıkı bağlantıları özellikle hidrofilik özellikteki maddelerin beyne girişinin önlenmesini sağlar. Buna karşılık, O₂, CO₂ gibi küçük lipofilik maddeler konsantrasyon gradyanına bağılı olarak plazma membranlarından kolayca difüzlenebilir ^{122,124,125} .

Kan-beyin engelini oluşturan hücreler, endotel hücreler, astrositler ve perisitlerdir. Endotel hücreleri bazal lamina çevreler. Şekil

16'da bu hücre tipleri görülmektedir. Karakteristik sıkı bağlantı bölgeleri vardır^{122,125-127}.



Şekil 16. Kan-beyin engelini oluşturan hücre tiplerinin* üç boyutlu(a) ve enine kesit (b) olarak gösterimi¹²⁷

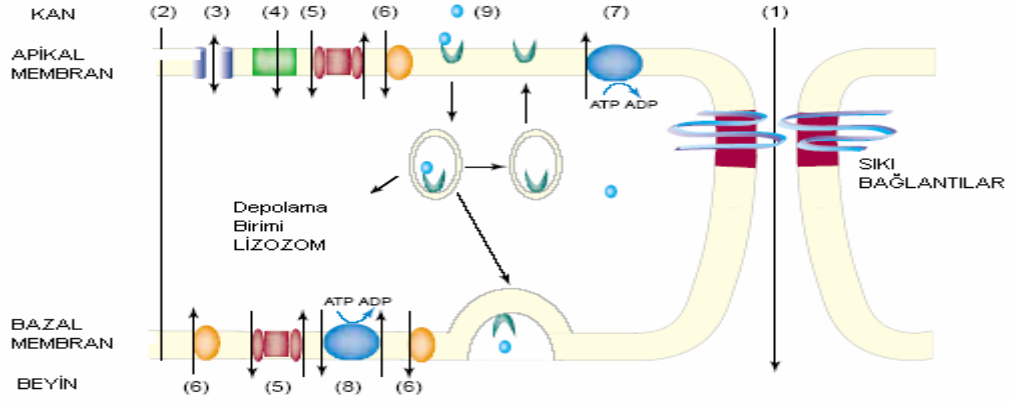
A: astrositler, BM: bazal membran, E: endotel hücreleri, P: perisitler, TJ: sıkı bağlantılar

* Şekilde nöronlar, mikroglialar vb. hücreler gösterilmemiştir.

Kan-beyin engelinin moleküler kompozisyonunun ve yapısının bilinmesi farklı koşullarda gelişen permeabilite değişikliklerinin mekanizmalarının anlaşılması bakımından çok önemlidir¹²⁸.

2.8.1. Kan-Beyin Engelinde Transport Mekanizmaları

Beyindeki homeostazı sağlamak adına, kan-beyin engeli birtakım yüzey taşıyıcıları (surface transporter) varlığında seçici olarak kanda bulunan bileşenlerin beyne girişini sağlamaktadır. Kan-beyin engelini beyin homeostazını sağlamasında yardımcı olan birçok tip transport mekanizması bulunmaktadır (Şekil 17)¹²².



Şekil 17. Kan-beyin engelinde transport mekanizmaları ^{122,127}

- (1) Paraselüler difüzyon
- (2) Transselüler difüzyon
- (3) Katyon kanalları
- (4) İyonla birlikte taşınma
- (5) İyonla zıt yönde taşınma
- (6) Kolaylaştırılmış difüzyon-aktif taşıma
- (7) Aktif taşıma
- (8) Aktif zıt yönlü taşınma
- (9) Endositoz

Çoğu lipofilik yapılı ilaç endotel hücre membranlarından kolaylıkla difüze olur, difüzyonda bu membranların yapısal özellikleri sınırlayıcıdır. Lipofilik yapıdaki bileşiklerin kan-beyin engelini aşabilme özelliğine sahip oluşu etkin maddelerin partitasyon katsayıları(log P) ile kan-beyin engelini geçmeleri arasında bir korelasyon olup olmadığı sorusunu akla getirmektedir. 1968 yılında, santral sinir sistemi depresanları üzerinde yapılan bir çalışmada kullanılan bileşiklerin log P (oktanol/su) değerleri 2'ye yaklaştığında maksimum hipnotik aktivenin görüldüğü belirtilmiştir. Ardından 1977 yılında imidazol türevleri ile yapılan başka bir çalışma da bu bulguyu desteklemiş ve bu olay '2 kuralı' olarak kabul görmüştür¹²⁹.

Bir ilacın kan-beyin bariyerinden geçip geçemeyeceği ilacın lipofilitesi, molekül ağırlığı, şekli ve yükü gibi fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Bunun yanı sıra ilaç molekülü, aktif veya pasif transmembran taşıyıcıları, eflux pompaları veya metabolizasyon enzimleri için substrat da olabilir. İlaçların taşınmasında unutulmaması gereken en önemli konulardan biri de kan-beyin engelinin fizyolojik kontrol altında olduğu ve transport özelliklerinin çeşitli hastalıklarla veya bazı maddeler varlığında değişiklik gösterebileceğidir ¹³⁰.

2.8.2 Kan-Beyin Engelini Taklit Eden İn Vitro Modeller

Santral sinir sistemi üzerine etkili kimyasal bileşiklerin tasarlanmasında ön koşul iyi bir beyin penetrasyonudur. Periferik dokularda etki gösterecek ilaçların geliştirilmesinde de, santral sinir sistemi üzerindeki yan etkilerin engellenmesi açısından beyin penetrasyon özelliklerinin bilinmesi önemlidir ¹³¹.

İn vitro kan beyin bariyeri modelleri iki temel kısımda incelenebilir:

- 1.Hücre kültürü modelleri^{100, 132-137}
- 2.Bilgisayar programları ¹¹⁹

Kan-beyin engelini taklit eden in vitro modeller, var olan ilaçların ve ilaç adaylarının kan-beyin bariyeri permeabilite özelliklerinin çalışılmasında önemli rol oynamaktadır ¹³¹. Beyne ilaç girişi ve kan-beyin bariyerini geçiş özellikle nörofarmasötik araştırmalarda santral sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde kullanılacak yeni ilaçların geliştirilmesi açısından her geçen gün daha çok önem kazanmaktadır ¹³²

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.GEREÇ

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Amonyum karbonat	Sigma-ABD
Asetilkolin iyodid (Achl)	Sigma-ABD
Asetonitril (HPLC Grade)	Sigma-ABD
Dimetil- β -siklodekstrin	Sigma-ABD
DPPC	Acros-Belçika
Dipalmitoil fosfatidil kolin	
DTNB	Serva-ABD
(5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoik asit))	
DMEM	Biochrom-Almanya
Dubelco's Modified Eagle's Medium	
Fenolftalein	
Kloroform	Lab-Scan-İrlanda
Kolesterol	Sigma-ABD
Metanol	Lab-Scan-İrlanda
Metil selüloz	Colorcon-İngiltere
MTT	Sigma-ABD
(3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromit)	
Orto-fosforik asit	Sigma-ABD
Potasyum dihidrojen fosfat	Reidel-deHaën-Almanya
Rivastigmin hidrojen tartarat	Dr.Reddy's- Hindistan
Sodyum heptan sülfonat	Sigma-ABD
Sodyum hidroksit	Merck-Almanya
Sodyum karbonat monobazik	Merck-Almanya
Sodyum taurokolat	Sigma-ABD

3.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler

Difüzyon sistemi	Harvard Aparatus Co.
Direnç ölçüm aleti	Bosstek
HPLC(Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi)	Thermo Finnigan
Surveyor PDA dedektör	
Surveyor otosampler	
Surveyor LC pompa	
HP 1015 Laserjet yazıcı	
Laminar akış	Telstar Bio-II-A
Partikül büyüklüğü ölçüm aleti	Smpatec GmbH-Partikel Technick
pH-metre	pH Meter CG 840
Süzme kiti (vakum pompası)	Alltech
Terazi	Shimadzu AW 320
Termostatlı ısıtıcı	Heidolph
Ultrasonik banyo	Brainsonic 221
UV Spektrofotometresi	Shimadzu UV 1700
Vakum Pompası	Laborbedorf Erich Wiegand
Rotaevaporatör	Heidolph
Ultrasantrifüj	Jouan KR 221
Etüv (CO2'li)	Heraeus
Elektron mikroskobu	Carl Zeis EM 900
Zeta potansiyeli ölçüm aleti	Zetasizer-Nano ZS-Malvern

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Rivastigmin Tartaratın Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi

Rivastigmin tartaratın miktar tayini için HPLC analizi kullanıldı. HPLC yöntemi, etkin maddenin hücre kültüründen geçiş çalışmalarında, in vitro diyaliz membran geçiş çalışmalarında, stabilite çalışmalarında kullanıldı.

HPLC analizlerine başlamadan önce rivastigmin tartarat için UV spektrofotometrede, 200 – 300 nm arasında dalga boyu taraması yapıldı. Dalga boyu taraması yapmak amacıyla rivastigmin tartaratın, 100 µg/ml da sulu çözeltisi hazırlandı. Dalga boyu taraması, 1 cm'lik kuvartz küvetler kullanarak suya karşı yapıldı.

3.2.2. Rivastigminin HPLC ile Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

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 işlemleri hem hücre geçiş çalışmalarında kullanılacak DMEM içerisinde, hem de diyaliz membrandan geçiş çalışmalarında kullanılacak pH 7.4 fosfat tamponunda gerçekleştirildi. Tablo 2'de HPLC yönteminin koşulları verilmiştir.

Tablo 2. Rivastigmin tartaratın HPLC ile miktar tayini koşulları

KOLON	Ace 5 C18, 4.6x250 mm
Mobil Faz	Sodyum-1-heptan sülfonat (dilüe fosforik asitle pH 3'e ayarlandı: 0.01 M) – asetonitril (72:28, v/v)
Kolon Sıcaklığı	30°C
Akış Debisi	1mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	50 µL
Dalga Boyu	217 nm
Alıkonma Zamanı	9 dak.

Bu amaçla, validasyon çalışması yapılmış ve aşağıdaki parametreler incelenmiştir.

3.2.2.1. Doğrusallık

Hazırlanan numunedeki etkin madde miktarının belli bir aralığı içerisindeki değişimi ile elde edilen yanıtın orantılı olduğunun ifadesidir.

Rivastigmin tartaratın serumlu DMEM içerisinde 11 farklı derişimde (50-0.012 µg/mL) 6 ayrı seri çözeltisi hazırlandı ve HPLC'ye enjekte edildi. Pik alanları bulundu. Rivastigmin tartarat derişimlerine karşılık elde edilen pik alanlarına doğrusal en küçük kareler yöntemi uygulandı. Standart doğru denklemi elde edildi. Gerekli istatistiksel parametreler hesaplandı.

Rivastigmin tartaratın pH 7.4 fosfat tamponu içerisinde 11 farklı derişimde (50-0.012 µg/mL) 6 ayrı seri çözeltisi hazırlandı ve

HPLC'ye enjekte edildi. Pik alanları bulundu. Rivastigmin tartarat derişimlerine karşılık elde edilen pik alanlarına doğrusal en küçük kareler yöntemi uygulandı. Standart doğru denklemi elde edildi. Gerekli istatistiksel parametreler hesaplandı.

3.2.2.2. Doğruluk ve Geri Elde

Doğruluk, saptanan madde miktarının numune içerisindeki gerçek etkin madde miktarına yakınlığıdır. Miktar tayini yönteminin doğruluğu geri elde etme yüzdesine bağlıdır. % 95 olasılıkla daha önceden kabul edilen ölçütler arasında kalmalıdır.

Rivastigmin tartaratın serumlu DMEM içerisinde hem çözeltiden hem de lipozomlardan kalibrasyon denklemi kullanılarak geri elde edilen miktarları hesaplandı.

Rivastigmin tartaratın pH 7.4 fosfat tamponu içerisinde hem çözeltiden hem de lipozomlardan kalibrasyon denklemi kullanılarak geri elde edilen miktarları hesaplandı.

Geri elde edilen miktarlar hesaplanarak, gerekli istatistiksel parametrelerle değerlendirildi.

3.2.2.3 Kesinlik

Miktar tayininde kullanılan analiz yöntemiyle, aynı derişimdeki numunenin birbiri ardına yapılan ölçümlerinin birbirine olan yakınlığı yöntemin kesinliğinin, kesinlik ise tekrar edilebilirliğinin ölçüsüdür. Kesinlik standart sapma ve bağıl sapma değerleri ile değerlendirilir.

a. Deney İçi Kesinlik

Rivastigmin tartaratın kalibrasyon doğru denklemini oluşturmak için serumlu DMEM içerisindeki stok çözeltisinden uygun seyreltmeler yapılarak hazırlanan çeşitli derişimdeki çözeltilerin, herhangi bir derişimde olan örneklerinden biri HPLC'ye ardı ardına 10 kere enjekte edildi.

Rivastigmin tartaratın kalibrasyon doğru denklemini oluşturmak için serumlu pH 7.4 fosfat tamponunu içerisindeki stok çözeltisinden uygun seyreltmeler yapılarak hazırlanan çeşitli derişimdeki çözeltilerin, herhangi bir derişimde olan örneklerinden biri HPLC'ye ardı ardına 10 kere enjekte edildi.

Elde edilen pik alanlarının ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

b. Deneyler Arası Kesinlik

Rivastigmin tartaratın serumlu DMEM içerisindeki 50, 12.5, 3.12, 0.78, 0.098 ve 0.024 µg/mL derişimlerde çözeltileri hazırlandı. Bu numuneler birbirini takip eden 3 gün içerisinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edildi. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen derişimlerin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

Rivastigmin tartaratın pH 7.4 fosfat tamponu içerisindeki 50, 12.5, 3.12, 0.78, 0.098 ve 0.024 µg/mL derişimlerde çözeltileri hazırlandı. Bu numuneler birbirini takip eden 3 gün içerisinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edildi. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen derişimlerin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

3.2.2.4 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 yapılmalıdır.

Bu amaçla DMEM, dimetil- β -CD ve sodyum taurokolatın 50 $\mu\text{g/mL}$ 'lik çözeltileri hazırlandı ve 217 nm'de HPLC'ye enjekte edildi.

3.2.2.5 Duyarlılık ve Saptama Sınırı

Kullanılan analiz yönteminin güvenilir bir şekilde analiz edebildiği en düşük derişimi belirlemek amacıyla yapılan işlemlerdir. Duyarlılık ve saptama sınırı aşağıdaki denklemlerle hesaplanır.

$$\text{Duyarlık sınırı (LOD)} = (3.3 \times \sigma) / S$$

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

σ : kalibrasyon aralığındaki en düşük derişimin standart sapması

S : kalibrasyon eğrisinin eğimi

3.2.3. HPLC'de Sodyum Taurokolat Miktar Tayini Metot Validasyonu

Sodyum taurokolat, geçiş çalışmalarında rivastigmin tartaratin penetrasyonunu artırmak için kullanıldı. Tablo 3'de HPLC yönteminin koşulları verilmiştir.

Tablo 3. Sodyum taurokolatın HPLC ile miktar tayini koşulları¹³⁸

KOLON	Ace 5 C18, 4.6x250 mm
Mobil Faz	% 0.3 amonyum karbonat
Kolon Sıcaklığı	25 °C
Akış Debisi	0.8 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	50 µL
Dalga Boyu	210 nm
Alıkonma Zamanı	8 dak.

3.2.3.1. Doğrusallık

Sodyum taurokolatın bidistile suda hazırlanan stok çözeltisinden hareketle 100, 75, 50, 25, 10, 8, 5, 2.5, 1.25, 0.625 µg/mL'lik 6 ayrı seri çözelti hazırlandı. Pik alanları bulundu. Sodyum taurokolat derişimlerine karşılık elde edilen pik alanlarına doğrusal en küçük kareler yöntemi uygulandı. Standart doğru denklemi elde edildi. Gerekli istatistiksel parametreler hesaplandı.

3.2.3.2. Doğruluk ve Geri Elde

Sodyum taurokolatın bidistile su içerisinde hem lipozomdan hem de çözeltiden kalibrasyon denklemi kullanılarak geri elde edilen miktarları hesaplandı.

Geri elde edilen miktarlar, gerekli istatistiksel parametrelerle değerlendirildi.

3.2.3.3 Kesinlik

a. Deney İçi Kesinlik

Sodyum taurokolatın bidistile su içerisinde 10 µg/mL'lik çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti HPLC'ye ard arda 10 kere enjekte edildi. Elde edilen pik alanlarının ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

b. Deneyler Arası Kesinlik

Sodyum taurokolatın bidistile su içerisinde 100, 50, 10, 8 ve 2.5 µg/mL derişimlerde çözeltileri hazırlandı. Bu numuneler birbirini takip eden 3 gün içerisinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edildi. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen derişimlerin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

3.2.3.4 Özgünlük ve Seçicilik

Bu amaçla rivastigmin tartaratın 50 µg/mL'lik çözeltisi hazırlandı ve HPLC'ye enjekte edildi.

3.2.3.5 Duyarlılık ve Saptama Sınırı

Duyarlılık ve saptama sınırı daha önce belirtildiği gibi hesaplanmıştır.

3.2.4 Dimetil-β-Siklodekstrin'e Ait Spektrofotometrik Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

Dimetil-β-siklodekstrin geçiş çalışmalarında rivastigmin tartaratin penetrasyonunu artırmak için kullanıldı.

Dimetil-β-siklodekstrin'in miktar tayini için kolorimetrik bir yöntem kullanıldı¹³⁹. Bu yöntemle göre; dimetil-β-siklodekstrin içeren numune 0,5 M NaOH ile pH 11'e getirilir. Renk verici madde olarak fenolftaleinin asetonitril içerisinde uygun derişimde hazırlanmış çözeltisi kullanılır. Fenolftalein çözeltisi ve numune (1/25 oranında) spektrofotometrede okunmadan hemen önce karıştırılır. Kör olarak β-siklodekstrin içermeyen, 0,5 M NaOH ile pH 11'e getirilmiş bidistile su ve fenolftalein çözeltisi kullanılır. 554 nm dalga boyunda absorbans okunur. Kullanılan fenolftalein çözeltisinin derişimi, tayin edilmek istenen dimetil-β-siklodekstrin aralığıyla ilişkilidir. Tablo 4'te tayin edilmek istenen β-siklodekstrin miktarı aralığında doğru bir biçimde analiz yapılmasını sağlayan fenolftalein derişimleri görülmektedir. Biz tabloda C ile gösterilen derişim aralığını seçerek çalışmalarımızda kullandık.

Tablo 4. Tayin edilmek istenen siklodekstrin miktarına göre değişen fenolftalein derişimleri

Fenolftalein Derişimi (mM)	Tayin Edilecek β-Siklodekstrin Aralığı(mg.mL ⁻¹)
A . 0.4	0.4 – 4.7
B. 0.17	0.26 – 0.95
C. 0.1	0.068 – 2.2
D. 0.05	0.0045 – 0.91

3.2.4.1 Doğrusallık

Dimetil- β -siklodekstrinin, 0.5 M NaOH ile pH 11'e getirilmiş bidistile suda hazırlanan stok çözeltisinden hareketle 8 farklı derişimde (2-0.08 mg/mL) 6 ayrı seri çözelti hazırlandı, absorbanları okundu. Okunan absorban değerlerinin logaritmaları alındı ve β -siklodekstrin derişimlerinin logaritmalarına karşı grafiğe geçirildi. Log absorban değerlerine karşılık log derişim değerlerine doğrusal en küçük kareler yöntemi uygulandı. Standart doğru denklemi elde edildi. Gerekli istatistiksel parametreler hesaplandı.

3.2.4.2 Doğruluk ve Geri Elde

Dimetil- β -siklodekstrinin hem lipozomdan hem de çözeltiden geri elde edilen miktarları hesaplandı. 0.5 M NaOH ile pH 11'e getirilmiş bidistile suda 2 mg/mL'lik stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden hareketle 1.2, 1, 0.8 mg/mL'lik çözeltiler hazırlandı, absorban ölçümleri yapıldı. Okunan absorban değerlerinin logaritmaları alındı. Log absorban değerlerine karşılık log derişim değerleriyle elde edilen doğru denkleminde yerine kondu. Geri elde edilen miktarlar, gerekli istatistiksel parametrelerle değerlendirildi.

3.2.4.3 Kesinlik

Dimetil- β -siklodekstrinin, 0,5 M NaOH ile pH 11'e getirilmiş bidistile suda 2 mg/mL'lik stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden hazırlanan 0.5 mg/mL'lik çözeltinin absorbanı ard arda 10 kez okundu. Elde edilen absorban değerlerinin, ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

3.2.4.4 Özgünlük ve Seçicilik

Bu amaçla dimetil- β -siklodekstrin 0,5 M NaOH ile pH 11 'e getirilmiş bidistile suda 1 mg/mL'lik stok çözeltisi hazırlandı. 554 nm'de deney prosedürüne göre rivastigmin tartarat ile birlikte dalga boyu taraması yapıldı. Rivastigmin tartaratın bu şartlarda pik verip vermediği kontrol edildi.

3.2.4.5 Duyarlılık ve Saptama Sınırı

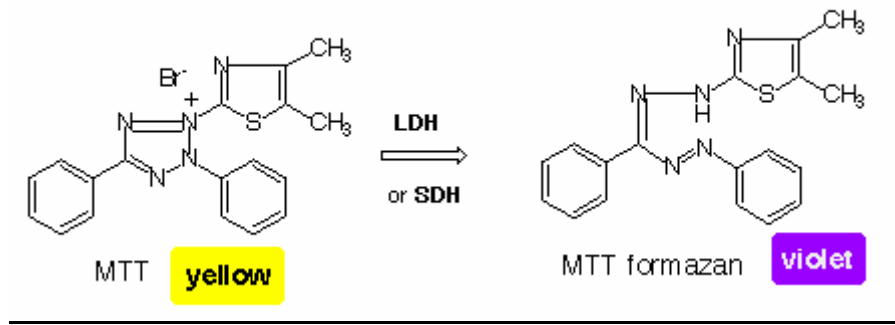
Duyarlılık ve saptama sınırı Bölüm 3.2.2.5 'te belirtildiği gibi hesaplanmıştır.

3.2.5 MTT Testi¹

Gelişme fazındaki hücreler, sitotoksik ilaca maruz bırakılır. Hücrelerin ilaca maruz kalacağı süre genellikle maksimum hücre hasarının oluşması için gereken süredir ki; bu süre aynı zamanda ilacın stabilitesine de bağlıdır. İlacın uzaklaştırılmasından sonra, hücrelerin 2-3 kez bölünmesi için belli bir süre (PDTs) beklenir böylece görünür durumda olup üreyemeyen hücreler ile hem görünen hem de üreyebilen hücreler ayırt edilmiş olur. Yaşayan hücreler, MTT boyasının redüksiyonu ile dolaylı olarak teşhis edilir.

¹ MTT testleri ve hücre kültürlerinin üretimi ŞAP Enstitüsünde yapılmıştır. Yardımlarından dolayı Sayın Şükran Yılmaz'a teşekkür ederiz.

MTT testinin esası, sarı renkli çözünabilir özellikteki MTT boyasının, metabolik olarak aktif olan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat dehidrogenaz(SDH) enzimi ile koyu mavi renkli çözünmez özellikteki formazan ürününe dönüşmesidir(Şekil 18). Oluşan formazan ürünü çözünür hale getirilir ve oluşan mor renk spektrofotometrik olarak ölçülür.



Şekil 18. MTT reaksiyonunun kimyasal gösterimi

MTT testi serumlu DMEM ve serum içermeyen DMEM için ayrı ayrı yapıldı(Şekil 19). Testte Caco-2, MDCK ve L-929 (fare fibroblast hücreleri) hücrelerinin canlılıkları 24 saat izlendi. Şekil 20, 21ve 22’de Caco-2, MDCK ve L-929 hücrelerinin serum içeren ve serum içermeyen DMEM ile inkübe edildikten sonra çekilen elektron mikroskobu fotoğrafları görülmektedir.

Rivastigmin, sodyum taurokolat, dimetil-β-siklodekstrin için MTT testi uygulandı. Amaç, hücrelerden geçiş çalışmasını yapacağımız çözelti ve lipozom formülasyonlarını oluşturan etkin ve yardımcı maddeleri, hücreler canlı kalacak şekilde, maksimum hangi miktarlarda kullanabileceğinin görülmesidir.

Rivastigmin için: 6, 4.5, 3, 1.5, 1 mg/mL derişimlerde çözeltiler, serumlu ve serumsuz DMEM ile ayrı ayrı hazırlandı.

Sodyum taurokolat için: 20, 15, 7.5, 3.75, 1.875, 0.005 mM derişimlerde çözeltiler, serumlu ve serumsuz DMEM ile ayrı ayrı hazırlandı.

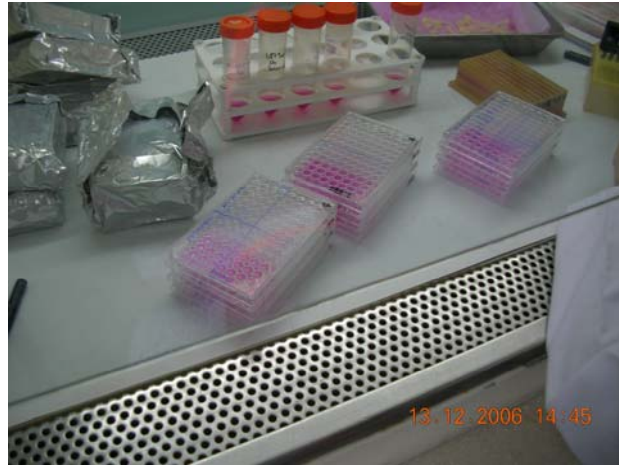
Dimetil-β-siklodekstrin için: % 5, % 3, % 1.5, % 0.75, % 0.375, % 0.25, % 0.15 siklodekstrin içeren çözeltiler, serumlu ve serumsuz DMEM ile ayrı ayrı hazırlandı.

Lipozom formülasyonunda kullanılacak lipitlerin hücrelere etkisini görmek için etkin madde ve absorpsiyon artırıcı maddeler içermeyen, sadece dipalmitoil fosfatidil kolin (DPPC), kolesterol (Ch) ve metil selülozdan (MC) oluşan lipozomlar 250, 500 ve 750 µL'lik olarak hazırlandı ve MTT testine tabi tutuldu.

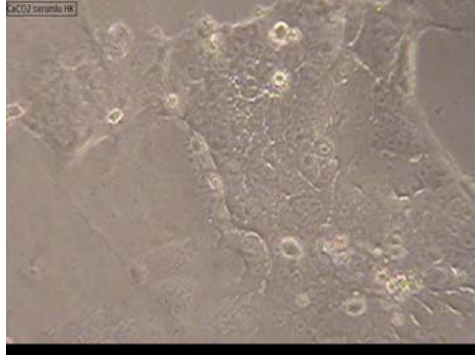
Hazırlanan numuneler, 0.22 µm'lik tek kullanımlık membran filtrelerden süzöldü. Deney yapılıncaya kadar +4°C'de saklandı. Test için 37°C'ye getirildikten sonra kullanıldı.

Test için kullanılacak 3 tip hücre 96 kuyucuklu doku költür kaplarında üretildi. Kuyucuklara 100' er µL DMEM eklendi ve 24 saat 37°C'de CO₂'li etöüde bekletildi. Her hücre grubu için hiçbir madde içermeyen sadece DMEM içeren kontrol grupları belirlendi. Ardından kaplar boşaltıldı ve değişen derişimlerde test maddelerinin DMEM içerisindeki çözeltileri (100 µL) kuyucuklara eklendi (Şekil 19) ve 24 saat 37°C'de CO₂'li etöüde bekletildi. 24 saatin sonunda kaplardaki içerik boşaltılarak, tüm kuyucuklara 100 µL taze DMEM ile 13 µL MTT çözeltisi eklendi. Költür kapları hemen alüminyum folyoyla sıkıca sarıldı ve 3 saat 37°C'de CO₂'li etöüde bekletildi. 3 saatin sonunda etöüden çıkarılan kaplar boşaltıldı ve kuyucuklara 100'er µL izopropanol ilave edildi. Oluşan mor renk spektrofotometrik olarak 570 nm'de tayin edildi. Farklı derişimlerdeki

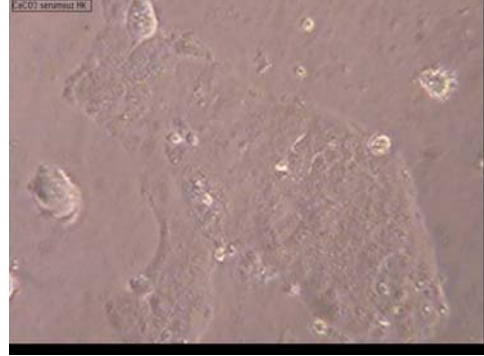
maddeler için farklı absorbans değerleri elde edildi ve bu değerlerden hareketle % canlılık hesapları yapıldı. Hücre kontrol gruplarının inverted mikroskop (ışık kaynağı altta olan mikroskop) görüntüleri Şekil 20, 21 ve 22'de görülmektedir.



Şekil 19. Farklı konsantrasyonlardaki maddelerin DMEM içinde hücrelere tatbik edilmesi

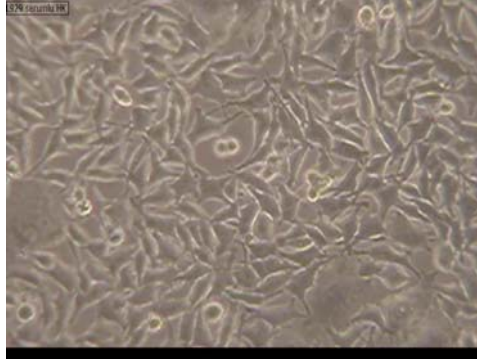


(a) serumlu DMEM

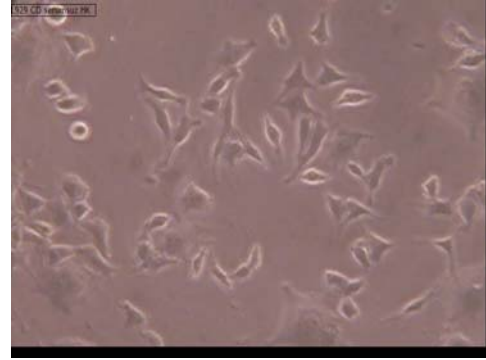


(b)serumsuz DMEM

Şekil 20. MTT testinde kullanılan Caco-2 hücrelerinin kontrol gruplarının inverted mikroskop görüntüleri

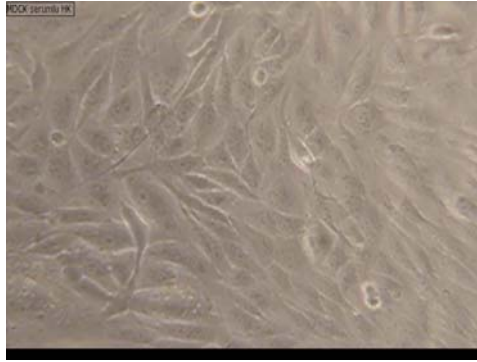


(a) serumlu DMEM

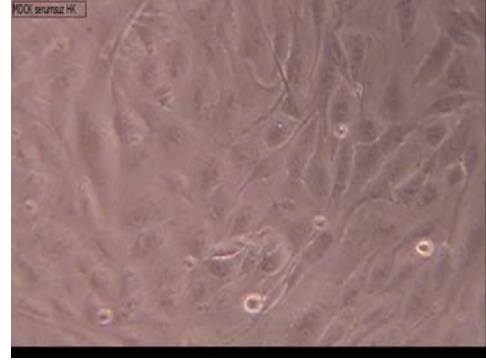


(b)serumsuz DMEM

Şekil 21. MTT testinde kullanılan L-929 hücrelerinin kontrol gruplarının inverted mikroskop görüntüleri



(a) serumlu DMEM



(b)serumsuz DMEM

Şekil 22. MTT testinde kullanılan MDCK hücrelerinin kontrol gruplarının inverted mikroskop görüntüleri

3.2.6 İn vitro ve in vivo Çalışmalarda Kullanılan Formülasyonlar

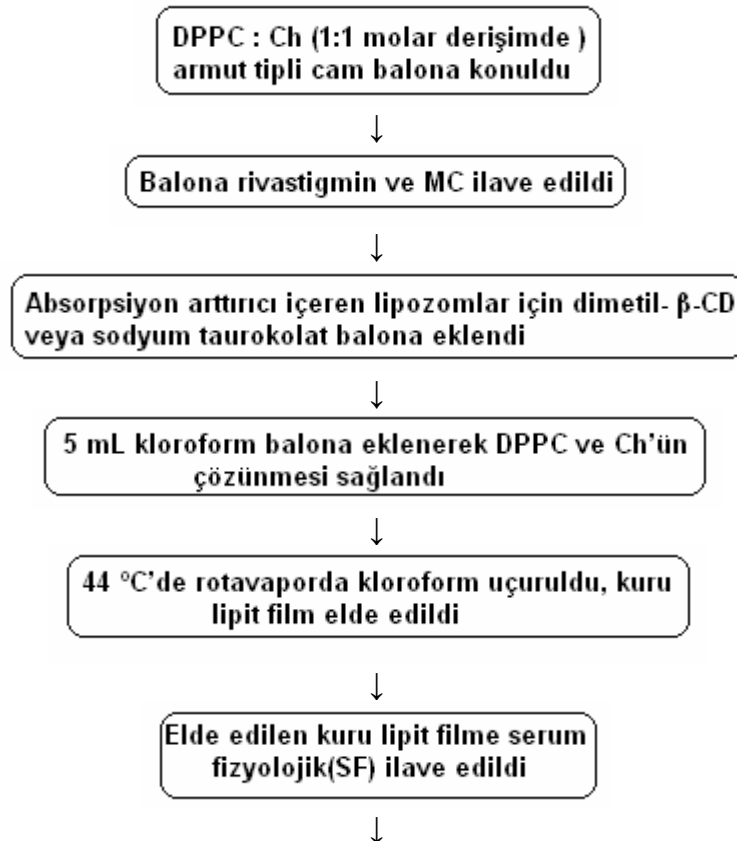
İn vitro geçiş çalışmalarında çözelti ve lipozom tipi formülasyonlar kullanıldı. Formülasyon içeriklerinde kullanılacak rivastigmin, sodyum taurokolat, dimetil- β -siklodekstrin miktarları MTT testi sonuçları göz önüne alınarak belirlendi. Geçiş çalışmalarında kullanılan formülasyonlar:

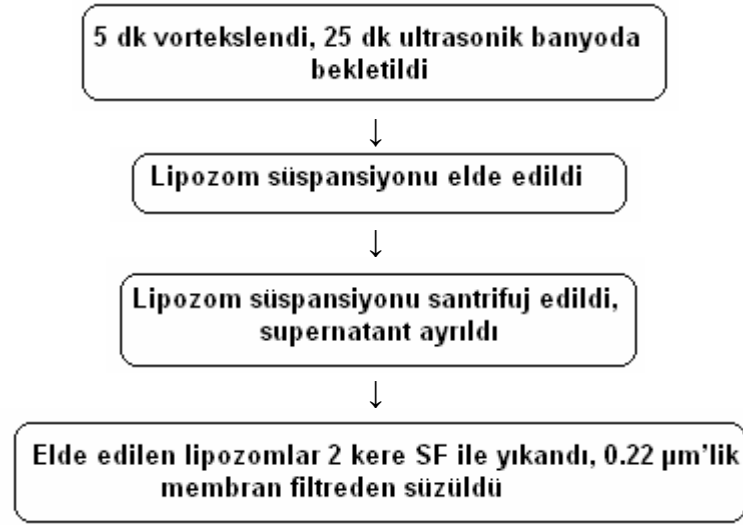
- Rivastigmin çözeltisi
- Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren çözelti

- c. Rivastigmin ve dimetil- β -siklodekstrin içeren çözelti
- d. Rivastigmin lipozomları
- e. Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomlar
- f. Rivastigmin ve dimetil- β -siklodekstrin içeren lipozomlar

3.2.6.1 İn vitro ve in vivo Çalışmalarda Kullanılan Lipozomların Hazırlanması

Tez çalışmamızda, rivastigmin, sodyum taurokolat, dimetil- β -siklodekstrin içeren MLV tipi lipozomlar kullanıldı. Lipozomlar, fosfolipit olarak DPPC, stabilite artırıcı olarak kolesterol (Ch) ve metil selüloz (MC), absorpsiyon artırıcı olarak sodyum taurokolat ve dimetil- β -siklodekstrin kullanılarak Bangham film yöntemi ile Şekil 23'de gösterildiği gibi hazırlandı.





Şekil 23. Lipozomların(MLV tipi) hazırlanması

3.2.6.2 İn vitro ve in vivo Çalışmalarda Kullanılan Lipozomların Karakterizasyonu

Hazırlanan lipozomların karakterize edilmesi amacıyla, partikül büyüklüğü ve dağılımı, partikül şekli, zeta potansiyeli, lipozom içine hapsedilen rivastigmin, dimetil- β -CD veya sodyum taurokolat miktarları incelendi.

3.2.6.2.1 Lipozomların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı

Hazırlanan lipozomların partikül büyüklüğü ve dağılımı Laser-X Diffraction Particle Sizer aleti ile ölçüldü. Ölçümler, aletin kuvvet sisteminde az miktarda lipozomun bidistile su içinde dağıtılmasıyla elde edilen dispersiyon kullanılarak yapıldı.

Laser-X Diffraction Particle Sizer aletinin çalışma prensibi, partikül yüzeyine çarpan lazer ışığının optik özelliklerine (saçılma, absorpsiyon gibi) dayanmaktadır. Kırılma (difraksiyon), gelen lazer ışığının

saçılma ve absorpsiyonundan sonra kalan kısmında gerçekleşir. Sistemi oluşturan kısımlar optik eksen üzerinde: Lazer kaynağı, ışın arttırıcı, ölçüm noktası, lens odaklayıcılar ve çok noktalı fotodedektörler şeklinde sıralanır. Fotodedektördeki spektrum, ölçüm noktası ve lens odaklanma aralığı ile belirlenir. Fotodedektör, lensin odak uzaklığına göre ayarlanmıştır. Partikül büyüklüğü ve dağılımı incelenen numunenin, partikül özelliklerine bağlı olarak dairesel ve simetrik bir görüntü oluşur. Merkezden uzaklaştıkça enerji yoğunluğu azalır. Çok noktalı fotodedektör, 31 tane yarım çember şeklindeki bölgeyi ölçebilme özelliğindedir. Işık, yoğunluğu ile orantılı bir şekilde elektrik akımına dönüştürülür, bu değer aletin bilgisayar programı ile sayısal hale getirilir, kaydedilir ve program tarafından değerlendirilir.

Hazırlanan lipozomların partikül büyüklüğü ve dağılımının zamanla ve sıcaklıkla değişip değişmediği stabilite çalışmalarında incelenmiştir.

3.2.6.2.2 Lipozomların Şekli

Hazırlanan lipozomların şekli inverted mikroskop (x40) ile gözlendi.

3.2.6.2.3 Lipozom İçinde Hapsedilen Rivastigmin, Dimetil- β -CD ve Sodyum Taurokolat Miktar Tayinleri

Hazırlanan lipozom süspansiyonları, 4°C'de 20000 g'de 10 dk süreyle santrifuj edildi. Süpernatant ayrıldı, miktar tayini çalışmalarında kullanıldı. Rivastigmin ve sodyum taurokolat HPLC ile, dimetil- β -CD ise spektrofotometrik olarak tayin edildi.

3.2.6.2.4 Lipozomların Zeta Potansiyelleri²

Hazırlanan lipozomların Zeta potansiyel ölçümleri Malvern Zeta Sizer aleti kullanılarak yapıldı. Bu aletin çalışma prensibi elektroforezdir. Elektroforez ortamda bulunan partiküllerin elektriksel alandaki hareketini ifade eder. Elektroforetik hız, elektroforetik mobilite ile orantılıdır. Elektroforetik mobilite, ölçülebilir bir parametredir. Elektroforetik mobilite de zeta potansiyeli ile ilişkilidir.

3.2.6.3 Lipozom Formülasyonlarına Ait Stabilite Çalışmaları

3.2.6.3.1 Lipozom Formülasyonlarında Rivastigmin Miktar Tayini

Rivastigmin, lipozomlardan Bölüm 3.2.6.2.3'te anlatıldığı gibi HPLC yöntemiyle, 0. ve 15. günlerde, 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. aylarda tayin edildi.

3.2.6.3.2 Lipozom Formülasyonlarında Sodyum Taurokolat Miktar Tayini

Sodyum taurokolat, lipozomlardan Bölüm 3.2.6.2.3'te anlatıldığı gibi, HPLC yöntemiyle tayin edildi

² Lipozom formülasyonlarına ait zeta potansiyel ölçümleri Atomika Teknik Cihazları, Eskişehir'de yapılmıştır. Yardımlarından dolayı Sayın Dr. Göktuğ Günkaya'ya teşekkür ederiz.

3.2.6.3.3 Lipozom Formülasyonlarında Dimetil- β -CD Miktar Tayini

Dimetil- β -CD, lipozomlardan Bölüm 3.2.6.2.3'te anlatıldığı gibi spektrofotometrik yöntemle tayin edildi.

3.2.6.3.4 Lipozomların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımları

Hazırlanan lipozomların partikül büyüklüğü ve dağılımı Laser-X Diffraction Particle Sizer aleti ile 0.,1.,2.,3.,4.,5. ve 6. aylarda tayin edildi.

3.2.6.3.5 Lipozomların Zeta Potansiyeli Ölçümleri

Hazırlanan lipozomların zeta potansiyelleri Malvern Zeta Sizer aleti ile 0., 3. ve 6. aylarda tayin edildi.

3.2.7 İn vitro Geçiş Çalışmaları

İn vitro geçiş çalışmaları, Caco-2 ve MDCK hücrelerinden ve diyaliz membrandan gerçekleştirildi. Geçiş incelenecek çözeltiler, lipozom içine hapsedilen rivastigmin, dimetil- β -CD ve sodyum taurokolat miktarları göz önünde bulundurularak hazırlandı.

Geçiş çalışmalarında kullanılacak lipozomlar Bölüm 3.2.6.1'de anlatıldığı gibi hazırlandıktan sonra, üstte kalan berrak sıvılardan rivastigmin miktar tayinleri yapıldı.

3.2.7.1 Hücre Kültürü Çalışmaları

3.2.7.1.1 Caco-2 ve MDCK Hücrelerinin Üretilmesi

-196°C'de dondurularak saklanmış hücreler çıkartılarak 37°C'lik su banyosunda çözöldü. 800 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Supernatant ayrılarak atıldı. Çökelti, 5 mL %10'luk fetal bovin serum, %1 sodyumbikarbonat (toplamda % 7.5 olacak şekilde) ve %1 içeren DMEM ile homojenize edildi ve 25 cm²'lik doku kültürü şişesine alındı. Hücreler, doku kültürü şişesi içinde 37°C'de CO₂'li etüvde üremeye bırakıldı. 48 saatte bir vasat taze DMEM'le değiştirildi. Hücrelerin üreme durumları mikroskop ile kontrol edildi. Hücrelerin % 100 tek tabaka şeklinde ürediği göröldükten sonra 75 cm²'lik doku kültürü şişesine pasajlama yapıldı.

Doku kültürü şişesinin yüzeyine tutunmuş hücreleri uzaklaştırmak için tripsinizasyon işlemi uygulandı. Tripsinizasyon işleminin ardından hücreler tripan mavisi ile boyanarak, bruker lamında mikroskop ile sayıldı. Hücre yoğunluğu hesaplandı. Caco-2 hücrelerinin mililitresinde 80000 hücre olacak şekilde DMEM ile seyreltme yapıldı^{140,141}. MDCK hücrelerinin mililitresinde 60000 hücre olacak şekilde DMEM ile seyreltme yapıldı¹⁴². Hücreler hazırlandıktan sonra filtreler üzerine aktarıldı. 48 saatte bir vasat tazelendi.

Caco-2 hücrelerinin tek tabaka oluşturması için süre 21 gün, MDCK hücrelerinininki ise 7 gündür.

3.2.7.1.2 Caco-2 ve MDCK Hücrelerinden Geçiş Çalışmaları

Hücre kültürlerinden geçişi incelenecek formülasyonlarda kullanılacak madde miktarlarının belirlenmesinde MTT testi sonuçları esas alındı. MTT testi sonuçlarında hücrelerin canlılığını etkilemeyecek biçimde kullanılabilecek maksimum rivastigmin derişimi 1.5 mg/mL, sodyum taurokolat derişimi 1.875 mM, dimetil- β -CD derişimi % 0.15 olarak belirlendi. Çözeltiler, lipozom içine hapsedilen rivastigmin, dimetil- β -CD ve sodyum taurokolat miktarları da göz önünde bulundurularak hazırlandı.

Caco-2 hücreleriyle ilgili kaynaklar incelendi. 21 günde üretilen hücre tek tabakalarının kullanılmasına karar verildi^{119,140,141}. MDCK hücreleri ile ilgili kaynaklar incelendiğinde MDCK'ların 3 ve 7 günde üreyebildiği görüldü¹¹⁹. İkişile de çözelti geçiş çalışmaları yapıldıktan sonra 7 günlük hücrelerin kullanılmasına karar verildi.

Geçiş çalışmalarında kullanılan Caco-2 ve MDCK hücreleri 0.4 μ m por çaplı filtreler üzerinde üretildi. Üzerinde hücre tek tabakası olan filtreler, difüzyon hüccresinin apikal ve bazolateral kısımlarının ara bölümüne yerleştirildi. Difüzyon sisteminin sıcaklığı 37°C'ye ayarlandı. Hücrelerin canlılığını koruyabilmeleri için sisteme sürekli % 95 O₂, % 5 CO₂ (karbojen gazı) verildi. Apikal kısımdan bazolateral kısma doğru geçişler incelendi.

Çözelti formülasyonlarıyla yapılan çalışmalarda, belirlenen miktarlardaki rivastigmin ve penetrasyon arttırıcılar, 4 mL serumlu DMEM içerisinde çözüldü. Difüzyon hüccresinin (Şekil 22) apikal kısmına DMEM içerisinde hazırlanan çözelti, basolateral kısmına da 4mL serumlu DMEM ilave edildi.

Geçiş çalışmaları için hazırlanan lipozomlar serumlu DMEM ile 4 mL hacme tamamlandı. Difüzyon hücresinin apikal kısmına DMEM içerisinde dağıtılmış lipozomlar, basolateral kısmına da 4mL serumlu DMEM ilave edildi.

15., 30., 45. dakikalarda, 1.,2., 4., 6., 8., 12. ve 24. saatlerde bazolateral kısımdan 1.5 mL örnek alındı. Ortamın hacminin değişmemesi için örnek alımından sonra, bazolateral kısma örnek hacmi kadar ilaçsız 37°C'ye getirilmiş DMEM ilave edildi. Alınan örneklerdeki rivastigmin miktar tayini HPLC ile yapıldı. Hücrelerden geçen % kümülatif ilaç miktarları zamana karşı grafiğe geçirildi, 24 saat sonunda % kümülatif geçen miktarlar hesaplandı. Hücre geçiş çalışmalarında kullanılan difüzyon hücresi Şekil 24'de görülmektedir.



Şekil 24. Hücre geçiş çalışmalarında kullanılan difüzyon hücresi

3.2.7.1.2.1 Rivastigminin Geçirgenlik Katsayısının ($k=P_{app}$) Hesaplanması

Rivastigminin lipozom ve çözelti formülasyonlarıyla gerçekleştirilen geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen % kümülatif rivastigmin miktarlarından hareketle log k değerleri hesaplandı.

Geçirgenlik katsayısı birimi cm/saat'tir ve aşağıdaki formüle göre hesaplanır^{143,144,145}:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \frac{1}{AC_0}$$

$$P_{app} = (dQ / dt) \times (1 / A \times Co)$$

Bu formülde;

P_{app} : Permeabilite katsayısı (cm/saat)

(dQ / dt) : Geçirgenlik hızı

A: Membran alanı

Co : Donör kompartmandaki konsantrasyonu ifade eder.

3.2.7.1.2.2 Hücrelerin Elektriksel Dirençlerinin Ölçülmesi

Hücre kültürlerinde hücre bütünlüğünün tespitinde kullanılan yöntemlerden birisi de elektriksel direncin ölçülmesidir. Bu amaçla; Ag^+ , Ag^+Cl^- elektrotları bulunan Bosstek tipi direnç ölçüm aleti kullanılmıştır. Elektrotlardan biri DMEM'li ortama, diğeri ise DMEM bulunan hücre tabakasına daldırılarak değerler ohm (Ω) cinsinden ölçüldü.

3.2.7.1.3 Geçiş Çalışmalarında Kullanılan Üzerinde Hücre Bulunmayan Filtrelerden Geçiş Çalışmaları

Hücre geçişi çalışmalarında kullanılan filtrelerin, geçiş üzerine etkisi olup olmadığını görmek amacıyla üzerinde hücre tek tabakası olmayan filtrelerden çözelti ve lipozom geçişleri incelendi.

3.2.7.2 Diyaliz Membran Geçişleri

Diyaliz membran geçişleri pH 7.4 fosfat tamponunda yapıldı. Bu pH'nın seçilmesindeki amaç hücre kültürü çalışmalarında kullanılan serumlu DMEM'in pH'sının 7.36 olarak ölçülmesiydi. Hem çözeltilerin hem de lipozomların diyaliz membrandan geçiş çalışmaları yapıldı.

Kullanılan diyaliz membran 24 saat boyunca pH 7.4 fosfat tamponunda ıslatıldı. Diyaliz membran geçişleri Franz difüzyon hücreleri kullanılarak yapıldı. Diyaliz membran Franz hücrelerinin orta kısmına yerleştirildi. Hücrelerin alt kısmına pH 7.4 fosfat tamponu (2 mL), üst kısmına ise geçişi incelenecek çözelti veya lipozom formülasyonları koyuldu. Ortam sıcaklığı 37°C'de tutuldu, sabit hızda karıştırma deney süresince devam etti.

15., 30., 45. dakikalarda, 1., 2., 4., 6., 8., 12. ve 24. saatlerde üst kısımdan 1.5 mL örnek alındı. Ortamın hacminin değişmemesi için örnek alımından sonra, bazolateral kısma örnek hacmi kadar 37°C'ye getirilmiş pH 7.4 fosfat tamponu ilave edildi. Alınan örneklerdeki rivastigmin miktar tayini HPLC ile yapıldı. Hücrelerden geçen % kümülatif etkin madde miktarları zamana karşı grafiğe geçirildi, 24 saat sonunda % kümülatif geçen miktarlar hesaplandı.

3.2.8 İn vivo Çalışmalar

3.2.8.1 İn vivo Çalışmalarda Kullanılan Deney Hayvanları

İn vivo çalışmalarımızda Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi'nden temin edilen, 14-16 haftalık, 30 ± 2 gram ağırlığındaki erkek Balb-C tipi fareler kullanıldı. İn vivo deneyler, Gazi Üniversitesi

Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı'ndan (G.Ü.ET-07.011) onay alınarak etik kurallara uygun biçimde yapıldı.

3.2.8.2 İn vivo Deney Tasarımı

İn vivo deneyler için fareler her grupta 15 hayvan olmak üzere 14 deney grubuna ayrıldı. Hayvan grupları ve hayvanlara uygulanan formülasyonlar Tablo 5'te gösterilmiştir. Formülasyonlar oral ve intraperitoneal yolla hayvanlara uygulanmıştır (Şekil 25). Örnekler, intrakardiyak olarak alındı (Şekil 26) ve analiz edilene kadar derin dondurucuda bekletildi.

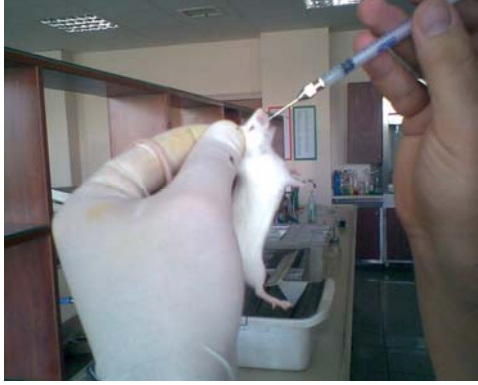
Kontrol grubundan ve diğer gruplardan 6. 8. ve 24. saatte 3'er hayvanın beyini çıkarıldı (Şekil 27). Beyinleri çıkarılmış fareler Şekil 28'de görülmektedir. Çıkarılan beyinler, AChE miktar tayini yapmak amacıyla kullanıldı.

Tablo 5. Hayvan grupları

GRUP NO	AÇIKLAMA
1	Kontrol grubu, hiçbir uygulama yapılmayan sağlam fareler
2	Intraperitoneal olarak rivastigmin çözeltisi uygulanan fareler
3	Intraperitoneal olarak boş lipozom uygulanan fareler
4	Oral yoldan rivastigmin lipozom uygulanan fareler
5	Oral yoldan rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozom uygulanan fareler
6	Oral yoldan rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren lipozom uygulanan fareler
7	Oral yoldan boş lipozom uygulanan fareler
8	Intraperitoneal olarak rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozom uygulanan fareler
9	Intraperitoneal olarak rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren lipozom uygulanan fareler
10	Intraperitoneal olarak rivastigmin lipozom uygulanan fareler
11	Intraperitoneal olarak rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren çözelti uygulanan fareler
12	Intraperitoneal olarak rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren çözelti uygulanan fareler
13	Oral yoldan rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren çözelti uygulanan fareler
14	Oral yoldan rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren çözelti uygulanan fareler

a

b



Şekil 25. Farelere oral (a) ve intraperitoneal (b) ilaç uygulaması



Şekil 26. Farelerden intrakardiyak olarak kan alınması



Şekil 27. Farelerin beyinlerinin çıkarılışı



Şekil 28. Beyinleri çıkarılmış fareler

3.2.8.3 Hayvanlara Uygulanacak Formülasyonların Hazırlanması

Hayvan deneylerinde kullanılan çözelti ve lipozomlar aseptik şartlar altında, steril olarak hazırlandı. Bunun için, formülasyonlarda steril serum fizyolojik çözeltisi kullanıldı. Hazırlanan çözelti ve lipozomlar 0.22 μm 'lik membran filtreden süzüldü. Formülasyon hazırlamada kullanılan cam malzemeler iyice yıkandı, etanolden geçirildi ve bidistile su ile muamele edildikten sonra 150°C'de iki saat kuru ısı sterilizasyonu yapıldı.

3.2.8.4 Hayvanlara Uygulanan Formülasyonlarda Rivastigmin Dozu

Hayvanlara uygulanacak lipozom ve çözeltilerde rivastigmin dozu 2300 µg/kg olarak belirlendi¹⁵. Bir hayvana verilecek rivastigmin miktarı 121 µg olarak belirlendi. Çözeltiler bu doza göre hazırlandı. Lipozom süspansiyonları hazırlandıktan sonra süpernatantlarından rivastigmin miktar tayini yapıldı. Hazırlanan lipozomlar yıkandıktan sonra SF ile uygun biçimde seyreltildi. Çözeltiler ve lipozomlar eşit konsantrasyonda rivastigmin içerecek şekilde hazırlandı. Formülasyonlarda kullanılacak sodyum taurokolat (1.875mM) ve dimetil-β-CD (%0.15) miktarları MTT testi sonuçlarına göre hesaplanarak kullanıldı.

3.2.8.5 İn vivo (Fare) Deneyler için Metot Validasyonu

İn vivo deneylerimizde kanda ve beyinde AChE miktar tayini yapıldı. AChE miktar tayini için literatür taraması yapıldığında, yaygın olarak kullanılan Ellman metodu kullanılmaya karar verildi. Ellman metodu esası kolorimetriye dayanan spektrofotometrik bir yöntemdir^{146,147,148,149}.

Asetiltiyokolin, AChE enzimi ile tiyokolin ve asetata parçalanır. Tiyokolin ortama ilave edilen renk maddesi ditiyobisnitrobenzoat (DTNB) ile birleşerek sarı renk verir. Oluşan sarı renkteki değişikliğe bağlı olarak, absorbans değerleri 6 dk boyunca kaydedilir ve delta absorbans değerleri hesaplanır.

Bu yöntem, hızlı ve duyarlı bir yöntem olup kanda (eritrositlerde) ve çeşitli doku homojenatlarında (beyin, böbrek, akciğer, karaciğer, kas) enzim tayini yapmak için kullanılabilir.

Ellman metodunda kullanılan çözeltiler:

Tampon çözeltisi – Fosfat tamponu (0.1 M, pH 8)

Substrat – Asetiltiyokolin (0.075 M)

Reajan – Ditiyobisnitrobenzoikasit (DTNB) (0.01 M) (39.6 mg DTNB ve 15 mg sodyumbikarbonat 10 ml 0.1 M, pH 7 fosfat tamponunda çözülür)

Kan numunelerinin hazırlanması:

1. Kan, fosfat tamponu (0.1 M, pH 8) içerisinde dağıtılır. (1:600 oranında)
2. Spektrofotometre küvetlerine 3'er ml konur.
3. İki küvete de 25 µL DTNB reajanı ilave edilir. Küvetler spektrofotometreye yerleştirilir, sıfırlama yapılır(autozero)
4. Numunenin içinde bulunduğu küvet spektrofotometreden çıkarılır, 20 µL asetiltiyokolin (0.075 M) ilave edilir, çalkalanır, spektrofotometreye geri yerleştirilir.
5. 412 nm'deki absorbans değişiklikleri 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6. dakikalarda absorbans değerleri okunarak kaydedilir.

* Eğer kan numuneleri buzlukta saklanıyorsa numuneleri okumaya başlamadan önce 25°C su banyosunda tüm numuneler eşit sürede (1 saat) bekletilerek çözünmeleri sağlanır.

Beyin numunelerinin Hazırlanması:

1. Beyin dokusu homojenize (homojenizatör ile) edilir.(20 mg beyin için 1 mL 0.1 M pH 8 fosfat tamponu olacak şekilde)
2. Bu homojenattan 0.4 mL, 2.6 mL 0.1 M pH 8 fosfat tamponu içeren küvetlere konur.
3. İki küvete de 100 µL DTNB reajanı eklenir. Küvetler spektrofotometreye yerleştirilir, sıfırlama yapılır (autozero).
4. Numunenin içinde bulunduğu küvet spektrofotometreden çıkarılır, 20 µL asetiltiyokolin (0.075 M) ilave edilir, çalkalanır, spektrofotometreye geri yerleştirilir.

5. 412 nm'deki absorbans değışiklikleri 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6. dakikalarda absorbans değeri okunarak kaydedilir.

3.2.8.5.1 Kan Numuneleri İçin Spektrofotometrik Metot Validasyonu

3.2.8.5.1.1 Doğrusallık

Rivastigminin bidistile su içerisinde hazırlanan stok çözeltisinden hareketle 8 farklı derişimde (4.75-0.5 mg/ml) çözeltisi hazırlandı. Küvetlere fosfat tamponuyla karıştırılmış boş kan konuldu. Hazırlanan bu çözeltilerden spektrofotometrede autozero yapıldıktan sonra asetilkolin iyodid ilavesinin hemen sonrasında küvetlere 20 µL ilave edildi. Sonuç derişimler, 31-3.26 µg/mL oldu. Yukarıda anlatıldığı gibi 6 dk boyunca absorbans değeri okundu, dakikadaki absorbans değışimi (ΔA) hesaplandı. Her bir derişim için 6 kez ölçüm yapıldı. Rivastigmin derişimi ile ΔA miktarı arasında lineer bir ilişki bulundu.

3.2.8.5.1.2 Doğruluk ve Geri Elde

3.6, 3, 2.4 mg/mL derişimlerde rivastigmin çözeltileri hazırlandı. Küvetlere fosfat tamponuyla karıştırılmış boş kan konuldu. Hazırlanan bu çözeltilerden spektrofotometrede autozero yapıldıktan sonra asetilkolin iyodid ilavesinin hemen sonrasında 20 µL ilave edildi, sonuç derişimler, 23.5, 19.6, 15.7 µg/mL oldu. Yukarıda anlatıldığı gibi 6 dk boyunca absorbans değeri okundu. 3.6, 3 ve 2.4 mg/mL'lik çözeltilerden ilave edilerek absorbans değeri 6 dk boyunca kaydedildi (her üç derişim için 3'er kez), ΔA hesaplandı. Geri elde edilen miktarlar, gerekli istatistiksel parametrelerle değerlendirildi.

3.2.8.5.1.3 Kesinlik

Rivastigminin bidistile su içerisinde 3 mg/mL' lik çözeltisi hazırlandı. Küvetlere fosfat tamponuyla karıştırılmış boş kan konuldu. Hazırlanan bu çözeltiden spektrofotometrede autozero yapıldıktan sonra asetilkolin iyodid ilavesinin hemen sonrasında 20 µL ilave edildi, sonuç konsantrasyon 19.6 µg/mL oldu. yukarıda anlatıldığı gibi 6 dk boyunca absorbans değerleri okundu. Ölçüm 10 kez tekrarlandı, ΔA değeri 10 kez hesaplandı.

Elde edilen ΔA değerlerinin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

Rivastigminin bidistile su içerisinde 4.75, 3, 2, 1.5, 1, 0.5 mg/mL derişimlerde çözeltileri hazırlandı. Analiz için gerekli diğer maddelerin eklenmesiyle bu derişimler 31, 19.6, 13, 9.79, 6.52, 3.26 µg/mL oldu. Bu numuneler birbirini takip eden 3 gün içerisinde yukarıda anlatıldığı gibi 3'er kez spektrofotometrede okundu. Elde edilen ΔA değerlerinin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

3.2.8.5.1.4 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 yapılmalıdır.

Bu amaçla, dimetil- β -CD ve sodyum taurokolatın 2 mg/mL'lik çözeltileri hazırlandı ve yukarıdaki şartlar altında spektrofotometrede değerlendirildi.

3.2.8.5.1.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı

Duyarlılık ve saptama sınırı daha önce belirtildiği gibi hesaplanmıştır.

3.2.8.5.2. Beyin Numuneleri İçin Spektrofotometrik Metot Validasyonu

3.2.8.5.2.1. Doğrusallık

Rivastigminin bidistile su içerisinde hazırlanan stok çözeltisinden hareketle 8 farklı derişimde (4-0.5 mg/mL) çözeltisi hazırlandı. Küvetlere beyin homojenizatu konuldu. Hazırlanan bu çözeltilerden spektrofotometrede autozero yapıldıktan sonra asetilkolin iyodid ilavesinin hemen sonrasında küvetlere 20 µL ilave edildi, sonuç derişimler, 25.5-3.2 µg/mL oldu. Yukarıda anlatıldığı gibi 6 dk boyunca absorbans değeri okundu, dakikadaki absorbans değışimi (ΔA) hesaplandı. Her bir derişim için 6 kez ölçüm yapıldı. Rivastigmin derişimi ile % AChE miktarı arasında lineer bir ilişki bulundu.

3.2.8.5.2.2 Doğruluk ve Geri Elde

3.6, 3, 2.4 mg/mL derişimlerde rivastigmin çözeltileri hazırlandı. Küvetlere beyin homojenizatu kondu. Hazırlanan bu çözeltilerden spektrofotometrede autozero yapıldıktan sonra asetilkolin iyodid ilavesinin hemen sonrasında küvetlere 20 µL ilave edildi, yukarıda anlatıldığı gibi 6 dk boyunca absorbans değeri okundu. 3.6, 3 ve 2.4 mg/mL'lik çözeltilerden ilave edildi. İlave edilen diğer maddelerle birlikte sonuç rivastigmin konsantrasyonları 22.9, 19.1, 15.3 µg/mL oldu. Absorbans değeri 6 dk boyunca kaydedildi(her üç için 3'er kez), ΔA

hesaplandı. Geri elde edilen miktarlar, gerekli istatistiksel parametrelerle değerlendirildi.

3.2.8.5.2.3 Kesinlik

Rivastigminin bidistile su içerisinde 3 mg/mL' lik çözeltisi hazırlandı. Küvetlere beyin homojenizatu kondu. Analiz için hazırlanmış numunedeki rivastigmin konsantrasyonu 19.1 µg/mL oldu. Hazırlanan bu çözeltiden spektrofotometrede autozero yapıldıktan sonra asetilkolin iyodid ilavesinin hemen sonrasında küvete 20 µL ilave edildi, yukarıda anlatıldığı gibi 6 dk boyunca absorban değerleri okundu. Ölçüm 10 kez tekrarlandı, ΔA değeri 10 kez hesaplandı.

Elde edilen ΔA değerlerinin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

3.2.8.5.2.4 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 yapılmalıdır.

Bu amaçla, dimetil- β -CD ve sodyum taurokolatın 2 mg/mL'lik çözeltileri hazırlandı ve yukarıdaki şartlar altında spektrofotometrede değerlendirildi.

3.2.8.5.2.5 Duyarlılık ve Saptama Sınırı

Duyarlılık ve saptama sınırı daha önce belirtildiği gibi hesaplanmıştır.

3.2.8.5.3 Hayvan Gruplarının Beyinlerinin Histolojik Olarak Değerlendirilmesi³

- a. Rivastigmin çözeltisi
- b. Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren çözelti
- c. Rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren çözelti
- d. Rivastigmin lipozomları
- e. Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomlar
- f. Rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren lipozomlar
- g. Boş lipozom

Yukarıda belirtilen formülasyonlar hayvanlara oral ve intraperitoneal olarak uygulandı. Uygulanan formülasyonların hayvanların beyinlerine olan etkileri, histolojik açıdan kontrol grubu (hiçbir formülasyon uygulanmayan hayvanların oluşturduğu grup) ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Histolojik çalışmalar için her gruptan 6., 8. ve 24. saatlerde alınan tam beyinlere aşağıda belirtilen işlemler sırasıyla uygulandı.

1. Hayvan gruplarından alınan beyinler, % 2.5'luk fosfat tamponlu glutaraldehit çözeltisine konuldu. İnceleneceği zaman bu beyinler 1 mm³'lük parçalara ayrılarak tespit edildi.
2. Ayrılan parçalar, osmium tetraoksit çözeltisinde 1 saat bekletilerek ikinci kez tespit edildi ve boyandı.
3. Boyanan parçalar fosfat tamponuyla yıkandı.

3 Histolojik analizler Anadolu Üniversitesi Bitkisel ve İlaç Araştırma Merkezi (BİBAM)'da ve değerlendirmeler Hatay Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ABD'da yapılmıştır. Yardımlarından dolayı Prof. Dr. Mehtap Kutlu'ya ve Yrd. Doç. Dr. Ahmet Nacar'a teşekkür ederiz.

4. 50° , 60° , 70° , 80° ve 90°'lik alkol serilerinde 15'er dakika bekletildikten sonra iki kez ayrı ayrı 96°'lik 15 dakika bekletildi. Son olarak mutlak alkolde iki kez ayrı ayrı 30 dakika bekletildi.
5. Propilen oksitte 10 dakika bekletildi.
6. Araldit-dodesilsüksinik anhidrit (DDSA) çözeltisinde bir gece bekletildi.
7. Araldit-DDSA-benzil dimetil amin (BDMA) içeren yassı gömme kalıplara (flat embedding mold, 14x19 mm) gömüldü.
8. 40°C'lik etüvde 24 saat, 60°C'lik etüvde 48 saat bekletildi.
9. Yarı kesitler alınarak toluidin mavisi ile boyandı, incelendi ve fotoğrafları çekildi.
10. Alınan ince kesitler ise uranil asetat ve kurşun asetat ile boyanarak elektron mikroskopunda incelenerek fotoğrafları çekildi.

3.2.9 Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen sonuçlar INSTAT adlı istatistik programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (tek yönlü ANOVA) yöntemi, Tukey'in karşılaştırmalı testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

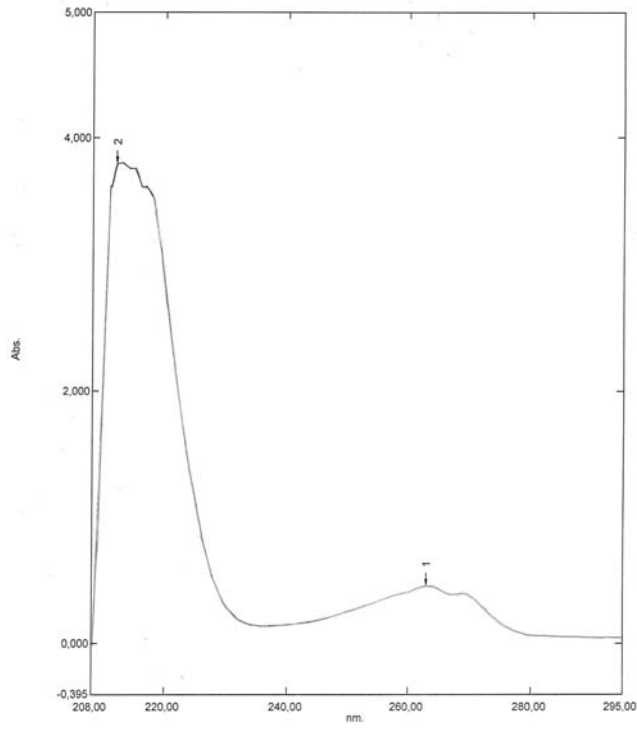
4. BULGULAR

Bu bölümde 2.Bölüm’de (yöntem) yapıları anlatılan çalışmalar sonucu elde edilen veriler tablolar ve grafikler halinde sunulmuştur. Tablolarda “n” değerleri, in vitro çalışmalarda yapılan paralel deney sayısını, in vivo çalışmalarda ise hayvan sayısını ifade etmektedir. Yapılan deneyler sonucu elde edilen değerlerle, ortalama(ort), standart sapma (S.S), bağıl sapma (B.S) ve % 95 olasılıklı güven aralığı ($\pm$ G.S) değerleri hesaplanmış, sonuçlar tablo ve grafiklerde gösterilmiştir.

4.1 Rivastigmin Tartarat’a Ait Çalışmalarla İlgili Bulgular

4.1.1 UV Spektrumuna Ait Bulgular

Rivastigmin’in bidistile sudaki spektrumu Şekil 29’da gösterilmiştir. Dalga boyu taraması sonucunda rivastigmin tartaratın maksimum dalga boyu verdiği absorbansın ($\lambda_{\max}$) 217 nm olduğu görüldü.



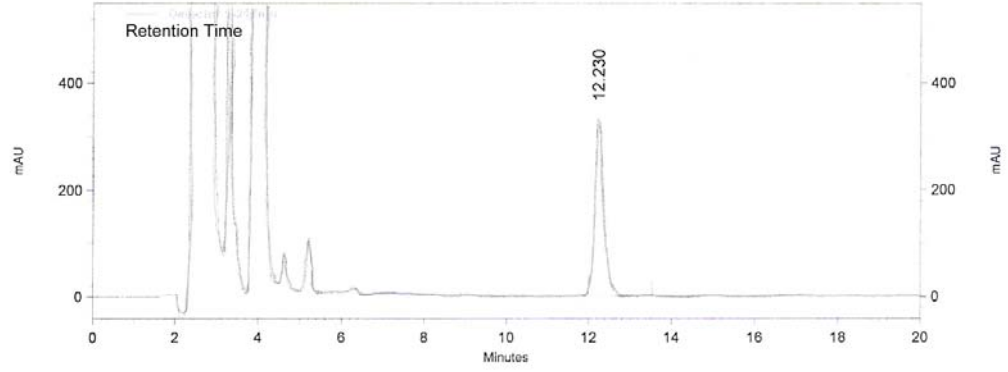
Şekil 29. Rivastigmin tartarata ait 200-300 nm arası dalga boyu taraması

4.1.2 HPLC Yöntemiyle Rivastigmin Miktar Tayini Yönteminin Validasyonuna Ait Bulgular

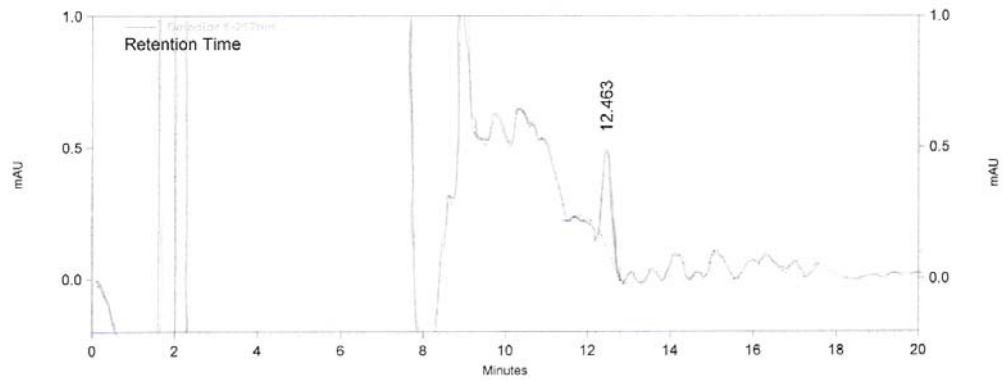
4.1.2.1 Rivastigmin'in Serumlu DMEM İçinde Validasyonuna Ait Bulgular

Rivastigmin DMEM içerisinde HPLC'ye enjekte edildiğinde elde edilen pikler Şekil 30'da görülmektedir.

a.



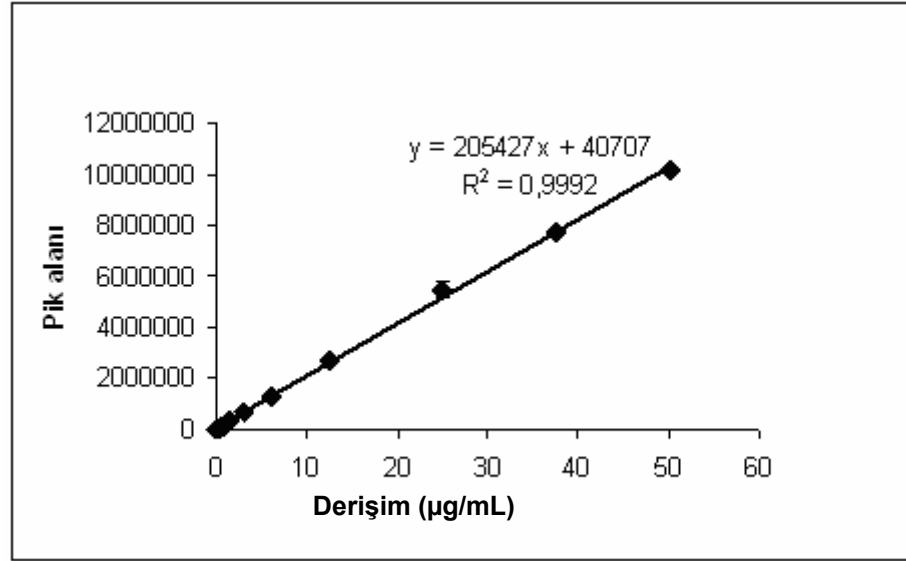
b.



Şekil 30. DMEM içerisinde 12.5 µg/mL(a) ve 24 ng/mL(b) derişimlerde rivastigmin pikleri

4.1.2.1.1 Doğrusallık

Çalışmalar, Bölüm 3.2.2.1’de anlatıldığı gibi yapıldı. Hesaplanan pik alanlarına karşılık konsantrasyonlar grafiğe geçirildi. En küçük kareler yöntemine göre değerlendirilip, standart doğru denklemi bulundu ve doğrusallığı kanıtlandı. Elde edilen konsantrasyon pik alanı grafiği Şekil 31’de verilmiştir.



Şekil 31. Rivastigminin DMEM’li ortamda HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği (n=6)

4.1.2.1.2 Doğruluk ve Geri Elde

Çalışmalar Bölüm 3.2.2.2’de anlatıldığı gibi yapıldı. Sonuçlar Tablo 6,7,8 ve 9’da verilmiştir.

Tablo 6. Rivastigminin DMEM içinde çözeltisinden geri elde ile hesaplanan miktarları (n=3)

Çözeltideki Rivastigmin Yüzdesi	Çözeltideki Rivastigmin Miktarı(µg)	Hesapla Bulunan Rivastigmin Miktarı ± G.S	B.S Ortalama
%80	0.80	0.798 ± 0.077	0.203
%100	1.00	0.999 ± 0.068	0.068
%120	1.20	1.197 ± 0.013	0.032

Tablo 7. DMEM içinde rivastigminin sadece rivastigmin içeren lipozomdan geri elde ile hesaplanan miktarları(n=3)

Rivastigmin Yüzdesi	Rivastigmin Miktarı(µg)	Hesapla Bulunan Rivastigmin Miktarı ± G.S	B.S Ortalama
%80	0.48	0.477 ± 0.007	0.128
%100	0.60	0.598 ± 0.005	0.068
%120	0.72	0.718 ± 0.006	0.071

Tablo 8. DMEM içinde rivastigminin rivastigmin ve dimetil-β-CD içeren lipozomdan geri elde ile hesaplanan miktarları(n=3)

Rivastigmin Yüzdesi	Rivastigmin Miktarı(µg)	Hesapla Bulunan Rivastigmin Miktarı ± G.S	B.S Ortalama
%80	0.32	0.318 ± 0.002	0.641
%100	0.40	0.397 ± 0.004	0.963
%120	0.48	0.479 ± 0.001	0.199

Tablo 9. DMEM içinde rivastigminin rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomdan geri elde ile hesaplanan miktarları(n=3)

i Rivastigmin Yüzdesi	Rivastigmin Miktarı(µg)	Hesapla Bulunan Rivastigmin Miktarı ± G.S	B.S Ortalama
%80	0.20	0.197 ± 0.002	0.576
%100	0.25	0.247 ± 0.004	0.143
%120	0.30	0.298 ± 0.001	0.102

4.1.2.1.3 Kesinlik

Çalışmalar Bölüm 3.2.2.3' de anlatıldığı gibi yapıldı. Sonuçlar Tablo 10 ve 11'de verilmiştir.

a. Deney içi kesinlik

Rivastigminin DMEM içindeki deney içi kesinlik sonuçları Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10. Rivastigminin DMEM içindeki deney içi kesinlik sonuçları

Örnek No	Rivastigmin Çözeltilisinin Derişimi (µg/mL)	Hesapla Bulunan Rivastigmin Çözeltisi Derişimi(µg/mL)
1	4	3.97
2	4	3.92
3	4	3.94
4	4	3.92
5	4	3.89
6	4	3.90
7	4	3.92
8	4	3.93
9	4	3.98
10	4	4.00
Ortalama	4	3.94
S.S		0.03
B.S		0.86
±Güven sınırı		0.02

b. Deneyler arası kesinlik

Rivastigminin DMEM içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları Tablo 11'de gösterilmiştir.

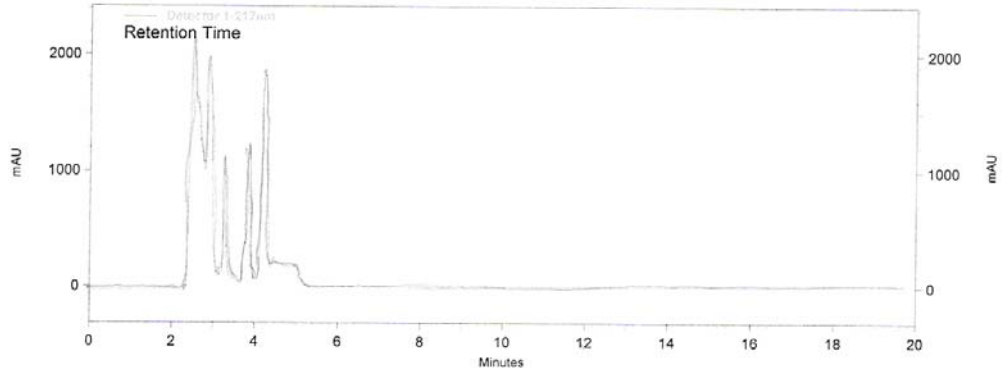
Tablo 11. Rivastigminin DMEM içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları

Derişim(µg/mL)	1.gün	2.gün	3.gün	ORT	SS	SEM
50	49.3	50	49.0	49.4	0.5	0.3
12.5	12.8	12.8	12.5	12.7	0.2	0.1
3.12	3.10	3.051	3.093	3.082	0.027	0.016
0.78	0.69	0.692	0.697	0.693	0.004	0.002
0.098	0.097	0.089	0.0905	0.0923	0.0042	0.0024

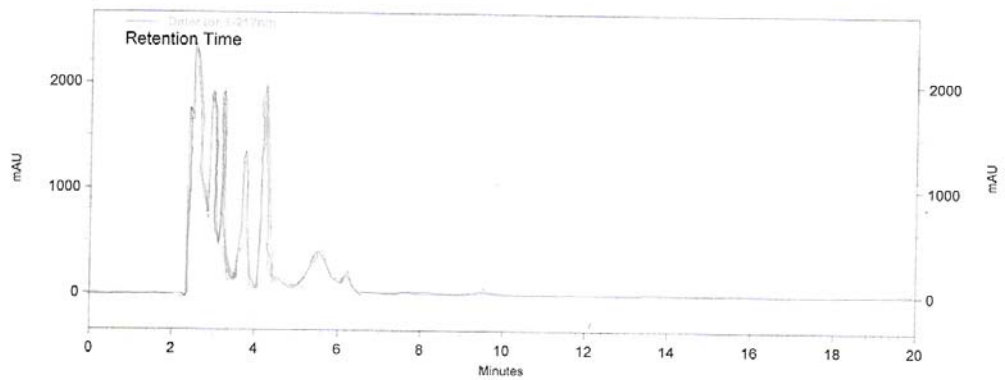
4.1.2.1.4 Özgünlük ve Seçicilik

Çalışmalar bölüm 3.2.2.4'te anlatıldığı gibi yapıldı. Rivastigminin pik verdiği dalga boyunda sodyum taurokolat'ın ve dimetil- β -CD'nin pik vermediği gösterildi. Yöntemin rivastigmin tayinine uygun oluşuna karar verildi. Şekil 32'de sodyum taurokolat ve dimetil- β -CD'ye ait pikler görülmektedir.

a.



b.



Şekil 32. Sodyum taurokolat enjeksiyonu ile elde edilen pik(a), dimetil- β -CD enjeksiyonu ile elde edilen pik(b)

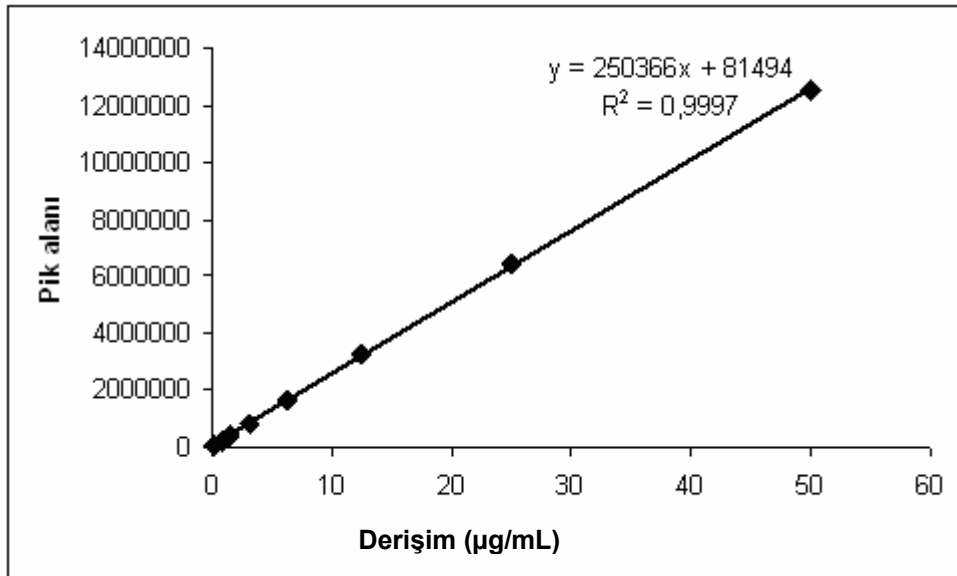
4.1.2.1.5 Duyarlılık ve Saptama Sınırı

Hesaplar bölüm 3.2.2.5'te verilen formüllere göre yapıldı. Analitik yöntemin duyarlılığı 0.012 µg/mL, saptama sınırı 0.038 µg/mL olarak bulundu.

4.1.2.2 Rivastigmin'in pH 7.4 Fosfat Tamponu İçinde Validasyonuna Ait Bulgular

4.1.2.2.1 Doğrusallık

Çalışmalar, Bölüm 3.2.2.1'de anlatıldığı gibi yapıldı. Hesaplanan pik alanlarına karşılık konsantrasyonlar grafiğe geçirildi. En küçük kareler yöntemine göre değerlendirilip, standart doğru denklemi bulundu ve doğrusallığı kanıtlandı. Elde edilen konsantrasyon pik alanı grafiği Şekil 33'de verilmiştir.



Şekil 33. Rivastigminin HPLC yöntemiyle pH 7.4 fosfat tamponu içerisinde elde edilen kalibrasyon grafiği(n=6)

4.1.2.2.2 Doğruluk ve Geri Elde

Çalışmalar Bölüm 3.2.2.2 ' de anlatıldığı gibi yapıldı. Sonuçlar Tablo 12,13,14 ve15'de verilmiştir.

Tablo 12. Rivastigminin pH 7.4 fosfat tamponu içinde çözeltisinden geri elde ile hesaplanan miktarları (n=3)

Çözeltideki Rivastigmin Yüzdesi	Çözeltideki Rivastigmin Miktarı(µg)	Hesapla Bulunan Rivastigmin Miktarı ± G.S	B.S Ortalama
%80	0.80	0.797 ± 0.006	0.076
%100	1.00	0.998 ± 0.005	0.058
%120	1.20	1.198 ± 0.002	0.013

Tablo 13. pH 7.4 fosfat tamponu içinde rivastigminin sadece rivastigmin içeren lipozomdan geri elde ile hesaplanan miktarları (n=3)

Rivastigmin Yüzdesi	Rivastigmin Miktarı(µg)	Hesapla Bulunan Rivastigmin Miktarı ± G.S	B.S Ortalama
%80	0.48	0.479 ± 0.004	0.074
%100	0.6	0.598 ± 0.005	0.083
%120	0.72	0.718± 0.003	0.045

Tablo 14. pH 7.4 fosfat tamponu içinde rivastigminin rivastigmin ve dimetil-β-CD içeren lipozomdan geri elde ile hesaplanan miktarları (n=3)

Rivastigmin Yüzdesi	Rivastigmin Miktarı(µg)	Hesapla Bulunan Rivastigmin Miktarı ± G.S	B.S Ortalama
%80	0.32	0.319 ± 0.006	0.174
%100	0.40	0.397 ± 0.003	0.056
%120	0.48	0.478 ± 0.004	0.083

Tablo 15. pH 7.4 fosfat tamponu içinde rivastigminin rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomdan geri elde ile hesaplanan miktarları (n=3)

Rivastigmin Yüzdesi	Rivastigmin Miktarı(μg)	Hesapla Bulunan Rivastigmin Miktarı ± G.S	B.S Ortalama
%80	0.20	0.198 ± 0.010	0.042
%100	0.25	0.249 ± 0.004	0.013
%120	0.30	0.299 ± 0.005	0.015

4.1.2.2.3 Kesinlik

Çalışmalar Bölüm 3.2.2.3' de anlatıldığı gibi yapıldı. Sonuçlar Tablo 16 ve 17'de verilmiştir.

a. Deney içi kesinlik

Rivastigminin pH 7.4 fosfat tamponu içindeki deney içi kesinlik sonuçları Tablo 16'da gösterilmiştir.

Tablo 16. Rivastigminin pH 7.4 fosfat tamponu içindeki deney içi kesinlik sonuçları

ÖRNEK NO	RİVASTİGMİN ÇÖZELTİSİNİN DERİŞİMİ (μG/ML)	HESAPLA BULUNAN RİVASTİGMİN ÇÖZELTİSİ DERİŞİMİ
1	3.5	3.51
2	3.5	3.46
3	3.5	3.44
4	3.5	3.46
5	3.5	3.43
6	3.5	3.41
7	3.5	3.47
8	3.5	3.31
9	3.5	3.41
10	3.5	3.38
Ortalama		3.43
Standart sapma		0.05
Bağıl sapma		1.46
± Güven sınırı		0.03

b. Deneyler arası kesinlik

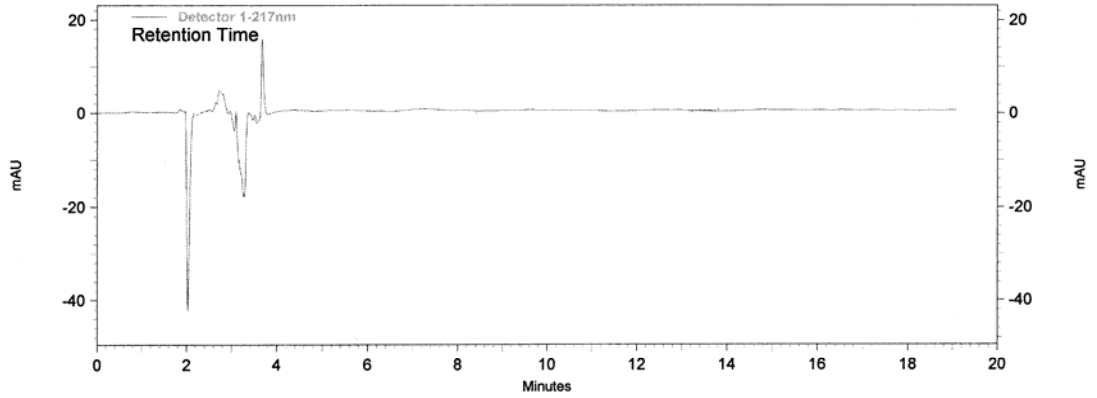
Rivastigminin pH 7.4 fosfat tamponu içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları Tablo 17’da gösterilmiştir.

Tablo 17. Rivastigminin pH 7.4 fosfat tamponu içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları

DERİŞİM(μ G/ML)	1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN	ORT	SS	SEM
50	49.6	49.5	50	49.7	0.2	0.1
12.5	12.6	12.8	12.9	12.8	0.1	0.1
3.12	3.12	3.15	3.05	3.11	0.05	0.03
0.78	0.658	0.66	0.630	0.650	0.017	0.010

4.1.2.2.4 Özgünlük ve Seçicilik

Çalışmalar bölüm 3.2.2.4’te anlatıldığı gibi yapıldı. Rivastigminin pik verdiği dalga boyunda sodyum taurokolat’ın ve dimetil- β -CD’nin pik vermediği gösterildi (Şekil 34). Yöntemin rivastigmin tayinine uygun oluşuna karar verildi.



Şekil 34. Rivastigminin özgünlük ve seçicilik deneyi sonuç piki

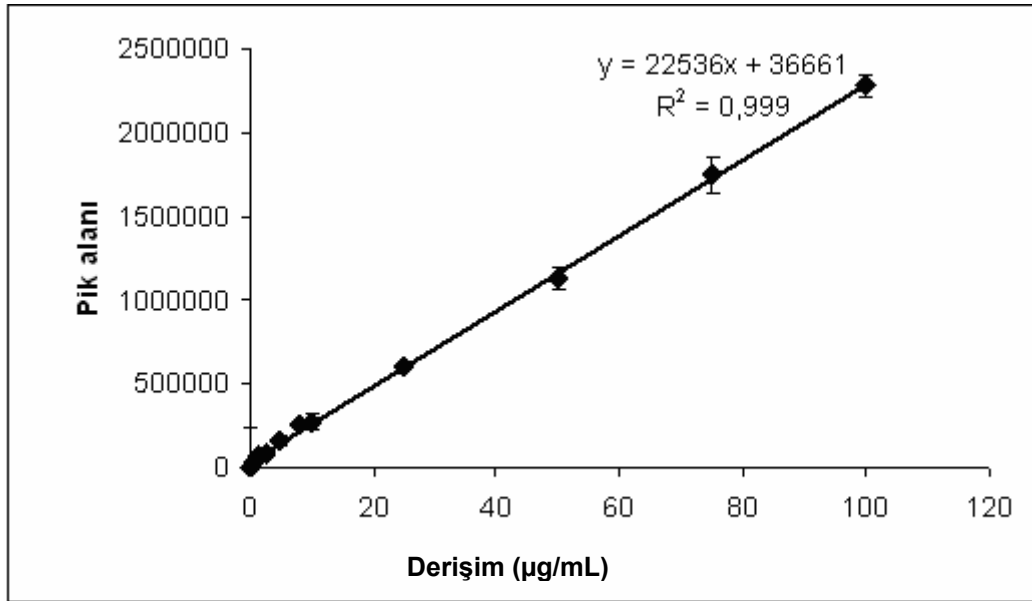
4.1.2.2.5 Duyarlılık ve Saptama Sınırı

Hesaplar bölüm 3.2.2.5'te verilen formüllere göre yapıldı. Analitik yöntemin duyarlılığı 0.06 µg/mL, saptama sınırı 0.19 µg/mL olarak bulundu.

4.2. HPLC Yöntemiyle Sodyum Taurokolat Miktar Tayini Yönteminin Validasyonuna Ait Bulgular

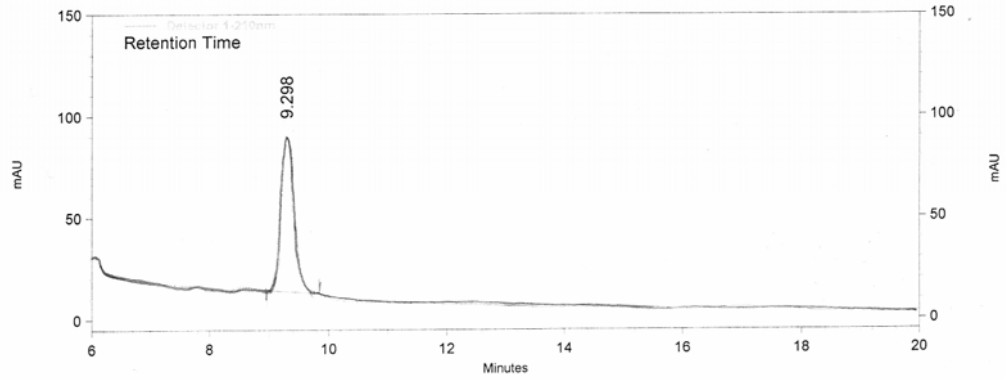
4.2.1 Doğrusallık

Çalışmalar, Bölüm 3.2.2.1'de anlatıldığı gibi yapıldı. Hesaplanan pik alanlarına karşılık konsantrasyonlar grafiğe geçirildi. En küçük kareler yöntemine göre değerlendirilip, standart doğru denklemi bulundu ve doğrusallığı kanıtlandı. Elde edilen konsantrasyon pik alanı grafiği Şekil 35'de verilmiştir.



Şekil 35. Sodyum taurokolatın HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği

Sodyum taurokolat bidistile su içerisinde HPLC'ye enjekte edildiğinde elde edilen pik Şekil 36'da görülmektedir.



Şekil 36. Bidistile su içerisinde 50 µg/mL derişimde sodyum taurokolat piki

4.2.2 Doğruluk ve Geri Elde

Çalışmalar Bölüm 3.2.3.2'de anlatıldığı gibi yapıldı. Sonuçlar Tablo 18 ve 19'da verilmiştir.

Tablo 18. Sodyum taurokolatın bidistile su içinde çözeltiden geri elde ile hesaplanan miktarları (n=3)

Çözeltideki sodyum taurokolat yüzdesi	Çözeltideki sodyum taurokolat miktarı (µg)	Hesapla bulunan sodyum taurokolat miktarı ± G.S	B.S ortalama
%80	0.64	0.638 ± 0.004	0.066
%100	0.80	0.797 ± 0.010	0.114
%120	0.96	0.958 ± 0.005	0.042

Tablo 19. Sodyum taurokolatın bidistile su içinde lipozomdan geri elde ile hesaplanan miktarları (n=3)

Sodyum taurokolat yüzdesi	Sodyum taurokolat miktarı (µg)	Hesapla bulunan sodyum taurokolat miktarı ± G.S	B.S ortalama
%80	0.48	0.477 ± 0.001	0.200
%100	0.60	0.598± 0.009	0.134
%120	0.72	0.719± 0.006	0.074

4.2.3 Kesinlik

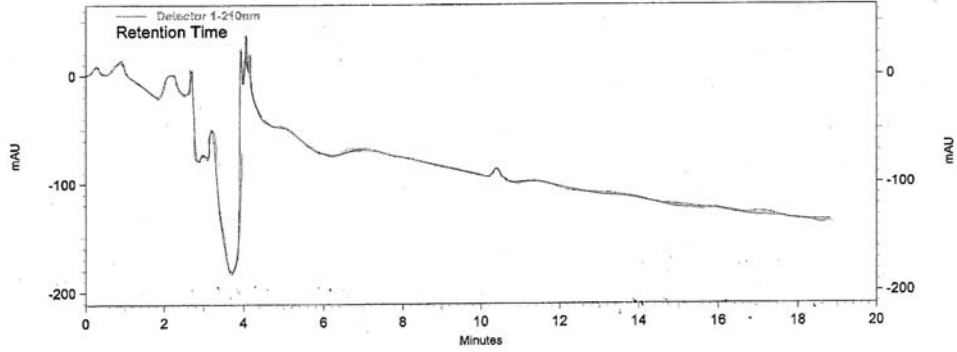
Sodyum taurokolatın bidistile su içindeki deney içi kesinlik sonuçları Tablo 20’de gösterilmiştir.

Tablo 20. Sodyum taurokolatın bidistile su içindeki deney içi kesinlik sonuçları

Örnek no	Sodyum taurokolat derişimi (µg/ml)	Hesapla bulunan sodyum taurokolat derişimi
1	10	9.54
2	10	10.03
3	10	11.02
4	10	9.78
5	10	10.44
6	10	10.22
7	10	10.27
8	10	9.8
9	10	10.22
10	10	10.16
Ortalama	10	10.2
S.S		0.40
B.S		3.90
± Güven sınırı		0.30

4.2.4 Özgünlük ve Seçicilik

Çalışmalar bölüm 3.2.2.4’te anlatıldığı gibi yapıldı. Sodyum taurokolatın pik verdiği dalga boyunda rivastigminin pik vermediği gösterildi (Şekil 37). Yöntemin sodyum taurokolat tayinine uygun oluşuna karar verildi.



Şekil 37. Sodyum taurokolatin özgünlük ve seçicilik deneyi sonuç piki

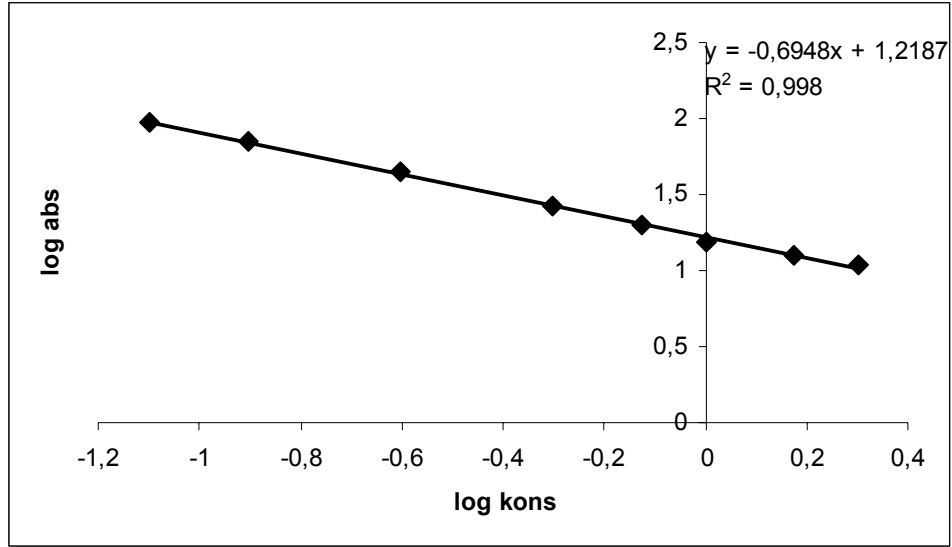
4.2.5 Duyarlılık ve Saptama Sınırı

Hesaplar Bölüm 3.2.2.5'te verilen formüllere göre yapıldı. Analitik yöntemin duyarlılığı 1.84 µg/mL, saptama sınırı 5.54 µg/mL olarak bulundu.

4.3. Dimetil-β-CD'nin Spektrofotometrik Miktar Tayini Validasyonu

4.3.1 Doğrusallık

Çalışmalar, Bölüm 3.2.4.1'de anlatıldığı gibi yapıldı. Hesaplanan pik alanlarına karşılık konsantrasyonlar grafiğe geçirildi. En küçük kareler yöntemine göre değerlendirilip, standart doğru denklemi bulundu ve doğrusallığı kanıtlandı. Elde edilen log absorbans-log konsantrasyon grafiği Şekil 38'de verilmiştir.



Şekil 38. Dimetil-β-CD'nin spektrofotometrik yöntemle elde edilen kalibrasyon grafiği

4.3.2 Doğruluk ve Geri Elde

Çalışmalar Bölüm 3.2.4.2'de anlatıldığı gibi yapıldı. Sonuçlar Tablo 21 ve 22'de verilmiştir.

Tablo 21. Dimetil-β-CD'nin çözeltiden geri elde ile hesaplanan miktarları (n=3)

Çözeltideki dimetil-β-CD yüzdesi	Çözeltideki dimetil-β-CD miktarı (mg/mL)	Hesapla bulunan dimetil-β-CD miktarı ± G.S	B.S ortalama
%80	0.072	0.069± 0.002	0.987
%100	0.090	0.088± 0.002	0.668
%120	0.108	0.107 ± 0.001	0.732

Tablo 22. Dimetil-β-CD'nin lipozomdan geri elde ile hesaplanan miktarları (n=3)

Dimetil-β-CD yüzdesi	Dimetil-β-CD miktarı (mg/mL)	Hesapla bulunan dimetil-β-CD miktarı ± G.S	B.S ortalama
%80	0.068	0.067± 0.023	0.458
%100	0.085	0.083 ± 0.017	0.829
%120	0.102	0.101 ± 0.011	0.748

4.3.3 Kesinlik

Çalışmalar Bölüm 3.2.4.3'te anlatıldığı gibi yapıldı. Sonuçlar Tablo 23'te verilmiştir.

Tablo 23. Dimetil- β -CD'nin deney içi kesinlik sonuçları

ÖRNEK NO	Dimetil- β -CD derişimi (mg/mL)	Hesapla bulunan Dimetil- β -CD derişimi (mg/mL)
1	0.8	0.81
2	0.8	0.83
3	0.8	0.81
4	0.8	0.78
5	0.8	0.83
6	0.8	0.81
7	0.8	0.78
8	0.8	0.81
9	0.8	0.78
10	0.8	0.81
Ortalama	0.8	0.800
S.S		0.016
B.S		2.000
± Güven sınırı		0.010

4.3.4 Özgünlük ve Seçicilik

Çalışmalar bölüm 3.2.4.4'te anlatıldığı gibi yapıldı. Dimetil- β -CD'nin absorbans verdiği dalga boyunda rivastigminin absorbans vermediği gösterildi. Yöntemin dimetil- β -CD'nin tayinine uygun oluğuna karar verildi.

4.3.5 Duyarlılık ve Saptama Sınırı

Hesaplar bölüm 3.2.2.5'te verilen formüllere göre yapıldı. Analitik yöntemin duyarlılığı 6.72 µg/mL, saptama sınırı 20.4 µg/mL olarak bulundu.

4.4. MTT Testine Ait Bulgular

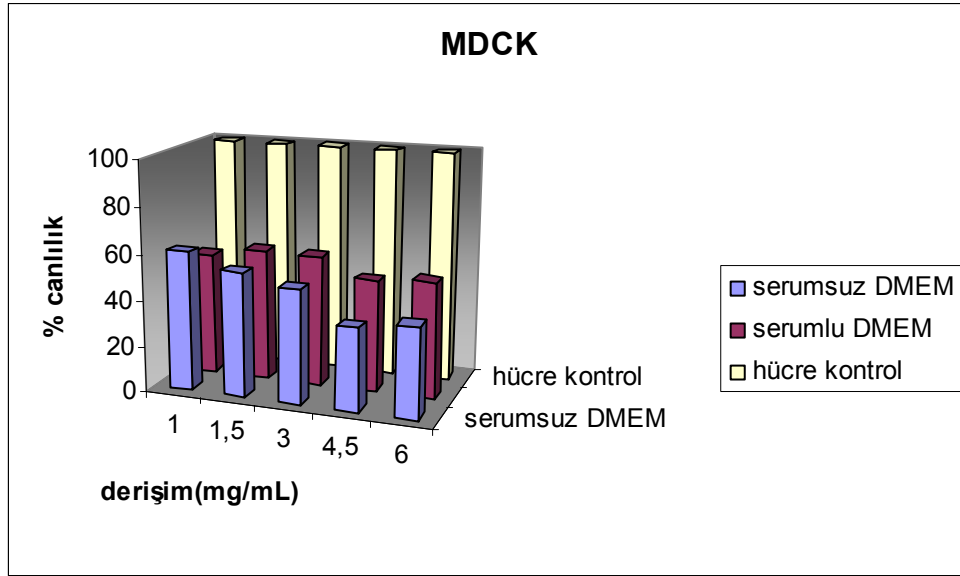
Rivastigmin ve absorpsiyon artırıcıların Caco-2, MDCK ve L-929 hücrelerine olan toksik etkileri incelendi. Boş lipozom formülasyonunun 250, 500 ve 750 µL oranındaki miktarlarının da hücreler üzerine etkileri incelendi. Formülasyonlarda kullanılan maddelerin yanı sıra hücrelerin besi ortamı olan DMEM'in serum içeren ve içermeyen hallerde hücrelerin canlılığı üzerine etkisi gözlemlendi. MTT testi sonucunda kültür kaplarında oluşan mor renk Şekil 39 ve 40'da gösterilmiştir. Elde edilen % canlılık değerlerine ait bulguların grafikleri Şekil 41-52'de verilmiştir.



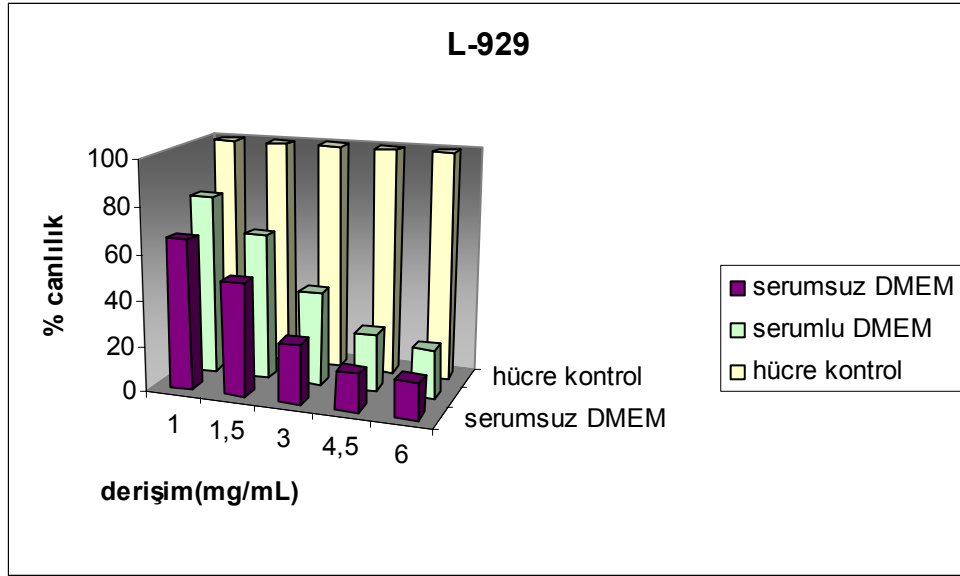
Şekil 39. MTT testi sonucunda MDCK hücrelerinde meydana gelen değişim



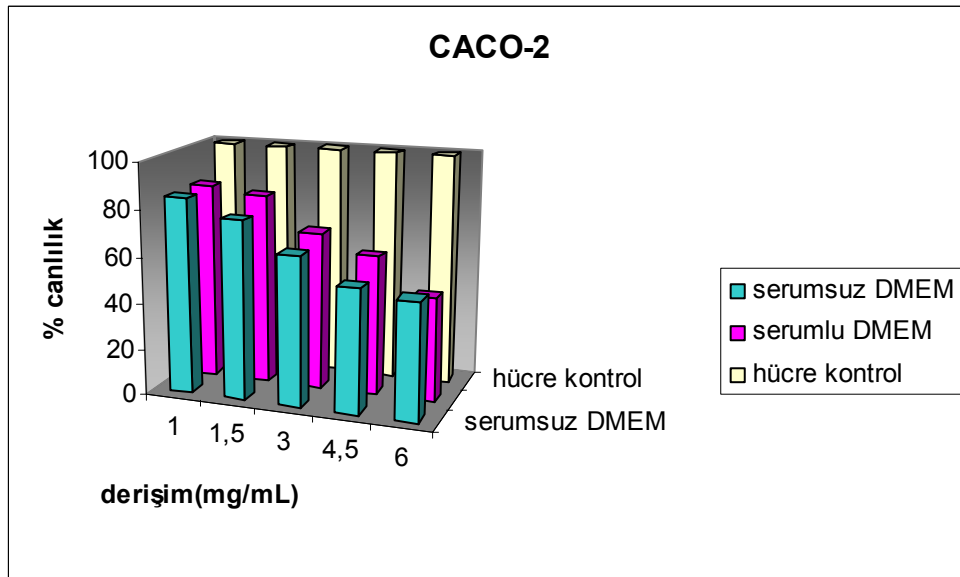
Şekil 40. MTT testi sonucunda L-929 hücrelerinin kontrol grubunda meydana gelen değişim



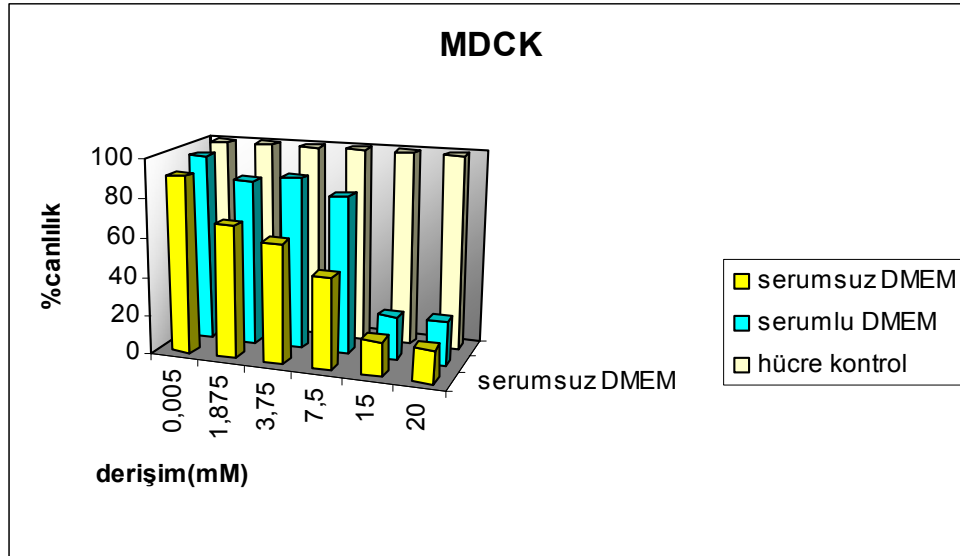
Şekil 41. Rivastigminin MDCK hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları



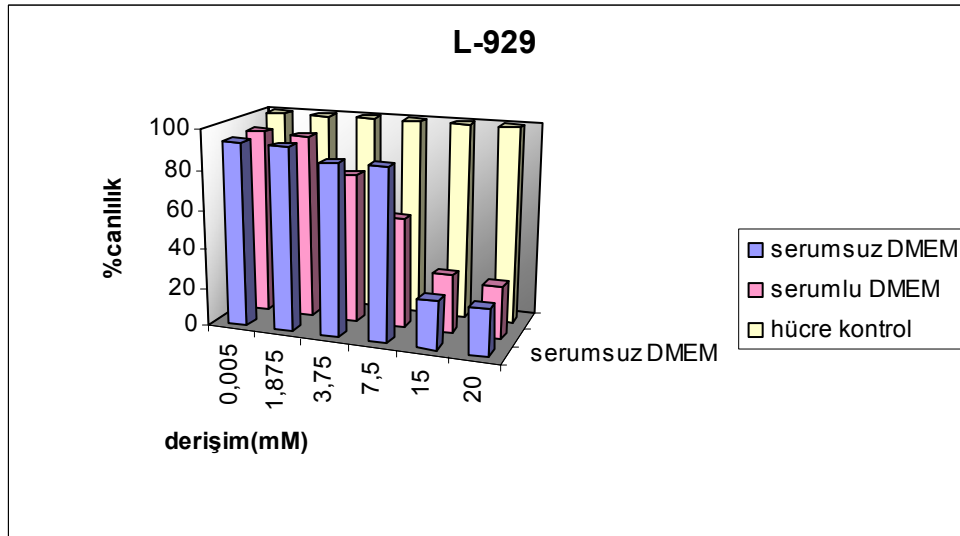
Şekil 42. Rivastigminin L-929 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları



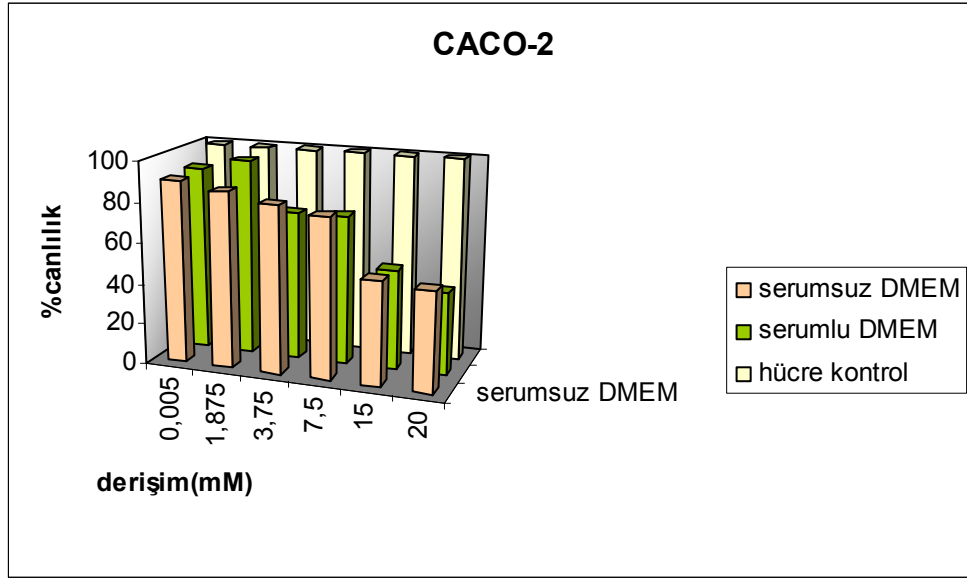
Şekil 43. Rivastigminin Caco-2 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları



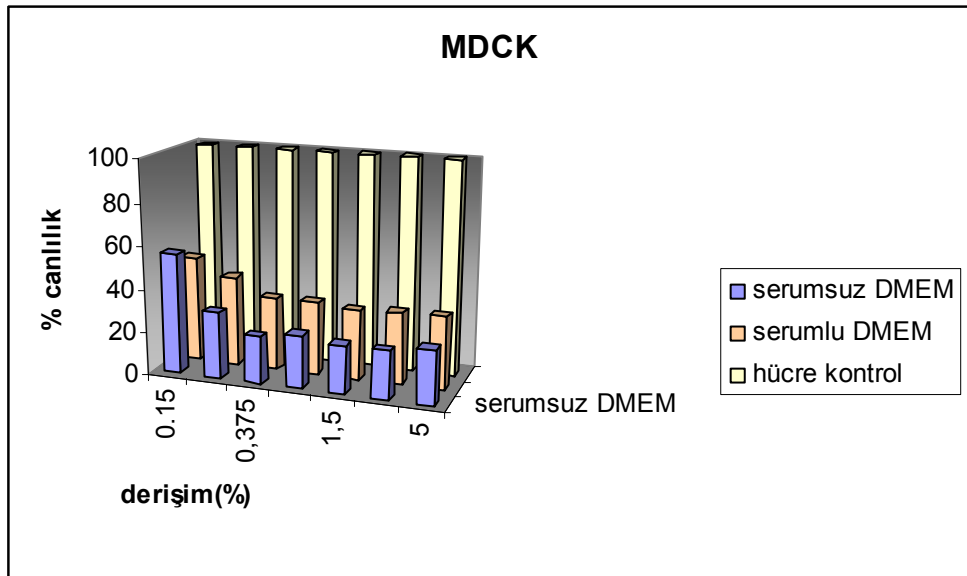
Şekil 44. Sodyum taurokolatın MDCK hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları



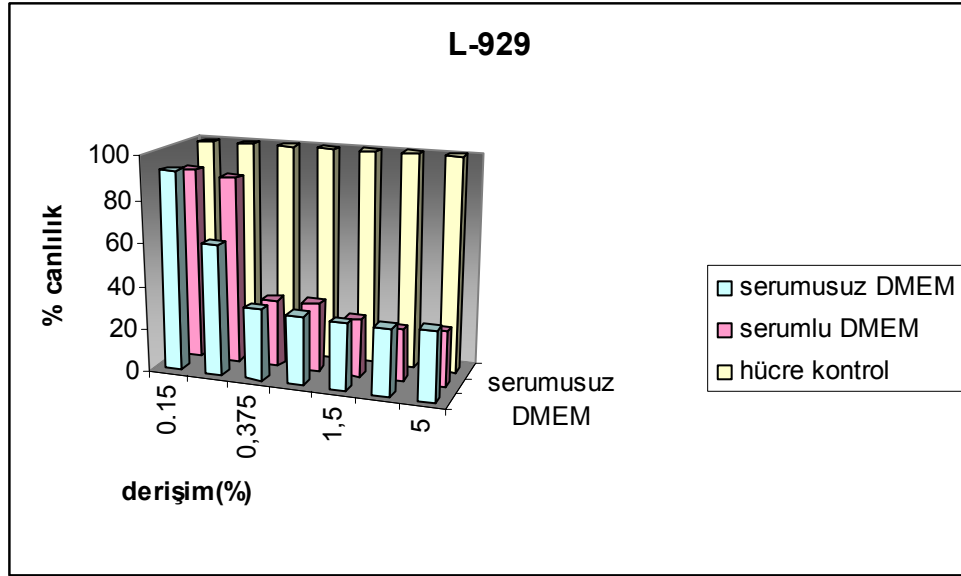
Şekil 45. Sodyum taurokolatın L-929 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları



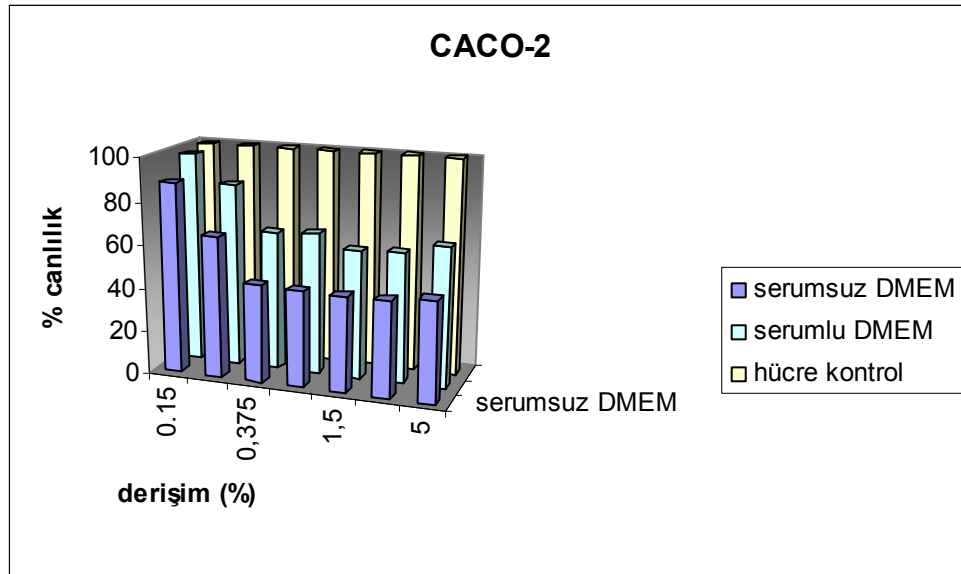
Şekil 46. Sodyum taurokolatın Caco-2 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları



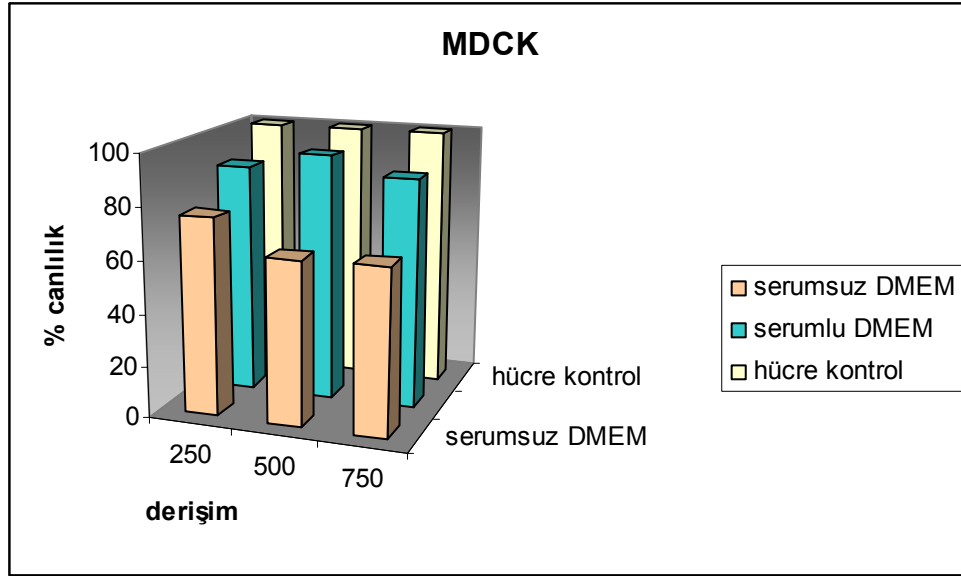
Şekil 47. Dimetil-β-CD'nin MDCK hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları



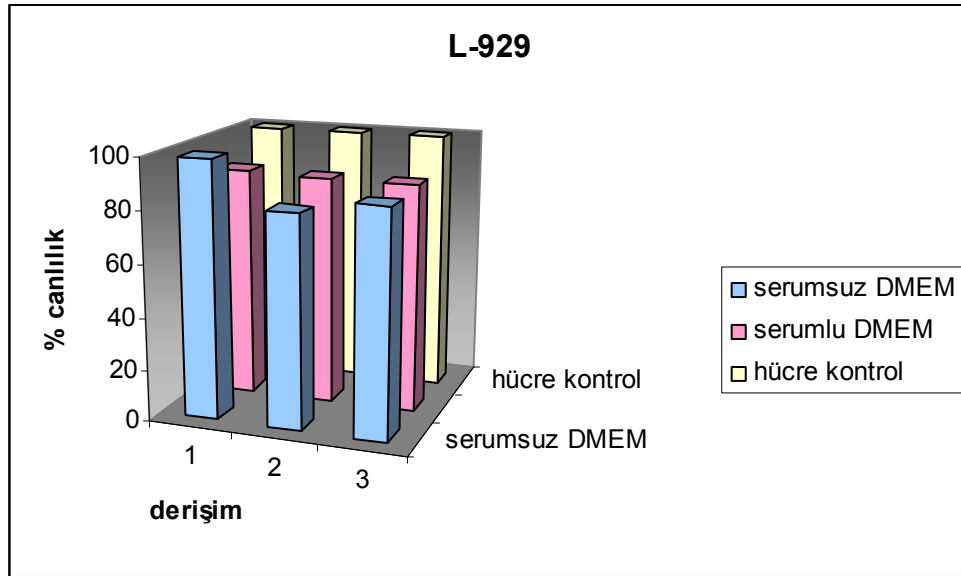
Şekil 48. Dimetil- β -CD'nin L-929 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları



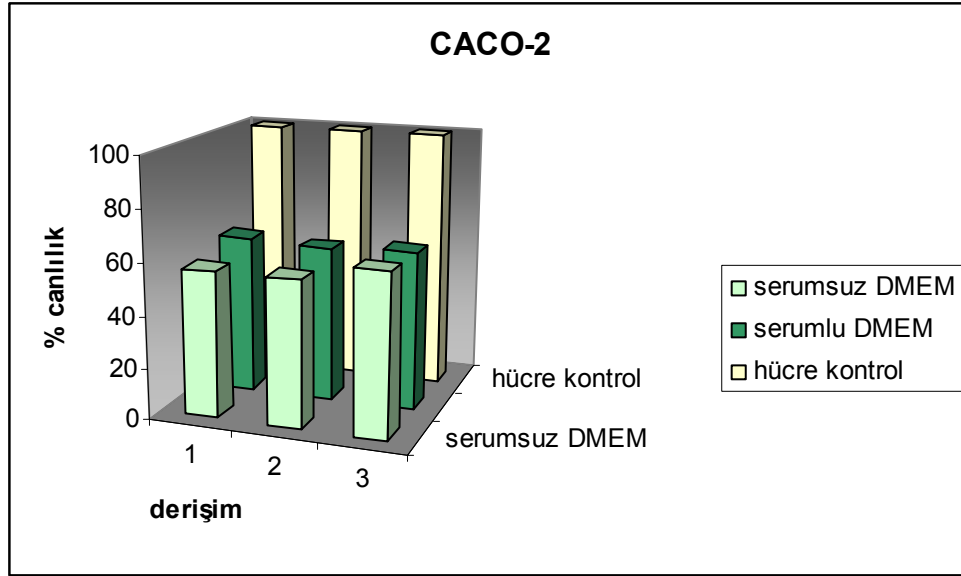
Şekil 49. Dimetil- β -CD'nin Caco-2 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları



Şekil 50. Boş lipozom formülasyonunun kullanılan lipidlerin MDCK hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları



Şekil 51. Boş lipozom formülasyonunun L-929 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları



Şekil 52. Boş lipozom formülasyonunun Caco-2 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları

MTT testi sonuçlarında hesaplanan % canlılık değerleri incelendi. INSTAT programı kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirildi. Serumlu ve serumsuz DMEM kullanıldığında anlamlı fark olduğu görüldü. Geçiş çalışmalarında serumlu DMEM kullanılmasına karar verildi.

İn vivo çalışmalarda ve in vitro geçiş çalışmalarında rivastigmin derişimi 1.5 mg/mL, sodyum taurokolat derişimi 1.875 mM ve dimetil- β -CD derişimi % 0.15 olarak belirlendi.

4.5. Lipozom Formülasyonlarına Ait Bulgular

4.5.1 Lipozomların Karakterizasyonuna Ait Bulgular

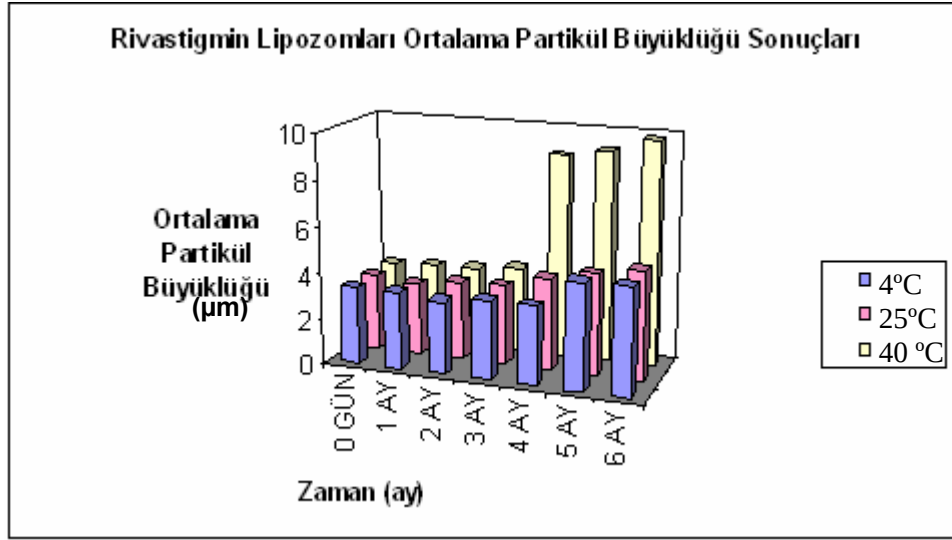
4.5.1.1 Lipozomların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular

4.5.1.1.1 Rivastigmin Lipozomlarının Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular

Lipozomların partikül büyüklükleri Laser Diffraction Particle Sizer aleti ile ölçüldü. DPPC:Ch (1:1), rivastigmin ve metil selüloz içeren lipozomların partikül büyüklükleri 3.40 μm olarak ölçüldü. Hazırlanan lipozomların partikül büyüklüklerinin zamanla değişip değişmediğini incelemek amacıyla 4°C, 25°C ve 40°C’de saklanan lipozomların 0.,1.,2.,3.,4.,5. ve 6. aylarda yapılan partikül büyüklüğü ölçümlerinin sonuçları Tablo 24’de ve Şekil 53’de gösterilmiştir.

Tablo 24. Rivastigmin lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları

Zaman (Ay)	Ortalama çap(μm) $\pm$ S.S (4°C)	Ortalama çap(μm) $\pm$ S.S (25°C)	Ortalama çap(μm) $\pm$ S.S (40°C)
0	3.40 $\pm$ 0.01	3.40 $\pm$ 0.01	3.40 $\pm$ 0.01
1	3.35 $\pm$ 0.01	3.45 $\pm$ 0.09	3.51 $\pm$ 0.03
2	3.17 $\pm$ 0.05	3.52 $\pm$ 0.09	3.55 $\pm$ 0.02
3	3.42 $\pm$ 0.01	3.20 $\pm$ 0.01	3.70 $\pm$ 0.02
4	3.41 $\pm$ 0.06	3.98 $\pm$ 0.63	8.87 $\pm$ 0.09
5	4.65 $\pm$ 0.08	4.42 $\pm$ 0.03	9.18 $\pm$ 0.02
6	4.66 $\pm$ 0.05	4.78 $\pm$ 0.63	9.74 $\pm$ 0.02



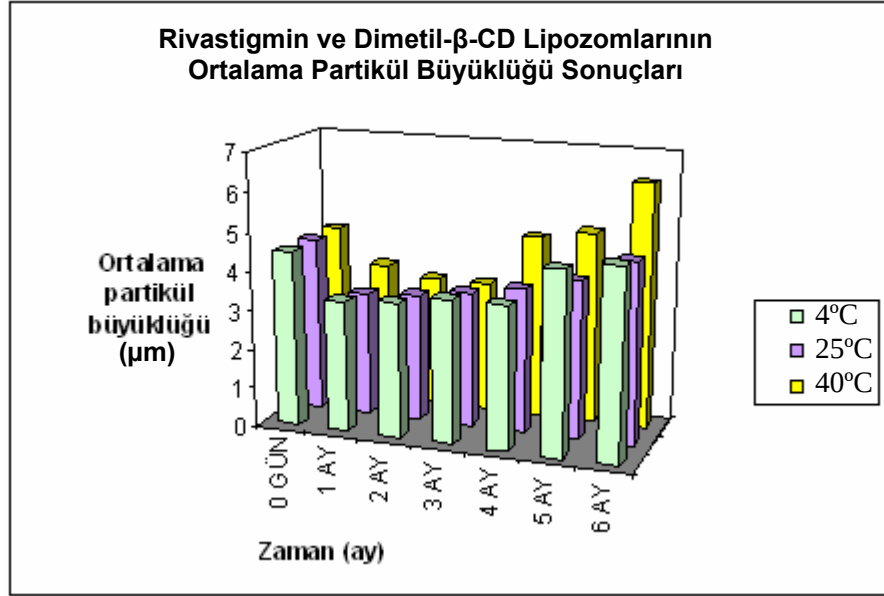
Şekil 53. Rivastigmin lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları

4.5.1.1.2 Rivastigmin ve Dimetil-β-CD Lipozomlarının Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular

Rivastigmin ve dimetil-β-CD içeren lipozomların partikül büyüklüğü ve dağılımına ait bulgular Tablo 25 ve Şekil 54’de gösterilmiştir.

Tablo 25. Rivastigmin ve dimetil-β-CD içeren lipozomlara ait partikül büyüklüğü sonuçları

Zaman (Ay)	Ortalama çap(µm) ± S.S (4°C)	Ortalama çap(µm) ± S.S (25°C)	Ortalama çap(µm) ± S.S (40°C)
0	4.51 ± 0.04	4.51 ± 0.04	4.51 ± 0.04
1	3.36 ± 0.03	3.19 ± 0.04	3.63 ± 0.01
2	3.45 ± 0.02	3.29 ± 0.01	3.37 ± 0.04
3	3.67 ± 0.04	3.61 ± 0.14	3.39 ± 0.06
4	3.68 ± 0.02	3.72 ± 0.01	4.72 ± 0.12
5	4.68 ± 0.02	4.51 ± 0.04	4.92 ± 0.02
6	4.89 ± 0.05	4.83 ± 0.11	6.78 ± 1.07



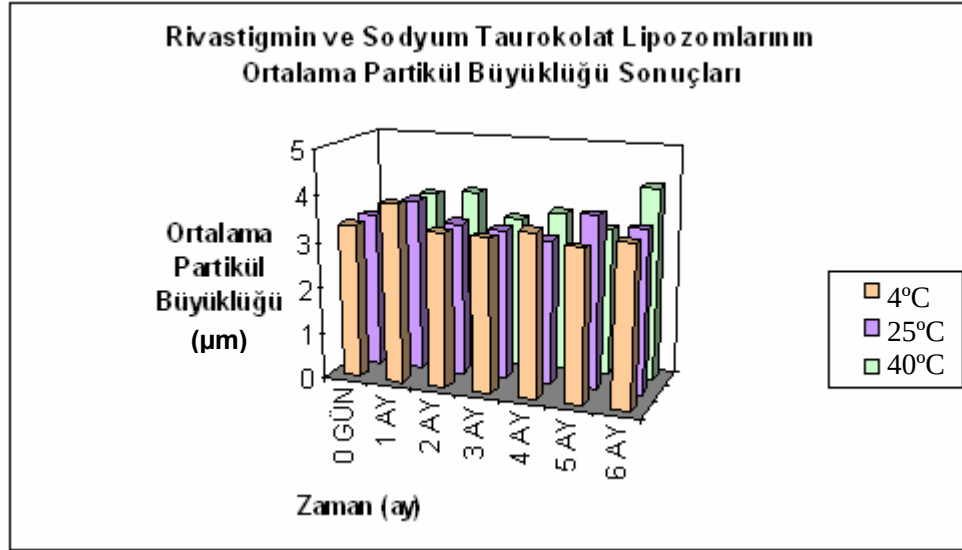
Şekil 54. Rivastigmin ve dimetil-β-CD içeren lipozomlara ait partikül büyüklüğü sonuçları

4.5.1.1.3 Rivastigmin ve Sodyum Taurokolat Lipozomlarının Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular

Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomların partikül büyüklüğü ve dağılımına ait bulgular Tablo 26 ve Şekil 55'de gösterilmiştir.

Tablo 26. Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomlara ait partikül büyüklüğü sonuçları

Zaman (Ay)	Ortalama çap(µm) ± S.S (4°C)	Ortalama çap(µm) ± S.S (25°C)	Ortalama çap(µm) ± S.S (40°C)
0	3.37 ± 0.00	3.37 ± 0.00	3.37 ± 0.00
1	3.88 ± 0.01	3.75 ± 0.01	3.73 ± 0.01
2	3.37 ± 0.05	3.34 ± 0.01	3.84 ± 0.01
3	3.33 ± 0.04	3.27 ± 0.01	3.30 ± 0.07
4	3.54 ± 0.10	3.14 ± 0.37	3.51 ± 0.01
5	3.30 ± 0.01	3.75 ± 0.01	3.22 ± 0.02
6	3.49 ± 0.01	3.54 ± 0.02	4.19 ± 0.18



Şekil 55. Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomlara ait partikül büyüklüğü sonuçları

4.5.1.2 Lipozomların Zeta Potansiyel Ölçümlerine Ait Bulgular

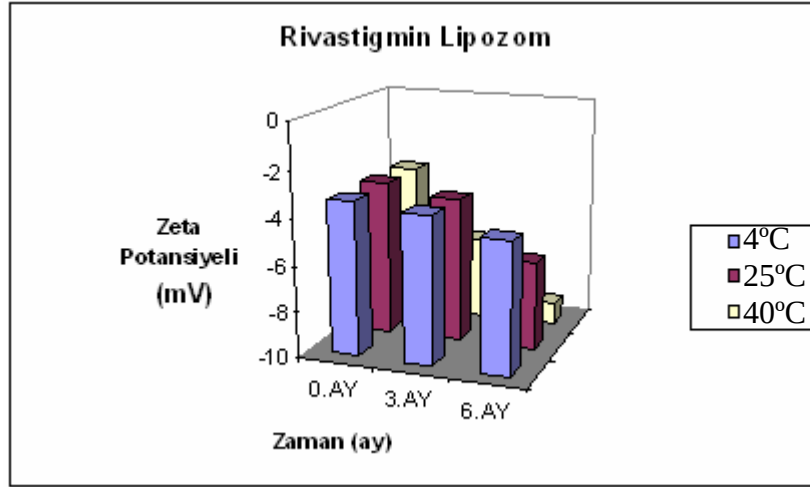
Hazırlanan lipozomların zeta potansiyelleri 0., 3. ve 6. aylarda Malvern Zeta Sizer aleti ile ölçüldü.

4.5.1.2.1 Rivastigmin Lipozomlarının Zeta Potansiyel Ölçümlerine Ait Bulgular

Rivastigmin lipozomlarının ait zeta potansiyel ölçümlerine ait bulgular Tablo 27 ve Şekil 56'da görülmektedir.

Tablo 27. Rivastigmin lipozomlarına ait zeta potansiyeli sonuçları

Zaman (Ay)	Zeta Potansiyeli (mV) ± S.S (4°C)	Zeta Potansiyeli (mV) ± S.S (25°C)	Zeta Potansiyeli (mV) ± S.S (40°C)
0	-3.28 ± 0.00	-3.28 ± 0.00	-3.28 ± 0.00
3	-3.69 ± 1.01	-3.68 ± 0.99	-6.34 ± 0.41
6	-4.03 ± 0.60	-6.17 ± 0.20	-9.02 ± 0.49



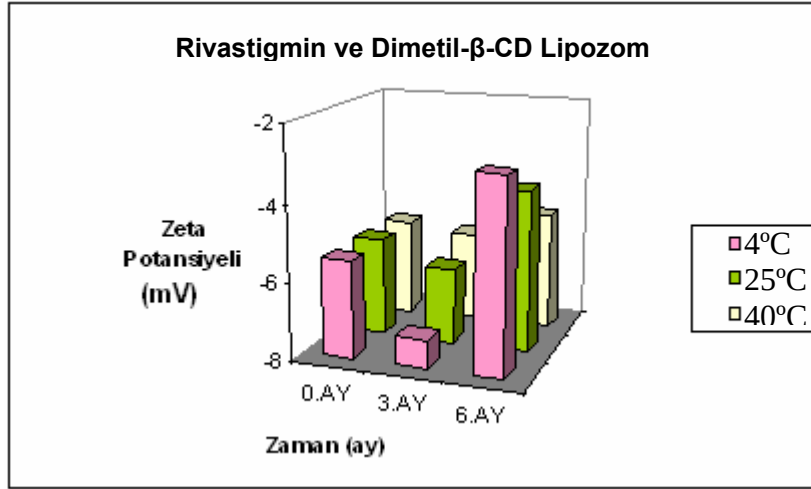
Şekil 56. Rivastigmin lipozomlarına ait zeta potansiyeli sonuçları

4.5.1.2.2 Rivastigmin ve Dimetil-β-CD Lipozomlarının Zeta Potansiyel Ölçümlerine Ait Bulgular

Rivastigmin ve dimetil-β-CD içeren lipozomların zeta potansiyeli ölçümlerine ait bulgular Tablo 28 ve Şekil 57’de gösterilmiştir.

Tablo 28. Rivastigmin ve dimetil-β-CD içeren lipozomlara ait zeta potansiyeli sonuçları

Zaman (Ay)	Zeta Potansiyeli (mV) ± S.S (4°C)	Zeta Potansiyeli (mV) ± S.S (25°C)	Zeta Potansiyeli (mV) ± S.S (40°C)
0	-5.43 ± 0.00	-5.43 ± 0.00	-5.43 ± 0.00
3	-5.62 ± 0.43	-6.04 ± 0.45	-7.25 ± 1.01
6	-4.91 ± 0.35	-3.80 ± 0.65	-2.97 ± 0.46



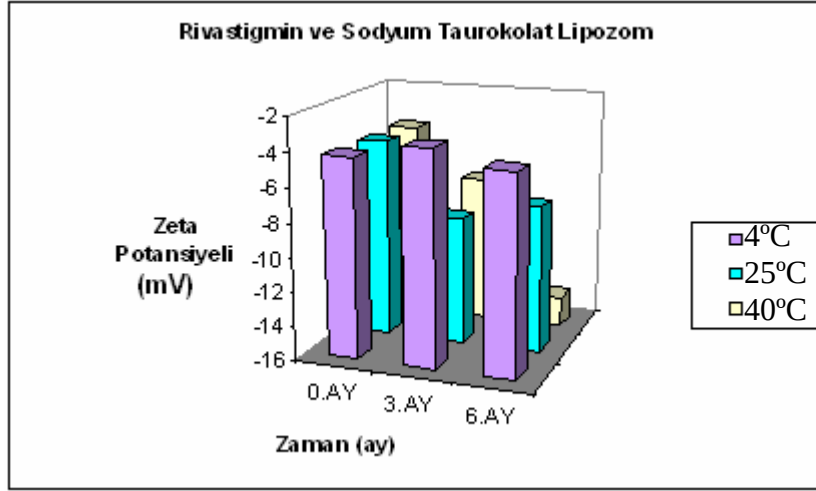
Şekil 57. Rivastigmin ve dimetil-β-CD içeren lipozomlara ait zeta potansiyeli sonuçları

4.5.1.2.3 Rivastigmin ve Sodyum Taurokolat Lipozomlarının Zeta Potansiyel Ölçümlerine Ait Bulgular

Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomların zeta potansiyeli ölçümlerine ait bulgular Tablo 29 ve Şekil 58'de gösterilmiştir.

Tablo 29. Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomlara ait zeta potansiyeli sonuçları

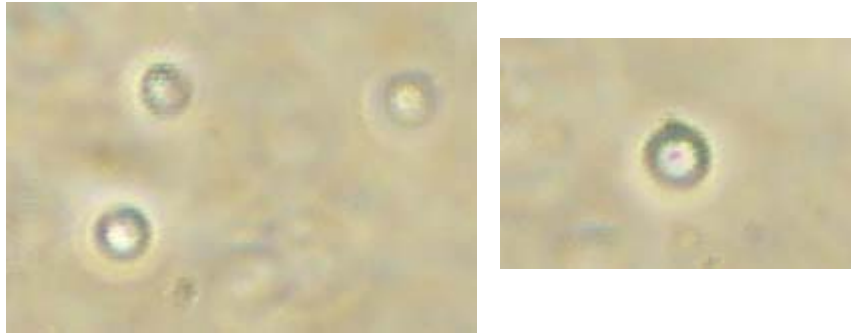
Zaman (Ay)	Zeta Potansiyeli (mV) ± S.S (4°C)	Zeta Potansiyeli (mV) ± S.S (25°C)	Zeta Potansiyeli (mV) ± S.S (40°C)
0	-4.30 ± 0.66	-4.30 ± 0.66	-4.30 ± 0.66
3	-3.48 ± 0.43	-8.53 ± 0.22	-7.20 ± 0.10
6	-4.36 ± 0.31	-7.40 ± 0.58	-14.2 ± 1.19



Şekil 58. Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomlara ait zeta potansiyeli sonuçları

4.5.1.3 Lipozomların Şekilleri

Lipozomların elektron mikroskobu görüntüleri Şekil 59'da görülmektedir.



Şekil 59. MLV tipi rivastigmin lipozomlarının elektron mikroskobu görüntüsü

4.5.1.4 Lipozomlarda Hapsedilen Rivastigmin Miktar Tayini

Lipozomlar içine hapsedilen rivastigmin miktarlarını tayin etmek amacıyla %0.9'luk serum fizyolojik çözeltisi ile süspansiyon halinde

hazırlanan lipozomlar 4°C'de 20000 g'de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilerek supernatant ve lipozomlar birbirinden ayrılmış, supernatantlar % 0.9'luk serum fizyolojik çözeltisi ile uygun biçimde seyreltilerek rivastigmin miktar tayininde kullanılmıştır. Hazırlanan rivastigmin lipozomları içinde hapsedilen rivastigmin miktarları hesaplanmıştır. Sadece rivastigmin içeren lipozomlarda, lipozom içine hapsedilen rivastigmin miktarı ortalama % 35.4, rivastigmin ile dimetil- β -CD içeren lipozomlarda lipozom içine hapsedilen rivastigmin miktarı ortalama % 29.9, rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomlar da ise % 25.2 olarak hesaplanmıştır.

4.5.1.4.1 Lipozomlarda Hapsedilen Sodyum Taurokolat Miktar Tayini

Sodyum taurokolat miktar tayini HPLC yöntemiyle yapıldı ve lipozom içine hapsedilen sodyum taurokolat miktarı % 41 bulundu.

4.5.1.4.2 Lipozomlarda Hapsedilen Dimetil- β -CD Miktar Tayini

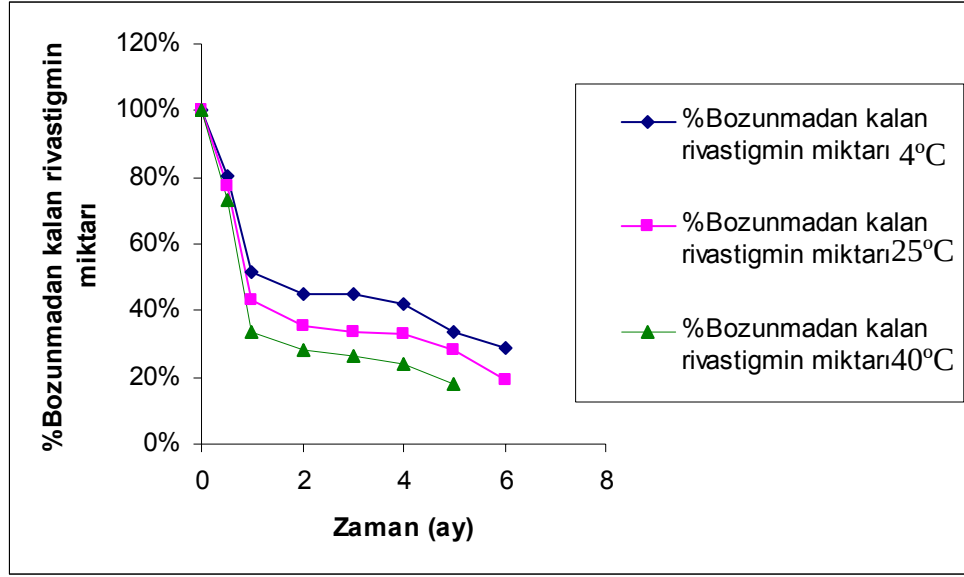
Dimetil- β -CD miktar tayini spektrofotometrik yöntemle yapıldı ve lipozom içine hapsedilen dimetil- β -CD miktarı % 65 bulundu.

4.5.1.5 Rivastigminin Lipozom Formülasyonları İçindeki Stabilitesine Ait Bulgular

Farklı saklama koşullarında (4°C, 25°C $\pm$ % 65 bağıl nem ve 40°C $\pm$ % 75 bağıl nem) 180 gün bekletilen 600 μ g/mL derişimde rivastigmin içeren lipozom formülasyonlarında rivastigminin stabilitesine ait sonuçlar Şekil 60, 61 ve 62'de gösterilmiştir.

Determinasyon katsayısı, sapma kareleri toplamı gibi uyum ölçütleri incelenerek elde edilen profiller kinetik açıdan incelenmiş, sodyum

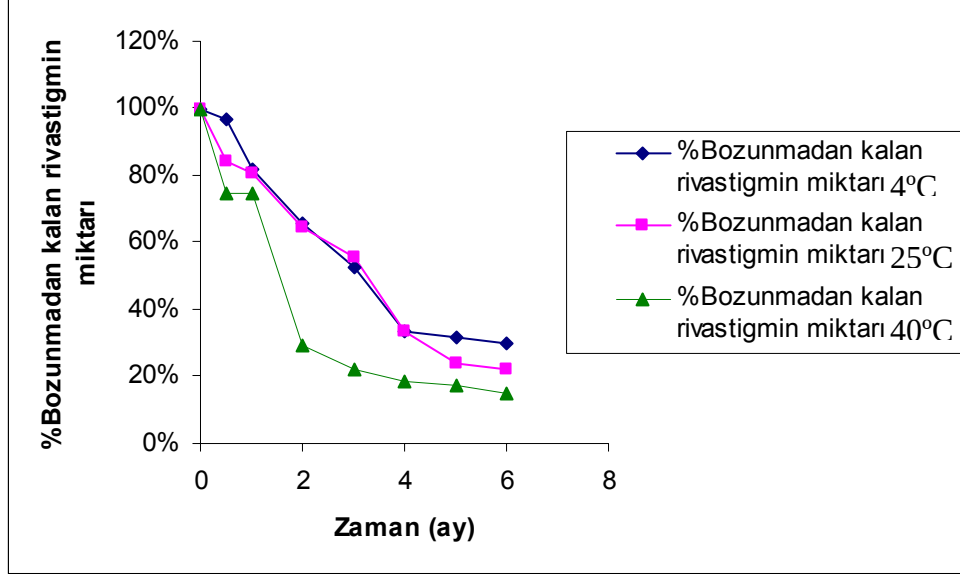
taurokolat ve dimetil- β -CD içeren lipozom formülasyonu içindeki rivastigminin birinci derece kinetikle, sadece rivastigmin içeren lipozomda ise bozunmanın ikinci dereceden olduğu gösterilmiştir. Kinetik hesapları Tablo 30, 31 ve 32’de gösterilmiştir.



Şekil 60. Stabilite çalışmalarında rivastigmin lipozomlarının içindeki rivastigmin miktarının zamana göre değişimi

Tablo 30. Rivastigminin lipozom formülasyonu içindeki stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri

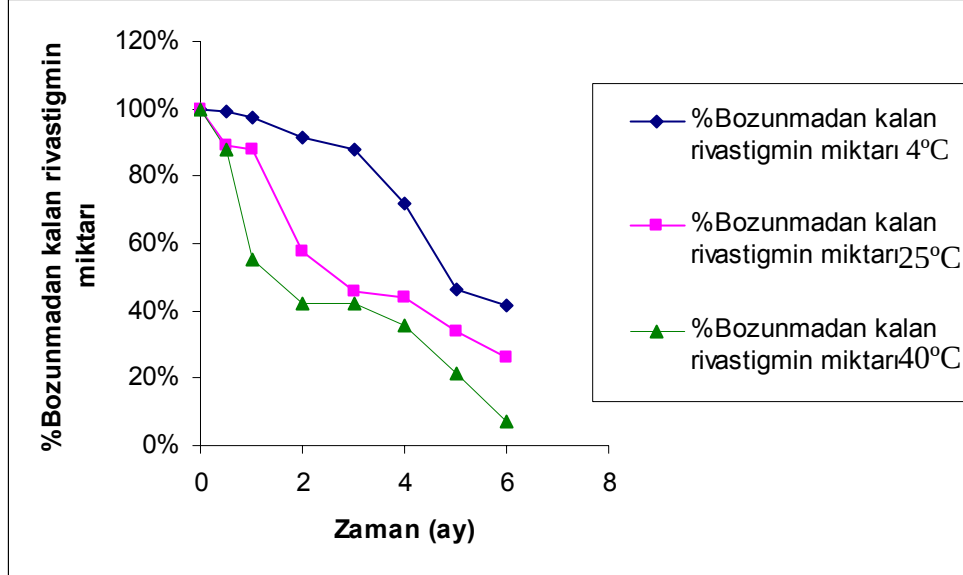
Reaksiyon Derecesi Ve Denklemi	Sıcaklık (°C)	Eğim (k)	Kesişim (C ₀)	Determinasyon Katsayısı (R ²)	Sapma Kareleri Toplamı (SKT)
Sıfır derece $C = C_0 - k.t$	4	9.59	79.1	0.737	1098
	25	10.5	74.5	0.688	1672
	40	13.4	73.01	0.656	1979
Birinci derece $C = C_0 \cdot e^{-kt}$	4	0.173	4.365	0.845	858
	25	0.223	4.30	0.828	1259
	40	0.299	4.25	0.793	1530
İkinci derece $C^{-1} = (C_0^{-1} + k.t)^{-1}$	4	3.6×10^{-3}	0.012	0.920	591
	25	5.65×10^{-3}	1.25×10^{-2}	0.882	784
	40	8.14×10^{-3}	1.40×10^{-2}	0.905	1299



Şekil 61. Stabilite çalışmalarında rivastigmin ve dimetil-β-CD içeren lipozomların içindeki rivastigmin miktarının zamana göre değişimi

Tablo 31. Rivastigmin ve dimetil-β-CD içeren lipozomlarda rivastigminin stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri

Reaksiyon Derecesi Ve Denklemi	Sıcaklık (°C)	Eğim (k)	Kesişim (C ₀)	Determinasyon Katsayısı (R ²)	Sapma Kareleri Toplamı (SKT)
Sıfır derece $C = C_0 - k.t$	4	12.9	96.1	0.940	353
	25	13.2	93.6	0.968	192
	40	13.7	80.8	0.791	1666
Birinci derece $C = C_0 \cdot e^{-kt}$	4	0.228	4.62	0.963	113
	25	0.265	4.64	0.972	158
	40	0.332	4.41	0.967	682
İkinci derece $C^{-1} = (C_0^{-1} + k.t)^{-1}$	4	8.14×10^{-3}	1.40×10^{-2}	0.905	1299
	25	6.16×10^{-3}	6.54×10^{-3}	0.926	3561
	40	9.61×10^{-3}	1.02×10^{-2}	0.891	846



Şekil 62. Stabilite çalışmalarında rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomların içindeki rivastigmin miktarının zamana göre değişimi

Tablo 32. Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomlarda rivastigminin stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri

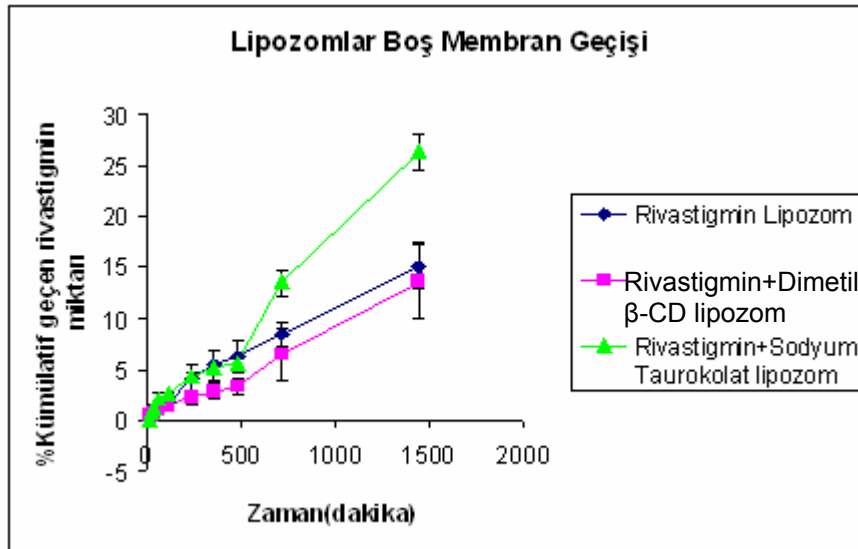
Reaksiyon Derecesi Ve Denklemi	Sıcaklık (°C)	Eğim (k)	Kesişim (C ₀)	Determinasyon Katsayısı (R ²)	Sapma Kareleri Toplamı (SKT)
Sıfır derece $C = C_0 - k.t$	4	10.4	107.4	0.867	690
	25	12.4	93.8	0.930	388
	40	13.5	85.2	0.873	884
Birinci derece $C = C_0 \cdot e^{-kt}$	4	0.151	4.73	0.910	355
	25	0.222	4.60	0.975	156
	40	0.362	4.62	0.877	553
İkinci derece $C^{-1} = (C_0^{-1} + k.t)^{-1}$	4	2.33×10^{-3}	7.76×10^{-3}	0.819	1745
	25	4.46×10^{-3}	8.32×10^{-3}	0.957	585
	40	1.60×10^{-2}	4.63×10^{-3}	0.614	145129

4.6 Hücre Kültüründen Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular

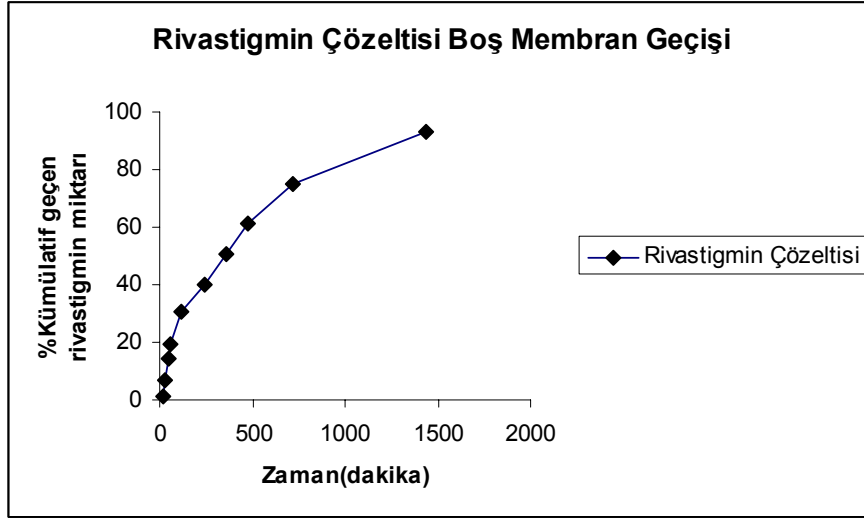
4.6.1 Hücre İçermeyen Membran Geçişleri

Hücre içermeyen membranlardan rivastigmin çözeltisi ve de lipozom geçişleri Bölüm 3.2.7.1.3' te anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

Elde edilen sonuçlar Şekil 63 ve 64'de görülmektedir.



Şekil 63. Hücre içermeyen membranlardan lipozom geçişlerine ait % kümülatif geçen rivastigmin miktarları (Her üç tip lipozom için n=3)



Şekil 64. Hücre içermeyen membranlardan rivastigmin çözeltisi geçişine ait % kümülatif geçen rivastigmin miktarı (n=1)

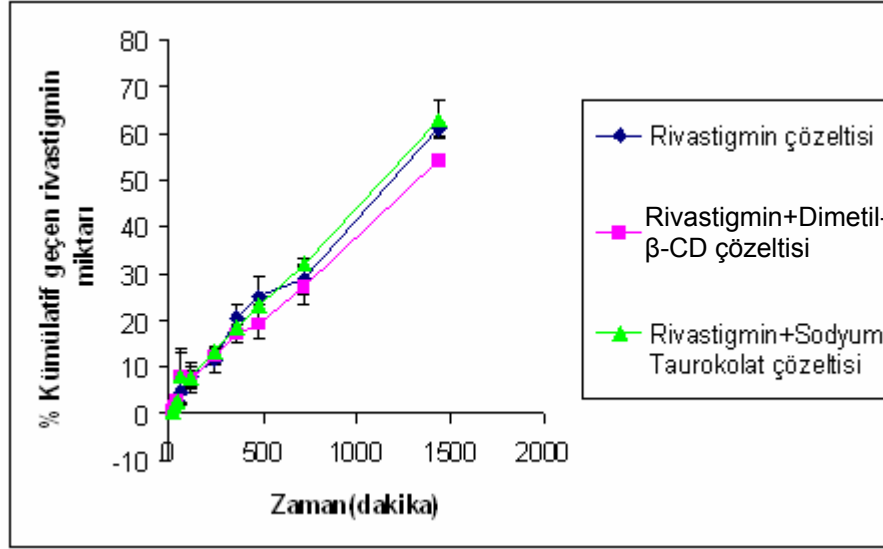
4.6.2 Caco-2 Hücrelerinden Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular

Caco-2 hücrelerinden geçiş çalışmaları hem çözelti hem de lipozom formülasyonları için Bölüm 3.2.7.1.2’de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Çalışmalar sırasında en az 5 noktalı günlük kalibrasyon yapıldı ve rivastigmin miktarları günlük kalibrasyonlara göre hesaplandı.

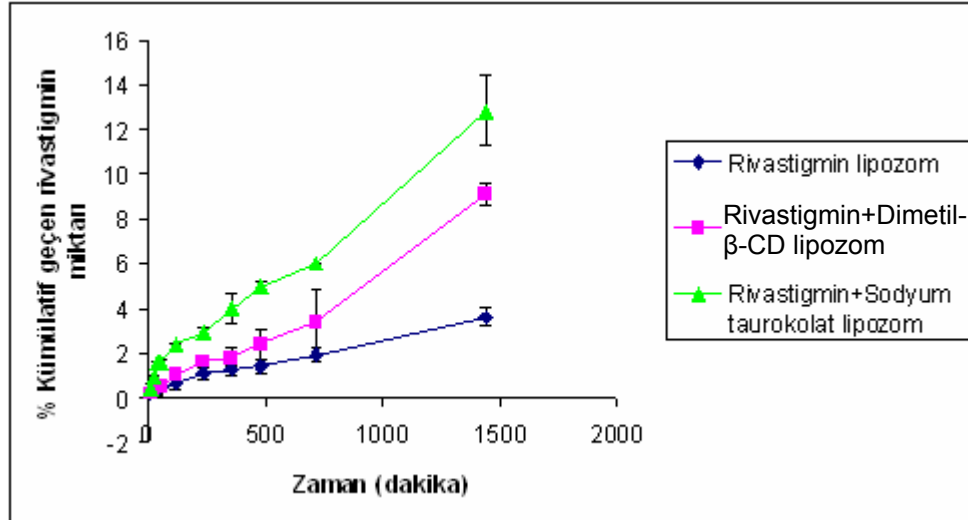
Çalışmalarda literatürlerde 21 günlük Caco-2 hücrelerinin kullanılmasından dolayı 21 günlük Caco-2 hücreleri kullanıldı. Hücre ekim yoğunluğu 80000 hücre/cm² olarak literatüre göre belirlendi¹⁴⁵.

Geçiş çalışmalarında kullanılan dimetil-β-CD ve sodyum taurokolat miktarları MTT testi sonuçlarına göre belirlendi. Caco-2 hücrelerinden çözelti ve lipozom geçişleri Şekil 65 ve 66’da görülmektedir.

Elde edilen verilerle log k değerleri hesaplandı.



Şekil 65. Caco-2 hücrelerinden çözelti geçişleri (Tüm çözeltiler için n=3)



Şekil 66. Caco-2 hücrelerinden lipozom geçişleri (Tüm lipozomlar için n=3)

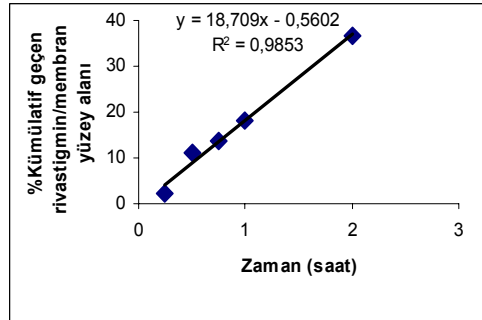
4.6.2.1. Caco-2 Hücrelerinden Geçiş Çalışmalarında log k Değerlerinin Hesaplanması

Log k değerleri Bölüm 3.2.7.1.2.1’de anlatıldığı gibi yapıldı. Hesaplanan değerler Tablo 33’de verilmiştir. Şekil 67 ve 68’de log k değerlerinin hesaplandığı grafikler görülmektedir.

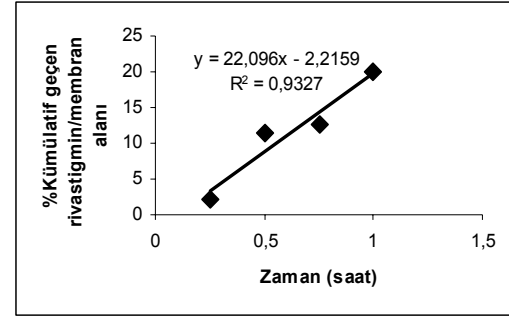
Tablo 33. Caco 2 hücrelerinde formülasyonlara ait log k değerleri

Örnekler	Log k
Rivastigmin çözeltisi	-1.96±0.04
Rivastigmin+Dimetil-β-CD çözeltisi	-1.84±0.01
Rivastigmin+Sodyum taurokolat çözeltisi	-1.78±0.03
Rivastigmin lipozom	-1.03±0.29
Rivastigmin+Sodyum taurokolat lipozomu	-0.75±0.13
Rivastigmin+Dimetil-β-CD lipozomu	-1.18±0.03

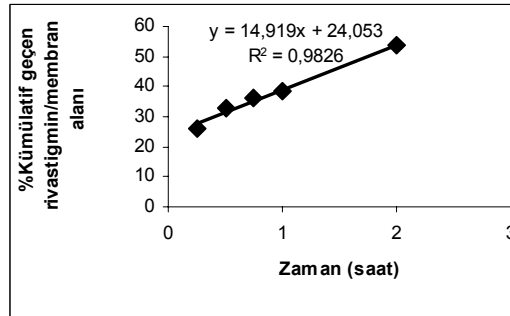
a.



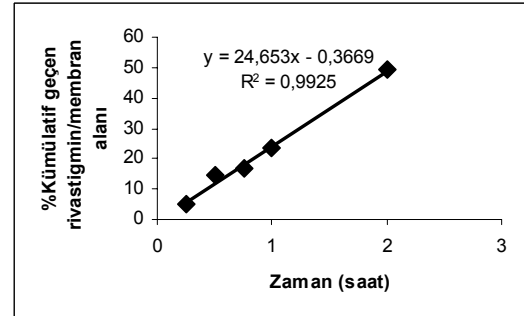
b.



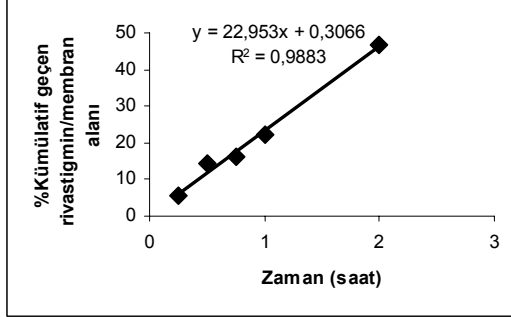
c.



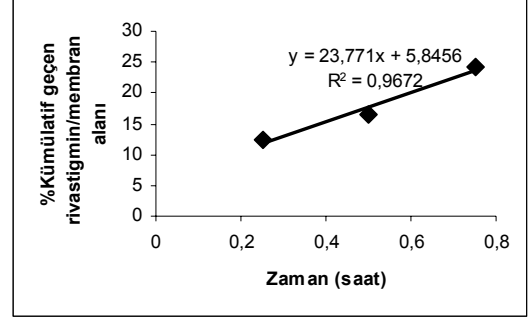
d.



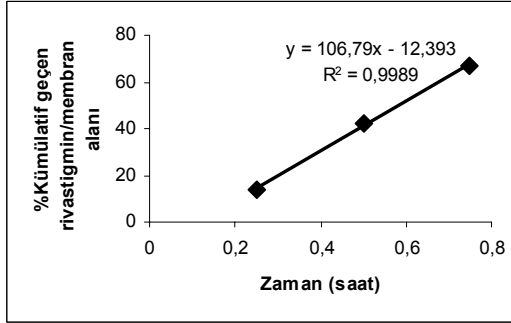
e.



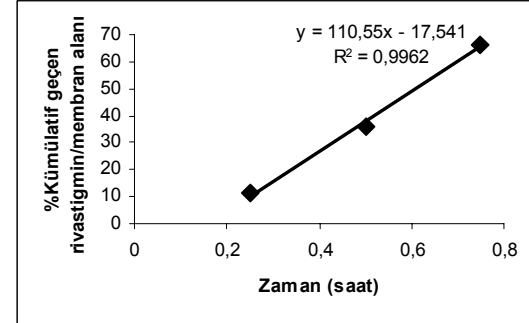
f.



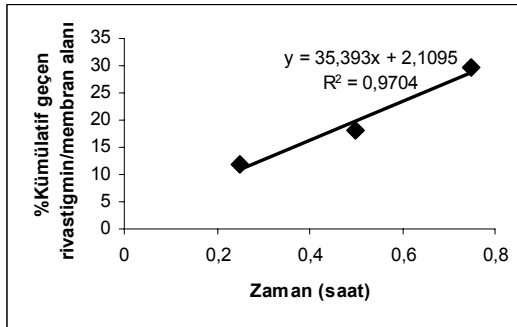
g.



h.



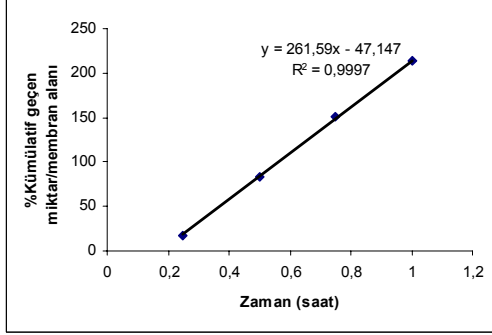
i.



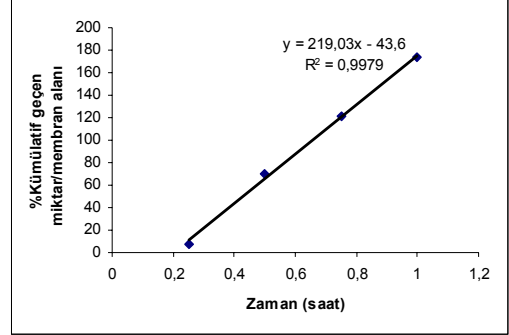
Şekil 67. Caco-2 hücrelerinde rivastigmin lipozomlarına ait log k değerlerinin hesaplandığı grafikler

a,b,c) Rivastigmin lipozom ile yapılan geçiş deneyleri, d,e,f) Rivastigmin ve dimetil-β-CD içeren lipozomlarla yapılan geçiş deneyleri, g,h,i) Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomlarla yapılan geçiş deneyleri

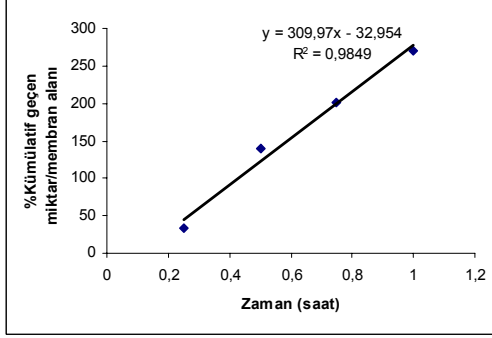
a.



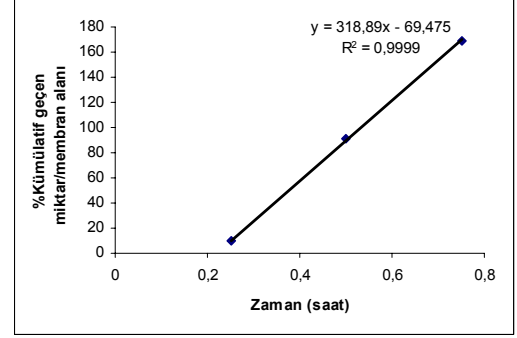
b.



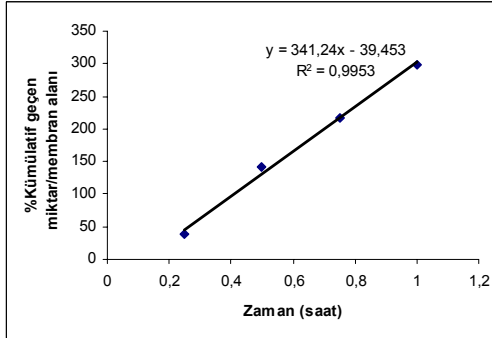
c.



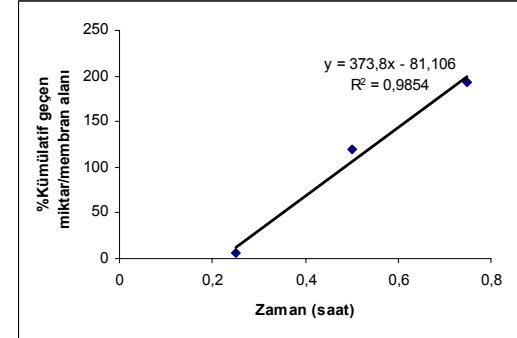
d.



e.



f.



Şekil 68. Caco-2 hücrelerinde Rivastigmin çözeltilerine ait log k değerlerinin hesaplandığı grafikler

a,b) Rivastigmin çözeltisi ile yapılan geçiş deneyleri, c,d) Rivastigmin ve dimetil-β-CD içeren çözeltiyle yapılan geçiş deneyleri, e,f) Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren çözeltisiyle yapılan geçiş deneyleri

4.6.2.2 Caco-2 Hücrelerinin Elektrik Dirençlerine Ait Bulgular

Elektriksel ölçümler Bölüm 3.2.7.1.2.2' de anlatıldığı biçimde yapılmış Tablo 34'de verilen sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 34. Caco-2 hücrelerinin geçiş deneylerinden sonraki elektriksel direnç değerlerinin ölçülmesi

Örnekler	Elektriksel Direnç (Ω)
Rivastigmin lipozomu	1275
Rivastigmin+dimetil- β -CD lipozomu	1230
Rivastigmin+sodyumtaurokolat lipozomu	1070

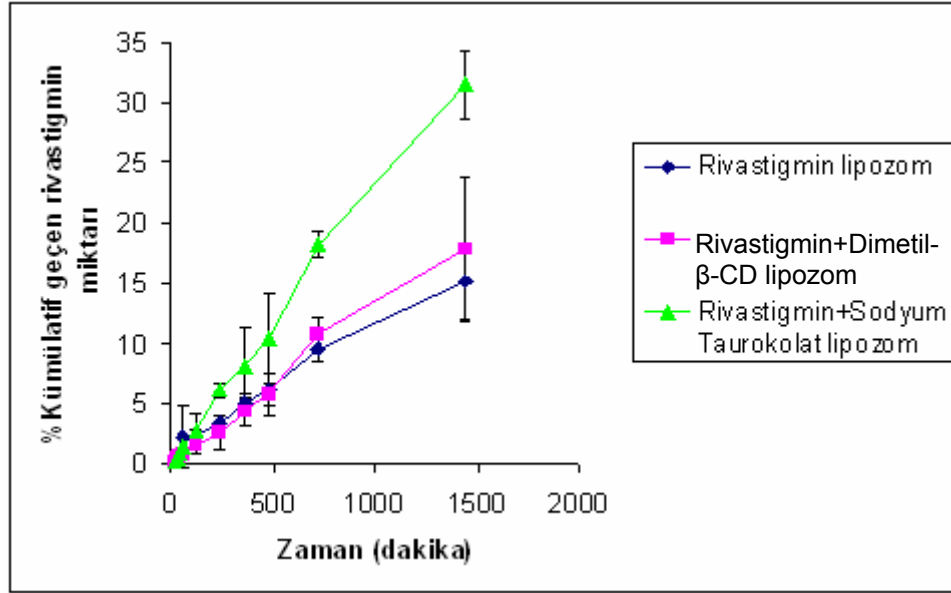
4.6.3 MDCK Hücre Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular

MDCK hücrelerinden geçiş çalışmaları hem çözelti hem de lipozom formülasyonları için Bölüm 3.2.7.1.2'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Çalışmalar sırasında en az 5 noktalı günlük kalibrasyon yapıldı ve rivastigmin miktarları günlük kalibrasyonlara göre hesaplandı.

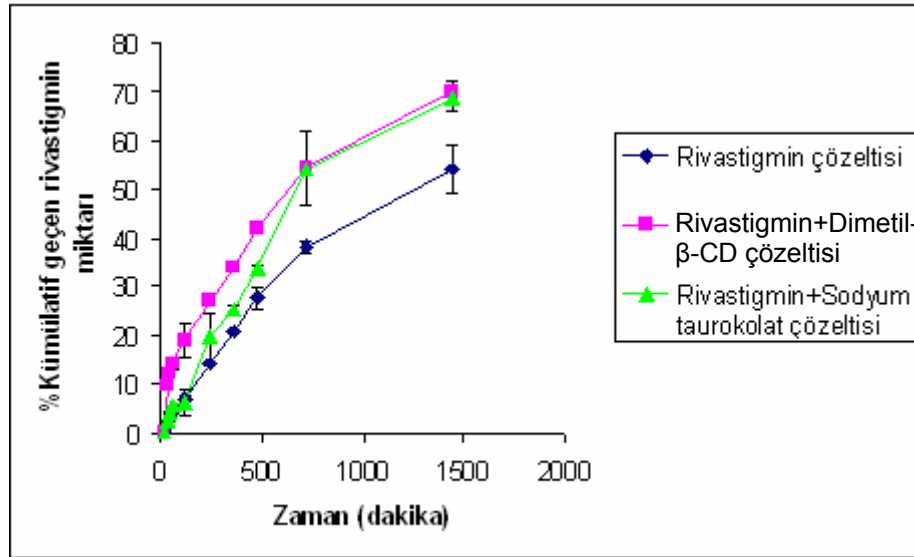
Çalışmalarda 7 günlük MDCK hücreleri kullanıldı. Hücre ekim yoğunluğu 60000 hücre/cm² olarak literatüre göre belirlendi¹⁴⁶.

Geçiş çalışmalarında kullanılan dimetil- β -CD ve sodyum taurokolat miktarları MTT testi sonuçlarına göre belirlendi. MDCK hücrelerinden lipozom ve çözelti geçişlerine ait bulgular Şekil 69 ve 70'de verilmiştir.

Elde edilen verilerle log k değerleri hesaplandı.



Şekil 69. MDCK hücrelerinden lipozom geçişleri (Tüm lipozomlar için n=3)



Şekil 70. MDCK hücrelerinden çözelti geçişleri (Tüm çözeltiler için n=3)

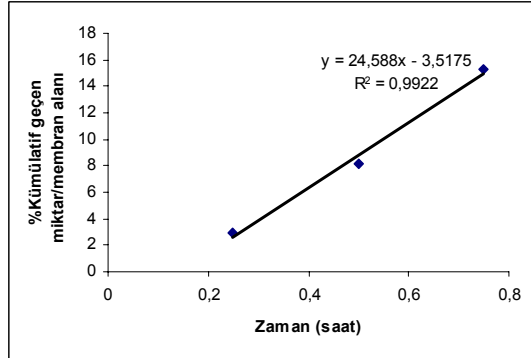
4.6.3.1. MDCK Hücrelerinden Geçiş Çalışmalarında log k Değerlerinin Hesaplanması

Log k değerleri Bölüm 3.2.7.1.2.1’de anlatıldığı gibi yapıldı. Hesaplanan değerler Tablo 35’da verilmiştir. Şekil 71 ve 72’de log k değerlerinin hesaplandığı grafikler görülmektedir.

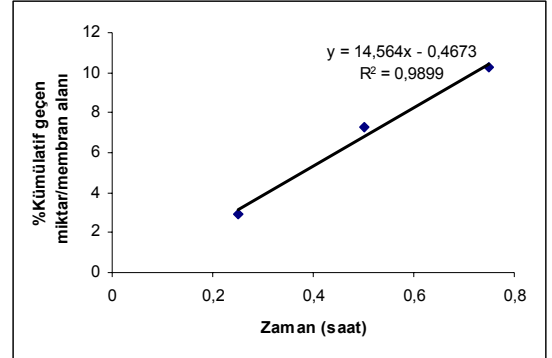
Tablo 35. MDCK hücrelerinde formülasyona ait log k değerleri

Örnekler	Log k
Rivastigmin çözeltisi	-1.80±0.01
Rivastigmin+Dimetil-B-CD çözeltisi	-1.72±0.03
Rivastigmin+Sodyum taurokolat çözeltisi	-1.65±0.06
Rivastigmin lipozom	-1.26±0.12
Rivastigmin+Sodyum taurokolat lipozomu	-1.15±0.16
Rivastigmin+Dimetil-B-CD lipozomu	-1.29±0.05

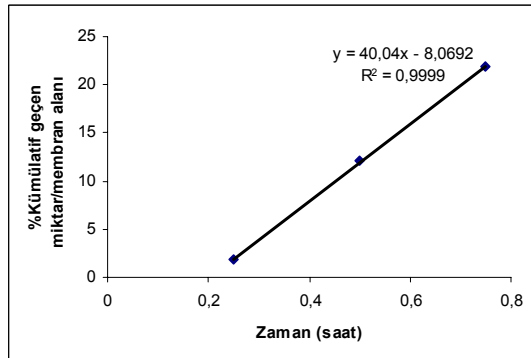
a.



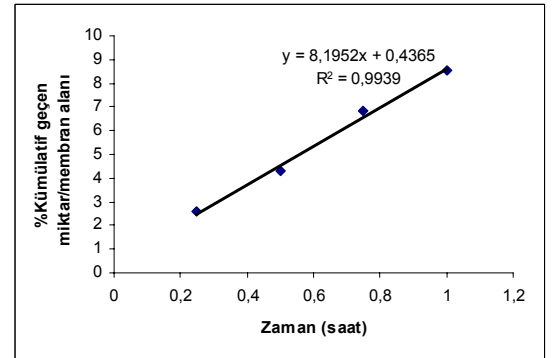
b.



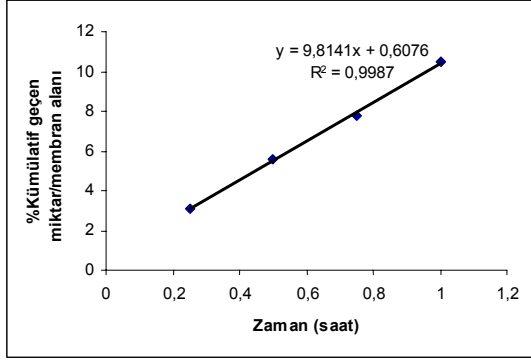
c.



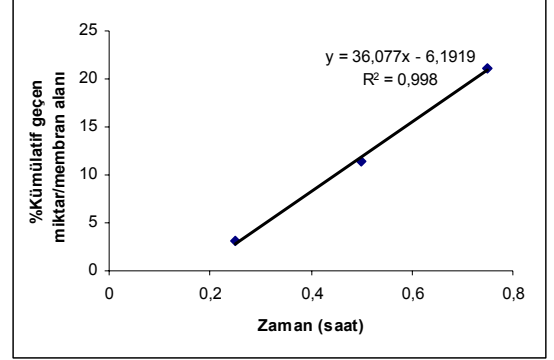
d.



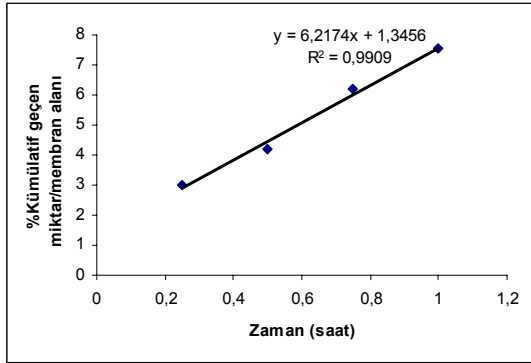
e.



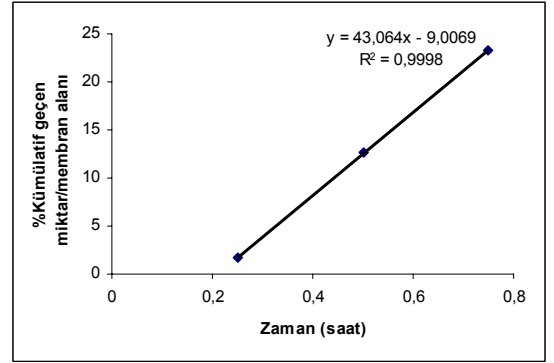
f.



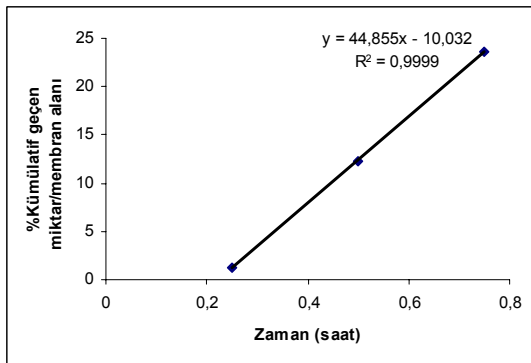
g.



h.



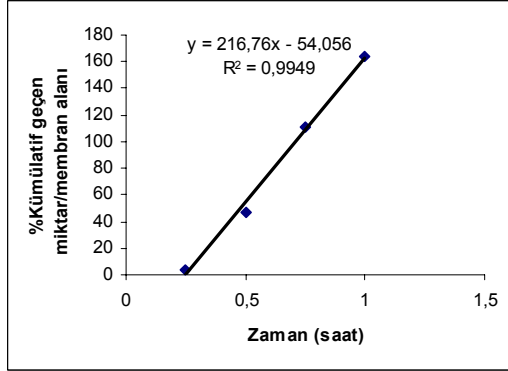
i.



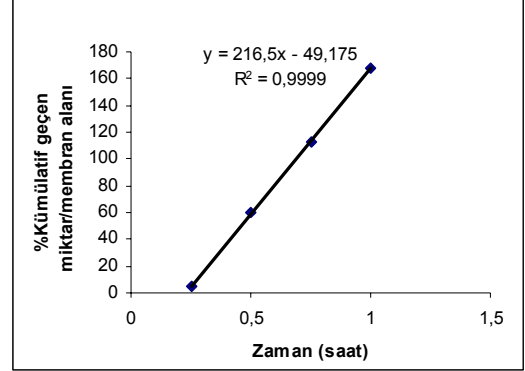
Şekil 71. MDCK hücrelerinde Rivastigmin lipozomlarına ait log k değerlerinin hesaplandığı grafikler

a,b,c) Rivastigmin lipozom ile yapılan geçiş deneyleri, d,e,f) Rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren lipozomlarla yapılan geçiş deneyleri, g,h,i) Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomlarla yapılan geçiş deneyleri

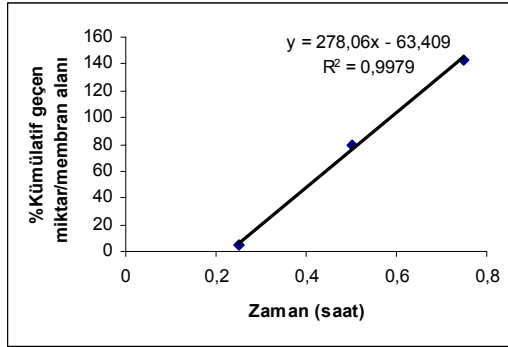
a.



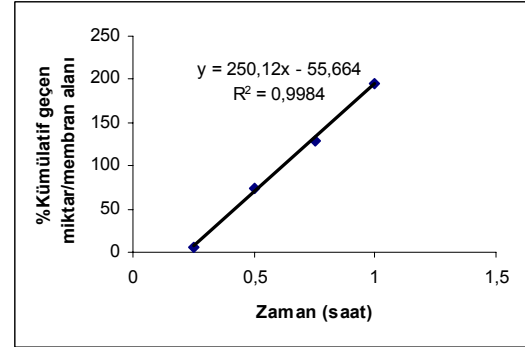
b.



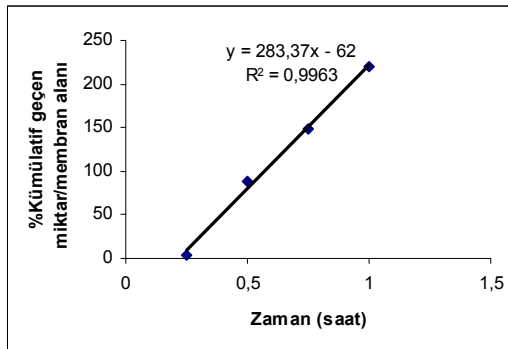
c.



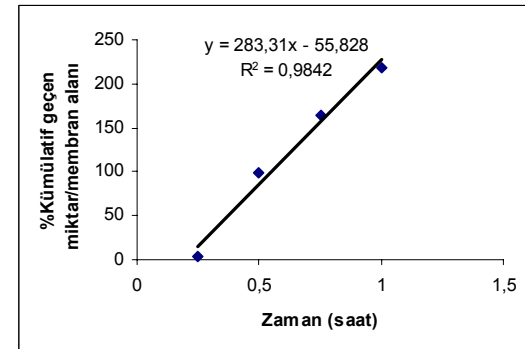
d.



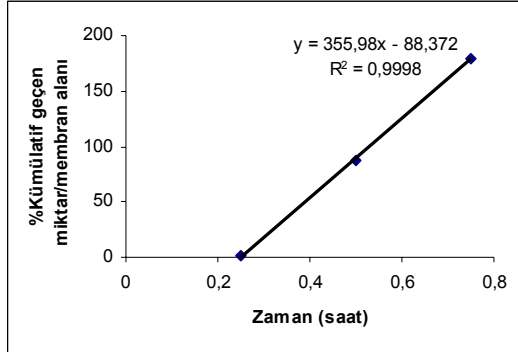
e.



f.



g.



Şekil 72. MDCK hücrelerinde Rivastigmin çözeltilerine ait log k değerlerinin hesaplandığı grafikler

a,b) Rivastigmin çözeltisi ile yapılan geçiş deneyleri, c,d) Rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren çözeltiyle yapılan geçiş deneyleri e,f) Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren çözeltisiyle yapılan geçiş deneyleri

4.6.3.2 MDCK Hücrelerinin Elektrik Dirençlerine Ait Bulgular

Elektriksel ölçümler Bölüm 3.2.7.1.2.2' de anlatıldığı biçimde yapılmış Tablo 36'da verilen sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 36. MDCK hücrelerinin geçiş deneylerinden sonraki elektriksel direnç değerlerinin ölçülmesi

Örnekler	Elektriksel Direnç (Ω)
Rivastigmin lipozomu	1308
Rivastigmin+dimetil- β -CD lipozomu	1010
Rivastigmin+sodyum taurokolat lipozomu	990

4.6.4 Diyaliz Membrandan Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular

Bölüm 3.7.2’de anlatıldığı şekilde hem çözeltilerin hem de lipozomların diyaliz membrandan geçiş özellikleri incelenmiştir. Lipozomlardan rivastigmin salım profilleri Şekil 73’de verilmiştir. pH 7.4 fosfat tamponunda tüm lipozom formülasyonları için zamana karşı % kümülatif salınan rivastigmin miktarının değişik kinetiklere olan uyumu incelenmiş (Tablo 37, 38, 39) ve rivastigmin salımının tüm lipozom formülasyonlarında en iyi birinci derece kinetiğine uyum sağladığı görülmüştür.

Lipozomlarda yapılan işlemler aynı şekilde çözeltiler için de gerçekleştirilmiş, % kümülatif salınan rivastigmin miktarları hesaplanmıştır (Şekil 74). Çözeltiler için de zamana karşı % kümülatif salınan rivastigmin miktarının değişik kinetiklere olan uyumu incelenmiş (Tablo 40, 41, 42) ve rivastigmin salımının tüm çözelti geçişlerinde RRSBW kinetiğine uyum sağladığı görülmüştür.

Tablo 37. Rivastigmin lipozom formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, rivastigminin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

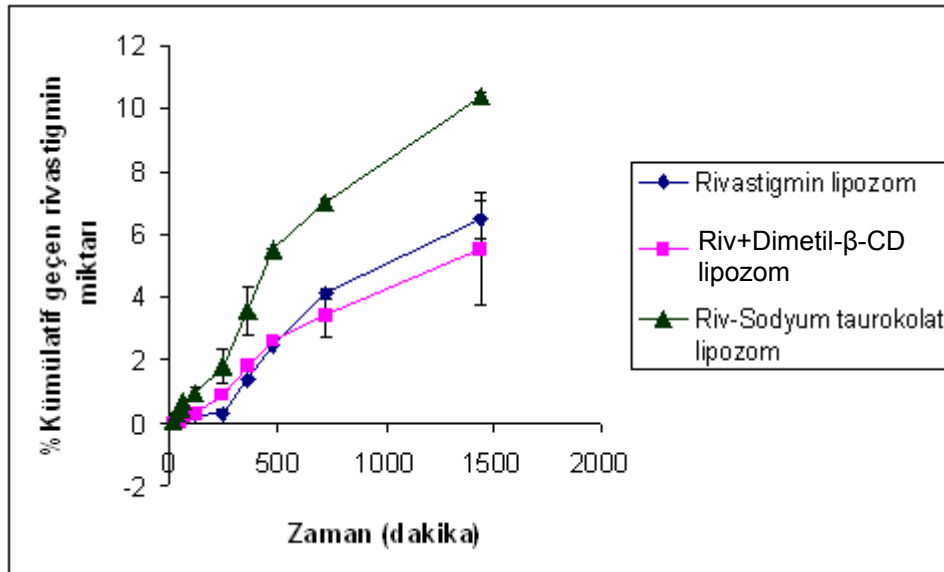
Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r^2	SKT
Birinci derece	-0.030	4.6069	0.9696	1.3290
Hixson Crowel	0.0046	-0.0026	0.9691	1.6363
Sıfır derece	0.290	0.1589	0.9680	1.6414
RRSBW	1.2083	-6.542	0.9612	2.3000
BTA	1.2062	-12.5793	0.9613	2.3137
Higuchi	1.4850	-12.5793	0.9138	3.7402

Tablo 38. Rivastigmin-Dimetil-B-CD lipozom formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, rivastigminin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	-0.0025	4.6049	0.9729	0.8458
Hixson Crowel	0.0039	0.0004	0.9720	0.8802
Sıfır derece	0.2488	0.0343	0.9703	0.9423
RRSBW	1.5553	7.1394	0.9475	25.7195
BTA	1.5534	-14.5990	0.9473	26.9324
Higuchi	1.3008	-1.1402	0.9703	0.9316

Tablo 39. Rivastigmin-Sodyum taurokolat lipozom formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, rivastigminin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	-0.0048	4.6016	0.9695	3.3520
Hixson Crowel	0.0073	0.0058	0.9564	6.0444
Sıfır derece	0.4579	0.3962	0.9528	6.7603
RRSBW	1.0342	-5.2461	0.9783	9.2217
BTA	0.0072	-10.5658	0.9780	9.9409
Higuchi	2.4348	-1.8257	0.9695	3.3520



Şekil 73. Rivastigminin lipozomlardan pH 7.4 fosfat tamponunda 37±0.5 °C'deki salım profili (Tüm lipozomlar için n=2)

Tablo 40. Rivastigmin çözeltisinin pH 7.4 fosfat tamponunda 37±0.5 °C’de diyaliz membrandan geçişinin kinetik değerlendirilmesi

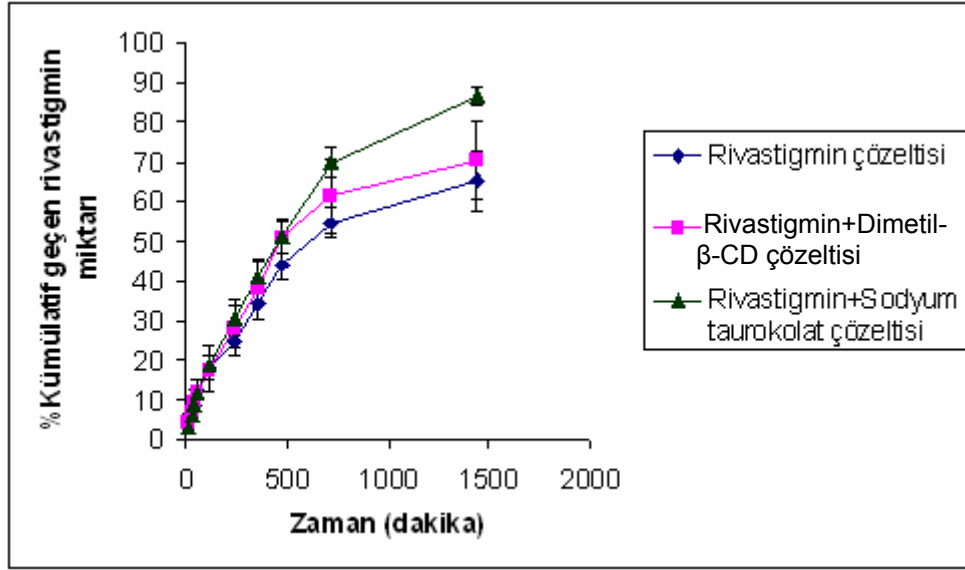
Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	-0.0441	4.4963	0.9393	210.0012
Hixson Crowel	0.0571	0.1772	0.9194	1144.239
Sıfır derece	2.6477	11.9218	0.8732	1929.7064
RRSBW	0.6957	-2.0864	0.9940	47.1732
BTA	0.6617	-5.9227	0.9936	61.4186
Higuchi	14.7707	-2.3203	0.9783	87.1828

Tablo 41. Rivastigmin ve Dimetil-B-CD çözeltisinin pH 7.4 fosfat tamponunda 37±0.5 °C’de diyaliz membrandan geçişinin kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	-0.0526	4.4921	0.9214	326.0371
Hixson Crowel	0.0665	0.1860	0.8976	1294.8323
Sıfır derece	2.9599	12.5248	0.8440	2377.4906
RRSBW	0.7602	-2.847	0.9941	87.3189
BTA	0.7194	-6.1596	0.9927	124.7258
Higuchi	16.5858	-3.7457	0.9655	178.8129

Tablo 42. Rivastigmin ve Sodyum taurokolat çözeltisinin pH 7.4 fosfat tamponunda 37±0.5 °C’de diyaliz membrandan geçişinin kinetik değerlendirilmesi

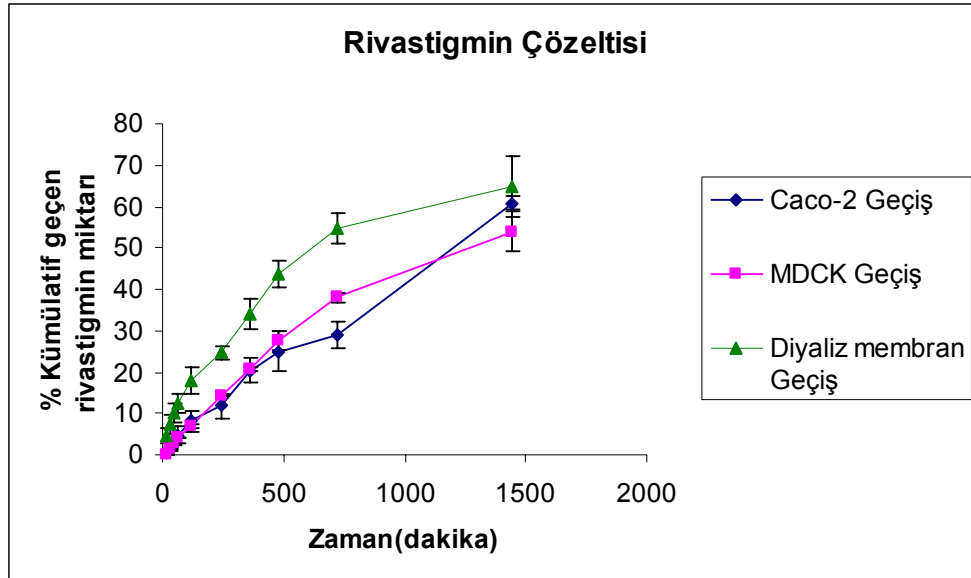
Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	-0.0845	4.5664	0.9921	38.6788
Hixson Crowel	0.0961	0.1222	0.9735	478.2591
Sıfır derece	3.6697	11.3088	0.9007	2020.4045
RRSBW	0.9094	-2.1847	0.9960	31.6788
BTA	0.8511	-6.8001	0.9945	37.5441
Higuchi	20.2535	-7.9904	0.9876	92.6643



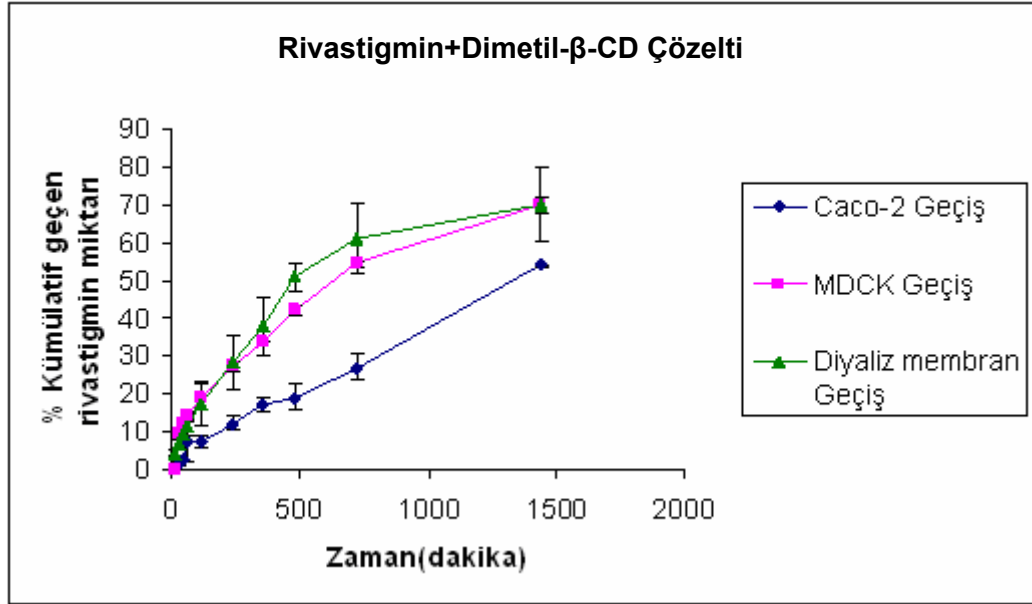
Şekil 74. Rivastigmin ve absorpsiyon artırıcı içeren çözeltilerin pH 7.4 fosfat tamponunda 37±0.5 °C'deki geçişi (Tüm çözeltiler için n=3)

4.6.5 Caco-2, MDCK ve Diyaliz Membrandan Geçiş Çalışmalarının Karşılaştırılması

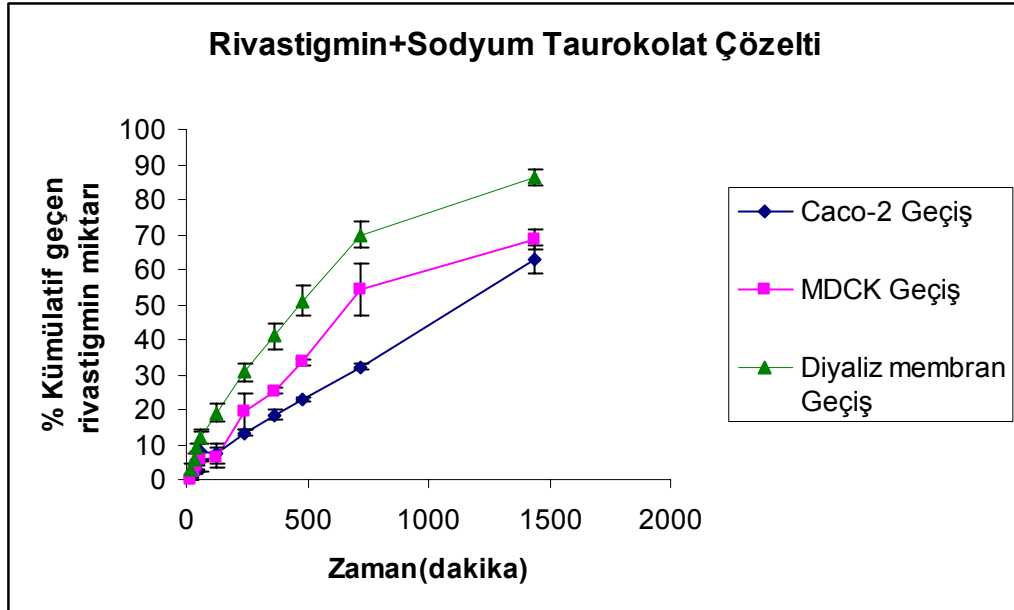
Bu bölümde geçiş çalışmaları yapılan tüm formülasyonlar için Caco-2, MDCK ve diyaliz membran geçiş deneyleri sonucunda elde edilen % kümülatif geçen rivastigmin miktarları grafiklerle Şekil 75-80'de gösterilmiştir.



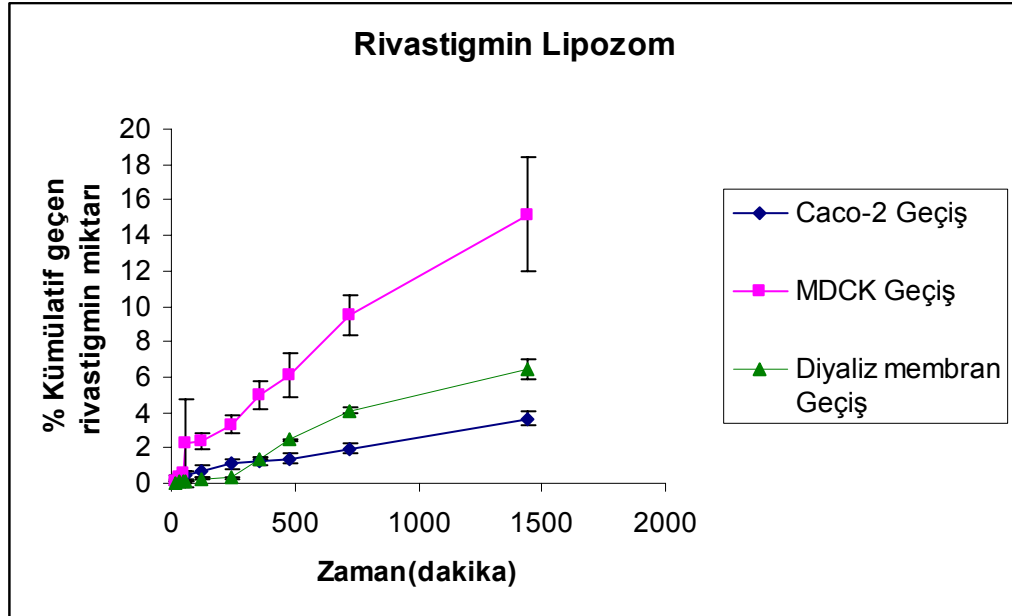
Şekil 75. Rivastigmin çözeltisine ait % kümülatif geçen miktarlar



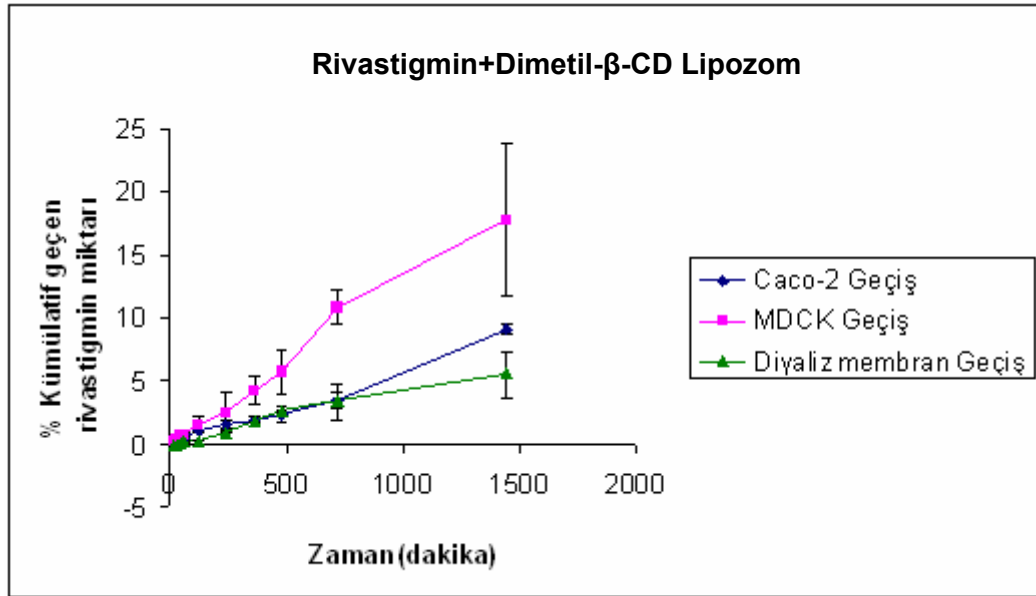
Şekil 76. Rivastigmin+Dimetil- β -CD çözeltisine ait % kümülatif geçen miktarlar



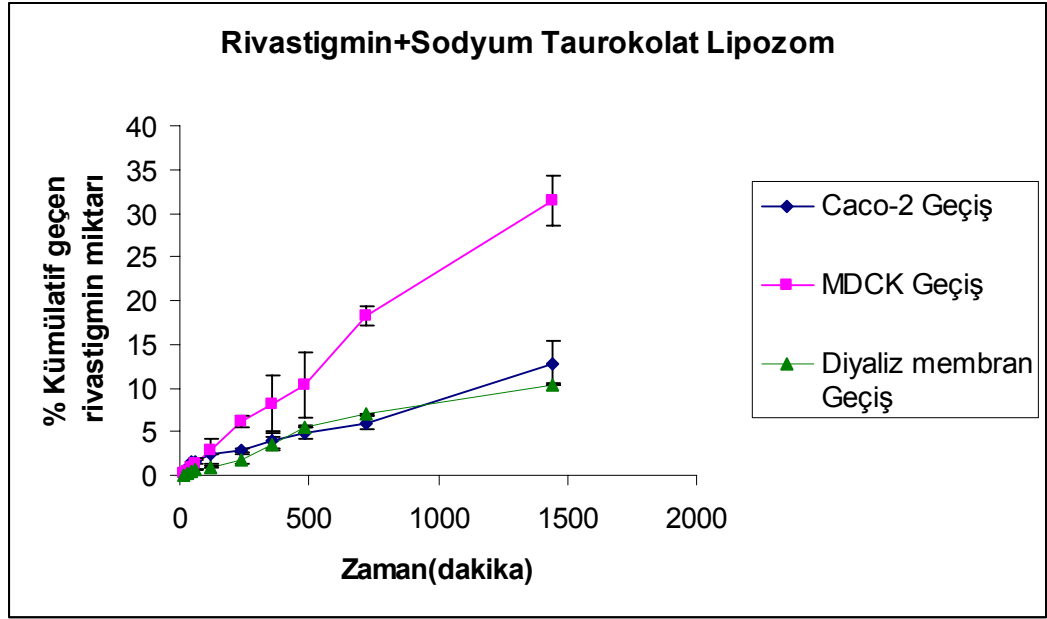
Şekil 77. Rivastigmin+Sodyum taurokolat çözeltisine ait % kümülatif geçen miktarlar



Şekil 78. Rivastigmin lipozomuna ait % kümülatif geçen miktarlar



Şekil 79. Rivastigmin+Dimetil- β -CD lipozomuna ait % kümülatif geçen miktarlar



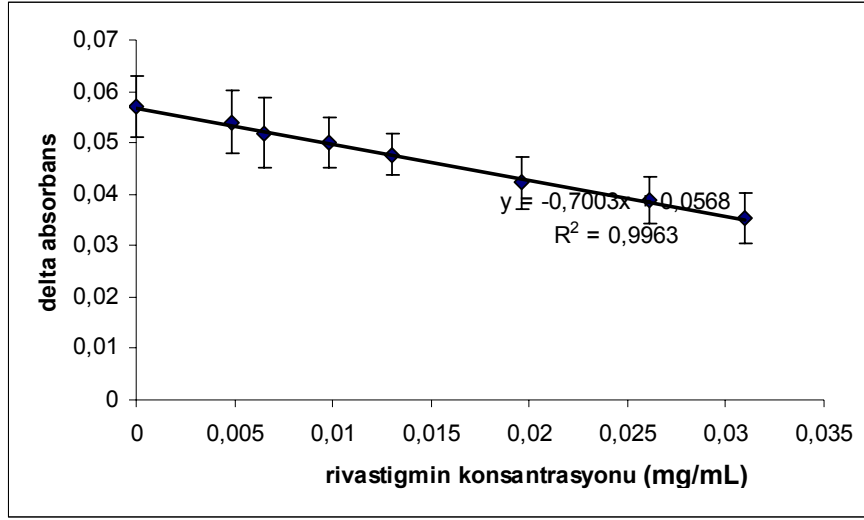
şekil 80. Rivastigmin+Sodyum taurokolat lipozomuna ait % kümülatif geçen miktarlar

4. 7 İN VİVO SONUÇLAR

4.7.1 Validasyon Bulguları (KAN)

4.7.1.1 Doğrusallık

alışmalar bölüm 3.2.8.5.1.1 'de anlatıldığı gibi yapıldı. Elde edilen kalibrasyon grafiğı şekil 81'de verilmiştir.



Şekil 81. Rivastigminin kanda doğrusallık sonuçları

4.7.1.2 Doğruluk ve Geri Elde

Çalışmalar bölüm 3.2.8.5.1.2 'de anlatıldığı gibi yapıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 43'de görülmektedir.

Tablo 43. Rivastigminin kanda doğruluk ve geri elde sonuçları

Çözeltideki rivastigmin yüzdesi	Çözeltideki rivastigmin miktarı(µg)	Hesapla bulunan rivastigmin miktarı ± G.S	B.S ortalama
%80	15.70	15.80±0.34	1.83
%100	19.60	19.70± 0.82	3.65
%120	23.50	23.38 ± 0.70	2.48

4.7.1.3 Kesinlik

Çalışmalar bölüm 3.2.8.5.1.3'te anlatıldığı gibi yapıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 44'de görülmektedir.

Tablo 44 . Rivastigminin kanda kesinlik sonuçları

Örnek No	Rivastigmin Çözeltilisinin Derişimi (µg/mL)	Hesapla Bulunan Rivastigmin Çözeltilisi Derişimi(µg/mL)
1	26.10	26.14
2	26.10	26.22
3	26.10	26.31
4	26.10	26.01
5	26.10	26.13
6	26.10	26.32
7	26.10	26.24
8	26.10	26.04
9	26.10	26.09
10	26.10	26.18
Ortalama	26.10	26.17
S.S		0.11
B.S		0.42
± Güven sınırı		0.07

4.7.1.4 Özgünlük ve Seçicilik

Çalışmalar bölüm 3.2.8.5.1.4'te anlatıldığı gibi yapıldı. Rivastigminin absorbands verdiği dalga boyunda sodyum taurokolat'ın ve dimetil-β-CD'nin absorbands vermediği gösterildi. Yöntemin AChE tayinine uygun oluşuna karar verildi.

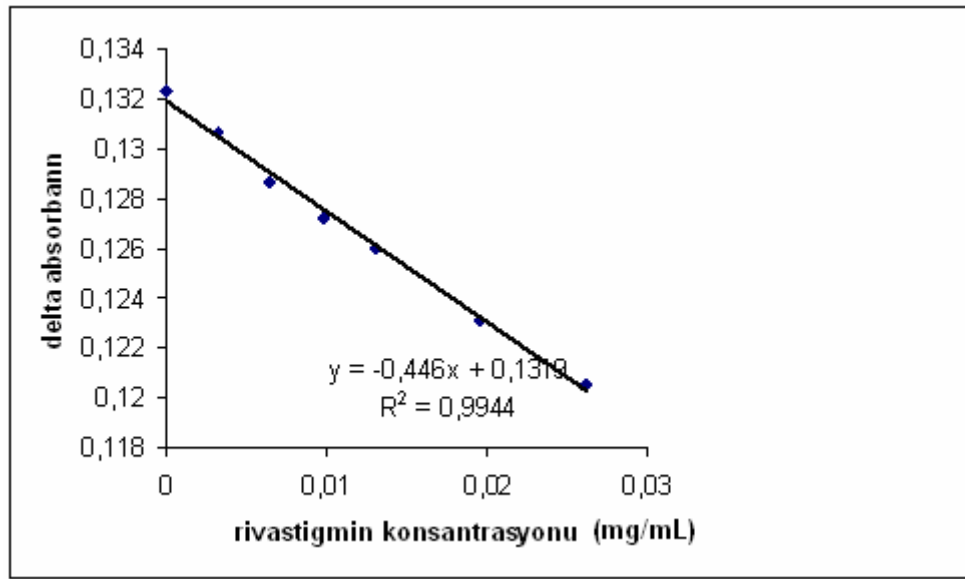
4.7.1.5 Duyarlılık ve saptama sınırı

Hesaplar bölüm 3.2.2.5'de verilen formüllere göre yapıldı. Analitik yöntemin duyarlılığı 1.8 µg/mL, saptama sınırı 5.94 µg/mL olarak bulundu.

4.7.2 Validasyon Bulguları (BEYİN)

4.7.2.1 Doğrusallık

Çalışmalar bölüm 3.2.8.5.2.1 'de anlatıldığı gibi yapıldı. Elde edilen kalibrasyon grafiği Şekil 82'de verilmiştir.



Şekil 82. Rivastigminin beyinde doğrusallık sonuçları

4.7.2.2 Doğruluk ve Geri Elde

Çalışmalar bölüm 3.2.8.5.1.2'de anlatıldığı gibi yapıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 45 'de görülmektedir.

Tablo 45. Rivastigminin beyinde doğruluk ve geri elde sonuçları

Çözeltideki rivastigmin yüzdesi	Çözeltideki rivastigmin miktarı(µg)	Hesapla bulunan rivastigmin miktarı ± G.S	B.S ortalama
%80	15.30	15.16±0.16	2.05
%100	19.10	19.30 ± 0.14	1.39
%120	22.90	23.10 ± 0.12	1.98

4.7.2.3 Kesinlik

Çalışmalar bölüm 3.2.8.5.1.3 'te anlatıldığı gibi yapıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 46'da görülmektedir.

Tablo 46. Rivastigminin beyinde kesinlik sonuçları

Örnek No	Rivastigmin Çözeltilisinin Derişimi (mg/mL)	Hesapla Bulunan Rivastigmin Çözeltisi Derişimi(mg/mL)
1	19.10	19.30
2	19.10	20.12
3	19.10	18.34
4	19.10	18.98
5	19.10	18.73
6	19.10	20.76
7	19.10	18.85
8	19.10	18.74
9	19.10	19.81
10	19.10	19.36
Ortalama		19.30
S.S		0.74
B.S		3.83
± Güven sınırı		0.46

4.7.2.4 Özgünlük ve Seçicilik

Çalışmalar bölüm 3.2.8.5.1.4'te anlatıldığı gibi yapıldı. Rivastigminin absorbands verdiği dalga boyunda sodyum taurokolat'ın ve dimetil-β-CD'nin absorbands vermediği gösterildi. Yöntemin AChE tayinine uygun oluşuna karar verildi.

4.7.2.5 Duyarlılık ve Saptama Sınırı

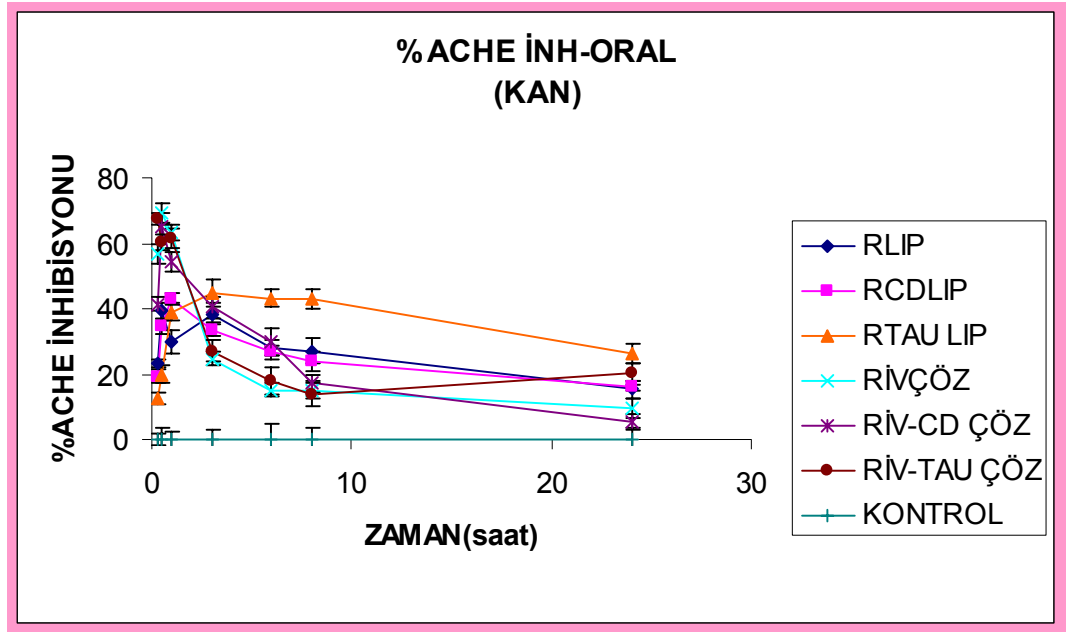
Hesaplar bölüm 3.2.2.5'de verilen formüllere göre yapıldı. Analitik yöntemin duyarlılığı 1.46 µg/mL, saptama sınırı 4.83 µg/mL olarak bulundu.

4.7.3 Hayvan Deneyleri Kan Sonuçları

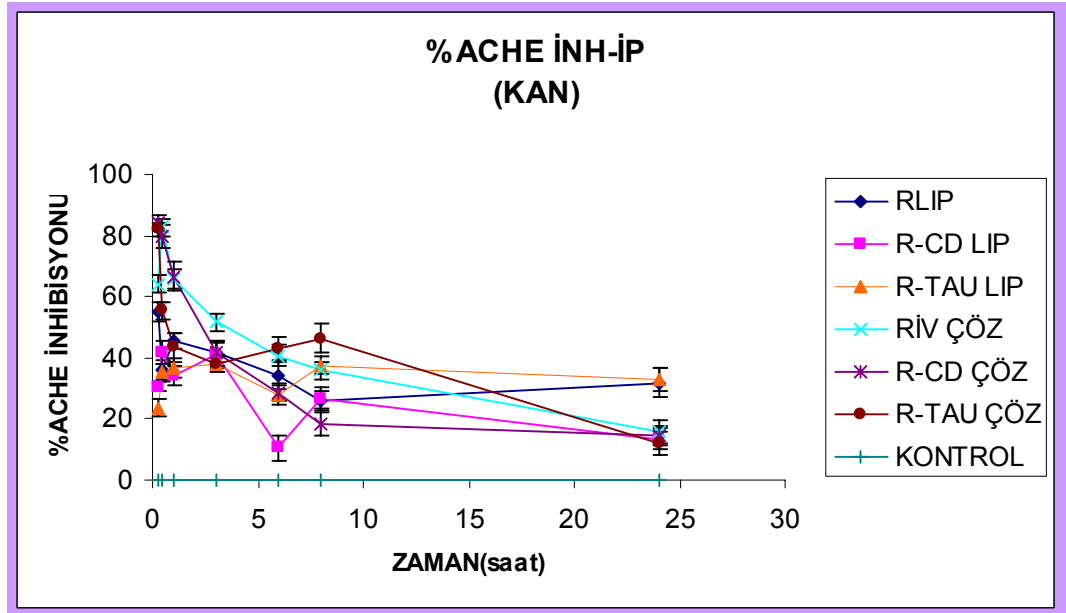
Hayvan deneyleri sonucunda alınan kan numuneleri Bölüm 3.2.8.5'te anlatıldığı gibi incelendi. % AChE inhibisyon oranları hesaplandı. Sonuçlar, Tablo 47'de ve Şekil 83 ve 84'de verilmiştir.

Tablo 47. Kan numuneleri incelenerek elde edilen AChE inhibisyon sonuçları

% İNHİBİSYON	15 DK	30 DK	1S	3S	6S	8S	24S
RLİP ORAL	23,20675	39,30041	29,86903	38,50412	28,1294	27,13465	15,25889
R-CD LİP ORAL	19,19831	34,5679	43,17702	33,6776	26,6526	23,98741	16,2203
R-TAU LİP ORAL	12,65823	19,89026	38,95226	45,05198	43,1083	43,07608	26,10905
BOŞ LİP ORAL	8,860759	16,11797	10,32953	10,22006	9,07173	0,041051	10,5892
RÇÖZ ORAL	56,96203	69,1358	63,24461	24,66586	15,18987	15,02463	9,765142
R-CD ÇÖZ ORAL	41,35021	64,9177	54,37262	40,46173	29,95781	17,11823	5,438813
R-TAU ÇÖZ ORAL	67,59494	60,28807	61,34347	26,89348	17,72152	13,58785	20,06593
RLİP İP	55,06329	35,80247	45,64146	41,8118	34,10689	26,24521	31,87749
R-CD LİP İP	30,59072	41,83813	34,09379	41,06926	10,54852	26,65572	13,47342
R-TAU LİP İP	23,48805	35,39095	36,83988	38,13285	28,05907	37,60263	33,00371
R ÇÖZ İP	64,13502	82,71605	65,77947	51,64034	40,78762	35,89217	15,7396
R-CD ÇÖZ İP	84,17722	79,73251	66,62442	41,47428	28,69198	18,4178	14,47833
R-TAU ÇÖZ İP	82,173	55,55556	43,59949	38,03159	43,03797	46,42857	11,8253
KONTROL	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 83. Oral verilen formülasyonlar sonucunda hesaplanan %AChE inhibisyonu sonuçları



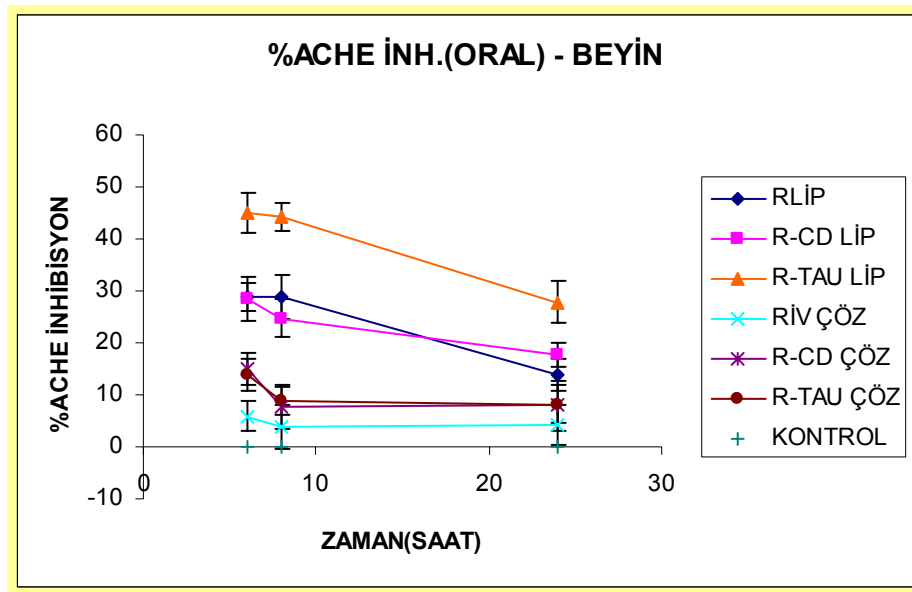
Şekil 84. İntraperitoneal verilen formülasyonlar sonucunda hesaplanan %AChE inhibisyonu sonuçları

4.7.4 Hayvan Deneyleri Beyin İnceleme Sonuçları

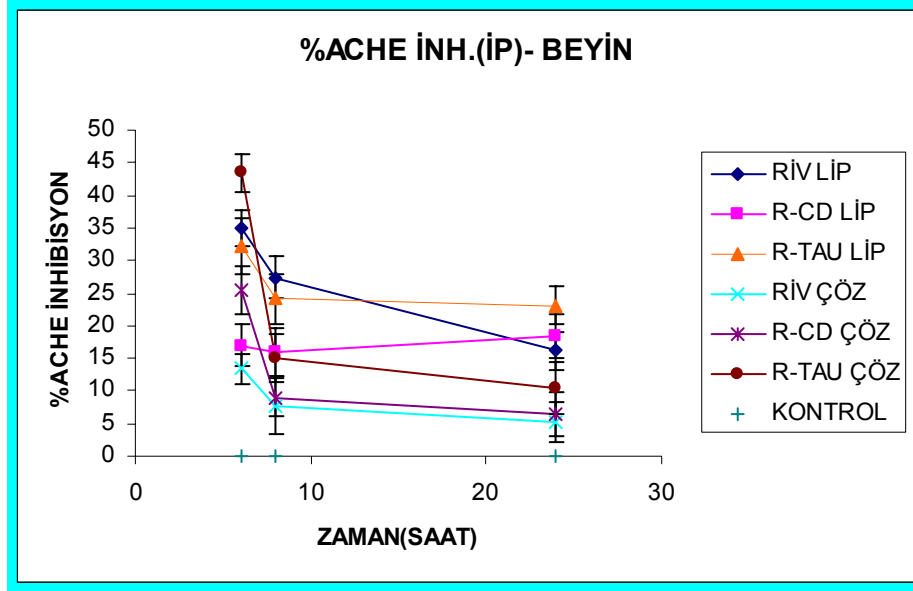
Hayvan deneyleri sonucunda alınan beyin numuneleri incelendi. %AChE inhibisyon oranları Bölüm 3.2.8.5'te anlatıldığı gibi hesaplandı. Sonuçlar, Tablo 48'de ve Şekil 85 ve 86'da verilmiştir.

Tablo 48. Beyin numuneleri incelenerek elde edilen AChE inhibisyon sonuçları

%İNHİBİSYON	6	8	24
RLİP ORAL	28,79177	28,88554	13,93035
R-CD LİP ORAL	28,61954	24,67866	17,66169
R-TAU LİP ORAL	44,93059	44,16384	27,8607
BOŞ LİP ORAL	10,40874	1,243875	11,69154
RÇÖZ ORAL	5,912596	3,756753	4,228856
R-CD ÇÖZ ORAL	14,91003	7,526071	7,960199
R-TAU ÇÖZ ORAL	13,79434	9,033798	8,208955
RLİP İP	35,06427	27,37781	16,16915
R-CD LİP İP	16,96658	16,06986	18,40796
R-TAU LİP İP	32,13368	24,11107	23,13433
R ÇÖZ İP	13,36761	7,777359	5,223881
R-CD ÇÖZ İP	25,44987	9,033798	6,467662
R-TAU ÇÖZ İP	43,44473	15,06471	10,44776
KONTROL	0	0	0



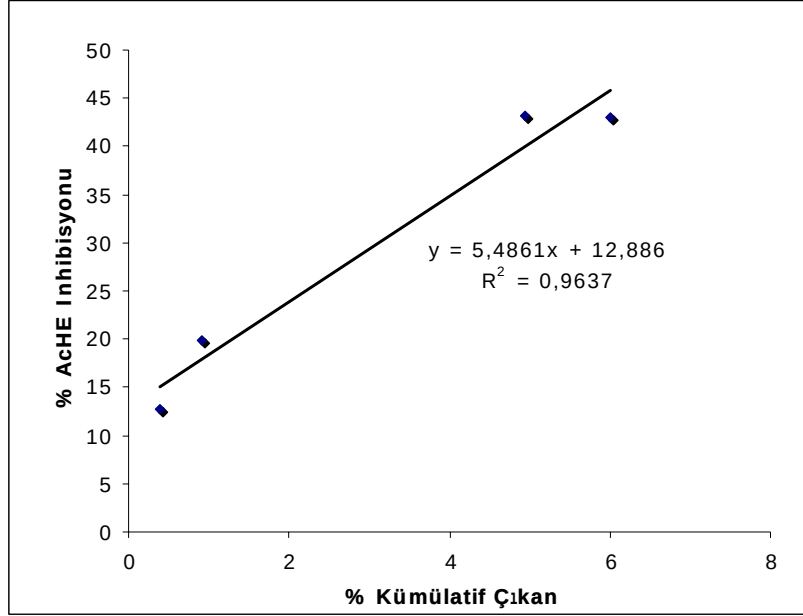
Şekil 85. Oral verilen formülasyonlar sonucunda hesaplanan %AChE inhibisyonu sonuçları



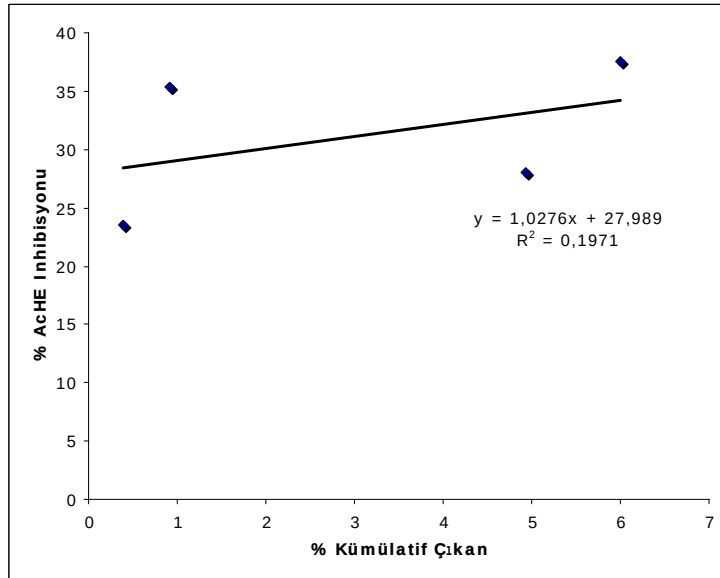
Şekil 86. İntraperitoneal yoldan verilen formülasyonlar sonucunda hesaplanan % AChE inhibisyonu sonuçları

4.7.5 İn vivo-İn vitro Korelasyon Çalışmaları

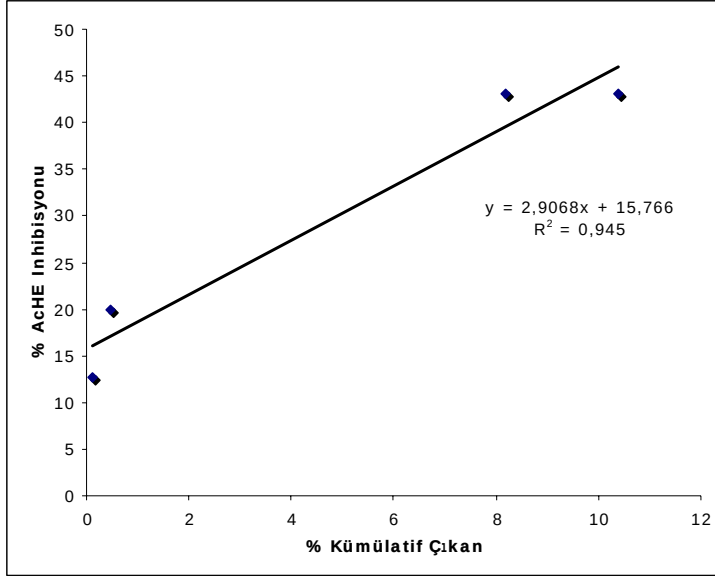
Bu bölümde MDCK ve Caco-2 hücrelerinden % kümülatif geçen rivastigmin miktarları ile hayvan deneyleri sonucunda hesaplanan % AChE inhibisyonu arasında ilişkilendirme yapılmıştır. Hücre kültürlerinden geçişi en fazla olan formülasyon sodyum taurokolat içeren lipozomdur. Hayvan deneylerinde hem kanda hem de beyinde en fazla % AChE inhibisyonu gerçekleştiren formülasyon oral yolla uygulanan ve intraperitoneal yolla verilen formülasyonların in vivo-in vitro korelasyonları yapılmıştır. Elde edilen grafikler Şekil 87-94'de verilmiştir.



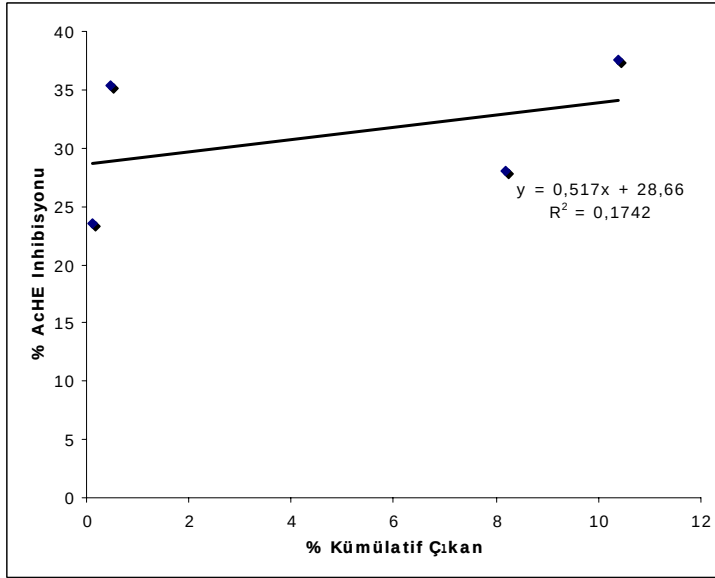
Şekil 87. Sodyum taurokolat lipozomlarının Caco-2 geçişi sonucunda elde edilen %kümülatif geçen miktarın oral yolla hayvanlara uygulanan taurokolat lipozomlarının % AChE inhibisyonu(kan) değerleri arasındaki ilişki



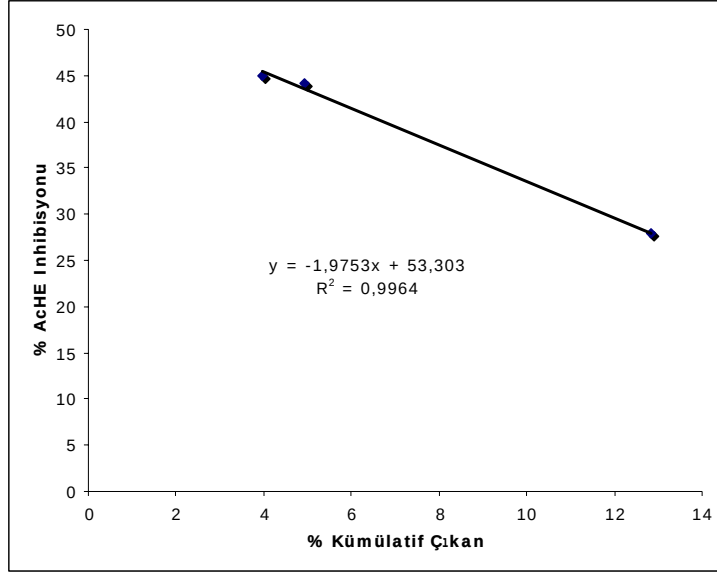
Şekil 88. Sodyum taurokolat lipozomlarının Caco-2 geçişi sonucunda elde edilen %kümülatif geçen miktarın intraperitoneal yolla hayvanlara uygulanan taurokolat lipozomlarının % AChE inhibisyonu(kan) değerleri arasındaki ilişki



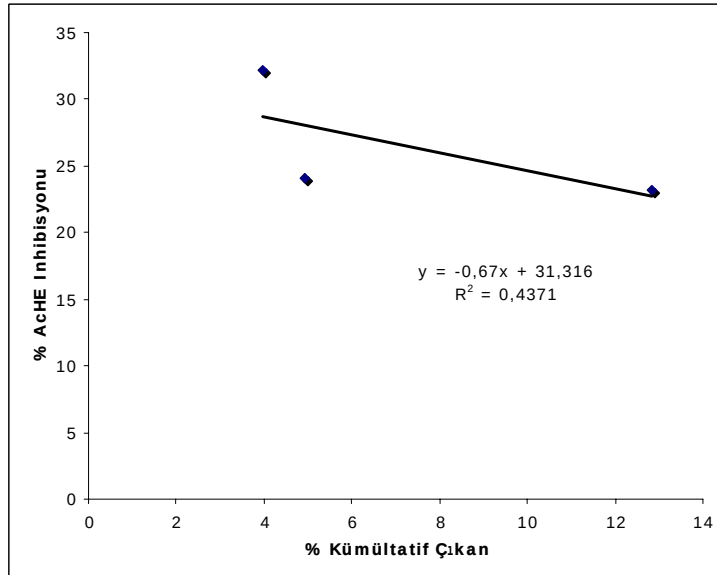
Şekil 89. Sodyum taurokolat lipozomlarının MDCK geçişi sonucunda elde edilen %kümülatif geçen miktarın oral yolla hayvanlara uygulanan taurokolat lipozomlarının % AChE inhibisyonu(kan) değerleri arasındaki ilişki



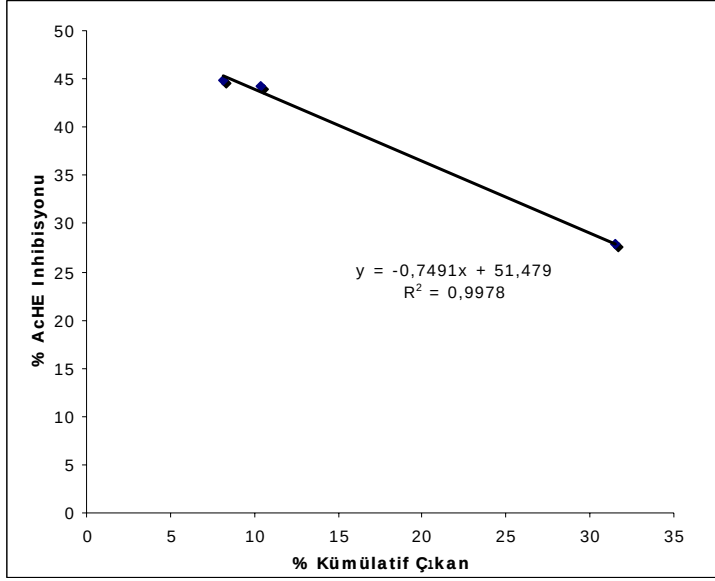
Şekil 90. Sodyum taurokolat lipozomlarının MDCK geçişi sonucunda elde edilen %kümülatif geçen miktarın intraperitoneal yolla hayvanlara uygulanan taurokolat lipozomlarının % AChE inhibisyonu(kan) değerleri arasındaki ilişki



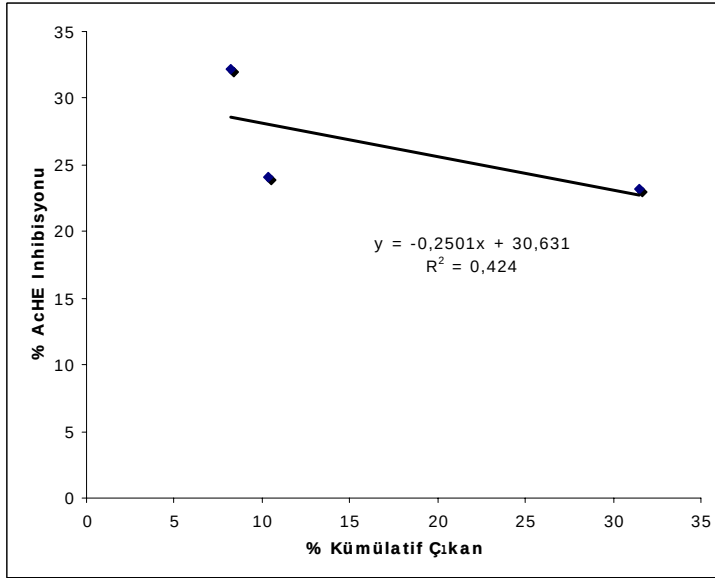
Şekil 91. Sodyum taurokolat lipozomlarının Caco-2 geçişi sonucunda elde edilen %kümülatif geçen miktarın oral yolla hayvanlara uygulanan taurokolat lipozomlarının % AChE inhibisyonu(beyin) değerleri arasındaki ilişki



Şekil 92. Sodyum taurokolat lipozomlarının Caco-2 geçişi sonucunda elde edilen %kümülatif geçen miktarın intraperitoneal yolla hayvanlara uygulanan taurokolat lipozomlarının % AChE inhibisyonu (beyin) değerleri arasındaki ilişki



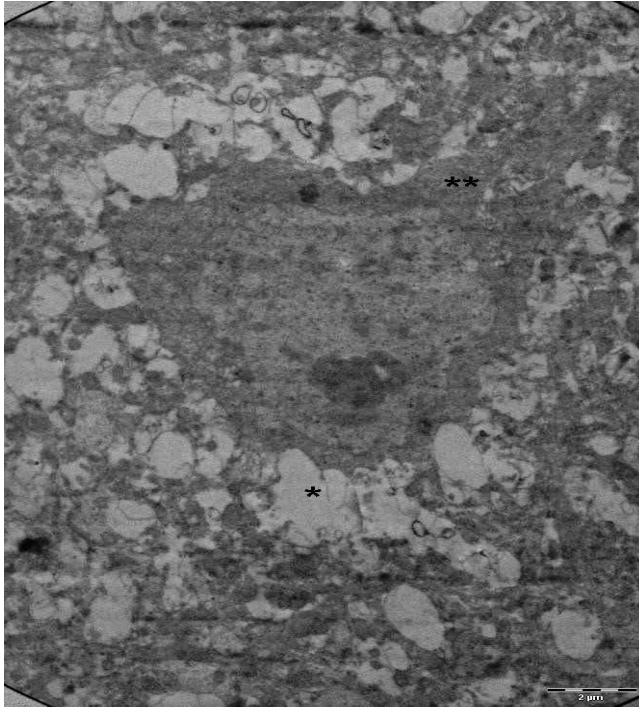
Şekil 93. Sodyum taurokolat lipozomlarının MDCK geçişi sonucunda elde edilen %kümülatif geçen miktarın oral yolla hayvanlara uygulanan taurokolat lipozomlarının % AChE inhibisyonu (beyin) değerleri arasındaki ilişki



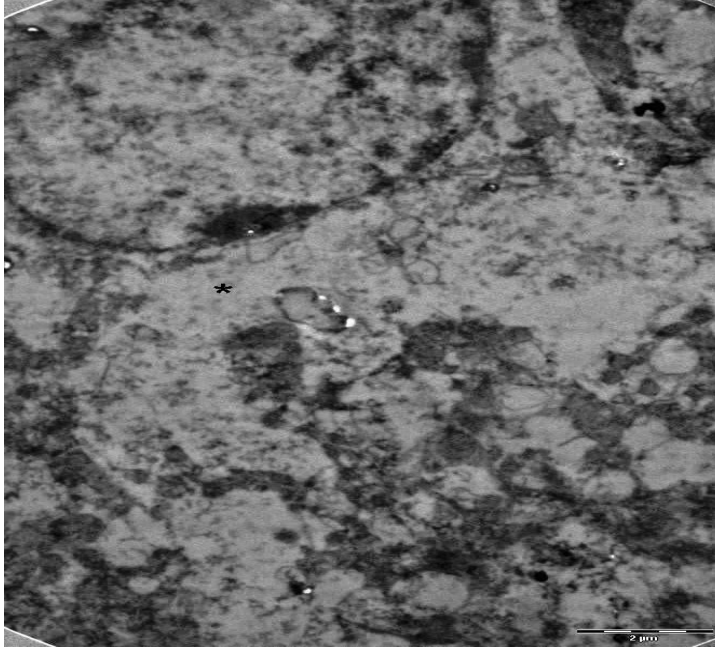
Şekil 94. Sodyum taurokolat lipozomlarının MDCK geçişi sonucunda elde edilen %kümülatif geçen miktarın intraperitoneal yolla hayvanlara uygulanan taurokolat lipozomlarının % AChE inhibisyonu(beyin) değerleri arasındaki ilişki

4.7.6 Histolojik Bulgular

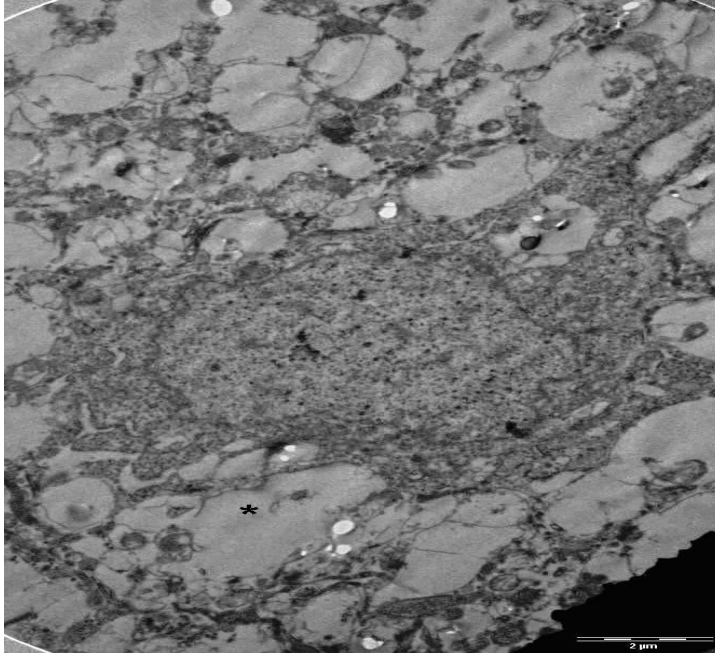
Rivastigmin çözletisi veya lipozomu verilen hayvanlardan alınan beyin örnekleriyle çekilen TEM mikroskobu görüntüleri Şekil 95-113'de gösterilmiştir.



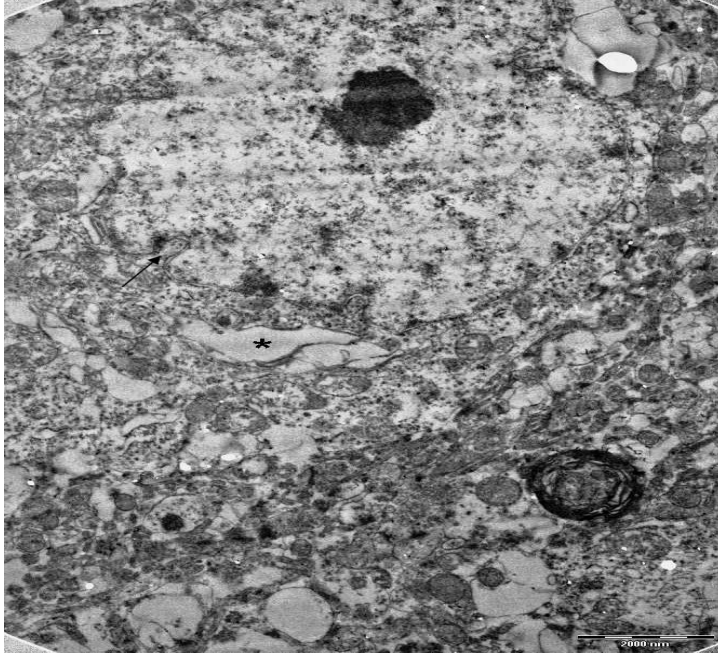
**Şekil 95. Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozom uygulanmış(oral yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü, *: hücreler arası boşluk
: nöronal büzülme (x6000)



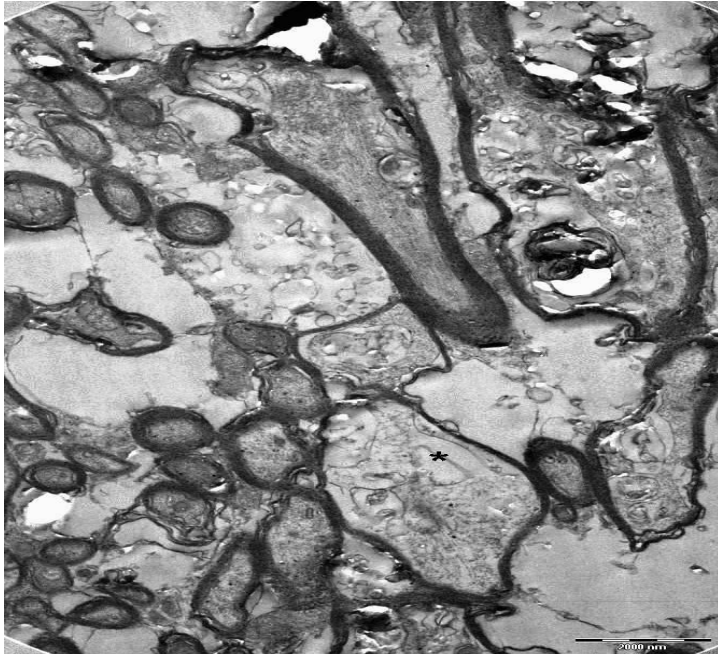
Şekil 96. Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozom uygulanmış(oral yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü, *: vakuolizasyon (x8200)



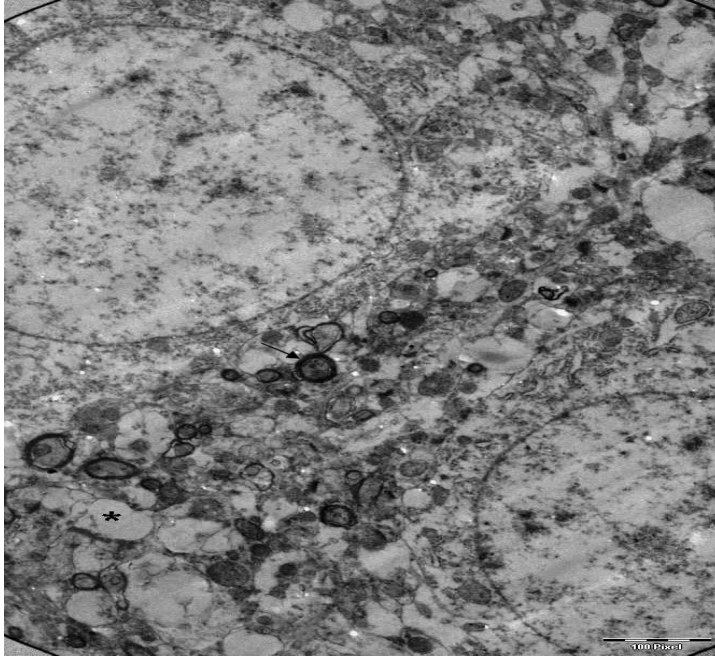
Şekil 97. Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren çözelti uygulanmış(oral yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü, *: hücreler arası boşluk (x8200)



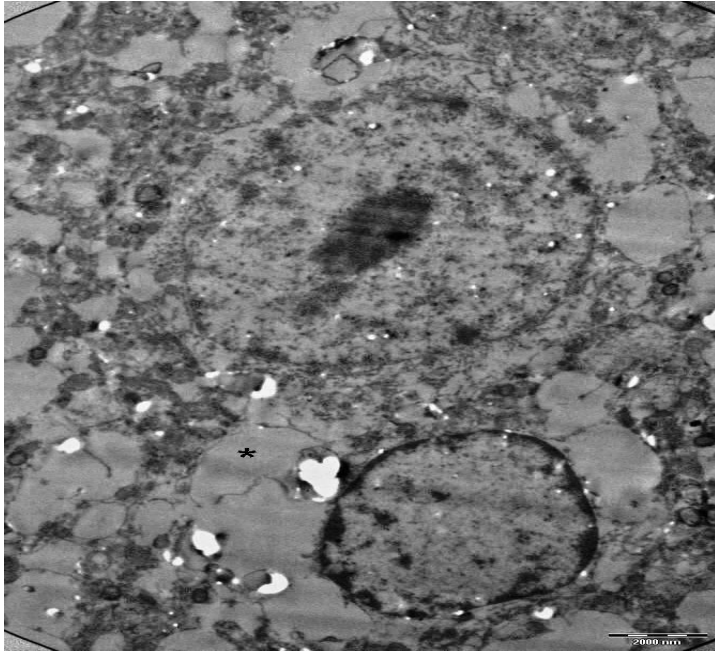
Şekil 98 . Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozom uygulanmış(ip yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü, *: endoplazmik retikulum sistarnası (x8200), ok: çekirdek çukurlaşması (x8200)



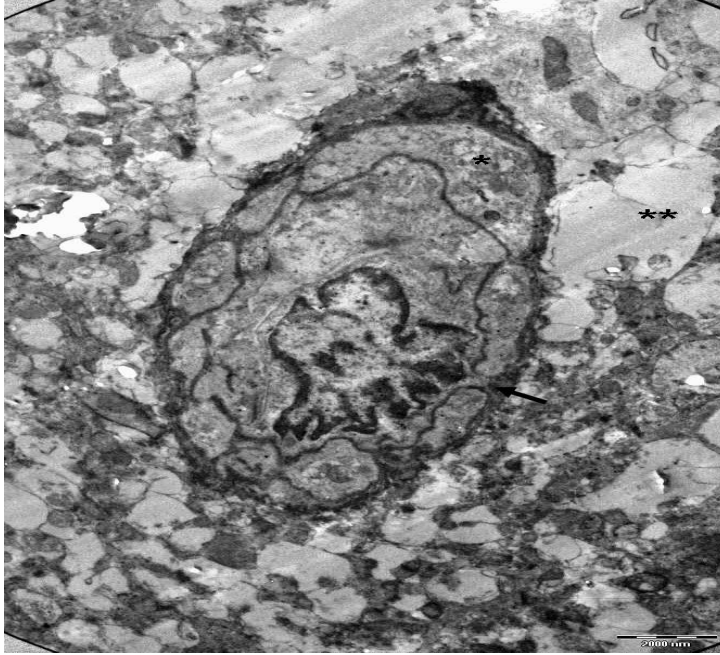
Şekil 99. Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren çözelti uygulanmış(ip yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü, *: miyelinli sinir uçları (x8200)



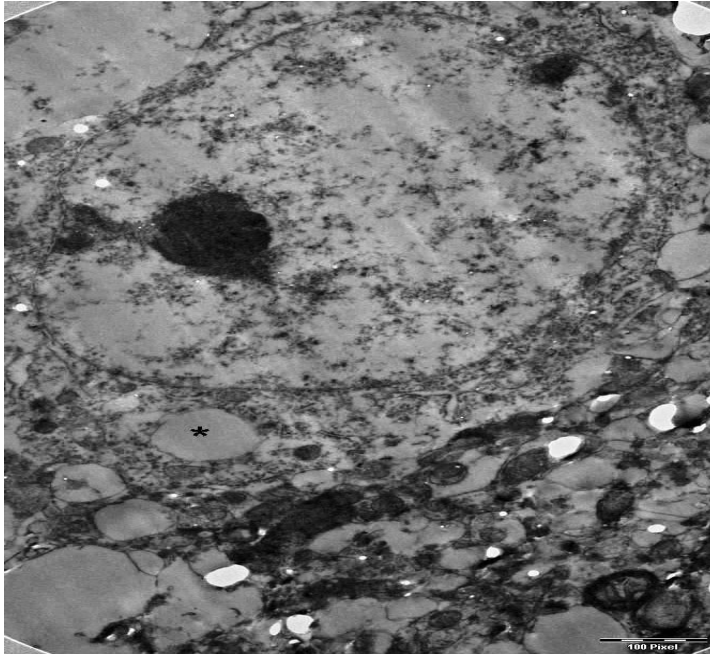
Şekil 100. Rivastigmin ve dimetil-β-CD içeren lipozom uygulanmış(ip yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü, *: hücreler arası boşluk (x6000)



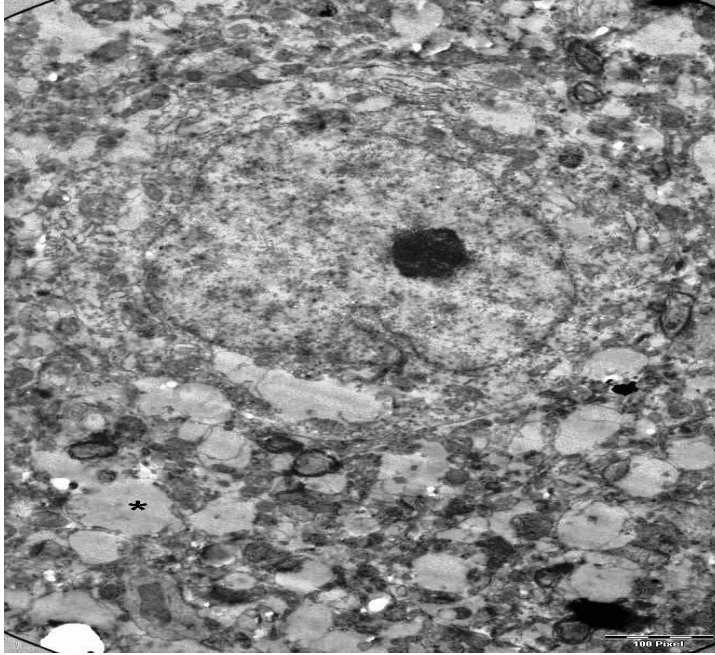
Şekil 101. Rivastigmin ve dimetil-β-CD içeren lipozom uygulanmış(oral yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü, ok: endotelial açıklık, * :endotel hücresi **vakuolizasyon (x6000)



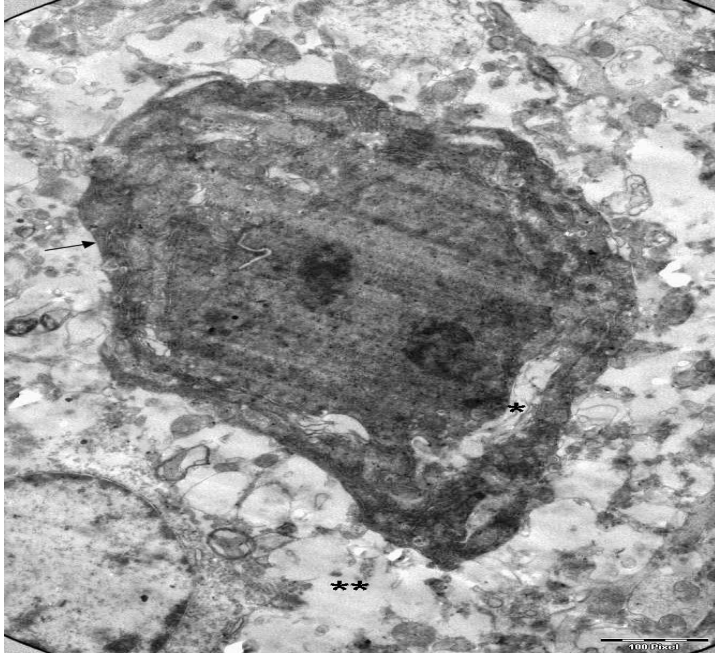
Şekil 102. Rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren çözelti uygulanmış(ip yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü, ok: sinir ucu, *: nöronal vakuolizasyon (x6000)



Şekil 103. Rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren çözelti uygulanmış(oral yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü, ok: sinir ucu, *: nöronal vakuolizasyon (x8200)



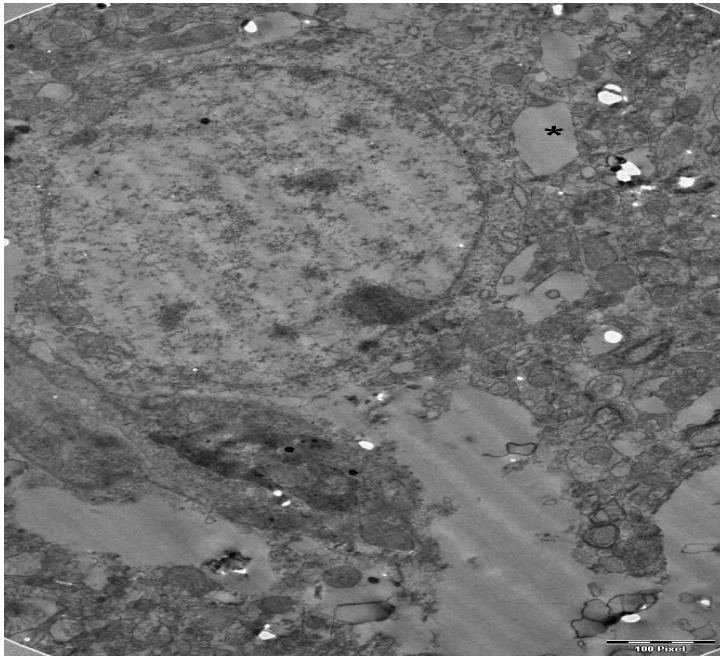
Şekil 104. Rivastigmin çözeltisi uygulanmış(ip yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü, *: nöronal vakuolizasyon (x6000)



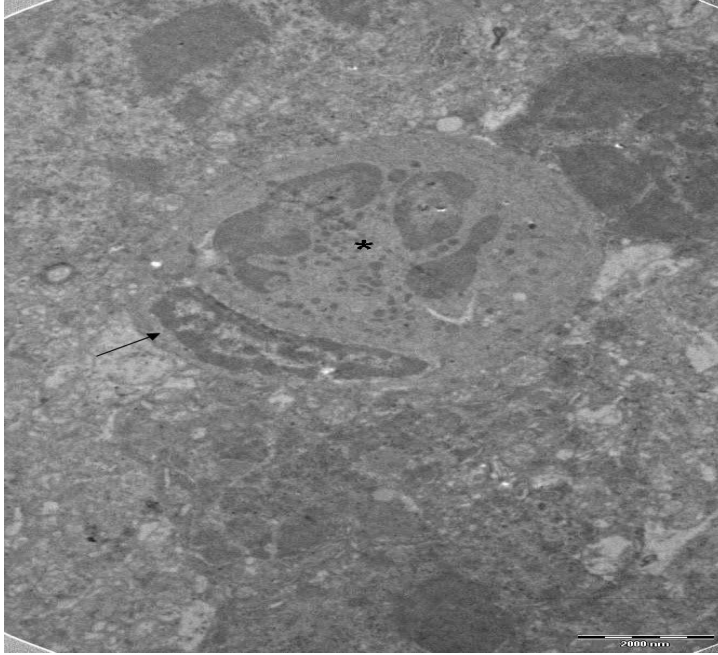
Şekil 105. Rivastigmin çözeltisi uygulanmış(ip yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü, *: endoplazmik retikulum sisternası, **: hücreler arası boşluk ve vakuolizasyon, ok: büzülmüş nöron (x6000)



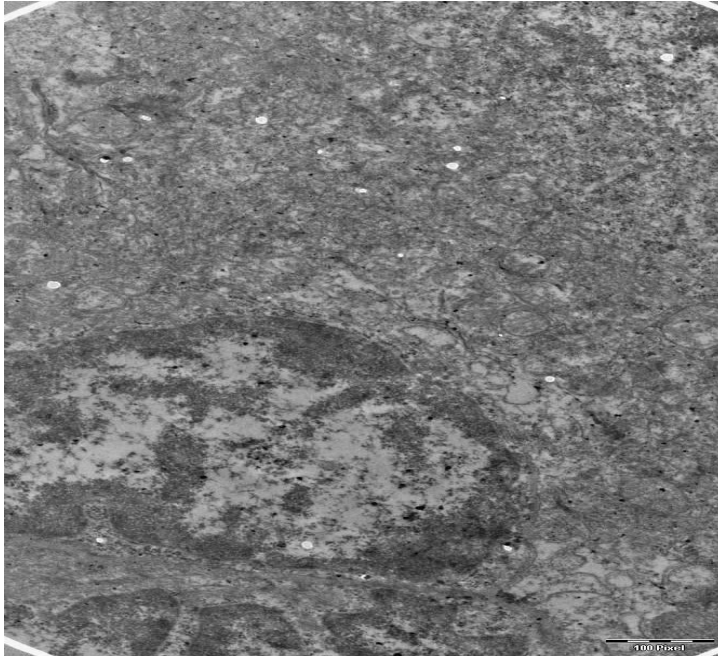
Şekil 106. Rivastigmin çözeltisi uygulanmış(ip yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü, *: endoplazmik retikulum sisternası, **: vakuolizasyon (x8200)



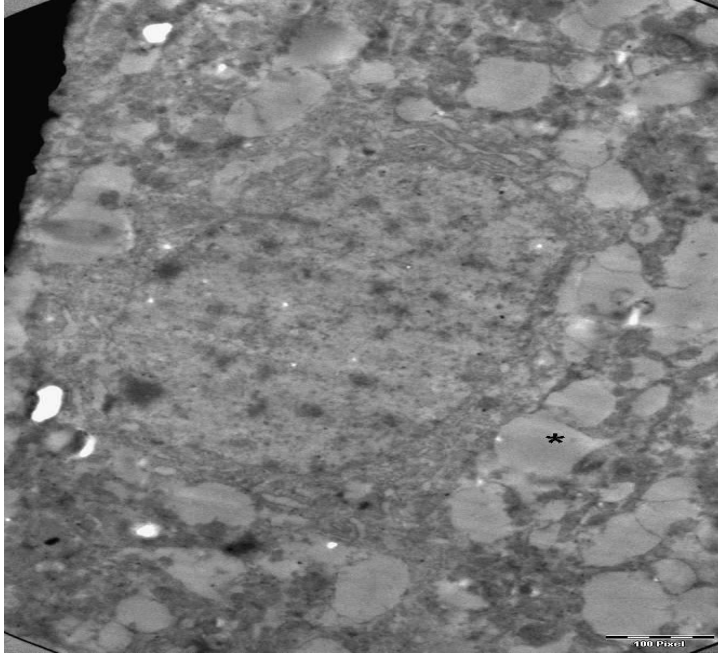
Şekil 107. Boş lipozom uygulanmış(oral yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü, *: endoplazmik retikulum sisternası (x8200)



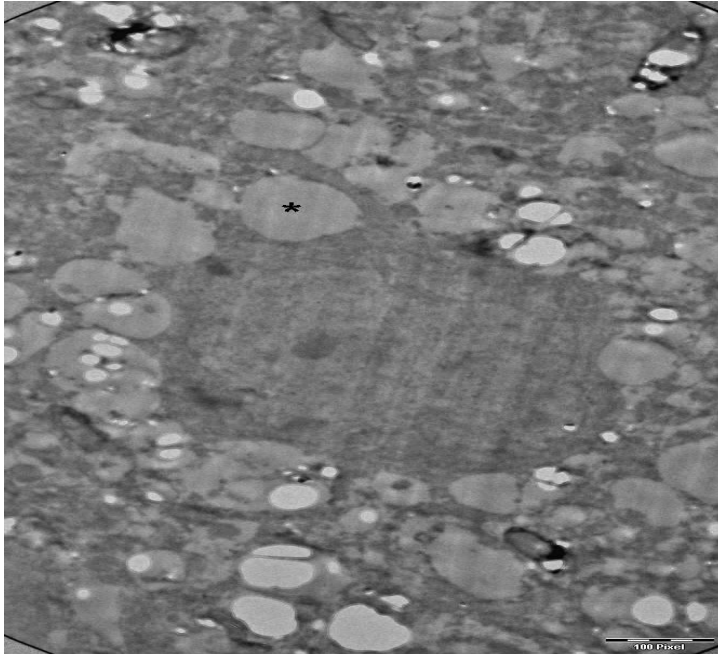
Şekil 108. Hiç bir formülasyon uygulanmayan(kontrol grubu) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü, *: nötrofil , ok: endotel hücresi (x8200)



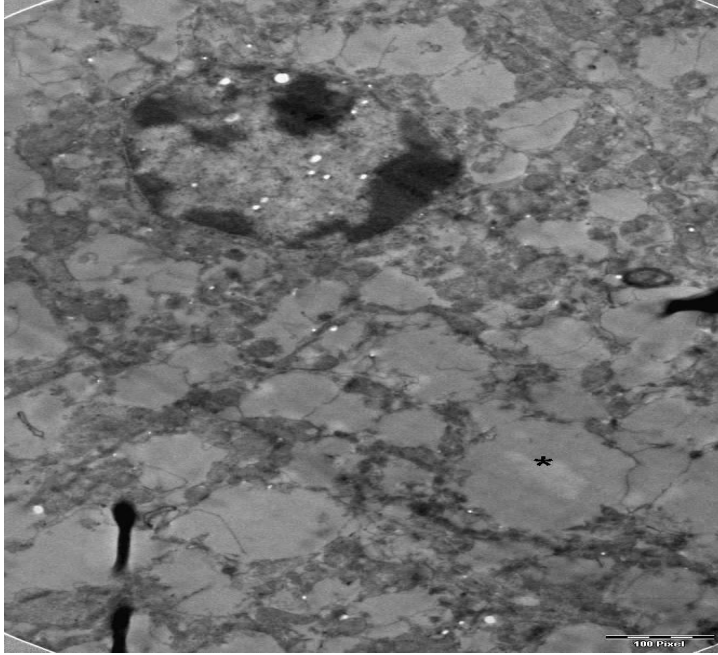
Şekil 109. Hiç bir formülasyon uygulanmayan(kontrol grubu) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü, *: nötrofil , ok: endotel hücresi (x16500)
Vakuolizasyon gözlenmedi.



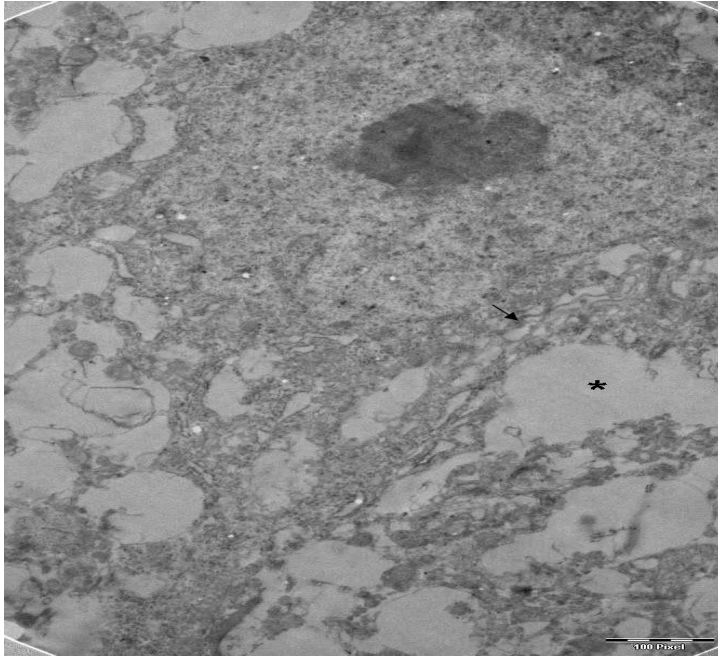
Şekil 110. Boş lipozom uygulanmış(ip yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü, *: nöronal vakuoliasyon (x6000)



Şekil 111. Rivastigmin lipozomu uygulanmış(ip yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü, *: nötrofil vakuolizasyonu (x6000)



Şekil 112. Rivastigmin lipozomu uygulanmış(oral yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü, *: hücreler arası boşluk (x8200)



Şekil 113. Rivastigmin lipozomu uygulanmış(oral yoldan) fare beyninin TEM mikroskobu ile çekilen görüntüsü, *: nötrofil vakuolizasyonu, ok: golgi sisternası (x8200)

5. TARTIŞMA

5.1 Analiz Yöntemlerinin Seçimi

5.1.1 Rivastigmin için Analiz Yönteminin Seçimi

Çalışmamızda rivastigmin içeren lipozomların etkin madde miktar tayinlerinde, hücre kültürlerinden geçiş çalışmalarında ve in vitro diyaliz membran salım deneylerinde HPLC yöntemi kullanıldı.

Literatürlerde rivastigminin dozaj formlarından, plazma/beyin homojenatlarından miktar tayinlerinde HPLC, GC-MS, LC-MS yöntemleri kullanılmıştır.

Rivastigmin için dalga boyu taraması yapılmış ve dalga boyu 217 nm olarak bulundu. Literatürde belirtilen dalga boyu da 217 nm olduğu için HPLC yöntemi için literatürde anlatılan şartlar altında validasyon çalışmaları yapılmıştır³⁵. 217 nm dalga boyunda, akış debisi 1 mL/ dakika olarak C₁₈ kolon kullanılarak analizler yapılmıştır. Yöntem doğrusallık yönünden hem DMEM'li ortamda hem de pH 7.4 fosfat tamponunda değerlendirilmiştir. İki koşulda da kalibrasyon doğrusunun r^2 değerleri 0.999'un üstünde bulunmuştur. Formülasyonlarda bulunan absorpsiyon artırıcı maddelerin 217 nm dalga boyunda pik vermedikleri gözlenmiş, yöntemin rivastigmin tayinine uygun olduğuna karar verilmiştir. HPLC yöntemi her iki ortam için doğru, kesin, özgün, hassas ve stabil bulunmuştur.

5.1.2 Sodyum Taurokolat için Analiz Yönteminin Seçimi

Sodyum taurokolat analizlerinde HPLC yöntemi kullanılmıştır. Yöntem literatürde anlatıldığı gibi denenmiştir¹³⁸. 210 nm dalga boyunda,

akış debisi 0.8 mL/dakika olarak C₁₈ kolon kullanılarak analizler yapılmıştır. Validasyon çalışmaları yapılmış, kalibrasyon doğrusunun r² değerleri 0.999'un üstünde bulunmuştur. Aynı koşullarda rivastigminin pik vermediği gözlenmiş, yöntemin sodyum taurokolat miktar tayini için uygun olduğuna karar verilmiştir.

5.1.3 Dimetil-β-CD için Analiz Yönteminin Seçimi

Dimetil-β-CD analizlerinde spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır¹³⁹. Literatürde anlatıldığı biçimde 554 nm dalga boyunda validasyon çalışmaları yapılarak kalibrasyon doğrusunun r² değeri 0.998 bulunmuştur. Aynı koşullarda rivastigminin pik vermediği gözlenmiş, yöntemin dimetil-β-CD miktar tayini için uygun olduğuna karar verilmiştir.

5.2 MTT Yöntemine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Hücre kültür çalışmaları yapılmadan önce, deneylerde kullanılması düşünülen maddelerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmeli, deneylerde kullanılacak etkin ve yardımcı madde miktarları buna göre seçilmelidir. Sitotoksikite testi sonucunda hücre canlılık oranları % 50'nin üzerinde olmalıdır.

Hücrelerin canlılık oranlarının değerlendirilmesinde en yaygın kullanılan metot MTT testidir. MTT testi kolorimetrik bir yöntemdir. MTT testinin esası, sarı renkli çözünebilir özellikteki MTT boyasının, metabolik olarak aktif olan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat dehidrogenaz(SDH) enzimi ile koyu mavi renkli çözünmez özellikteki formazan ürününe dönüşmesidir (Şekil 16). Oluşan formazan ürünü çözünür hale getirilir ve oluşan mor renk spektrofotometrik olarak ölçülür.

MTT testleri Bölüm 3.2.5 'te anlatıldığı gibi Caco-2, MDCK ve L-929 hücrelerinde yapıldı. L-929 hücreleri geçiş çalışmalarında kullanılmayacak olmasına rağmen MTT testinde kullanıldı; çünkü L929 hücreleri sitotoksik çalışmalarda rutin olarak kullanılan bir hücre tipidir. Amaç, hücrelerden geçiş çalışmasını yapacağımız çözelti ve lipozom formülasyonlarını oluşturan etkin ve yardımcı maddeleri, hücreler canlı kalacak şekilde, maksimum hangi miktarlarda kullanabileceğinin görülmesidir.

Rivastigmin için, 6, 4.5, 3, 1.5, 1 mg/ml derişimlerde çözeltiler, sodyum taurokolat için; 20, 15, 7.5, 3.75, 1.875, 0.005 mM derişimlerde çözeltiler, dimetil-β-siklodekstrin için %5, %3, %1.5, %0.75, %0.375, %0.25, %0.15 siklodekstrin içeren çözeltiler, serumlu ve serumsuz DMEM ile ayrı ayrı hazırlandı. Çalışmaların hem serumlu hem de serumsuz DMEM'de gerçekleştirilmesinin nedeni serumun hücrelerin yaşayabilirliği üzerindeki etkisini gözlemlemektir. Serumun hücreler üzerinde olumlu etkileri vardır^{64,69}.

Lipozom formülasyonunda kullanılacak lipitlerin hücrelere etkisini görmek için etkin madde ve absorpsiyon artırıcı maddeler içermeyen, sadece dipalmitoil fosfatidil kolin(DPPC), kolesterol(Ch) ve metil selülozdan(MC) oluşan lipozomlar 250, 500 ve 750 µL'lik olarak hazırlandı ve MTT testine tabi tutuldu.

Tezimizde lipozom formülasyonu çalıştığımız ve uzun süreli etki görmeyi amaçladığımız için MTT testinin 24 saat için yapılmasına karar verilmiştir. Test sonuçları 24 saat hücrelerin canlı kalabildiğini göstermiş olduğundan, hücre kültürlerinden geçiş çalışmaları 24 saat gerçekleştirilmiştir.

Hücre kültür kaplarında MTT testi sonucunda meydana gelen renk değişimleri gözlemlendi. Test sonucunda hücre kontrol gruplarının mor renkte olduğu görüldü. Mor renkli hücre kontrol gruplarıyla aynı renkte olan kısımlardaki madde konsantrasyonlarının toksik etki meydana getirmedikleri veya meydana gelen mor renk tonunun hücre kontrol grubuna yakınlığına bağlı olarak meydana gelen toksik etkiyi kantitatif olarak değerlendirmek mümkündür. Test sonucu şeffaf renk oluşumuna neden olan madde derişimlerinin toksik olduğuna karar verilebilir. Kültür kaplarında gözle görülebilen renk değişimi bir ön izlenim verse de yeterli değildir. Analiz sonucunda elde edilen absorbans değerlerinden hareketle hesaplanan % canlılık değerlerinin derişime karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen grafiklerle kesin kantitatif sonuçlar elde edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, serumlu DMEM ile elde edilen % canlılık değerlerinin, serumsuz DMEM'e oranla daha yüksek olduğu görülmüş ve hücre kültüründen geçiş çalışmalarında serumlu DMEM kullanılmasına karar verilmiştir. Bu nedenle validasyon çalışmalarında serumlu DMEM kullanılmıştır. Sonuçlardan da anlaşılacağı gibi, besi ortamındaki serum varlığının rivastigmin, sodyum taurokolat ve dimetil- β -siklodekstrin'in Caco-2, MDCK ve L-929 hücreleri üzerindeki toksik etkilerinin azaltılmasına olumlu etkisi olduğu görülmektedir.

Yapılan literatür taramasında rivastigmin için herhangi bir hücre tipi üzerinde yapılan MTT testi sonuçlarına rastlanmamıştır. Rivastigminin Caco-2, MDCK ve L-929 hücrelerindeki % canlılık değerleri incelendiğinde, rivastigmin derişimi arttıkça % canlılık değerlerinin azaldığı görülmektedir. Hücre kültüründen geçiş çalışmalarında kullanılmak üzere rivastigmin derişimi % 1.5 olarak karar verilmiştir. % 1.5 rivastigmin derişiminin serumlu DMEM içerisindeki % canlılık sonuçları L-929

hücrelerinde % 64, MDCK hücrelerinde % 55 ve Caco-2 hücrelerinde % 82 olarak hesaplanmıştır.

Yapılan literatür taramasında absorpsiyon artırıcı maddelerin rivastigminin hücre kültürlerinden geçişinde kullanımına ilişkin bilgi bulunamamıştır. Yapılan bir çalışmada, anti-HIV ajanı olarak kullanılan kozalan'ın Caco-2 hücrelerinden geçişini artırmak için sodyum dezoksikolat kullanılmış, yapılan MTT testi sonucunda 10 mM derişimde kullanımının uygun olacağına karar verilmiştir¹⁵⁰. Yapılan başka bir çalışmada dimetil- β -siklodekstrin'in Caco-2 hücrelerine olan etkisi incelenmiş ve % 5'lik derişiminin uygun olduğu belirtilmiştir¹⁵¹. Bir diğer çalışmada siklodekstrinlerin Calu-3 hücreleri üzerindeki etkileri incelenmiş ve β -CD'nin 2-15 mM konsantrasyonda kullanımının hücrelerin canlılığı üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir¹⁵². Bu verilere dayanarak dimetil- β -CD ve sodyum taurokolatın farklı derişimlerde çözeltileri hazırlanarak MTT testinde kullanılmıştır.

Absorpsiyon artırıcı olarak kullanılan maddelerden biri olan dimetil- β -CD'nin Caco-2, MDCK ve L-929 hücrelerindeki % canlılık değerleri incelendiğinde, dimetil- β -CD derişimi arttıkça % canlılık değerlerinin azaldığı görülmektedir. L-929 ve Caco-2 hücrelerinde % canlılık sonuçları MDCK hücrelerine göre daha yüksek bulunmuştur. Bunun için kullanılacak miktarın belirlenmesinde MDCK hücrelerinin % canlılık sonuçları baz alınmıştır. Hücre kültüründen geçiş çalışmalarında kullanılmak üzere dimetil- β -CD derişimi % 0.15 olarak karar verilmiştir. % 0.15 dimetil- β -CD derişiminin serumlu DMEM içerisindeki % canlılık sonuçları L-929 hücrelerinde % 90, MDCK hücrelerinde % 56 ve Caco-2 hücrelerinde % 98 olarak hesaplanmıştır.

Diğer absorpsiyon artırıcı madde sodyum taurokolat'ın Caco-2, MDCK ve L-929 hücrelerindeki % canlılık değerleri incelendiğinde,

sodyum taurokolat derişimi arttıkça % canlılık değerlerinin azaldığı görölmektedir. L-929 ve Caco-2 hücrelerinde % canlılık sonuçları MDCK hücrelerine göre daha yüksek bulunmuştur. Bunun için kullanılacak miktarın belirlenmesinde MDCK hücrelerinin % canlılık sonuçları baz alınmıştır. Hücre kültüründen geçiş çalışmalarında kullanılmak üzere sodyum taurokolat derişimi 1.875 mM olarak karar verilmiştir. 1.875 mM derişiminin serumlu DMEM içerisindeki % canlılık sonuçları L-929 hücrelerinde % 94, MDCK hücrelerinde % 69 ve Caco-2 hücrelerinde % 97 olarak hesaplanmıştır.

5.4 Rivastigminin Hücre Kültürlerinden Geçiş Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Geçiş çalışmalarına başlamadan önce hücre içermeyen boş membrandan geçiş yapılması membranın madde geçişine etkisi olup olmadığının anlaşılmasında önemlidir. Bu nedenle rivastigmin çözeltisinin ve rivastigmin içeren ve rivastigmin ile sodyum taurokolat içeren, rivastigmin ile dimetil- β -CD içeren lipozomların hücre içermeyen boş membranlardan geçişi gerçekleştirilmiştir. Bölüm 4.6.1’de grafiklerle belirtilen sonuçlara göre rivastigmin çözeltisinin 24 saat sonunda apikal kısımdan bazolateral kısma % kümülatif rivastigmin geçişi % 93’tür. Rivastigmin içeren lipozomların 24 saat sonunda apikal kısımdan bazolateral kısma % kümülatif rivastigmin geçişi % 15.1, rivastigmin +sodyum taurokolat içeren lipozomların 24 saat sonunda apikal kısımdan bazolateral kısma % kümülatif rivastigmin geçişi % 26.4, rivastigmin ile dimetil- β -CD içeren lipozomların 24 saat sonunda apikal kısımdan bazolateral kısma % kümülatif rivastigmin geçişi % 13.6 olarak bulunmuştur. Geçiş yüzdeleri incelendiğinde, sodyum taurokolatın boş membrandan rivastigmin geçişini arttırdığını, dimetil- β -CD’nin ise rivastigmin geçişinde anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı görölmektedir.

5.4.1 Rivastigminin Caco-2 Hücrelerinden Geçiş Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Rivastigminin Caco-2 hücrelerinden geçişini incelemeye başlamadan önce literatür taraması yapılarak Caco-2 hücrelerinin inkübasyon süresine ve hücre ekim yoğunluğuna karar verildi. Literatür taraması sonucunda 21 gün inkübe edilen Caco-2 hücrelerinin membrana daha iyi fikse olarak, tek tabaka oluşturduğu görüldü. Caco-2 hücrelerinden geçiş çalışmalarında 21 gün inkübe edilen Caco-2 hücrelerinin 80000 hücre/cm² yoğunlukta kullanılmasına karar verildi^{140,141}.

Caco-2 hücrelerinden rivastigmin çözeltisi, rivastigmin+sodyum taurokolat çözeltisi, rivastigmin+dimetil- β -CD çözeltisi, rivastigmin lipozomu, rivastigmin+sodyum taurokolat lipozomu, rivastigmin+dimetil- β -CD lipozomu geçişleri yapılmıştır.

Bölüm 4.6.1’de grafiklerle belirtilen sonuçlara göre rivastigmin çözeltisinin 24 saat sonunda apikal kısımdan bazolateral kısma % kümülatif rivastigmin geçişi % 60.9’tür.

Rivastigmin+sodyum taurokolat çözeltisinin 24 saat sonunda apikal kısımdan bazolateral kısma % kümülatif rivastigmin geçişi % 87.2,’dir. Absorpsiyon artırıcı olarak kullanılan sodyum taurokolatın rivastigminin Caco-2 hücrelerinden geçişini anlamlı olarak artırdığı görülmüştür (p<0.01).

Rivastigmin+dimetil- β -CD çözeltisinin 24 saat sonunda apikal kısımdan bazolateral kısma % kümülatif rivastigmin geçişi % 74.9 olarak bulunmuştur. Absorpsiyon artırıcı olarak kullanılan dimetil- β -CD’nin rivastigminin Caco-2 hücrelerinden geçişini anlamlı olarak artırdığı görülmüştür (p<0.01).

Rivastigmin içeren lipozomların 24 saat sonunda apikal kısımdan bazolateral kısma % kümülatif rivastigmin geçişi % 3.6'dır.

Rivastigmin+sodyum taurokolat içeren lipozomların 24 saat sonunda apikal kısımdan bazolateral kısma % kümülatif rivastigmin geçişi % 12.8'dir. Absorpsiyon artırıcı olarak kullanılan sodyum taurokolatın rivastigminin Caco-2 hücrelerinden geçişini sadece rivastigmin içeren lipozomlara göre anlamlı olarak arttırdığı görülmüştür ($p<0.01$).

Rivastigmin+dimetil- β -CD içeren lipozomların 24 saat sonunda apikal kısımdan bazolateral kısma % kümülatif rivastigmin geçişi % 9.1 olarak bulunmuştur. Absorpsiyon artırıcı olarak kullanılan dimetil- β -CD'nin rivastigminin Caco-2 hücrelerinden geçişini sadece rivastigmin içeren lipozomlara göre anlamlı olarak arttırdığı görülmüştür ($p<0.01$).

Caco-2 hücrelerinden yapılan çözelti ve lipozom geçiş çalışmalarında sıfırıncı dakikadan itibaren sürekli artan kümülatif geçiş gözlenmiştir. Grafikler incelendiğinde en çok artışın 12. saat ile 24. saat arasında olduğu görülmüştür.

Boş membrandan geçiş çalışmalarında elde edilen % kümülatif geçen madde miktarları ile Caco-2 hücreleriyle yapılan geçiş çalışmalarında elde edilen % kümülatif geçen madde miktarları birbirinden oldukça farklıdır. Caco-2 hücrelerinden geçişte elde edilen % kümülatif geçen madde miktarları daha düşüktür. Bunun nedeni, Caco-2 hücrelerinin membranı bir tabaka halinde kaplaması ve rivastigminin geçişini engelleyici sıkı bağlantı noktaları içeren ikinci bir bariyer oluşturması olarak açıklanabilir.

5.4.1.1 Rivastigminin Caco-2 Hücrelerinden Geçirgenlik Katsayısına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Rivastigminin geçirgenlik katsayısı hesapları Bölüm 3.2.7.1.2.1’de anlatıldığı gibi ilgili formülle yapıldı. Geçiş katsayıları hem çözelti çözelti için hem de lipozom formülasyonları için hesaplandı.

Rivastigmin çözeltisi içinde rivastigminin geçirgenlik katsayısı (-1.96 cm/saat) olarak hesaplandı. Rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren içeren çözelti için geçirgenlik katsayısı (-1.84 cm/saat) olarak hesaplandı. Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren çözelti için rivastigminin geçirgenlik katsayısı (-1.78 cm/saat) olarak hesaplandı. Üç tip çözelti formülasyonu içinde rivastigminin geçirgenlik katsayısı değerleri incelendiğinde absorpsiyon artırıcı maddelerin bulunduğu çözeltilerin geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen geçirgenlik katsayısı değerlerinin, sadece rivastigmin içeren çözelti geçişiyle hesaplanan geçirgenlik katsayısı değerlerinden yüksek olduğu görüldü.

Rivastigmin lipozomu içinde rivastigminin geçirgenlik katsayısı (-1.03 cm/saat) olarak hesaplandı. Rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren içeren lipozom formülasyonunda rivastigmin için geçirgenlik katsayısı (-1.18 cm/saat) olarak hesaplandı. Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozom için rivastigminin geçirgenlik katsayısı (-0.75 cm/saat) olarak hesaplandı. Üç tip lipozom formülasyonu içinde rivastigminin geçirgenlik katsayısı değerleri incelendiğinde sodyum taurokolat içeren lipozomların geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen geçirgenlik katsayısı değerlerinin, diğer iki lipozom formülasyonunun geçişleriyle hesaplanan geçirgenlik katsayısı değerlerinden yüksek olduğu görüldü. Dimetil- β -CD içeren lipozomların geçişleriyle, hesaplanan % kümülatif geçen rivastigmin miktarı değerleri, sadece rivastigmin içeren lipozomların geçişleriyle elde edilen % kümülatif geçen rivastigmin miktarı değerlerinden yüksek

olmasına rağmen geçirgenlik katsayısı değeri rivastigmin lipozomlarından daha düşük bulunmuştur. Bunun nedeninin dimetil- β -CD içeren lipozomların geçiş deneylerinin ilk 1 saatinde rivastigmini, rivastigmin lipozomlarından daha yavaş salması olduğu düşünülmüştür.

5.4.1.2 Caco-2 Hücrelerinin Elektriksel Dirençlerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Bölüm 4.6.2.2’de belirtilen elektriksel direnç değerleri incelendiğinde sodyum taurokolat ve dimetil- β -CD içeren lipozomların geçişlerinin yapıldığı hücre membranlarından yapılan ölçümler sodyum taurokolat varlığında elektriksel dirençte düşüş olduğunu göstermiştir. Dimetil- β -CD varlığında ise biraz daha az olmakla birlikte yine düşüş görülmüştür. Bu düşüş, absorpsiyon artırıcı maddelerin sıkı bağlantı bölgelerini açmış olduğunu düşündürmüştür.

5.4.2 Rivastigminin MDCK Hücrelerinden Geçiş Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Rivastigminin MDCK hücrelerinden geçişini incelemeye başlamadan önce literatür taraması yapılarak Caco-2 hücrelerinin inkübasyon süresine ve hücre ekim yoğunluğuna karar verildi. Literatür taraması sonucunda 7 gün inkübe edilen MDCK hücrelerinin membrana daha iyi fikse olarak, tek tabaka oluşturduğu görüldü. MDCK hücrelerinden geçiş çalışmalarında 7 gün inkübe edilen MDCK hücrelerinin 60000 hücre/cm² yoğunlukta kullanılmasına karar verildi¹⁴².

MDCK hücrelerinden rivastigmin çözeltisi, rivastigmin+ sodyum taurokolat çözeltisi, rivastigmin+dimetil- β -CD çözeltisi, rivastigmin

lipozomu, rivastigmin+sodyum taurokolat lipozomu, rivastigmin+ dimetil- β -CD lipozomu geçişleri yapılmıştır.

Bölüm 4.6.2’de grafiklerle belirtilen sonuçlara göre rivastigmin çözeltisinin 24 saat sonunda apikal kısımdan bazolateral kısma %kümülatif rivastigmin geçişi %54’tür.

Rivastigmin+sodyum taurokolat çözeltisinin 24 saat sonunda apikal kısımdan bazolateral kısma %kümülatif rivastigmin geçişi % 69.9’dur. Absorpsiyon artırıcı olarak kullanılan sodyum taurokolatın rivastigminin MDCK hücrelerinden geçişini anlamlı olarak arttırdığı görölmüştür ($p<0.01$).

Rivastigmin+dimetil- β -CD çözeltisinin 24 saat sonunda apikal kısımdan bazolateral kısma % kümülatif rivastigmin geçişi % 68.7 olarak bulunmuştur. Absorpsiyon artırıcı olarak kullanılan dimetil- β -CD’nin rivastigminin MDCK hücrelerinden geçişini anlamlı olarak arttırdığı görölmüştür ($p<0.01$).

Rivastigmin içeren lipozomların 24 saat sonunda apikal kısımdan bazolateral kısma % kümülatif rivastigmin geçişi % 15.2’dir.

Rivastigmin+sodyum taurokolat içeren lipozomların 24 saat sonunda apikal kısımdan bazolateral kısma % kümülatif rivastigmin geçişi %31.5 ’dir. Absorpsiyon artırıcı olarak kullanılan sodyum taurokolatın rivastigminin MDCK hücrelerinden geçişini sadece rivastigmin içeren lipozomlara göre anlamlı olarak artırdığı görölmüştür ($p<0.01$).

Rivastigmin+dimetil- β -CD içeren lipozomların 24 saat sonunda apikal kısımdan bazolateral kısma % kümülatif rivastigmin geçişi % 17.8 olarak bulunmuştur. Absorpsiyon artırıcı olarak kullanılan dimetil-

β -CD'nin rivastigminin MDCK hücrelerinden geçişini sadece rivastigmin içeren lipozomlara göre anlamlı olarak artırdığı görülmüştür ($p<0.01$).

MDCK hücrelerinden yapılan çözelti ve lipozom geçiş çalışmalarında sıfırıncı dakikadan itibaren sürekli artan kümülatif geçiş gözlenmiştir. Grafikler incelendiğinde en çok artışın 12. saat ile 24. saat arasında olduğu görülmüştür.

Boş membrandan geçiş çalışmalarında elde edilen % kümülatif geçen madde miktarları ile MDCK hücreleriyle yapılan geçiş çalışmalarında elde edilen % kümülatif geçen madde miktarları birbirinden oldukça farklıdır. MDCK hücrelerinden geçişte elde edilen % kümülatif geçen madde miktarları daha düşüktür. Bunun nedeni, MDCK hücrelerinin membranı bir tabaka halinde kaplaması ve rivastigminin geçişini engelleyici yapısında protein bulunduran sıkı bağlantı noktaları içeren ikinci bir bariyer oluşturması olarak açıklanabilir.

5.4.2.1 Rivastigminin MDCK Hücrelerinden Geçirgenlik Katsayısına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Rivastigminin geçirgenlik katsayısı hesapları Bölüm 3.2.7.1.2.1'de anlatıldığı gibi ilgili formülle yapıldı. Geçiş katsayıları hem çözelti çözelti için hem de lipozom formülasyonları için hesaplandı.

Rivastigmin çözeltisi içinde rivastigminin geçirgenlik katsayısı (-1.78 cm/saat) olarak hesaplandı. Rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren içeren çözelti için geçirgenlik katsayısı (-1.72 cm/saat) olarak hesaplandı. Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren çözelti için rivastigminin geçirgenlik katsayısı (-1.65 cm/saat) olarak hesaplandı. Üç tip çözelti formülasyonu içinde rivastigminin geçirgenlik katsayısı değerleri

incelendiğinde absorpsiyon artırıcı maddelerin bulunduğu çözeltilerin geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen geçirgenlik katsayısı değerlerinin, sadece rivastigmin içeren çözelti geçişiyle hesaplanan geçirgenlik katsayısı değerlerinden yüksek olduğu görüldü.

Rivastigmin lipozomu içinde rivastigminin geçirgenlik katsayısı (-1.26 cm/saat) olarak hesaplandı. Rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren lipozom formülasyonunda rivastigmin için geçirgenlik katsayısı (-1.29 cm/saat) olarak hesaplandı. Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozom için rivastigminin geçirgenlik katsayısı (-1.15 cm/saat) olarak hesaplandı. Üç tip lipozom formülasyonu içinde rivastigminin geçirgenlik katsayısı değerleri incelendiğinde sodyum taurokolat içeren lipozomların geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen geçirgenlik katsayısı değerlerinin, diğer iki lipozom formülasyonunun geçişleriyle hesaplanan geçirgenlik katsayısı değerlerinden yüksek olduğu görüldü. Dimetil- β -CD içeren lipozomların geçişleriyle hesaplanan % kümülatif geçen rivastigmin miktarı değerleri, sadece rivastigmin içeren lipozomların geçişleriyle elde edilen % kümülatif geçen rivastigmin miktarı değerlerinden yüksek olmasına rağmen geçirgenlik katsayısı değeri rivastigmin lipozomlarından çok az daha düşük bulunmuştur. Bunun nedeninin dimetil- β -CD içeren lipozomların geçiş deneylerinin ilk 1 saatinde rivastigmini, rivastigmin lipozomlarından daha yavaş salması olduğu düşünülmüştür.

5.4.2.2 MDCK Hücrelerinin Elektriksel Dirençlerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Bölüm 4.6.3.2' de belirtilen elektriksel direnç değerleri incelendiğinde sodyum taurokolat ve dimetil- β -CD içeren lipozomların geçişlerinin yapıldığı hücre membranlarından yapılan ölçümler sodyum taurokolat varlığında elektriksel dirençte düşüş olduğunu göstermiştir.

Dimetil- β -CD varlığında ise biraz daha az olmakla birlikte yine düşüş görülmüştür. Bu düşüş, absorpsiyon artırıcı maddelerin sıkı bağlantı bölgelerini açmış olduğunu düşündürmüştür.

5.5 Diyaliz Membrandan Salım Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Diyaliz membrandan rivastigmin çözeltisi, rivastigmin+sodyum taurokolat çözeltisi, rivastigmin+dimetil- β -CD çözeltisi, rivastigmin lipozomu, rivastigmin+sodyum taurokolat lipozomu, rivastigmin+ dimetil- β -CD lipozomu geçiş çalışmaları yapılmıştır. Deneyler Bölüm 3.7.2 'de anlatıldığı gibi yapılmış, elde edilen % kümülatif salınan rivastigmin miktarları kullanılarak rivastigminin farklı formülasyonlardan salım kinetikleri incelenmiştir.

Rivastigmin lipozomlarından 24 saat sonunda % kümülatif salınan rivastigmin miktarı % 6.5 olarak hesaplanmıştır. % kümülatif salınan rivastigmin miktarından hareketle hesaplanan salım kinetiğine göre uyum ölçütleri göz önüne alınarak, rivastigmin lipozomlarının rivastigmini birinci derece kinetikle saldığına karar verilmiştir ($r^2 = 0.97$, SKT=1.33).

Rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren lipozomlardan 24 saat sonunda % kümülatif salınan rivastigmin miktarı % 5.5 olarak hesaplanmıştır. % kümülatif salınan rivastigmin miktarından hareketle hesaplanan salım kinetiğine göre uyum ölçütleri göz önüne alınarak, rivastigmin lipozomlarının rivastigmini birinci derece kinetikle saldığına karar verilmiştir ($r^2 = 0.973$, SKT=0.846).

Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomlardan 24 saat sonunda % kümülatif salınan rivastigmin miktarı %10.3 olarak hesaplanmıştır. % kümülatif salınan rivastigmin miktarından hareketle hesaplanan salım kinetiğine göre uyum ölçütleri göz önüne alınarak, rivastigmin lipozomlarının rivastigmini birinci derece kinetikle saldığına karar verilmiştir ($r^2 = 0.970$, SKT=3.35).

Rivastigmin çözeltisinden 24 saat sonunda % kümülatif salınan rivastigmin miktarı % 64.9 olarak hesaplanmıştır. % kümülatif salınan rivastigmin miktarından hareketle hesaplanan salım kinetiğine göre uyum ölçütleri göz önüne alınarak, rivastigmin lipozomlarının rivastigmini RRSBW kinetiğiyle saldığına karar verilmiştir ($r^2 = 0.994$, SKT=47.2).

Rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren çözeltiden 24 saat sonunda % kümülatif salınan rivastigmin miktarı % 70.2 olarak hesaplanmıştır. % kümülatif salınan rivastigmin miktarından hareketle hesaplanan salım kinetiğine göre uyum ölçütleri göz önüne alınarak, rivastigmin lipozomlarının rivastigmini RRSBW kinetiğiyle saldığına karar verilmiştir ($r^2 = 0.994$, SKT=87.3).

Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren çözeltiden 24 saat sonunda % kümülatif salınan rivastigmin miktarı % 86.6 olarak hesaplanmıştır. % kümülatif salınan rivastigmin miktarından hareketle hesaplanan salım kinetiğine göre uyum ölçütleri göz önüne alınarak, rivastigmin lipozomlarının rivastigmini RRSBW kinetiğiyle saldığına karar verilmiştir ($r^2 = 0.996$, SKT=31.7). Rivastigmin salımındaki artışın nedeni düşünülmüştür.

$J = (D \times A \times K \times C_d) / h$ formülüne göre:

J: (Flux) akı, D: difüzyon katsayısı, A:alan, K:geçen madde için membran ile (maddenin molekül büyüklüğüne göre) çözelti arasındaki partisyon

katsayısı, C_d : donör kısımdaki madde konsantrasyonu, h : membran kalınlığını ifade etmektedir. Buradan permeabilite katsayısı değeri:

$k_p = (D \times K)/h$ şeklinde elde edilir.

Formülden, permeabilitenin difüzyon katsayısı ve membran çözelti partisyon katsayısı ile doğru orantılı olduğunu görüyoruz. Bu denkleme göre rivastigmin diyaliz membranından sodyum taurokolat ve dimetil- β -CD varlığında daha fazla geçiyor olabilir; çünkü bu maddeler rivastigminin membrana olan partisyon katsayısını artırmaktadır. Bu olay Fick'in ikinci kanunu ile ifade edilmektedir¹⁵³. Bundan başka ayrıca:

$$J = (A \times \alpha \times D) / (\gamma \times h)$$

Burada A : alan, α :termodinamik aktivite katsayısı, D : difüzyon katsayısı, γ : maddenin membrandaki efektif aktivite katsayısı, h : membran kalınlığıdır. Bu denkleme göre de sodyum taurokolat ve dimetil- β -CD, α ve γ 'yı değiştiriyor olabileceği düşünüldü. α , donör fazdaki madde miktarıyla doğru orantılıdır. Katı ve doymunluk durumunda bu termodinamik aktivite katsayısının en yüksek olduğu literatürlerde bildirilmektedir. O yüzden deneylerde hep doymun çözelti kullanılmaya çalışılır. Partisyon katsayısı ile geçişin arttığı pek çok yayında bildirilmektedir¹⁵⁴. Bizim çalışmamızda diyaliz membranından ve boş membrandan sodyum taurokolat ve dimetil- β -CD'li formülasyonlardan rivastigmin geçişinin artması, yukarıdaki literatür bilgileri ışığında sodyum taurokolat ve dimetil- β -CD gibi maddelerin birlikte kullanıldıklarında etkin maddenin membrana olan partisyon katsayısını ve termodinamik aktivite katsayısını (α) arttırdığı düşünülmüştür.

5.5.1 Hücre Kültürü ve Diyaliz Membran Geçiş Çalışmalarının Birlikte Değerlendirilmesi

Bölüm 4.6.5'te verilen grafikler incelendiğinde, rivastigmin çözeltisi ve rivastigminin yanı sıra absorpsiyon artırıcı madde içeren çözeltiilerde en fazla rivastigmin geçişi diyaliz membrandan olmaktadır. Bu

beklenen bir sonuçtur, çünkü hücre tek tabakaları geçişi sınırlayıcı durumdadır. Diyaliz membrandan sonra en fazla geçiş MDCK hücrelerinden gerçekleşmiştir. Sonuçta en az rivastigmin geçişi Caco-2 hücrelerinden olmuştur. Bunun nedeninin Caco-2 hücrelerinin MDCK hücrelerinden daha yüksek TEER değerine sahip olması olabileceği düşünülmüştür. Sodyum taurokolat, rivastigminin geçişini artırma konusunda dimetil- β -CD'den daha etkili olmuştur. Sodyum taurokolat safra tuzlarından olduğundan sıkı bağlantıları açtığı düşünülmüştür.

Lipozomların geçişlerinde genel olarak, çözelti formülasyonlarının aksine en fazla geçiş diyaliz membrandan gerçekleşmemiştir. Bunun nedeni düşünüldüğünde, lipozomların doğal lipid yapılarının hücre membran yapılarına benzerlik göstermesi bu şekilde hücrelerden geçişlerinin diyaliz membranına göre daha kolay olabileceği akla gelmiştir. Absorpsiyon artırıcı madde içeren lipozomlarda hücrelerden daha fazla geçişin gözlenmesi bu düşüncüyü kuvvetlendirmiştir. Bu olayı, absorpsiyon artırıcı maddelerin hücreler arasındaki sıkı bağlantı bölgelerini açarak rivastigmin geçişini artırdıkları şeklinde yorumlayabiliriz. Lipozom formülasyonlarında MDCK ve Caco-2 hücre geçişleri kıyaslandığında MDCK hücrelerinden geçişin daha fazla olduğu dikkat çekmiştir. Bunun nedeni, MDCK hücrelerinin Caco-2 hücrelerine göre daha düşük TEER değerlerine sahip olması şeklinde açıklanabilir.

5.6 Lipozom Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

5.6.1 Lipozom Formülasyonuna Ait Karakterizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Lipozom formülasyonlarının dezavantajlarından bir tanesi fiziksel ve kimyasal açıdan stabilite sorunlarının sıklıkla görülmesidir. Lipozomların stabilite problemlerinden ötürü raf ömürleri kısadır. Fiziksel

dayanıksızlık lipozom içine hapsedilmiş etkin maddenin sızmasına ayrıca agregat oluşmasına yol açabilir. Kimyasal dayanıksızlığın nedeni de formülasyonda kullanılan lipidlerin çifte bağlarının oksidasyonundan veya ester bağı hidrolizinden kaynaklanabilir.

Bizim tezimizde incelediğimiz lipozom formülasyonları 4°C, 25°C ve 40°C’de altı ay boyunca saklandı, partikül büyüklükleri ve zeta potansiyelleri ölçüldü, etkin madde ve yardımcı madde miktar tayinleri yapıldı. 4°C’de saklanan rivastigmin lipozomlarında ve rivastigmin ile dimetil-β-CD içeren lipozomlarda 5.aydan sonra anlamlı büyüme gözlemlendi($p<0.001$). 4°C’de saklanan rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomlarda ise 6 ayın sonunda anlamlı bir artış gözlenmedi ($p>0.05$). Buradan anlaşıldığı gibi hazırlanan lipozom formülasyonları 4°C’de saklandığında partikül büyüklüğü açısından oldukça stabildir.

5.6.2 Lipozom Formülasyonuna Ait Zeta Potansiyeli Ölçümlerinin Değerlendirilmesi

6 ay boyunca 4°C, 25°C ve 40°C’de saklanan rivastigmin lipozomlarının zeta potansiyeli sonuçları 0, 3 ve 6. aylarda ölçülmüştür. 4°C’de saklanan rivastigmin lipozomlarında ve rivastigmin ile dimetil- β-CD içeren lipozomlarda 3. aydan sonra zeta potansiyellerinde anlamlı bir düşüş gözlenmiştir($p<0.001$). 4°C’de saklanan rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomlarda ise 6 ay sonunda zeta potansiyellerindeki değişim anlamsız bulunmuştur($p>0.05$). Sonuç olarak hazırlanan lipozom formülasyonları 4°C’de saklandığında, rivastigmin lipozomları ve rivastigmin ile dimetil-β-CD içeren lipozomlar 3 ay, rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomlar ise 6 ay zeta potansiyelleri açısından stabilitesini korumuştur.

5.6.3 Lipozomlar İçine Hapsedilen Rivastigmin Miktarının Değerlendirilmesi

Lipozomlar içine hapsedilen rivastigmin miktarlarını tayin etmek amacıyla % 0.9'luk serum fizyolojik çözeltisi ile süspansiyon halinde hazırlanan lipozomlar 4°C'de 20000 g'de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilerek supernatant ve lipozomlar birbirinden ayrılmış, supernatantlar % 0.9'luk serum fizyolojik çözeltisi ile uygun biçimde seyreltilerek rivastigmin miktar tayininde kullanılmıştır. Hazırlanan rivastigmin lipozomları içinde hapsedilen rivastigmin miktarları hesaplanmıştır. Sadece rivastigmin içeren lipozomlarda, lipozom içine hapsedilen rivastigmin miktarı ortalama % 35.4 , rivastigmin ile dimetil- β -CD içeren lipozomlarda lipozom içine hapsedilen rivastigmin miktarı ortalama % 29.9, rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomlar da ise % 25.2 olarak hesaplanmıştır.

Lasic⁴⁰ tarafından yayınlanan bir derlemede, lipozomlarda enkapsülasyon veriminin teorik olarak % 70'in üzerinde olabileceğinin düşünülmesine karşın, bu değerin deneysel olarak hiçbir zaman sağlanamadığı belirtilmiştir. % 50 civarında bulunan enkapsülasyon veriminin iyi bir sonuç olduğu ifade edilmiştir⁴⁰.

Elde edilen enkapsülasyon verimlerini karşılaştırmak üzere literatür taraması yapılmış, ancak rivastigmin ile hazırlanan lipozomlara ait bir kaynak bulunamamıştır. Mura ve arkadaşları sonikasyon yöntemi ile hazırladıkları MLV tipi benzokain lipozomlarında enkapsülasyon verimini % 26.5-29.7 olarak bildirmişlerdir¹⁵⁵.

5.6.4 Lipozomlar İçine Hapsedilen Sodyum Taurokolat Miktarının Değerlendirilmesi

Bölüm 5.6.3'te anlatıldığı gibi santrifüj edilen rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomların supernatantlarından sodyum taurokolat miktar tayini yapılmıştır. Lipozom içine hapsedilen sodyum taurokolat miktarlarının bilinmesi önemlidir; çünkü hazırlanan lipozomlar içine hapsedilmiş sodyum taurokolat miktarı MTT testi sonucu ile uyumlu olmalıdır. Lipozom içine hapsedilen sodyum taurokolat miktarı % 41 olarak hesaplanmıştır.

5.6.5 Lipozomlar İçine Hapsedilen Dimetil-β-CD Miktarının Değerlendirilmesi

Bölüm 5.6.3'te anlatıldığı gibi santrifüj edilen rivastigmin ve dimetil- β-CD içeren lipozomların supernatantlarından dimetil- β-CD miktar tayini yapılmıştır. Lipozom içine hapsedilen dimetil- β-CD miktarlarının bilinmesi önemlidir; çünkü hazırlanan lipozomlar içine hapsedilmiş dimetil- β-CD miktarı MTT testi sonucu ile uyumlu olmalıdır. Lipozom içine hapsedilen dimetil- β-CD miktarı % 65 olarak hesaplanmıştır.

5.6.6 Rivastigminin Lipozom Formölasyonu İçindeki Stabilesinin Değerlendirilmesi

Rivastigmin ışıktan korunmak koşuluyla oda sıcaklığında (25°C) saklandığında stabilite açısından sorun yaratan bir madde değildir.

Tezimizde incelediğimiz lipozom formölasyonları, 4°C, 25°C ve 40°C'de altı ay boyunca saklandı. Bu sıcaklıklarda saklanan lipozomların

her ay etkin madde miktar tayinleri yapıldı. Her ay yapılan ölçümlerle % bozunmadan kalan rivastigmin miktarları hesaplandı. Bu hesaplanan veriler kullanılarak elde edilen profiller kinetik açıdan değerlendirilerek hangi kinetiğe uygun olarak bozundukları uyum ölçütleri göz önünde bulundurularak hesaplanmıştır.

Rivastigmin lipozomları içine hapsedilmiş rivastigminin 2. derece kinetikle bozunduğu gösterilmiştir. 4°C için uyum ölçütleri r^2 0.920, SKT ise 591 olarak hesaplanmıştır. Raf ömrü 11 gün olarak bulunmuştur. 25°C için uyum ölçütleri r^2 0.882, SKT ise 784 olarak hesaplanmıştır. Raf ömrü 7 gün olarak bulunmuştur.

Rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren lipozomlar içine hapsedilmiş rivastigminin 1. derece kinetikle bozunduğu gösterilmiştir. 4°C için uyum ölçütleri r^2 0.963, SKT ise 113 olarak hesaplanmıştır. Raf ömrü 14 gün olarak bulunmuştur. 25°C için uyum ölçütleri r^2 0.972, SKT ise 158 olarak hesaplanmıştır. Raf ömrü 12 gün olarak bulunmuştur.

Rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomlar içine hapsedilmiş rivastigminin 1. derece kinetikle bozunduğu gösterilmiştir. 4°C için uyum ölçütleri r^2 0.91, SKT ise 355 olarak hesaplanmıştır. Raf ömrü 21 gün olarak bulunmuştur. 25°C için uyum ölçütleri r^2 0.975, SKT ise 156 olarak hesaplanmıştır. Raf ömrü 14 gün olarak bulunmuştur.

Her üç lipozom formülasyonuna ait raf ömürleri incelendiğinde en yüksek raf ömrünün rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozomlara ait olduğu görülmektedir. Sıcaklığın artmasıyla rivastigmin lipozomlarının raf ömürlerinin azaldığı görülmektedir.

5.7 İn vivo Hayvan Deneylerinin Değerlendirilmesi

5.7.1 İn vivo deneylerde Kullanılan Yöntem Seçiminin Değerlendirilmesi

Rivastigmin, AChE inhibitörü olarak kullanılan bir etkin maddedir. Biz de hazırladığımız formülasyonların AChE inhibisyonu etkisini incelemek amacıyla literatür taraması yaptığımızda, bu amaçla en yaygın olarak kullanılan metodun Ellman metodu olduğunu gördük. Bu metod ufak modifikasyonlarla en çok kullanılan yöntemdir¹⁴⁶⁻¹⁴⁹. Literatür taraması sırasında bir de pH ölçmeye dayanan Michel metodu olduğu fakat bu yöntemin pek kullanılmadığı görülmüştür¹⁵⁶.

5.7.2 Deney Hayvanlarının Seçimi

Yapılan literatür taraması sonucunda AChE miktar tayini yapmak amacıyla genelde fare ve sıçanların kullanıldığı görülmüştür¹⁴⁶⁻¹⁴⁹. Biz de tezimizde deney hayvanı olarak 14-16 haftalık, 30 ± 2 gram ağırlındaki erkek Balb-C tipi fareler kullandık.

5.7.3 Hayvan Deneylerinde Kan Bulgularının Değerlendirilmesi

Hayvan deneylerinde alınan kan numuneleri Bölüm 3.2.8.5'te anlatıldığı gibi hazırlandı ve spektrofotometrede 402 nm dalga boyunda değerlendirildi.

Genel olarak, intraperitoneal yolla uygulanan çözelti formülasyonlarının ilk 1 saat içinde yüksek oranda AChE inhibisyonu gerçekleştirdikleri görülmüştür.

Oral yolla uygulanan çözelti formülasyonları için de, ilk 1 saat içinde yüksek inhibisyon dereceleri gözlemlendi. Oral yolla uygulanan çözeltilerin, intraperitoneal yolla uygulanan çözeltilere göre daha düşük AChE inhibisyonu gerçekleştirdikleri görüldü. Bunun nedeni, intraperitoneal yoldan uygulanan rivastigminin biyoyararlanımının daha yüksek olması olarak yorumlanabilir. Özellikle sodyum taurokolat içeren rivastigmin çözeltisinin gerçekleştirdiği AChE inhibisyonu, diğer çözelti formlarına göre daha yüksek olarak görülmüştür.

Lipozom formülasyonlarının gerçekleştirdikleri AChE inhibisyonu çözelti formülasyonlarına göre daha az olmakta; fakat daha uzun süre devam etmektedir. Bunun nedeni lipozom formülasyonlarının kan dolaşımına girdiklerinde, içlerinde hapsedilmiş etkin maddeyi salmaları için biraz zamana ihtiyaç duymaları şeklinde yorumlanabilir. Çünkü çözelti formülasyonlarında rivastigmin serbest halde bulunmaktadır, vücuda verilir verilmez hemen kan hücreleriyle etkileşerek AChE inhibisyonu gerçekleştirebilmektedirler.

Rivastigmin karaciğer ilk geçiş etkisine maruz kalan bir etkin maddedir. Biz lipozom formülasyonu hazırlayarak bu etkiyi azaltabileceğimizi düşündük. Lipozomlar, intraperitoneal yolla vücuda verildiklerinde lenf yoluyla dağılırlar. Oral yolla verildiklerinde ise mide barsak sistemi pH'sından ve burada bulunan enzimlerden etkilenme olasılıkları yüksektir. Biz tezimizde kullandığımız lipozomları hazırlarken oral yolla vücuda verildiklerinde, mide barsak kanalındaki stabiliteyi sağlamayı amaçlayarak formülasyonlarına metil selüloz ilave ettik. Ayrıca Peyer plakları barsakta bulunan ikincil lenfoid organlardan biridir. İsveçli anatomist Johan Conrad Peyer tarafından 17. Yüzyılda bulunmuştur ve ismi buradan gelmektedir. İleumun alt kısmında genel olarak bulunurlar, daha aşağı gittikçe sayıları da artar. Büyüklükleri birkaç santim olan

uzunca yuvarlağımsı kümeciklerdir. Lenf düğümü gibidirler. İçlerinde makrofaj ve benzeri yapılar başta olmak üzere tüm bağışıklık sistemi hücreleri vardır. B ve T lenfositlerden bolca vardır. Sonuç olarak, eğer Peyer plaklarına herhangi bir antijenik madde veya çok küçük partikül gelirse bu immün sistem hücreleri tarafından yabancı madde olarak kabul edilir ve fagosite edilirler. Bu zaten yıllardır oral aşılama şeklinde kullanılmaktadır ¹⁵⁷. Lipozomlar antijenik madde olan lipitlerden oluştuğu için ve boyutları küçük olduğu için eğer bağışıklık sistemi hücreleri ile karşılaşılırsa hemen fagosite edilirler¹⁵⁸. Mikro ve nano boyuttaki lipozomlar Peyer plaklarına ulaşırlarsa hemen fagosite edilirler ve lenf sistemine karışırlar. Bu da lipozomların mide - barsak kanalındaki yüksek asit ve alkali pH veya enzimler tarafından bozunmasını engeller¹⁵⁹. Sonuç olarak lipozomlar oral yoldan uygulanırlarsa Peyer plaklarına ulaştıklarında antijenik/ yabancı madde olarak kabul edilip fagosite edilirler ve bu şekilde asit, alkali ve enzimatik bozunmadan korunurlar, ayrıca membranlardan lipit karakteri nedeniyle daha fazla ve hızlı geçebilirler¹⁵⁷. Bizim çalışmamızda da oral yoldan kullanılan lipozomların hem lipozom formülasyonuna katılan metil selüloz ile hem de Peyer plaklarında yabancı madde olarak kabul edilmesiyle parçalanmadan dolaşıma geçtiği ve dolayısıyla % AchE İnhibisyonunu oldukça uzun süre devam ettirdiği gözlenmiştir.

Lipozomların AChE inhibisyonu değerleri incelendiğinde intraperitoneal yolla uygulanan lipozomlarla, oral yolla uygulanan lipozomlar arasında belirgin bir fark gözlenmemiştir. Fakat intraperitoneal yolla uygulanan lipozomların etkisi daha kısa sürede ortaya çıkmıştır.

Tüm formülasyonların zamana karşı % AChE inhibisyon değerleri incelendiğinde, sodyum taurokolat içeren lipozomların hem oral hem de intraperitoneal yolla vücuda verildiklerinde en kararlı AChE

inhibisyonunu gerçekleştirdikleri görülmüştür. Yani etkileri yavaş yavaş artış göstermiştir ve 24 saat sonunda bile hala devam etmektedir.

5.7.4 İn vitro-in vivo Korelasyon Çalışmasının Değerlendirilmesi

Hayvan deneyleri sonucunda elde edilen kan ve beyin numunelerinden % AChE inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Hem kan hem de beyin numunelerinde en yüksek inhibisyon değeri bulguları sodyum taurokolat içeren lipozomların oral yolla verildiği grupta olduğu görüldü. Hücre kültürü çalışmalarında da en yüksek % kümülatif geçiş miktarları sodyum taurokolat içeren lipozomlarda elde edilmektedir. Aynı örnek alma zamanlarında, hücre kültürlerinde hesaplanan % kümülatif geçen ilaç miktarı ile beyinde veya kandaki % AChE inhibisyon değerleri grafiğe geçirilerek korelasyon çalışması sodyum taurokolat içeren lipozom formülasyonları için gerçekleştirildi^{160,161}. Oral yolla hayvanlara verilen sodyum taurokolat lipozomlarının uygulandığı gruplarda hem kanda hem beyinde elde edilen yüksek inhibisyon yüzdesi ile hücrelerden kümülatif geçiş sonucu elde edilen değerler arasında yüksek bir korelasyon gözlenmiştir.

Literatürde hem Caco-2 hem de MDCK hücreleri kan-beyin engelini taklit etmede kullanılmaktadır^{119,142}. Bizim çalışmamızda da sodyum taurokolat içeren rivastigminli lipozomların oral yoldan uygulandığında bulunan yüksek r^2 'li in vivo/in vitro korelasyon sonuçları, her iki hücre kültürünün de kan-beyin engeli modeli olarak kullanılabileceğini gösterdi.

5.7.5 Hayvan Deneylerinde Beyin Bulgularının Değerlendirilmesi

Hayvan deneylerinde alınan beyin numuneleri Bölüm 3.2.8.5'te anlatıldığı gibi hazırlandı ve spektrofotometrede 402 nm dalga boyunda değerlendirildi.

Oral yolla verilen rivastigmin çözeltisinin beyindeki AChE inhibisyonu değerleri en düşük olarak bulunmuştur. Bu rivastigmin çözeltisinin beyne en az geçen formülasyon olduğunu göstermektedir.

Tüm lipozomların AChE inhibisyonu değerleri çözeltilerden yüksek bulunmuştur. Bu da lipozomların beyne daha iyi geçtiği şeklinde yorumlanabilir. Lipozomlar lipit karakterde olduğundan beyin dokusuna daha iyi penetre olmuştur⁵⁵.

İntraperitoneal yolla verilen çözeltilerden absorpsiyon artırıcı madde içeren çözeltilerin AChE inhibisyonu değerleri, sadece rivastigmin içeren çözeltilere oranla daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç, absorpsiyon artırıcı maddelerin rivastigminin beyne geçişini artırdığını düşündürmüştür.

Oral yolla ve intraperitoneal yolla verilen çözeltilerin 6. saatten sonra AChE inhibisyon yüzdelerinde belirgin düşüş gözlenmiştir. Bu düşüşün lipozomlara oranla daha fazla ve belirgin olması çözelti içindeki rivastigminin vücuttan lipozomlara oranla daha yüksek hızla uzaklaştığı şeklinde yorumlanabilir.

Oral yolla verilen sodyum taurokolat içeren lipozomlarının % AChE inhibisyonu değerleri tüm formülasyonlar içinde 6., 8. ve 24. saatlerde en yüksek bulunmuştur. Sodyum taurokolat rivastigminin beyne geçişini arttırmış ve etki süresini uzatmıştır.

Oral yolla verilen dimetil- β -CD içeren lipozomların % AChE inhibisyonu değerleri ile sadece rivastigmin içeren lipozomların % AChE inhibisyonu değerleri karşılaştırıldığında 6 ve 8. saatlerde belirgin bir fark görülmemiş ancak 24. saatte dimetil- β -CD içeren lipozomların etkisinin, sadece rivastigmin içeren lipozomlara göre daha az azalarak devam ettiği görülmüştür. Dimetil- β -CD, rivastigminin beyinden uzaklaşma hızını azaltarak beyinde kalış süresini artırdığı düşünülmüştür.

Oral yolla verilen sodyum taurokolat içeren rivastigmin çözeltisi ile dimetil- β -CD içeren rivastigmin çözeltilerinin % AChE inhibisyonu değerleri birbirine oldukça yakın çıkmıştır. Fakat bu maddeleri içeren oral yolla verilen lipozomların % AChE inhibisyonu değerleri arasında belirgin bir farklılık gözlenmiştir. Sodyum taurokolat lipozom formülasyonlarında daha yüksek ve daha uzun süreli etki göstermiştir. Bunun nedeninin, sodyum taurokolatın lipozom formülasyonu içinde beyne kadar taşınması ve beyne ulaşınca sodyum taurokolatı yavaş yavaş salması olduğu düşünülmüştür.

İntraperitoneal yolla verilen lipozomlar arasında en yüksek ve en uzun süreli % AChE inhibisyonu etkisi sodyum taurokolat içeren lipozomlarda gözlenmiştir.

5.7.6 Hayvan Deneylerinde Beyin Örneklerinin TEM Mikroskobu Görüntülerinin Değerlendirilmesi

TEM mikroskobu görüntüleri incelendiğinde, kontrol grubunda endotel hücrelerin ve nötrofillerin varlığı gözlenmiştir. Vakuolizasyona ait bir bulguya rastlanmamıştır.

Boş lipozomları oral yolla uygulandığı grupta endoplazmik retikulum sisternasında dilatasyon gözlenmiştir. Boş lipozomların intraperitoneal yolla uygulandığı grupta nöronal vakuolizasyon (nöronal hücrelerin genişlemesi) meydana gelmiştir.

Intraperitoneal yolla rivastigmin çözeltisi uygulanan grupta endoplazmik retikulum sisternasında dilatasyon ve vakuolizasyon gözlenmiştir. Intraperitoneal yolla rivastigmin lipozomu uygulanan grupta nötrofillerde artan vakuolizasyon gözlenmiştir. Oral yolla rivastigmin lipozomu uygulanan grupta da nötrofillerde artan vakuolizasyon ve bunun yanı sıra golgi sisternaları gözlenmiştir.

Intraperitoneal yolla rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren çözelti uygulanan grupta nöronal vakuolizasyon ve belirgin sinir uçları gözlenmiştir. Oral yolla rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren çözelti uygulanan grupta da nöronal vakuolizasyon gözlenmiştir. Intraperitoneal yolla rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren lipozom uygulanan grupta hücreler arası boşluklarda artış gözlenmiştir. Oral yolla rivastigmin ve dimetil- β -CD içeren lipozom uygulanan grupta endotelial bağlantılarda açılma gözlenmiştir.

Intraperitoneal yolla rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren çözelti uygulanan grupta miyelinli sinir hücrelerinin uçlarında dejenerasyon gözlenmiştir. Oral yolla rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren çözelti uygulanan grupta hücreler arası boşluklarda artış gözlenmiştir. Intraperitoneal yolla rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozom uygulanan grupta çekirdek çukurlaşması ve endoplazmik retikulum sisternasında dilatasyon gözlenmiştir. Oral yolla rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozom uygulanan grupta hücreler arası boşluklarda artış ve nöronal büzölme görölmüştür.

Sonuçlar değerlendirildiğinde, kontrol grubu dışındaki hemen hemen tüm gruplarda hücreler arası boşluklarda artış ve vakuolizasyon gözlenmiştir. Dimetil- β -CD ve sodyum taurokolat içeren formülasyonların uygulandığı gruplarda vakuolizasyon ve dilatasyon daha belirgin olarak gözlenmiştir. Oral yolla rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozom uygulanan grupta gözlenen vakuolizasyon ve dilatasyon tüm gruplar arasında en yüksektir.

6. SONUÇ

Rivastigminin hücre kültürlerinden geçişinin incelenmesini, geçişte absorpsiyon artırıcı maddelerin etkilerinin görülmesini ve lipozom formülasyonlarının geliştirilmesini amaçlayan bu çalışmada aşağıda belirtilen sonuçlara varılmıştır.

- Sadece rivastigmin, rivastigmin ve dimetil- β -CD, rivastigmin ve sodyum taurokolat içeren lipozom formülasyonları geliştirildi.
- Rivastigminin lipozom formülasyonlarının 4°C, 25°C ve 40°C’de altı ay boyunca yapılan stabilite çalışmaları sonucunda, en stabil formülasyonun sodyum taurokolat içeren lipozomlar olduğu görüldü. Dimetil- β -CD ile hazırlanan lipozomların ikinci sırada, sadece rivastigmin içeren lipozomların ise en az stabil olduğu görüldü.
- In vitro diyaliz membrandan salım kinetiği deneylerinde, lipozomların rivastigmini birinci derece kinetikle, çözeltilerin ise RRSWB kinetiğine uyarak saldığı görüldü.
- MTT testi sonuçları göz önünde bulundurularak 24 saatlik geçiş çalışmalarının serumlu DMEM ortamında yapılmasına, rivastigmin derişimi % 1.5, sodyum taurokolat derişimi 1.875 mM, dimetil- β -CD derişiminin % 0.15 olarak kullanılmasına karar verildi.
- Caco-2 hücrelerinden geçiş deneylerinde sodyum taurokolat ve dimetil- β -CD, hem çözelti formülasyonlarında hem de lipozom formülasyonlarında rivastigminin 24 saat sonundaki % kümülatif geçen miktarını belirgin derecede artırmıştır.
- MDCK hücrelerinden çözelti geçiş deneylerinde sodyum taurokolat ve dimetil- β -CD rivastigminin 24 saat sonundaki % kümülatif geçen miktarını belirgin derecede artırmıştır. Lipozom formülasyonlarında ise dimetil- β -CD içeren lipozomların geçişi daha az artırdığı, sodyum taurokolatın geçişi belirgin biçimde artırdığı görüldü.

- Hayvan deneyleri kan sonuçları incelendiğinde en yüksek % AChE inhibisyonu gerçekleştiren formülasyonun hem oral hem intraperitoneal yolla verildiğinde sodyum taurokolat içeren lipozomlara ait olduğu görüldü.
- Hayvan deneyleri beyin sonuçları incelendiğinde en yüksek ve en uzun süreli AChE inhibisyonu gerçekleştiren formülasyonun oral yolla verilen sodyum taurokolat içeren lipozomlara ait olduğu görüldü.
- İn vivo/in vitro korelasyon sonuçları değerlendirildiğinde oral yolla verilen sodyum taurokolat içeren lipozomların % AChE inhibisyonu değerleriyle, hücre kültürlerinden geçişi gerçekleştirilen sodyum taurokolat içeren lipozomların % kümülatif geçiş değerleri arasında, hem kan hem de beyin numuneleri için determinasyon katsayısı 0.90'nın üzerinde olduğu saptandı..
- TEM mikroskobu fotoğrafları incelendiğinde sodyum taurokolat içeren oral formülasyonların hücreler arası boşlukta daha fazla genişlemeye neden olduğu görüldü.

Yaptığımız tüm çalışmalar değerlendirildiğinde, sodyum taurokolat'ın rivastigminin geçişini hem in vitro hem in vivo olarak artırdığı görüldü. Özellikle sodyum taurokolat ile hazırlanan lipozomların 4°C'de stabilitelerinin yüksek oluşu da önemli bir avantajdır.

İN vivo-in vitro korelasyon sonuçları ayrıca hem Caco-2 hücrelerinin hemde MDCK hücrelerinin kan-beyin engelini taklit etmede iyi sonuçlar verebileceğini gösterdi.

7. ÖZET

Alzheimer hastalığı günümüzde sıklıkla karşılaşılan ve bellek fonksiyonlarında ciddi azalmalara neden olarak, hastaların günlük hayatlarını sürdürmelerini zorlaştıran bir hastalıktır. Bu çalışmada, Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan rivastigminin üç tip lipozom formülasyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan lipozom formülasyonlarının karakterizasyonu ve stabilite çalışmaları yapıldı. Formülasyonlarda kullanılacak maddelerin farklı derişimleri için MTT testleri yapıldı. Rivastigminin Caco-2 ve MDCK hücre kültürlerinden geçiş özellikleri, diyaliz membrandan salım kinetikleri çözelti formülasyonlar ile kıyaslanarak incelendi. Hücre kültürü geçiş çalışmaları sonucunda geçirgenlik katsayıları hesaplandı. Rivastigmin formülasyonları hayvanlara uygulandı. Kandan ve beyinden AChE inhibisyon yüzdesi hesaplandı. Beyinlerin TEM mikroskobu fotoğrafları çekildi. Hazırlanan lipozomlarda rivastigminin enkapsülasyon verimleri, rivastigmin, rivastigmin ile dimetil-beta-siklodekstrin, rivastigmin ile sodyum taurokolat içeren lipozomlar için sırasıyla %35.4, %29.9 ve %25.2 olarak hesaplandı. Stabilite çalışmalarında lipozomların partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımları, zeta potansiyelleri, etkin madde miktar tayinleri incelendi, raf ömürleri hesaplandı. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde en stabil formülasyonun rivastigmin ile sodyum taurokolat içeren lipozomlar (4°C'de raf ömrü 21 gün), onu takiben rivastigmin ile dimetil-beta-siklodekstrin içeren lipozomların(4°C'de raf ömrü 14 gün) olduğu görüldü. Hücre kültürlerinden geçişi incelenen formülasyonların % kümülatif geçiş değerleri incelendiğinde çözeltiler arasında en fazla geçişin sodyum taurokolat içeren çözeltiler (Caco-2:%87.2, MDCK:%69.9), lipozomlar arasında ise sodyum taurokolat içeren lipozomlara ait olduğu görüldü (Caco-2:%12.8, MDCK:%31.5). Geçirgenlik katsayıları hesaplandığında en yüksek değerlerin sodyum taurokolat lipozomlarına (Caco-2:-0.75, MDCK:-1.15) ait olduğu görüldü. Diyaliz membrandan salım kinetikleri uyum ölçütleriyle

değerlendirildiğinde tüm lipozomların rivastigmini birinci derece kinetikle saldığı görüldü. Hayvan deneyleri kan ve beyin sonuçları incelendiğinde en yüksek AChE inhibisyon değerleri rivastigmin ile sodyum taurokolat içeren lipozomlar için bulundu. TEM mikroskobu görüntüleri de sonucu destekledi.

8. SUMMARY

Alzheimer's disease is one of the most common diseases today. It causes loss of memory function and obstructs the daily lives of patients. We prepared three formulations of rivastigmine which is used for the treatment of Alzheimer's disease. Characterisation and stability studies of liposome formulations were done. MTT tests were occurred for different concentrations of the materials that were used in formulations. Absorption properties of rivastigmine through Caco-2 and MDCK cells and kinetics of release through dialysis membrane were studied. Permeability coefficients were calculated after absorption studies of cell cultures. Rivastigmine liposomes and solutions were applied to animals. % AChE inhibition values were calculated with blood and brain samples. The photographs of the brains were taken by TEM microscope. The encapsulation efficiency of liposomes were found %35.4, %29.9 and %25.2 for rivastigmine, rivastigmine and sodium taurocholate, rivastigmine and di-methyl-beta-CD liposomes respectively. In stability studies, particle size and size distribution, zeta potential, rivastigmine amount were investigated and shelf lives of liposomes were calculated. Whole results were considered and the most stable formulation was found to be rivastigmine and sodium taurocholate liposome (shelf life at 4°C - 21days) and rivastigmine and di-methyl-beta-CD liposomes (shelf life at 4°C - 14 days) following. The highest values of % cumulative amount of rivastigmine passed through the cell cultures were found to be at rivastigmine and sodium taurocholate solution (Caco-2:%87.2, MDCK:%69.9) between solutions, rivastigmine and sodium taurocholate liposome (Caco-2:%12.8, MDCK:%31.5) between liposomes. Permeability coefficients were calculated for both cell culture systems. The highest values belonged to sodium taurocholate liposomes (Caco-2:-0.75, MDCK:-1.15). Kinetics of release through dialysis membrane were calculated. The results showed that release of

rivastigmine through all liposome formulations occurred with first order kinetics. Blood and brain sample results of animal studies were examined and the highest values of AChE inhibition were observed for rivastigmine and sodium taurocholate liposomes. The TEM microscope photographs supported that result.

9. KAYNAKLAR

1. Mayeux R, Sand M. Treatment of Alzheimer's Disease. New E J Med 1999;22(341):1670-1677.
2. Doraiswamy MP, Krishnan RRK, Anand R, Sohn H, Danylunk J, Hartman RD et al. Long term effects of rivastigmine in moderately severe Alzheimer's disease, Does early initiation of therapy offer sustained benefits?. Prog Neuropharm & Biol Psych 2002;26:705-712.
3. Topçuoğlu SE, Selekler K. Alzheimer Hastalığı. Geriatri 1999;1(2):63-67.
4. Alzheimer's Disease Research. A Program of the American Health Assistance Foundation. <http://www.ahaf.org/Subindex/AD-PDF-FactSheets/WhatCausesAD.pdf>
5. Alzheimer's Disease Research. A Program of the American Health Assistance Foundation. <http://www.ahag.org/alzdis/about/BrainAlzheimer.htm>
6. Öztekin F. Alzheimer hastalığının tedavisi. Demans Dizisi 2000;2:66-76.
7. Mised dergisi 2005;11-12:46-57.
8. Williams BR, Nazarians A, Gill M. A review of rivastigmine: a reversible cholinesterase inhibitor. Clin Ther, 2003;25(6):1651-1653.

9. Yüksel N. Alzheimer hastalığının ilaçla tedavisi. Klinik Psikiyatri.2000;3:137-141.
10. Scarpini E, Scheltens P, Feldman H. Treatment of Alzheimer's disease:current status and new perspectives. Lancet Neuro 2003;2:539-547.
11. Dantoin T, Auriacombe S, Sarazin M, Becker H, Pere JJ, Bourdoux I. Rivastigmine monotherapy and combination therapy with memantine in patients with moderately severe Alzheimer's disease who failed to benefit from previous cholinesterase inhibitor treatment. J Clin Pract 2006;60(1):110-118.
12. Leonard BE. Pharmacotherapy in the treatment of Alzheimer's disease: an update. World Psych 2004;3(2): 84-88.
13. Ercan S. Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan kolinesteraz inhibitörleri. Demans 2002;2:5-9.
14. Merck Index, 13th ed.,1480, 2001.
15. Physicians Desk Reference, 58th ed., 2252-2260, 2004.

- 16.** <http://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/exelon.pdf>
- 17.** Agid Y, Dubois B, Anand R, Gharabawi G. Efficacy and tolerability of rivastigmine in patients with dementia of the alzheimer type, Curr. Ther. Res. 1998; 59(12):833-845.
- 18.** Guideline for cognitive impairment: dementia diagnosis to management, Alberta Clinical Practice Guidelines, 2005.
- 19.** Scarpini E, Scheltens P, Feldman H. Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives, Lancet Neuro. 2003; 2: 539-547.
- 20.** Farlow M, Lilly LM. Rivastigmine: an open labeled, observational study of safety and effectiveness in treating patients with Alzheimer's disease for up to 5 years. BMC Ger 2005;5(3):1-7.
- 21.** Reading PJ, Luce AK, McKeith IG. Rivastigmine in the treatment of parkinsonian psychosis and cognitive impairment: preliminary findings from an open trial, Mov Dis 2001;16(6):1171-1174.
- 22.** Emre M, Aarsland D, Albanese A, Byrne EJ, Deuschle G, De Deyn PP, et al. Rivastigmine for dementia associated with parkinson's disease. N Eng J Med 2004;351(25): 2509-2519.

- 23.**Leroi I, Collins D, Marsh L. Non-dopaminergic treatment of cognitive impairment and dementia in Parkinson's disease. *J Neuro Sci* 2006; 248(1-2):104-114.
- 24.**Parry AMM, Scott RB, Palace J, Smith S, Mathews. Potentially adaptive functional changes in cognitive processing for patients with multiple sclerosis and their acute modulation by rivastigmine, *Brain* 2003;126:2750-2760.
- 25.**Kumari V, Aasen Ingrid, Ffytche D, Williams CR, Sharma T. Neural correlates of adjunctive rivastigmine treatment to antipsychotics in schizophrenia: A randomized, placebo-controlled, double blind fMRI study, *NeuroImage* 2006;29:545-556.
- 26.**Eskander MF, Nagykeri NG, Leung EY, Khelghati B, Geula C. Rivastigmine is a potent inhibitor of acetyl and butyrylcholinesterase in Alzheimer's plaques and tangles. *Brain Res* 2005;1060:144-152.
- 27.**Polinsky RJ. Clinical pharmacology of rivastigmine: a new generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Clin. Ther* 1998; 20(4):634-647.
- 28.**Farlow MR. Pharmacokinetic profiles of current therapies for alzheimer's disease: implications for switching to galantamine. *Clin.Ther* 2001;23-Suppl.A:A13-A24.

- 29.** Mustazza C, Borioni A, Giudice MRD, Gatta RF, Meneguz A, Volpe MT, et al. Synthesis and cholinesterase activity of phenylcarbamates related to rivastigmine, a therapeutic agent for Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem* 2007;37:91-109.
- 30.** Jann MW, Shirley KL, Small GW. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of cholinesterase inhibitors. *Clin Pharmacokinet* 2002;41(10):719-739.
- 31.** Hsiung GYR. Current therapy: a review of the cholinesterase inhibitors. *BC Med J* 2004;47(7):1-5.
- 32.** <http://www.exelon.com/hcp/treating/tolerability.jsp>
- 33.** Gobburu JV, Tammara V, Lesko L, Jhee SS, Sramek JJ, Cutler NR, Yuan R, et al. Pharmacokinetic- pharmacodynamic modeling of rivastigmine, a cholinesterase inhibitor, in patients with Alzheimer's disease. *J Clin Pharm* 2001; 41: 1082-1090.
- 34.** Tse FLS, Laplanche R. Absorption, metabolism and disposition of [^{14}C] SDZ ENA 713, an acetylcholinesterase inhibitor, in minipigs following oral, intravenous and dermal administration. *Pharm Res* 1998; 15: 1614-1620.
- 35.** Rao BM, Srinivasu MK, Kumar KP, Bhadrwaj N, Ravi R, Mohakhud PK, Reddy GO, Kumar PR, et al. A stability indicating LC method for Rivastigmine hydrogen tartrate. *J Pharm Biomed Anal* 2005; 37: 57-63.

- 36.**Enz A, Chappuis A, Dattler A. A simple rapid and sensitive method for simultaneous determination of rivastigmine and its major metabolite NAP 226-90 in rat brain and plasma by reversed-phase liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. Biomed Chrom 2004; 18: 160-166.
- 37.**Pommier F, Frigola R. Quantitative determination of rivastigmine and its major metabolite in human plasma by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. J Chrom 2003; 784: 301-313.
- 38.**Vademecum Modern İlaç Rehberi. 30. Ankara; 2007.
- 39.**Uhumwangho MU, Okor RS. Current trends in the production and biomedical applications of liposomes: a review. J Med Biomed Res 2005; 4: 9-21.
- 40.**Lasic DD. Novel applications of liposomes. Tibtech 1998; 16: 307-321.
- 41.**New RRC. Liposomes: a practical approach. 1. New York: Oxford University Pres; 1990.
- 42.**Garcia-Garcia E, Andrieux K, Gil S, Couvreur P. Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: A way to deliver drugs to the brain?. Int J Pharm 2005; 298: 274-292.
- 43.**Allen TM. Liposomes : Opportunities in drug delivery. Drugs 1997; 4: 8-14.

- 44.**Matteucci ML, Thrall DE. The role of liposomes in drug delivery and diagnostic imaging: a review. Vet Rad Ultrasound 2000; 41: 100-107.
- 45.**Gürsoy AZ. Kontrollü salım sistemleri.1. İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği; 2002.
- 46.**Ostro MJ. Liposomes. 1. New York: Marcel Dekker, inc; 1983.
- 47.**Sharma A, Sharma US. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. Int J Pharm 1997; 154: 123-140.
- 48.**Kreuter J. Colloidal drug delivery systems. 1. USA: Marcel Dekker; 1994.
- 49.**Keller BC. Liposomes in nutrition. Trends F Sci & Tech2001; 12: 25-31.
- 50.**Torchilin VP, Weissig V. Liposomes. 2. Boston: Oxford University Press; 2003.
- 51.**Erdoğan S, Özer AY, Hıncal AA. Radyopak lipozomların nükleer tıpta kullanımları. FABAD J Pharm Sci 1995; 20: 105-116.
- 52.**Özer AY. Oküler ilaç taşınmasında lipozomlar. FABAD J Pharm Sci 1995; 20: 173-180.

- 53.** Cheema SK, Gobin AS, Rhea R, Lopez-Berestein G, Newman RA, Mathur AB, et al. Silk fibroin mediated delivery of liposomal emodin to breast cancer cells. *Int J Pharm* 2007; 341: 221-229.
- 54.** Zavaleta CL, Phillips WT, Soundararajan A, Goins AB. Use of avidin/biotin-liposome system for enhanced peritoneal drug delivery in an ovarian cancer model. *Int J Pharm* 2007; 337: 316-328.
- 55.** Bozdağ S, Vural İ, Çapan Y, Dalkara T. Beyin tümörlerinin tedavisinde ilaç taşıyıcı sistemlerin uygulanması. *FABAD J Pharm Sci* 2002; 27: 89-104.
- 56.** Li C, Yoshimoto M, Fukunaga K, Nakao K. Characterization and immobilization of liposome-bound cellulase for hydrolysis of insoluble cellulose. *Biosource Tech* 2007; 98: 1366-1372.
- 57.** Hoiuchi A, Satou T, Akao N, Koike K, Fujita K, Nikaido T. The effect of free and polyethylene glycol-liposome-entrappe albendazole on larval mobility and number in *Toxocara canis* infected mice. *Vet Parasitol* 2005;129:83-87.
- 58.** Yan W, Chen W, Huang L. Mechanism of adjuvant activity of cationic liposome: Phosphorylation of a mapkinase, ERK and induction of chemokins. *Mol Immun* 2007;44:3672-3681.
- 59.** Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamru N, Hoshimoto S, Nagasawa T, et al. Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-RNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. *Vaccine* 2007;25:2990-2993.

60. Feng-chun QI, Chun-i W, Ya-jun W, Xue-mei Z, Yan Z, Bo S, et al. Immunogenicity and efficacy of Liposome encapsulated influenza split vaccine in Balb/C Mice. *Chem Res Chinese U*;23(3):314-318.
61. Betz G, Aeppli A, Nenshutina N, Leuenberger H. In vivo comparison of various liposome formulations for cosmetic application. *Int J Pharm* 2005;296:255-260
62. Serikawa T, Kikuchi A, Sugaya S, Suzuki N, Kikuchi H, Tanaka K. In vitro and in vivo evolution of novel cationic liposomes utilized for cancer gene therapy. *J Cont Rel* 2006;113:225-260.
63. Kajiwar E, Kawano K, Hattori J, Fukushima M, Hayashi K, Maitani Y. Long circulating liposome encapsulated ganciclovir enhances the efficacy of HSV-TK suicide gene therapy. *J Cont Rel* 2007;120:104-110.
64. Freshney RI. Culture of animal cells. 4. Canada: Wiley-Liss, inc.; 1994.
65. Artursson P, Borchardt RT. Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond. *Pharm Res* 1997; 14: 1655-1658.
66. Lundquist S, Renftel M, Brillault J, Fenart L, Cecchelli R, Dehouck MP, et al. Prediction of drug transport through the blood-brain barrier in vivo: A comparison between two in vitro cell models. *Pharm Res* 2002; 19: 976-981.

- 67.**Audus KL, Bartel RL, Hidalgo IJ, Borchardt RT. The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism studies. *Pharm Res* 1990; 7: 435-449.
- 68.**Martin BM. Tissue cell culture techniques. 1. Boston: Birkhauser; 1994.
- 69.**Clynes M. Animal cell culture techniques. 1. New York: Springer; 1998.
- 70.**Artursson P. Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa. *Crit Rev Ther Drug Car Syst* 1991; 8: 305-330.
- 71.**http://www.corning.com/Lifesciences/technical_information/techDocs/Transwell-InstructionManuel.pdf
- 72.**Stringer JL, Peppas NA. Diffusion of small molecular weight drugs in radiation-crosslinked poly(ethylene oxide) hydrogels. *J Cont Rel* 1996; 42 :195-202.
- 73.**Freshney RI. Culture of animal cells, a manual basic technique. Fourth ed. Canada 2000.
- 74.**Boulenc X, Marti E, Joyeux H, Roques C, Berger Y, Fabre G, et al. Importance of the paracellular pathway for the transport of a new bisphosphonate using the human Caco-2 monolayers model. *Biochem Pharmacol* 1993; 46: 1591-1600.
- 75.**Walter E, Kissel T. Heterogeneity in the human intestinal cell line Caco-2 leads to differences in transepithelial transport. *Eur J Pharm Sci* 1995; 3: 215-230.

- 76.** Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem and Biophys Res Com* 1991; 175: 880-885.
- 77.** Anderberg EK, Nyström C, Artursson P. Epithelial transport of drugs in cell culture. VII: Effects of pharmaceutical surfactant excipients and bile acid on transepithelial permeability in monolayers of human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J Pharm Sci* 1992; 81: 879-887.
- 78.** Hilgers AR, Conradi RA, Burton PS. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharm Res* 1990; 7: 902-910.
- 79.** Gan LS, Eads C, Niederer T, Bridgers A, Yanni S, Hsyu PH, Pritchard FJ, Thakker D, et al. Use of Caco-2 cells as an in vitro intestinal absorption and metabolism model. *Drug Dev Ind Pharm* 1994; 20: 615-631.
- 80.** Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: A survey of twenty cell lines. *Cancer Res* 1988; 48: 1936-1942.
- 81.** Artursson P. Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *J Pharm Sci* 1990; 79: 476-482.

- 82.** Garberg P, Eriksson P, Schipper N, Sjöström B. Automated absorption assessment using Caco-2 cells cultured on both sides of polycarbonate membranes. *Pharm Res* 1999; 16: 441-445.
- 83.** Wilson G. Cell culture techniques for the study of drug transport. *Eur J D Met Pharm* 1990; 15: 159-163.
- 84.** Raiman J, Törmälehto S, Yrityk K, Junginger HE, Mönkkönen J. Effects of various absorption enhancers on transport of clodronate through Caco-2 cells. *Int J Pharm* 2003; 261: 129-136.
- 85.** Gan LS, Eads C, Niederer T, Bridgers A, Yanni S, Hsyu PH, Pritchard FJ, Thakker D, et al. Use of Caco-2 Cells as an in vitro intestinal absorption and metabolism model. *Drug Dev Ind Pharm* 1994; 20: 615-631.
- 86.** Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Del* 2001; 46: 27-43.
- 87.** Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, et al. Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 1993; 123: 1777-1788.
- 88.** Hochman J, Artursson P. Mechanisms of absorption enhancement and tight junction regulation. *J Cont Rel* 1994; 29: 253-267.
- 89.** Burton PS, Conradi RA, Hilgers AR, Ho NFH, Maggiora LL. The relationship between peptide structure and transport across epithelial cell monolayers. *J Cont Rel* 1992; 19: 87-98.

- 90.** Barlow D, Satoh T. The design of peptide analogues for improved absorption. *J Cont Rel* 1994; 29: 283-291.
- 91.** Rubas W, Jezyk N, Grass GM. Comparison of the permeability characteristics of a human colonic epithelial (Caco-2) cell line to colon of rabbit, monkey and dog intestine and human drug absorption. *Pharm Res* 1993; 10: 113-118.
- 92.** Walter E, Kissel T, Reers M, Dickneite G, Hoffmann D, Stüber W, et al. Transepithelial transport properties of peptidomimetic thrombin inhibitors in monolayers of a human intestinal cell line (Caco-2) and their correlation to in vivo data. *Pharm Res* 1995; 12: 360-365.
- 93.** Conradi RA, Wilkinson KF, Rush BD, Hilgers AR, Ruwart MJ, Burton PS, et al. In vitro/ in vivo models for peptide oral absorption: Comparison of Caco-2 cell permeability with rat intestinal absorption of renin inhibitory peptides. *Pharm Res* 1993; 10: 1790-1792.
- 94.** Kim DC, Burton PS, Borchardt RT. A correlation between the permeability characteristics of a series of peptides using an in vitro cell culture model (Caco-2) and those using an in situ perfused rat ileum model of the intestinal mucosa. *Pharm Res* 1993; 10: 1710-1714.
- 95.** Lennernas H, Regardh CG. Evidence for an interaction between the β -blocker pafenolol and bile salts in the intestinal lumen of the rat leading to dose-dependent oral absorption and double peaks in the plasma concentration –Time profile. *Pharm Res* 1993; 10: 879-883.

- 96.** Yamaguchi T, Ikeda C, Sekine Y. Intestinal absorption of a β -adrenergic blocking agent nadolol. II. Mechanism of the inhibitory effect on the intestinal absorption of nadolol by sodium cholate in rats. *Chem Pharm Bull* 1986; 34: 3836-3843.
- 97.** Lehr CM, Lee VHL. Binding and transport of some bioadhesive plant lectins across Caco-2 cell monolayers. *Pharm Res* 1993; 10: 1796-1799.
- 98.** Lazorova L, Artursson P, Engström A, Sjölander A. Transport of an influenza virus vaccine formulation (iscom) in Caco-2 cells. *A Physicol Soc* 1996: G554-G563.
- 99.** Mikogami T, Heyman M, Spik G, Desjeux JF. Apical-to-basolateral transepithelial transport of human lactoferrin in the intestinal cell line HT-29cl. 19A. *A Physicol Society* 1994: G308-G315.
- 100.** Young RC, Mitchell RC, Brown TH, Ganellin CR, Griffiths R, Jones M, Rana KK, Saunders D, Smith IR, Sore NE, Wilks TJ, et al. Development of a new physicochemical model for brain penetration and its application to the design of centrally acting H₂ receptor histamine antagonists. *J Med Chem* 1988; 31: 656-671.
- 101.** Seelig A, Gottschlich R, Devant RM. A method to determine the ability of drugs to diffuse through the blood-brain barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994; 91: 68-72.
- 102.** Conradi RA, Hilgers AR, Ho NFH, Burton PS. The influence of peptide structure on transport across Caco-2 cells. *Pharm Res* 1991; 8: 1453-1458.

- 103.** Martin IC. A practitioner's perspective of the role of quantitative structure-activity analysis in medicinal chemistry. *J Med Chem* 1981; 24: 229-240.
- 104.** Wilson G, Hassan IF, Dix CJ, Williamson I, Shah R, Mackay M, Artursson P, et al. Transport and permeability properties of human Caco-2 cells: An in vitro model of the intestinal epithelial cell barrier. *J Cont Rel* 1990; 11: 25-40.
- 105.** Brunet JL, Maresca M, Fantini J, Belzunces LP. Human intestinal absorption of imidacloprid with Caco-2 cells as enterocyte model. *Toxicol App Pharmacol* 2004; 194: 1-9.
- 106.** Jewell C, Cusack S, Cashman KD. The effect of conjugated linoleic acid on transepithelial calcium transport and mediators of paracellular permeability in human intestinal-like Caco-2 cells. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2005; 72: 163-171.
- 107.** Esposito A, Sannino A, Cozzolino A, Quintiliano SN, Lamberti M, Ambrosio L, Nicolais L, et al. *Biomater* 2005; 26: 4101-4110.
- 108.** Ingels F, Deferme S, Destexhe E, Oth M, Van den Mooter G, Augustijns P, et al. Simulated intestinal fluid as transport medium in the Caco-2 cell culture model. *Int J Pharm* 2002; 232: 183-192.
- 109.** Huynh-Delerme C, Huet H, Noel L, Frigieri A, Kolf-Clauw M. Increased functional expression of P-glycoprotein in Caco-2 TC7 cells exposed long-term to cadmium. *Toxicology in Vitro* 2005; 19: 439-447.

- 110.** Sha X, Yan G, Wu Y, Li J, Fang X. Effect of self-microemulsifying drug delivery systems containing Labrasol on tight junctions in Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci* 2005; 24: 477-486.
- 111.** Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroent* 1989; 96: 736-749.
- 112.** Tsukazaki M, Satsu H, Mori A, Sugita-Konishi Y, Shimizu M. Effects of tributyltin on barrier functions in human intestinal Caco-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315: 991-997.
- 113.** Bromberg L, Alakhov V. Effects of polyether-modified poly(acrylic acid) microgels on doxorubicin transport in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers. *J Cont Rel* 2003; 88: 11-22.
- 114.** Tammela P, Laitinen L, Galkin A, Wennberg T, Heczko R, Vuorela H, Slotte JP, Vuorela P, et al. Permeability characteristics and membrane affinity of flavonoids and alkyl gallates in Caco-2 cells and in phospholipid vesicles. *Arc Biochem Biophys* 2004; 425: 193-199.
- 115.** Collier K, Matalonis S, Owen AJ. Evaluation of permeability enhancement by microemulsion in a Caco-2 cell system. *Proceed. Int'l. Symp Control Rel Bioact Mater* 1999; 26.
- 116.** Liu P, Davis P, Liu H, Krishnan TR. Evaluation of cytotoxicity and absorption enhancing effects of melittin- a novel absorption enhancer. *Eur J Phar Biopharm* 1999; 48: 85-87.

- 117.** Irvine JD, Takahashi L, Lockhart K, Cheong J, Tolan JW, Selick HE, Grove JR, et al. MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. *J Pharm Sci* 1999; 88: 28-33.
- 118.** Cho MJ, Thompson DP, Cramer CT, Vidmar TJ, Scieszka JF. The Madin Darby Canine Kidney (MDCK) epithelial cell monolayer as a model cellular transport barrier. *Pharm Res* 1989; 6: 71-77.
- 119.** Garberg P, Ball M, Borg N, Cecchelli R, Fenart L, Hurst RD, Lindmark T, Mabondzo A, Nilsson JE, Raub TJ, Stanimirovic D, Terasaki T, Öberg JO, Österberg T, et al. In vitro models for the blood-brain barriers. *Toxicology in Vitro* 2005; 19: 299-334.
- 120.** Gumbleton M, Audus KL. Progress and limitations in the use of in vitro cell cultures to serve as a permeability screen for the blood-brain barrier. *J Pharm Sci* 2001; 90: 1681-1698.
- 121.** Horio M, Chin KV, Currier SJ, Goldenberg S, Williams C, Pastan I, Gottesman MM, Handler J, et al. Transepithelial transport of drugs by the multidrug transporter in cultured Madin-Darby Canine Kidney cell epithelia. *J Biol Chem* 1989; 264: 14880-14884.
- 122.** Huber JD, Egleton RD, Davis TP. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci* 2001; 24: 719-725.
- 123.** Rubin LL, Hall DE, Porter S, Barbu K, Cannon C, Horner HC, Janatpour M, Liaw CW, Manning K, Morales J, Tanner LI, Tomaselli KJ, Bard F, et al. A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol* 1991; 115: 1725-1735.

- 124.** Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview Structure, regulation and clinical implications. *Neurobiol Dis* 2004; 16:1-13.
- 125.** Abbott NJ. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J. Anat.* 2002; 200: 629-638.
- 126.** Abbott NJ. Physiology of the blood-brain barrier and its consequences for drug transport to the brain. *Int Cong Series* 2005; 1277: 3-18.
- 127.** Abbott NJ. Prediction of blood-brain barrier permeation in drug discovery from in vivo, in vitro and in silico models. *Drug Disc Today: Technologies* 2004; 1: 407-416.
- 128.** Gloor SM, Wachtel M, Bolliger MF, Ishihara H, Landmann R, Frei K, et al. Molecular and cellular permeability control at the blood-brain barrier. *Brain Res Rev* 2001; 36: 258-264.
- 129.** Begley DJ, Bradbury MW, Kreuter J. The blood-brain barrier and drug delivery to the CNS. 1. New York: Marcel Dekker, inc; 2000.
- 130.** Gaillard PJ, Boer AG. Relationship between permeability status of the blood-brain barrier and in vitro permeability coefficient of a drug. *Eur J Pharm Sci* 2000; 12: 95-102
- 131.** Kusch-Poddar M, Drewe J, Fux I, Gutmann H. Evaluation of the immortalized human brain capillary endothelial cell line BB19 as a human cell culture model for the blood-brain barrier. *Brain Res* 2005; 1064: 21-31.

- 132.** Franke H, Gala HJ, Beuckmann CT. Primary cultures of brain microvessel endothelial cells: a valid and flexible model to study drug transport through the blood-brain barrier in vitro. *Brain Res Protoc* 2000; 5: 248-256.
- 133.** Fletcher NF, Brayden DJ, Brankin B, Worrall S, Callanan JJ. Growth and characterisation of a cell culture model of the feline blood-brain barrier. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 109: 233-244.
- 134.** Lundquist S, Renftel M. The use of in vitro cell culture models for mechanistic studies and as permeability screens for the blood-brain barrier in the pharmaceutical industry- Background and current status in the drug discovery process. *Vasc Pharm* 2002; 38: 355-364.
- 135.** Franke H, Galla HJ, Beuckmann CT. An improved low-permeability in vitro model of the blood-brain barrier: Transport studies on retinoids, sucrose, haloperidol, caffeine and mannitol. *Brain Res* 1999; 818: 65-71.
- 136.** Muruganandam A, Herx LM, Monette R, Durkin JP, Stanimirovic DB. Development of immortalized human cerebromicrovascular endothelial cell line as an in vitro model of the human blood-brain barrier. *FASEB J* 1997; 11: 1187-1197.
- 137.** Liu X, Tu M, Kelly RS, Chen C, Smith BJ. Development of a computational approach to predict blood-brain barrier permeability. *Drug Met Dispos* 2004; 32: 132-139.

- 138.** Yeh YH, Hwang DF. High performance liquid chromatographic determination for bile components in fish, chicken, duck. *J Chrom B* 2001;75:1-8.
- 139.** Basappa C, Rao P, Rao DN, Divakar S. A modified colorimetric method for the estimation of β -cyclodextrin using phenolphthalein. *Int J Food Sci Tech* 1998;33:517-520.
- 140.** Othman AA, Syed SA, Newman AH, Eddington ND. Transport, metabolism and in vivo population pharmacokinetics of the chloro benzotropine analogs, a class of compounds extensively evaluated in animal models of drug abuse. *J Pharm Exp Ther* 2007;320:344-353.
- 141.** Stevenson CL, Augustijns PF, Hendren RW. Use of Caco-2 cells and LC/MS/MS to screen a peptide combinatorial library for permeable structures. *Int J Pharm* 1999;177:103-115.
- 142.** Wang Q, Rager JD, Weinstein K, Kardos PS, Dobson GL, Li J, et al. Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood-brain barrier. *Int J Pharm* 2005;288:349-359.
- 143.** Raiman J, Törmaletho S, Yrityk K, Junginger HE, Mönkkönen J. Effects of various absorption enhancers on transport of clodronate through Caco-2 cells. *Int J Pharm* 2003;261:129-136.
- 144.** Zerrouk N, Corti G, Ancillotti S, Maestrelli F, Cirri M, Mura P. Influence of cyclodextrins and chitosan, separately or in combination on glyburide solubility and permeability. *Eur J Pharm Biopharm* 2006;62:241-246.

- 145.** Meaney CM, O'Driscoll CM. A comparison of the permeation enhancement potential of simple bile salt and mixed bile salt:fatty acid micellar systems using the Caco-2 cell culture model. *Int J Pharm* 2000;207:21-30.
- 146.** Ellman GL, Courtney D, Andre V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961;7:88-95.
- 147.** Alcala MM, Vivas NM, Hospital S, Camps P, Torreno Diego Muroz, Badia A. Characterization of the anticholinesterase activity of two tacrin-huperizin A hybrids. *Neuropharmacol* 2003;44:749-755.
- 148.** Snape MF, Misra A, Murray TK, De Souza RJ, Williams JL, Cross AJ, et al. A comparative study in rats of the in vitro and in vivo pharmacology of the acetylcholinesterase inhibitors tacrine, donepezil and NXX-066. *Neuropharmacol* 1999;38:181-193.
- 149.** Worek F, Mast U, Kiderlen D, Diepold C, Eyer P. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin Chim Acta* 1999;208:73-90.
- 150.** Udata C, Pate J, Pal D, Hechman E, Chushman. Mitra AK. Enhanced transport of a novel anti HIV agent –cosalane and its congeners across human intestinal epithelial cell monolayers. *Int J Pharm* 2003;250:157-168.
- 151.** Karamustafa F. Alendronatın Mikroemülsiyon Formülasyonunun Geliştirilmesi ve Caco-2 Hücrelerinden Geçişinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2005.

- 152.** Matilainen L, Toropainen T, Vihola H, Hirvonen J, Jarvinen T, Jorho P, et al. In vitro toxicity and permeation of cyclodextrins in Calu-3 cells. *J Cont Rel* 2007.
- 153.** Higuchi T. Physical chemical analysis of percutaneous absorption from creams and ointments. *J Soc Cosmet Chem* 1960;11:85-97.
- 154.** Potts RO, Guy RH. Predicting skin permeability. *Pharm Res* 1992;9:663-669.
- 155.** Mura P, Maestrelli F, Gonzales-Rodriges ML, Michelacci I, Ghelardini C, Rabasco AM. Development, characterization and in vitro evaluation of benzocaine loaded liposomes. *Eur J Pharm Biopharm* 2007;67(1):86-95.
- 156.** Hawkins KI and Knittle E. Comparison and acetylcholineesterase determinations by the Michel and Ellman Methods. *Anal Chem* 1972;44(2):416-417.
- 157.** Borges O, Cordeiro-da-Silva A, Romeijn SG, Amidi M, Sousa A, Borchard G, Junginger HE. Uptake studies in rat Peyer's patches, cytotoxicity and release studies of alginate coated chitosan nanoparticles for mucosal vaccination. *J Cont Rel* 2006; 114: 348-58.
- 158.** Değim Z, Değim T, Baş L, Elmas M. The use of liposomal enrofloxacin for intracellular infections in kangal dogs and visualisation of phagocytosis of liposomes. *J Biomed Mater Res* 2002; 61(2): 246-51.

- 159.** Degim IT, Gumusel B, Degim Z, Özçelikay T, Tay A, Güner Ş, [Oral administration of liposomal insulin](#). J Nanosci Nanotech 2006; 6(9-10): 2945-2949.
- 160.** Takka S, Sakr A, Goldberg A. Development and validation of an in vitro in vivo korelation for buspirone hydrochloride extended release tablets. J Contr Rel 2003;88:147-157.
- 161.** Değim Z, Ünal N, Eşsiz D, Abbasoğlu U. Caco-2 cell culture as a model for famotidine absorption. Drug Del 2005;12:27-33.
- 162.** Cardo OC, O'Brien JPO, Casals D, Rittman-Graver L, Biedler JL, Melamed MR, Bertino JR. Multy drug resistance gene (p-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier size. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1989;86:695-698.

10. EKLER

10.1 TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimi planlayıp yöneten, yapılan çalışmaların her aşamasında yanımda olarak bana yardımcı olan, benden hoşgörü ve sabrını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili hocam **Doç. Dr. Zelihagül Değim'e**

Her ihtiyacım olduğunda yardımına koşan, fikirleri ve tecrübeleriyle benden ilgi ve desteğini esirgemeyen **Sayın Doç. Dr. Tuncer Değim'e**

Bilgi birikimlerinden faydalandığım, bana karşı her zaman içten ve anlayışlı olan **Sayın Prof. Dr. Nevin Çelebi'ye, Sayın Prof. Dr. Füsün Acartürk'e** ve **Sayın Prof. Dr. İlbeyi Ağabeyoğlu'na**

Samimi davranışları ve güleryüzlerinden dolayı **Sayın Prof. Dr. Tanver Doğanay'a , Sayın Doç. Dr. Figen Tırnaksız'a, Sayın Doç. Dr. Sevgi Takka'ya** ve **Sayın Yrd.Doç. Dr. Zeynep Şafak Teksin'e**

Bana sürekli destek olan arkadaşlarım **Arş. Gör. Sibel Tamer** ve **Arş. Gör. Sezen Yarımkaaya'ya** ayrıca **Arş. Gör. Fatmanur Tuğcu Demiröz'e,** **Arş. Gör.Tuba İnceçayır'a, Arş. Gör Can Dokak'a, Arş Gör. Şeyda Akkuş'a , Arş. Gör. Evren Odabaşıoğlu'na** ve **Fatma Çelik'e** sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı: N. Başaran

Soyadı: Mutlu

Doğum yeri ve tarihi: Ankara; 07.08.1983

Eğitimi

- Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 2005- (Yüksek lisans)
- Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 2001-2005 (Lisans)
- Özel Adana Fen Lisesi

Yabancı Dili

İngilizce

Üye Olduğu Kuruluşlar

- FABAD (Farmasötik Bilimler Ankara Derneği)
- TÜFTAD (Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği)