T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KANSER TEDAVİSİNDE ETKİLİ NANOPARTİKÜL VE KUANTUM NOKTACIKLARININ GELİŞTİRİLMESİ

GÜLEN MELİKE DEMİR

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ARALIK 2016

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

KANSER TEDAVİSİNDE ETKİLİ NANOPARTİKÜL VE KUANTUM NOKTACIKLARININ GELİŞTİRİLMESİ

Gülen Melike DEMİR

DOKTORA TEZİ

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ARALIK 2016

Gülen Melike DEMİR tarafından hazırlanan "Kanser Tedavisinde Etkili Nanopartikül ve Kuantum Noktacıklarının Geliştirilmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. İsmail Tuncer DEĞİM

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

.....

Başkan : Prof. Dr. Füsun ACARTÜRK

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

.....

Üye : Prof.Dr. Yeşim KARASULU

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ege Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

.....

Üye : Prof. Dr. Sevgi TAKKA

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

.....

Üye : Doç. Dr. Müge KILIÇARSLAN

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

.....

Tez Savunma Tarihi: 30 / 12 / 2016

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

Prof. Dr. Mustafa ASLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

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

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

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

Gülen Melike DEMİR

30 / 12 / 2016

KANSER TEDAVİSİNDE ETKİLİ NANOPARTİKÜL VE KUANTUM NOKTACIKLARININ GELİŞTİRİLMESİ

(Doktora Tezi)

Gülen Melike DEMİR

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2016

ÖZET

Tez çalışmasının amacı; fibrosarkoma kanser türü için oral yolla kullanılabilen, düşük dozda tedavi etkinliği yüksek, sitotoksisitesi düşük kemoterapötik bir ilaç formülasyonu geliştirmektir. Tedavide düşük dozda yüksek antikanser etkinlik görülebilmesi için, hem kombine kullanım ile sinerjik etki elde edilmesi amaçlanmış hem de hedefleme sistemleri ile ilacın tamamının hedef bölgeye gönderilmesi planlanmıştır. Antikanser etkinliğin sağlanması için oral yolla kullanıma olanak tanıyan imatinib mesilat veya erlotinib hidroklorür ile çalışılmıştır. Çalışmada, fizikokimyasal özellikleri farklı olan bu etkin maddelerin ilaç etkinliklerinin ve formülasyon özelliklerinin karşılaştırılmalı olarak incelenmesi düşünülmüştür. Ayrıca formülasyonlara steroidal olmayan antienflamatuvar bir ilaç olan deksketoprofen trometamol ilave edilerek sinerjik etki yaratılması hedeflenmiştir. Etkin maddeler kitozan nanopartiküllerine veya çinko oksit kuantum noktacıklarına yüklenmiş, taşıyıcı sistemler polietilen glikol ve folik asit ile geliştirilmiştir. Üretilen taşıyıcı sistemler üzerinde karakterizasyon çalışmaları sürdürülmüş, miktar tayin yöntemleri geliştirilip (UPLC ile) valide edilmiş, *in vitro* geçiş çalışmaları ile etkin madde çıkış hızları saptanmıştır. Sitotoksisite testleri ve Caco-2 hücrelerinden geçiş çalışmaları yapılmış, fibrosarkomalı hücreler üzerinde antitümöral etkinlik değerlendirilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarının yanı sıra deney hayvanları ile çalışılmış ve farmakokinetik çalışmalar ve antitümöral etkinlik çalışmaları sürdürülmüştür. Antitümöral etkinliğin değerlendirilmesinde tümör boyutları ölçülmüş, tümör dokuları histopatolojik olarak incelenmiş, tümör dokusunda çeşitli kitler ile enzim aktiviteleri tayin edilmiş ve ilacın çeşitli dokulara dağılımı değerlendirilmiştir. Bu deneylere ek olarak formülasyonların stabiliteleri de değerlendirilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda en yüksek etkinlik imatinib mesilat ve deksketoprofen trometamol etkin maddelerini içeren polietilen glikol ve folik asit yüklü kuantum noktacıkları ile elde edilmiştir. Bu formülasyon liyofilize edilip kapsüllere doldurulmuş ve deney hayvanlarına verilerek etkinliği tekrar değerlendirilmiştir. Geliştirilen imatinib mesilat içeren çinko oksit kuantum noktacıkları ile fibrosarkoma tümörü tedavisinde ümit verici sonuçlar alınmıştır.

Bilim Kodu : 1020

Anahtar Kelimeler : Nanopartikül, kuantum noktacıkları, kombine tedavi, fibrosarkoma

Sayfa Adedi : 302

Danışman : Prof. Dr. İsmail Tuncer DEĞİM

THE DEVELOPMENT OF NANOPARTICLES AND QUANTUM DOTS EFFECTIVE FOR CANCER THERAPY

(Ph. D. Thesis)

Gülen Melike DEMİR

GAZI UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

December 2016

ABSTRACT

The purpose of this thesis is to develop an orally applicable, effective with low dose, less cytotoxic chemotherapeutic containing drug formulation for the treatment of fibrosarcoma. In order to obtain high therapeutic effect with low dose, synergic effect of active compounds (combined therapy), targetting were aimed to use. Imatinib mesylate or erlotinib hydroclorür were used are as, orally applicable drugs. In this study, drug efficiencies and formulation properties of these drugs were investigated. Dexketoprofen tremetamol which is non steroidal antiinflammatory drug is also added to formulations to enhance effect. Active agents are loaded into the chitosan nanoparticles or zinc oxide quantum dots and these nanocarrier systems were decorated with polyethylene glycol and folic acid. Characterization studies were performed for prepared nanocarrier systems. Quantitation methods (UPLC) were developed and validated. Drug release studies (*in vitro*) were performed. Cytotoxicity tests and permeability tests with Caco-2 cell lines were performed and antitumoral activity tests were done with fibrosarcomatous cell lines. Pharmacokinetic studies and antitumoral activity tests were performed in animals. Antitumoral activity was evaluated by measuring tumor size, histopatologically evaluations and enzyme activities. Tissue distribution of formulations were also determined. In addition to these studies, stabilities of formulations were pursued. Optimum efficacy was obtained with imatinib mesylate, dexketoprofen tremetamol, polyethylene glycol and folic acid containing quantum dots. After lyophilisation, formulation was placed in hard gelatine capsules and administered orally to tumor bearing mice. Finally, the nanocarrier system based on quantum dots loaded imatinib mesylate was found to be promising for the treatment of fibrosarcoma tumors.

Science Code : 1020

Key Words : Nanoparticle, quantum dots, combine therapy, fibrosarcoma

Page Number : 302

Advisor : Prof. Dr. İsmail Tuncer DEĞİM

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimine başvurduğum andan itibaren her an desteğini hissettiğim, bana yol gösteren ve yolumu aydınlatan, doktora tezimi planlayıp yöneten, karşılaştığım her olumsuzlukta sabır göstererek çözüm üreten, araştırma şevkimin ve isteğimin kırılmasına izin vermeden beni yönlendiren, bilim insanı olarak hayatım boyunca örnek alacağım değerli hocam *Sn. Prof. Dr. İsmail Tuncer DEĞİM*'e sağladığı olanaklar için sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tezim sırasında bilimsel katkılarını ve desteğini benden esirgemeyen, kendi tez öğrencisi gibi kabul edip ilgilenen ve zaman ayıran, yılmadan çalışmamı sağlayan, beni gözeten ve benimle ilgilenen kıymetli hocam *Sn. Prof. Dr. Zelihagül DEĞİM*'e;

Tecrübeleri ve bilgisiyle bana her zaman destek olan, yönlendiren Bölüm Başkanım *Sn. Prof. Dr. Füsun ACARTÜRK*'e ve çalışmalarım sırasında bilimsel katkılarını ve desteğini esirgemeyen, Anabilim Dalı Başkanım *Sn. Prof. Dr. Nevin ÇELEBİ*'ye;

Bilgi birikimlerinden faydalandığım, içtenliğini eksik etmeyen *Prof. Dr. Yeşim KARASULU*'ya;

1003 - Öncelikli Alanlar Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı kapsamında 213M675 kodlu proje ile doktora tez çalışmalarımı destekleyen *TÜBİTAK*'a;

Çalışmalarım sırasındaki katkılarından dolayı *Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi*'ne, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi*'ne ve sundukları tüm imkanlar için *Şap Enstitüsü*'ne;

Doktora tezim boyunca göstermiş oldukları yakın ilgi ve destekleri için *Sn. Prof. Dr. Sevgi TAKKA, Sn. Prof. Dr. Figen TIRNAKSIZ*'a ve *Sn. Doç. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN*'e;

Çalışmalarım sırasında göstermiş oldukları sabır ve hoşgörüleri için *Dr. Ecz. Fatmanur TUĞCU-DEMİRÖZ, Dr. Ecz. Sibel İLBASMIŞ TAMER, Dr. Ecz. Tuba İNCEÇAYIR, Dr. Ecz. Başaran MUTLU AĞARDAN, Dr. Ecz. Şeyda AKKUŞ ARSLAN*'a; her başım sıkıştığında soluğu yanında aldığım değerli ağabeyim *Uzm. Ecz. Serdar TORT*'a; dostlukları ile her zaman yanımda olan, iyi günü kötü günü birlikte atlattığımız kıymetli arkadaşlarım *Özlem ÇOBAN* ve *Sema TUNA TORUNOĞLU*'na, her ihtiyacım olduğunda yardımıma koşan değerli dostum *Tahir Emre YALÇIN*'a ve gösterdikleri yakınlık için başta *Sıla GÜLBAĞ, Duygu YILMAZ USTA* ve *Alptuğ KARAKÜÇÜK* olmak üzere tüm bölüm arkadaşlarıma ve *Fatma ÇELİK*'e;

Tüm yaşamım boyunca arkamda olan, attığım her adımı destekleyen, siz olmasaydınız asla başaramazdım dediğim, sevgi, sabır ve hoşgörülerini eksik etmeyen, özverili ve fedakar canım Anneciğim ve canım Babacığım *Gülcan-Erkan DEMİR*'e; beni her zaman güldürmeyi, mutlu etmeyi başaran, sevgi dolu, miniş kız kardeşlerim *Güler Merve DEMİR* ve *Meriç DEMİR*'e ve her zaman sevgisini hissettiğim, ailemden gördüğüm, biricik dostum *Gülşen APAK*'a;

Her an ama her koşulda bana destek olan, ilgisini ve sabrını eksik etmeyen, varlığıyla güç ve huzur veren, bir an olsun yalnız bırakmayan sevgili yol arkadaşım *Emre DEMİRBOLAT*'a

TEŞEKKÜR EDERİM…

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ xii

ŞEKİLLERİN LİSTESİ xvi

RESİMLERİN LİSTESİ xxiv

SİMGELER VE KISALTMALAR xxviii

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 5

2.1. Kanser Fizyolojisi 5

2.1.1. Fibrosarkom fizyolojisi 7

2.2. Kanser Tedavisi 8

2.2.1. Kanser tedavisinde kemoterapi 8

2.3. Oral Yoldan Kullanılan Antikanser İlaçlar 11

2.3.1. Tirozin kinaz inhibitörleri 14

2.3.2. Kombine kullanım ile antikanser etkinliğinin artırılması 20

2.4. Kuantum Noktacıkları 22

2.4.1. Kuantum noktacıklarının yapısı ve özellikleri 23

2.4.2. Kuantum noktacıklarının hazırlama teknikleri 24

2.4.3. Kuantum noktacıklarının suda çözünürlükleri 24

2.4.4. Kuantum noktacıklarına fonksiyonel grup ilavesi 25

2.4.5. Kuantum noktacıklarının görüntüleme tekniklerinde kullanımı 26

2.4.6. Kuantum noktacıklarının ilaç salımında ve kanser tedavisinde kullanımı 27

Sayfa

2.4.7. Kuantum noktacıklarının analizleri için kullanılan teknikler 27
2.4.8. Kuantum noktacıklarının toksisitesi 28
2.4.9. Kuantum noktacıklarının stabiliteleri 28
2.5. Polimerik Nanopartiküller 28
2.5.1. Nanopartiküllerin yapısı ve özellikleri 29
2.5.2. Nanopartikül hazırlama yöntemleri 31
2.5.3. Nanopartiküllere fonksiyonel grup ilavesi 33
2.5.4. Nanopartiküllerin ilaç salımında ve kanser tedavisinde kullanımı 34
2.5.5. Nanopartiküllerin karakterizasyonları için kullanılan teknikler 35
2.5.6. Nanopartiküllerin toksisitesi 36
2.5.7. Nanopartiküllerin stabiliteleri 36
2.6. Antikanser İlaçların *İn Vivo* Etkinliğinin İncelenmesi 37
2.6.1. Hücre kültürleri 37
2.6.2. Hücre canlılığının ve sitotoksisitenin incelenmesi 41
2.6.3. İntestinal gerçirgenlik ve yapılan çalışmalar 43
2.6.4. Antikanser etkinin incelenmesinde kullanılan hücre tipleri 44
3. GEREÇ VE YÖNTEM 47
3.1. Gereç 47
3.1.1. Etkin maddeler 47
3.1.2. Kullanılan kimyasal malzemeler 47
3.1.3. Kullanılan alet ve cihazlar 48
3.2. Yöntem 51
3.2.1. Önformülasyon çalışmaları 51
3.2.2. Formülasyon çalışmaları 64
3.2.3. Hücre çalışmaları 87
3.2.4. Deney hayvanı çalışmaları 91

Sayfa

3.2.5. Formülasyonlara ait stabilite çalışmaları 102

3.2.6. Kapsüllerde yapılan çalışmalar 103

4. BULGULAR 107

4.1. Önformülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular 107

4.1.1. Etkin madde ve yardımcı maddelere ait partikül büyüklüğü sonuçları .. 107

4.1.2. Etkin madde ve yardımcı maddelere ait çalışmalar 108

4.1.3. Etkin maddelerin dalga boyu taramaları 115

4.1.4. Etkin maddelerin *in vitro* çalışmalarda kullanılmak üzere geliştirilen miktar tayini yöntemleri için validasyon sonuçları 121

4.1.5. Etkin maddelerin çözeltideki stabilitesi ile ilgili çalışmalar 141

4.1.6. Etkin maddelerin *in vivo* çalışmalarda kullanılmak üzere geliştirilen miktar tayini yöntemi için validasyon sonuçları 142

4.1.7. Formülasyonlarda yer alan maddelere ait sitotoksisite test sonuçları 146

4.2. Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular 154

4.2.1. Kuantum noktacıklarına ait karakterizasyon çalışmaları 154

4.2.2. Nanopartiküllere ait karakterizasyon çalışmaları 168

4.2.3. Formülasyonlarda yapılan *in vitro* salım çalışmalarına ait bulgular 174

4.2.4. İn vitro salım çalışmalarına ait reaksiyon kinetikleri 186

4.3. Hücre Çalışmalarına Ait Bulgula..... r 187

4.3.1. Caco-2 hücrelerinden geçiş çalışmaları..... 187

4.3.2. Maddelerin salım ve geçiş çalışmalarına göre hesaplanan permeabilite katsayılarına ait bulgular 192

4.3.3. Hücre bütünlüklerinin değerlendirilmesine yönelik bulgular 193

4.3.4. Hücreler üzerinde antitümöral aktivitenin değerlendirilmesine ilişkin bulgular..... 194

4.4. Deney Hayvanı Çalışmalarına Ait Bulgular 196

4.4.1. İlaçların farmakokinetik parametlerinin hesaplanması 196

4.4.2. Antikanser etkinliğin incelenmesine yönelik bulgular..... 203

Sayfa

4.5. Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular 219
4.5.1. Kuantum noktacıklarında yapılan stabilite testlerine ait bulgular 219
4.5.2. Nanopartiküllerde yapılan stabilite testlerine ait bulgular 233
4.5.3. Nanotaşıyıcı sistemlerin raf ömürlerinin hesaplanmasına yönelik bulgular 247
4.6. Kapsüllerde Yapılan Çalışmalar ve Bunlara Ait Bulgular 248
4.6.1. Liyofilize toz ile kapsülde yapılan çözünme hızı çalışmaları 248
4.6.2. Liyofilize tozda yapılan antitümöral etkinlik değerlendirme çalışmaları 250
4.6.3. Liyofilize tozda yapılan stabilite çalışmaları 252
5. TARTIŞMA 257
5.1. Önformülasyon Çalışmaları 257
5.2. Formülasyon Çalışmaları 261
5.2.1. Kuantum noktacıklarına ait karakterizasyon çalışmaları 261
5.2.2. Nanopartiküllere ait karakterizasyon çalışmaları 263
5.2.3. İn vitro etkin madde çıkış çalışmaları 264
5.3. Hücre Çalışmaları 267
5.3.1. Caco-2 hücreleri ile yapılan çalışmalar 267
5.3.2. WEHI 164 hücreleri ile yapılan antitümöral etkinlik çalışmaları 268
5.4. Deney Hayvanları Çalışmaları 270
5.4.1. Farmakokinetik verilerin değerlendirilmesi 270
5.4.2. Antikanser etkinliğin değerlendirilmesi 271
5.5. Stabilite Çalışmaları 272
5.6. Kapsülde Yapılan Çalışmalar 274
6. SONUÇ 277
KAYNAKLAR 279
EKLER 297

Sayfa

Ek-1. Formülasyonların reaksiyon kinetiklerine ait değerlendirme sonuçları 298

Ek–2. Etik Kurul Onayı – 1 299

Ek-2. Etik Kurul Onayı – 2 300

ÖZGEÇMİŞ..... 301

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 2.1. Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin Türkiye İlaç Piyasasındaki Yeri 14

Çizelge 2.2. Sıkça kullanılan doğal polimerlerden bazıları ve özellikleri 30

Çizelge 2.3. Sıkça kullanılan sentetik polimerlerden bazıları ve özellikleri..... 31

Çizelge 2.4. Hücrelerin yüzeyden ayrılma yöntemleri 40

Çizelge 2.5. Farklı hücre hatları ve özellikleri..... 44

Çizelge 2.6. Kanser çalışmalarında kullanılan hücrelere örnekler 46

Çizelge 3.1. İmatinib mesilat miktar tayini yöntemi geliştirme çalışmaları 54

Çizelge 3.2. İMA miktar tayini yöntem geliştirilmesi için BEH kolonda yapılan çalışmalar..... 55

Çizelge 3.3. UPLC cihazı ile etkin madde tayinleri için çalışma koşulları 56

Çizelge 3.4. Plazmada İMA miktar tayini yöntemi geliştirilmesi için yapılan çalışmalar..... 61

Çizelge 3.5. Kuantum noktacıkları formülasyonları..... 65

Çizelge 3.6. Asidik ortamdaki kuantum noktacıklarına ERLO yüklenmesi..... 67

Çizelge 3.7. Asidik ortamdaki kuantum noktacıklarına imatinib yüklenmesi..... 68

Çizelge 3.8. Kitozan çözeltisine NaOH ilavesi ile pH'sının bazik değerlere çekilmesi . 69

Çizelge 3.9. Bazik ortamdaki kuantum noktacıklarına erlotinib yüklenmesi 69

Çizelge 3.10. Bazik ortamdaki kuantum noktacıklarına imatinib yüklenmesi 70

Çizelge 3.11. Çeşitli içeriklerde kör hazırlanması 70

Çizelge 3.12. Farklı kitozan oranları kullanılarak kuantum noktacıkları hazırlanması .. 71

Çizelge 3.13. Tripolifosfat (TPP) içerikli kuantum noktacıkları hazırlanması..... 72

Çizelge 3.14. Düşük kitozan içerikli erlotinib yüklü kuantum noktacıkları formülasyonları..... 72

Çizelge 3.15. Düşük kitozan içerikli imatinib yüklü kuantum noktacıkları formülasyonları..... 73

Çizelge 3.16. Azalmış kitozan konsantrasyonunda kör hazırlanması 74

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 3.17. Suda kolayca dağılabilen kuantum noktacıkları formülasyonları 74

Çizelge 3.18. Farklı miktarlarda glasiyal asetik asit içeren kitozan formülasyonları 75

Çizelge 3.19. Nano Spray Dryer B-90 cihazında püskürtme etkinliği çalışmaları 76

Çizelge 3.20. Nano Spray Dryer B-90 cihazında kitozan NP'leri için optimizasyon çalışmaları 78

Çizelge 3.21. Formülasyon üretiminde kullanılan çalışma koşulları 78

Çizelge 3.22. Nanopartiküllerin formülasyon içerikleri 80

Çizelge 3.23. Erlotinib çözeltisinden geçiş çalışmaları 82

Çizelge 3.24. Taşıyıcı sistemlerin isimlendirilmeleri 83

Çizelge 4.1. Formülasyonlarda kullanılacak olan maddelerin partikül büyüklüğü ve dağılımı ölçüm sonuçları 107

Çizelge 4.2. Etkin ve yardımcı maddelere ait erime noktası tayin sonuçları 113

Çizelge 4.3. Etkin ve yardımcı maddelere ait dalga boyu taraması sonuçları 121

Çizelge 4.4. İmatinib mesilat için deney içi kesinlik sonuçları 131

Çizelge 4.5. Erlotinib HCl için deney içi kesinlik sonuçları 132

Çizelge 4.6. DEX için deney içi kesinlik sonuçları 132

Çizelge 4.7. Farklı ortamlarda çözülmüş İMA'ya ait deneyler arası kesinlik sonuçları 133

Çizelge 4.8. Farklı ortamlarda çözülmüş ERLO'ya ait deneyler arası kesinlik sonuçları 133

Çizelge 4.9. Farklı ortamlarda çözülmüş DEX'e ait BEH kolonda yapılan deneyler arası kesinlik sonuçları 134

Çizelge 4.10. Farklı ortamlarda çözülmüş DEX'e ait CORTEKS C18 kolonda yapılan deneyler arası kesinlik sonuçları 134

Çizelge 4.11. İmatinib mesilat için doğruluk ve geri elde sonuçları 135

Çizelge 4.12. Erlotinib HCl için doğruluk ve geri elde sonuçları 135

Çizelge 4.13. Deksketoprofen tremetamol için doğruluk ve geri elde sonuçları 136

Çizelge 4.14. Farklı ortamlardaki maddelere ait duyarlılık ve saptama sınırı sonuçları 140

Çizelge 4.15. pH 3 asetat tamponunda ERLO çözeltisi stabilite sonuçları 141

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.16. Maddelere ait çözelti hal stabilitesi sonuçları 141

Çizelge 4.17. Plazma numuneleri için etkin maddelere ait deney içi kesinlik sonuçları 143

Çizelge 4.18. Plazma numuneleri için etkin maddelere ait deneyler arası kesinlik sonuçları 144

Çizelge 4.19. Plazma numuneleri için etkin maddelere ait deneyler arası kesinlik sonuçları 144

Çizelge 4.20. Farklı pH'larda hazırlanmış erlotinib yüklü kuantum noktacıklarına ait bulgular 159

Çizelge 4.21. Farklı pH'larda hazırlanmış imatinib yüklü kuantum noktacıklarına ait bulgular 159

Çizelge 4.22. Farklı konsantrasyonlarda kitozan yüklenmiş ERLO yüklü kuantum noktacıkları 161

Çizelge 4.23. TPP ile sertleştirilmiş imatinib yüklü kuantum noktacıkları 161

Çizelge 4.24. Kuantum noktacıklarına ait karakterizasyon çalışması sonuçları 164

Çizelge 4.25. Farklı konsantrasyonlardaki kitozan çözeltilerinin özellikleri 168

Çizelge 4.26. Kitozan nanopartiküllerine ait bulgular 169

Çizelge 4.27. Fromülasyonlara ait püskürtmeyi etkileyebilecek parametrelere ait sonuçlar 170

Çizelge 4.28. Formülasyonlara ait karakterizasyon sonuçları 170

Çizelge 4.29. ERLO ve DEX içeren çözelti için diyaliz membranda salım çalışmaları 174

Çizelge 4.30. ERLO ve DEX içeren çözelti için selofan membranda salım çalışmaları 175

Çizelge 4.31. ERLO ve DEX içeren çözelti için diyaliz membrandaki diğer salım çalışmaları 176

Çizelge 4.32. ERLO ve DEX içeren çözelti için diyaliz membrandaki diğer salım çalışmaları 177

Çizelge 4.33. İMA ve DEX içeren çözeltiye ait Franz difüzyon hücresinden salım çalışmaları 177

Çizelge 4.34. Formülasyonların reaksiyon kinetiklerine ait r^2 değerleri 186

Çizelge 4.35. Formülasyonlara Ait Permeabilite Katsayıları 192

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.36. Caco-2 Hücre Bütünlüklerinin Değerlendirilmesinde TEER Ölçüm Sonuçları 193

Çizelge 4.37. Fibrosarkomalı hücreler üzerine çözeltilerin antitümöral etkinlik yüzdeleri 194

Çizelge 4.38. Fibrosarkomalı hücreler üzerine kuantum noktacıklarının antitümöral etkinlik yüzdeleri 195

Çizelge 4.39. Fibrosarkomalı hücreler üzerine nanopartiküllerin antitümöral etkinlik yüzdeleri 195

Çizelge 4.40. İMA ve DEX maddelerinin çözelti hallerine ait farmakokinetik parametreler 197

Çizelge 4.41. İMA ve DEX içeren kuantum noktacıklarına ait farmakokinetik parametreler 198

Çizelge 4.42. İMA ve DEX içeren nanopartiküllere ait farmakokinetik parametreler ... 199

Çizelge 4.43. ERLO ve DEX maddelerinin çözelti hallerine ait farmakokinetik parametreler 200

Çizelge 4.44. ERLO ve DEX içeren kuantum noktacıklarına ait farmakokinetik parametreler 201

Çizelge 4.45. ERLO ve DEX içeren nanopartiküllere ait farmakokinetik parametrele r 202

Çizelge 4.46. Deney hayvanlarında kumpas ile tümör ölçüm sonuçları..... 204

Çizelge 4.47. Histopatolojik inceleme verileri 205

Çizelge 4.48. Tirozin Kinaz Reseptör İnhibisyonu Etkinliği..... 215

Çizelge 4.49. Siklooksijenaz enzimi reseptör inhibisyon etkinliği..... 216

Çizelge 4.50. Folat reseptör inhibisyon etkinliği 217

Çizelge 4.51. Deney hayvanlarında etkin maddelerin doku dağılım sonuçları 218

Çizelge 4.52. Nanotaşıyıcı sistemler için raf ömrü değerleri..... 247

Çizelge 4.53. Kapsül formunun reaksiyon kinetiklerine ait değerleri 250

Çizelge 4.54. Kapsül formunun antitümöral aktivite açısından değerlendirilmesi..... 252

Çizelge 4.55. Liyofilize toza ait farklı sıcaklıklardaki raf ömrü değerleri..... 255

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Peyer plaklarından M hücreleri aracılığı ile nanopartiküler sistemlerin geçişi..... 13

Şekil 2.2. İmatinib mesilatın moleküler yapısı 16

Şekil 2.3. Erlotinib HCl'in moleküler yapısı..... 18

Şekil 2.4. Kuantum noktacıklarının suda çözünür hale getirilmesi için yaklaşımlar..... 25

Şekil 2.5. Kuantum Noktacığına fonksiyonel grup ilave edilmesi 26

Şekil 2.6. Nanopartikül yapıları..... 29

Şekil 2.7. Yüzey modifikasyonları yapılmış PLGA-PEG nanopartikül yapısı..... 34

Şekil 2.8. Farklı hücre kültürlerinin özellikleri..... 39

Şekil 2.9. Sitotoksisite tayininde uygulanan kantitatif yöntemler 42

Şekil 3.1. Kuantum noktacıklarının üretim basamaklarının şematik gösterimi..... 67

Şekil 3.2. Franz Difüzyon Hücresinin şematik görünümü..... 81

Şekil 3.3. Diyaliz torbası yönteminin şematik görünümü..... 83

Şekil 4.1. İmatinib mesilatın DSC termogramı..... 108

Şekil 4.2. Erlotinib HCl'in DSC termogramı..... 108

Şekil 4.3. Deksketoprofen trometamolün DSC termogramı..... 109

Şekil 4.4. PEG-2000'in DSC termogramı..... 109

Şekil 4.5. DSPE-PEG2000-FA maddesine ait DSC termogramı..... 110

Şekil 4.6. Folik asit'in DSC termogramı 110

Şekil 4.7. İmatinib mesilat, deksketoprofen trometamol, folik asit ve PEG-2000 karışımına ait DSC termogramı..... 111

Şekil 4.8. Erlotinib HCl, deksketoprofen trometamol, folik asit ve PEG-2000 karışımına ait DSC termogramı..... 111

Şekil 4.9. İmatinib mesilat, deksketoprofen trometamol ve DSPE-PEG-2000-FA maddeleri karışımına ait DSC termogramı..... 112

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.10. Erlotinib HCl, deksketoprofen trometamol ve DSPE-PEG-2000-FA karışımına ait DSC termogramı 112

Şekil 4.11. İmatinib mesilat'in FTIR analiz sonucu 113

Şekil 4.12. Erlotinib HCl'in FTIR analiz sonucu 114

Şekil 4.13. Deksketoprofen trometamolün FTIR analiz sonucu 115

Şekil 4.14. İmatinib mesilatın *distile su* ortamındaki spektrum grafiği 116

Şekil 4.15. İmatinib mesilatın *pH 7,4 fosfat tamponu*ndaki spektrum grafiği 116

Şekil 4.16. İmatinib mesilatın *DMEM* ortamındaki spektrum grafiği 117

Şekil 4.17. Erlotinib HCl'in *distile su* ortamındaki spektrum grafiği 117

Şekil 4.18. Erlotinib HCl'in *pH 7,4 fosfat tamponu*ndaki spektrum grafiği 118

Şekil 4.19. Erlotinib HCl'in *pH 3 asetat tamponu*ndaki spektrum grafiği 118

Şekil 4.20. Erlotinib HCl'in *DMEM* ortamındaki spektrum grafiği 119

Şekil 4.21. Deksketoprofen tremetamol'ün *distile su* ortamındaki spektrum grafiği ... 119

Şekil 4.22. Deksketoprofen tremetamol'ün *pH 7,4 fosfat tamponu*ndaki spektrum grafiği 120

Şekil 4.23. Deksketoprofen tremetamol'ün *DMEM* ortamındaki spektrum grafiği 120

Şekil 4.24. Distile su ortamında çözülmüş imatinib mesilata ait doğrusallık grafiği (n=6) 124

Şekil 4.25. BEH kolonda distile su ortamında çözülmüş DEX'e ait doğrusallık grafiği (n=6) 124

Şekil 4.26. pH 7,4 fosfat tamponu ortamında çözülmüş imatinib mesilata ait doğrusallık grafiği (n=6) 125

Şekil 4.27. BEH kolonda pH 7,4 fosfat tamponu ortamında çözülmüş DEX'e ait doğrusallık grafiği (n=6) 125

Şekil 4.28. DMEM ortamında çözülmüş imatinib mesilata ait doğrusallık grafiği (n=6) 126

Şekil 4.29. BEH kolonda DMEM ortamında çözülmüş DEX'e ait doğrusallık grafiği (n=6) 126

Şekil 4.30. Distile su ortamında çözülmüş erlotinib HCl'e ait doğrusallık grafiği (n=6) 127

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.31. CORTEKS C18 kolonunda distile su ortamında çözülmüş DEX'e ait doğrusallık grafiği (n=6) 127

Şekil 4.32. pH 7,4 fosfat tamponu ortamında çözülmüş erlotinib HCl'e ait doğrusallık grafiği (n=6) 128

Şekil 4.33. CORTEKS C18 kolonunda pH 7,4 fosfat tamponu ortamında çözülmüş DEX'e ait doğrusallık grafiği (n=6) 128

Şekil 4.34. pH 3 asetat tamponu ortamında çözülmüş ERLO'ya ait doğrusallık grafiği (n=6) 129

Şekil 4.35. CORTEKS C18 kolonunda pH 3 asetat tamponu ortamında çözülmüş DEX'e ait doğrusallık grafiği (n=6) 129

Şekil 4.36. DMEM ortamında çözülmüş erlotinib HCl'e ait doğrusallık grafiği (n=6) . 130

Şekil 4.37. CORTEKS C18 kolonunda DMEM ortamında çözülmüş DEX'e ait doğrusallık grafiği (n=6) 130

Şekil 4.38. Distile su ortamında imatinib mesilata ait kromatogram sonucu 137

Şekil 4.39. pH 7,4 fosfat tamponu ortamında imatinib mesilata ait kromatogram sonucu 137

Şekil 4.40. DMEM ortamında imatinib mesilata ait kromatogram sonucu 138

Şekil 4.41. Distile su ortamında erlotinib HCl'e ait kromatogram sonucu 138

Şekil 4.42. pH 7,4 fosfat tamponu ortamında erlotinib HCl'e ait kromatogram sonucu 139

Şekil 4.43. pH 3 asetat tamponu ortamında erlotinib HCl'e ait kromatogram sonucu ... 139

Şekil 4.44. DMEM ortamında erlotinib HCl'e ait kromatogram sonucu 140

Şekil 4.45. Plazma ortamında imatinib mesilata ait doğrusallık grafiği 142

Şekil 4.46. Plazma ortamında erlotinib HCl'ye ait doğrusallık grafiği 143

Şekil 4.47. Plazmada yer alan imatinib mesilata ait kromatogram 145

Şekil 4.48. Plazmada yer alan erlotinib HCl'e ait kromatogram 145

Şekil 4.49. İmatinib mesilata ait hücre canlılığı bulguları 147

Şekil 4.50. Erlotinib HCl'e ait hücre canlılığı bulguları 148

Şekil 4.51. Deksketoprofen trometamole ait hücre canlılığı bulguları 149

Şekil 4.52. PEG2000'e ait hücre canlılığı bulguları 150

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.53. Folik asite ait hücre canlılığı bulguları 151

Şekil 4.54. Kitozana ait hücre canlılığı bulguları 152

Şekil 4.55. Tripolifosfata ait hücre görüntüleri ve hücre canlılığı bulguları 153

Şekil 4.56. Kuantum noktacıklarına ait sitotoksisite test sonuçları 163

Şekil 4.57. Nanopartiküllere ait sitotoksisite test sonuçları 169

Şekil 4.58. Kuantum noktacıklarından Franz difüzyon hücresinde İMA salım profili 179

Şekil 4.59. Farklı şekilde hazırlanan kuantum noktacıklarından Franz difüzyon hücresinde imatinib mesilat salım profili 179

Şekil 4.60. Kuantum noktacıklarından Franz difüzyon hücresinde ERLO salım profili 180

Şekil 4.61. ERLO içeren kuantum noktacıklarından Franz difüzyon hücresinde DEX salım profili 180

Şekil 4.62. Kuantum noktacıklarından diyaliz torbasında İMA salım profili 181

Şekil 4.63. İMA içeren kuantum noktacıklarından diyaliz torbasında DEX salım profili 181

Şekil 4.64. Kuantum noktacıklarından diyaliz torbasında ERLO salım profili 182

Şekil 4.65. ERLO içeren kuantum noktacıklarından diyaliz torbasında DEX salım profili 182

Şekil 4.66. Nanopartiküllerden Franz difüzyon hücresinde ERLO salım profili 183

Şekil 4.67. ERLO içeren nanopartiküllerden Franz difüzyon hücresinde DEX salım profili 183

Şekil 4.68. Nanopartiküllerden diyaliz torbasında İMA salım profili 184

Şekil 4.69. İMA içeren nanopartiküllerden diyaliz torbasında DEX salım profili 184

Şekil 4.70. Nanopartiküllerden diyaliz torbasında ERLO salım profili 185

Şekil 4.71. ERLO içeren nanopartiküllerden diyaliz torbasında DEX salım profili ... 185

Şekil 4.72. Caco-2 hücrelerinde kuantum noktacıklarından İMA geçiş profili 188

Şekil 4.73. İMA içeren Caco-2 hücrelerinde kuantum noktacıklarından DEX geçiş profili 188

Şekil 4.74. Caco-2 hücrelerinde kuantum noktacıklarından ERLO geçiş profili 189

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.75. ERLO içeren Caco-2 hücrelerinde kuantum noktacıklarından DEX geçiş profili 189

Şekil 4.76. Caco-2 hücrelerinde nanopartiküllerden İMA geçiş profili 190

Şekil 4.77. İMA içeren Caco-2 hücrelerinde nanopartiküllerden DEX geçiş profili... 190

Şekil 4.78. Caco-2 hücrelerinde nanopartiküllerden ERLO geçiş profili 191

Şekil 4.79. ERLO içeren Caco-2 hücrelerinde nanopartiküllerden DEX geçiş profili 191

Şekil 4.80. Fibrosarkomalı hücreler üzerine çözeltilerin etkisi 194

Şekil 4.81. Fibrosarkomalı hücreler üzerine kuantum noktacıklarının etkisi 195

Şekil 4.82. Fibrosarkomalı hücreler üzerine nanopartiküllerin etkisi..... 195

Şekil 4.83. İmatinib mesilat ve deksketoprofen maddelerinin çözelti halinde intraperitonal uygulama ile verildikten sonraki kan konsantrasyonu-zaman grafiği 197

Şekil 4.84. İMA ve DEX içeren kuantum noktacıklarına ait kan konsantrasyonu-zaman grafiği 198

Şekil 4.85. İMA ve DEX içeren nanopartiküllere ait kan konsantrasyonu-zaman grafiği..... 199

Şekil 4.86. ERLO ve DEX maddelerinin çözelti halinde intraperitonal uygulama veya oral yol ile verildikten sonraki kan konsantrasyonu-zaman grafiği..... 200

Şekil 4.87. ERLO ve DEX içeren kuantum noktacıklarına ait kan konsantrasyonu - zaman grafiği 201

Şekil 4.88. ERLO ve DEX içeren nanopartiküllere ait kan konsantrasyonu-zaman grafiği..... 202

Şekil 4.89. QD-İMA formülasyonuna ait partikül büyüklüğü değişimi 219

Şekil 4.90. QD-İMA-PEG formülasyonuna ait partikül büyüklüğü değişimi 219

Şekil 4.91. QD-İMA-PEG-FA formülasyonuna ait partikül büyüklüğü değişimi..... 220

Şekil 4.92. QD-ERLO formülasyonuna ait partikül büyüklüğü değişimi 220

Şekil 4.93. QD-ERLO-PEG formülasyonuna ait partikül büyüklüğü değişimi..... 221

Şekil 4.94. QD-ERLO-PEG-FA formülasyonuna ait partikül büyüklüğü değişimi 221

Şekil 4.95. QD-İMA formülasyonuna ait polidispersite indeksi değişimi..... 222

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.96. QD-İMA-PEG formülasyonuna ait polidispersite indeksi değişimi..... 222

Şekil 4.97. QD-İMA-PEG-FA formülasyonuna ait polidispersite indeksi değişimi 223

Şekil 4.98. QD-ERLO formülasyonuna ait polidispersite indeksi değişimi..... 223

Şekil 4.99. QD-ERLO-PEG formülasyonuna ait polidispersite indeksi değişimi..... 224

Şekil 4.100. QD-ERLO-PEG-FA formülasyonuna ait polidispersite indeksi değişimi.. 224

Şekil 4.101. QD-İMA formülasyonuna ait zeta potansiyeli değişimi..... 225

Şekil 4.102. QD-İMA-PEG formülasyonuna ait zeta potansiyeli değişimi..... 225

Şekil 4.103. QD-İMA-PEG-FA formülasyonuna ait zeta potansiyeli değişimi 226

Şekil 4.104. QD-ERLO formülasyonuna ait zeta potansiyeli değişimi..... 226

Şekil 4.105. QD-ERLO-PEG formülasyonuna ait zeta potansiyeli değişimi 227

Şekil 4.106. QD-ERLO-PEG-FA formülasyonuna ait zeta potansiyeli değişimi..... 227

Şekil 4.107. QD-İMA formülasyonunda bozunmadan kalan etkin madde miktarının zamana göre değişimi 228

Şekil 4.108. QD-İMA-PEG formülasyonunda bozunmadan kalan etkin madde miktarının zamana göre değişimi 228

Şekil 4.109. QD-İMA-PEG-FA formülasyonunda bozunmadan kalan etkin madde miktarının zamana göre değişimi 229

Şekil 4.110. QD-ERLO formülasyonunda bozunmadan kalan etkin madde miktarının zamana göre değişimi 229

Şekil 4.111. QD-ERLO-PEG formülasyonunda bozunmadan kalan etkin madde miktarının zamana göre değişimi 230

Şekil 4.112. QD-ERLO-PEG-FA formülasyonunda bozunmadan kalan etkin madde miktarının zamana göre değişimi 230

Şekil 4.113. İmatinib mesilat – Deksketoprofen trometamol içeren PEG'siz nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü değişimi..... 233

Şekil 4.114. İmatinib mesilat – Deksketoprofen trometamol içeren PEG'ile nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü değişimi..... 233

Şekil 4.115. İmatinib mesilat – Deksketoprofen trometamol içeren PEG-FA'lı nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü değişimi..... 234

Şekil 4.116. Erlotinib HCl-Deksketoprofen trometamol içeren PEG'siz nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü değişimi..... 234

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.117. Erlotinib HCl-Deksketoprofen trometamol içeren PEG'ile nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü değişimi 235

Şekil 4.118. Erlotinib HCl-Deksketoprofen trometamol içeren PEGFA'lı nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü değişimi 235

Şekil 4.119. İmatinib mesilat – Deksketoprofen trometamol içeren PEG'siz nanopartiküllere ait polidispersite indeksi değişimi 236

Şekil 4.120. İmatinib mesilat – Deksketoprofen trometamol içeren PEG'ile nanopartiküllere ait polidispersite indeksi değişimi 236

Şekil 4.121. İmatinib mesilat – Deksketoprofen trometamol içeren PEG-FA'lı nanopartiküllere ait polidispersite indeksi değişimi 237

Şekil 4.122. Erlotinib HCl – Deksketoprofen trometamol içeren PEG'siz nanopartiküllere ait polidispersite indeksi değişimi 237

Şekil 4.123. Erlotinib HCl – Deksketoprofen trometamol içeren PEG'ile nanopartiküllere ait polidispersite indeksi değişimi 238

Şekil 4.124. Erlotinib HCl – Deksketoprofen trometamol içeren PEGFA'lı nanopartiküllere ait polidispersite indeksi değişimi 238

Şekil 4.125. İmatinib mesilat – Deksketoprofen trometamol içeren PEG'siz nanopartiküllere ait zeta potansiyeli değişimi 239

Şekil 4.126. İmatinib mesilat – Deksketoprofen trometamol içeren PEG'ile nanopartiküllere ait zeta potansiyeli değişimi 239

Şekil 4.127. İmatinib mesilat – Deksketoprofen trometamol içeren PEGFA'lı nanopartiküllere ait zeta potansiyeli değişimi 240

Şekil 4.128. Erlotinib HCl – Deksketoprofen trometamol içeren PEG'siz nanopartiküllere ait zeta potansiyeli değişimi 240

Şekil 4.129. Erlotinib HCl – Deksketoprofen trometamol içeren PEGile nanopartiküllere ait zeta potansiyeli değişimi 241

Şekil 4.130. Erlotinib HCl – Deksketoprofen trometamol içeren PEG-FA'lı nanopartiküllere ait zeta potansiyeli değişimi 241

Şekil 4.131. İmatinib mesilat – Deksketoprofen trometamol içeren PEG'siz nanopartiküllerin içinde bozunmadan kalan etkin madde miktarının zamana göre değişimi 242

Şekil 4.132. İmatinib mesilat – Deksketoprofen trometamol içeren PEG'ile nanopartiküllerin içinde bozunmadan kalan etkin madde miktarının zamana göre değişimi 242

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.133. İmatinib mesilat – Deksketoprofen trometamol içeren PEGFA'lı nanopartiküllerin içinde bozunmadan kalan etkin madde miktarının zamana göre değişimi 243

Şekil 4.134. Erlotinib HCl – Deksketoprofen trometamol içeren PEG'siz nanopartiküllerin içinde bozunmadan kalan etkin madde miktarının zamana göre değişimi 243

Şekil 4.135. Erlotinib HCl – Deksketoprofen trometamol içeren PEG'ile nanopartiküllerin içinde bozunmadan kalan etkin madde miktarının zamana göre değişimi 244

Şekil 4.136. Erlotinib HCl – Deksketoprofen trometamol içeren PEGFA'lı nanopartiküllerin içinde bozunmadan kalan etkin madde miktarının zamana göre değişimi 244

Şekil 4.137. Kapsüllerden imatinib salım profili 249

Şekil 4.138. Liyofilize toza ait zamana karşı partikül büyüklüğü değişimi..... 253

Şekil 4.139. Liyofilize toza ait zamana karşı polidispersite indeksi değişimi 253

Şekil 4.140. Liyofilize toza ait zamana karşı zeta potansiyeli değişimi 254

Şekil 4.141. Liyofilize toza ait zamana karşı yükleme kapasitesindeki değişim..... 254

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 3.1. MTT testinde kullanılmak üzere, örnek hazırlama sırasında çekilmiş görüntü 64

Resim 3.2. Nano Spray Dryer B-90 (BUCHI) cihazına ait görüntü 76

Resim 3.3. Nanospray Dryer cihazı ile örneğin püskürtme görüntüsü 79

Resim 3.4. Piknometre ile gerçek dansiteleri bulunan formülasyonlara ait görüntü ... 80

Resim 3.5. Dikey difüzyon hücreleriyle kullanılan polikarbonat membranlar 87

Resim 3.6. Hücre geçiş çalışmalarında kullanılan dikey difüzyon hücresi ve parçaları 88

Resim 3.7. Evom Voltmeter ® aleti ile TEER ölçümü 89

Resim 3.8. Deney hayvanları çalışmaları 93

Resim 3.9. Fibrosarkomalı deney hayvanlarında tümör büyüklüklerinin ölçülmesi ... 94

Resim 3.10. Standart çözeltilerin hazırlanması işlemine ait görüntü 100

Resim 3.11. İnkübasyon sonrası hücrelerde gözlenen mavi renk oluşumu 101

Resim 3.12. Reaksiyonun durmasını gösteren mavi rengin sarı renge dönümüşü 101

Resim 3.13. Reaksiyon bitiminde folat reseptör tayinine hazır hücrelerin plakadaki görünümü 102

Resim 3.14. En iyi formülasyon için kullanılacak olan kapsüllerin görüntüsü 104

Resim 3.15. Fibrosarkomalı deney hayvanlarına ilaç uygulaması 105

Resim 3.16. Kapsüllerin mideye ulaştıklarının kontrolüne ait görüntü 106

Resim 4.1. L929 fibroblast hücreleri kontrol grubuna ait görüntüler 146

Resim 4.2. İmatinib mesilata ait hücre görüntüleri 147

Resim 4.3. Erlotinib HCl'e ait hücre görüntüleri 148

Resim 4.4. Deksketoprofen trometamole ait hücre görüntüleri 149

Resim 4.5. PEG2000'e ait hücre görüntüleri 150

Resim 4.6. Folik asite ait hücre görüntüleri 151

Resim 4.7. Kitozana ait hücre görüntüleri 152

Resim **Sayfa**

Resim 4.8. Tripolifosfata ait hücre görüntüleri ve hücre canlılığı bulguları..... 153

Resim 4.9. Kuantum noktacıklarının AFM cihazında elde edilen görüntüsü 156

Resim 4.10. UV lamba altında kuantum noktacıklarının görünüşleri; A (soldaki), kuantum noktacıkları; B (sağdaki), distile su 158

Resim 4.11. DEXER10 formülasyonuna ait hazırlama görüntüleri 160

Resim 4.12. DEXER11 (soldaki ve ortadaki) ve DEXER12 (sağdaki) formülasyonlarına ait görüntüler 160

Resim 4.13. Mangan asetat ilavesiyle üretilmiş etkin madde yüklü kuantum noktacıkları 162

Resim 4.14. KÖR4'e (QD ve CH içerikli formülasyon) ait TEM görüntüleri (x18000)..... 162

Resim 4.15. KÖR5'e (Pegile QD ve CH içerikli formülasyon) (x18000) (sol) ve etkin madde içermeyen pegfa'lı (x120000) (sağ) kuantum noktacıklarına ait TEM görüntüsü 163

Resim 4.16. QD-İMA kodlu formülasyona ait TEM görüntüsü (x49000) 165

Resim 4.17. QD-İMA-PEG kodlu formülasyona ait TEM görüntüsü (x49000) 165

Resim 4.18. QD-İMA-PEG-FA kodlu formülasyona ait TEM görüntüsü (x49000) 166

Resim 4.19. QD-ERLO kodlu formülasyona ait TEM görüntüsü (x120000)..... 166

Resim 4.20. QD-ERLO-PEG kodlu formülasyona ait TEM görüntüsü (x120000)..... 167

Resim 4.21. QD-ERLO-PEG-FA kodlu formülasyonaait TEM görüntüsü (x120000).. 167

Resim 4.22. NP-İMA kodlu formülasyona ait TEM görüntüsü (x150000)..... 171

Resim 4.23. NP-İMA-PEG kodlu formülasyona ait TEM görüntüsü (x98000)..... 171

Resim 4.24. NP-İMA-PEG-FA kodlu formülasyona ait TEM görüntüsü (x68000) 172

Resim 4.25. NP-ERLO kodlu formülasyona ait TEM görüntüsü (x49000) 172

Resim 4.26. NP-ERLO-PEG kodlu formülasyonlara ait TEM görüntüleri (x68000) 173

Resim 4.27. NP-ERLO-PEG-FA kodlu formülasyonlara ait TEM görüntüleri (x68000)..... 173

Resim 4.28. Fibrosarkoma oluşturulmuş deney hayvanları..... 203

Resim 4.29. Kontrol grubuna ait mikroskobik görüntü (HEx20) 206

Resim **Sayfa**

Resim 4.30. İMA (A), ERLO (B) ve DEX (C) maddelerinin çözelti halinde oral uygulanmaları sonrasında hücre görüntüleri 207

Resim 4.31. İMA-DEX (A) ve ERLO-DEX (B) maddelerinin çözelti halinde oral uygulanmaları sonrasında hücre görüntüleri 208

Resim 4.32. Kuantum noktacıkları ile hazırlanmış yalnızca etkin madde içeren formülasyonlara ait hücre görüntüleri 209

Resim 4.33. Kuantum noktacıklarına ait etkin madde ve PEG içeren formülasyonlara ait hücre görüntüleri 210

Resim 4.34. Kuantum noktacıklarına ait etkin madde ve PEGFA içeren formülasyonlara ait hücre görüntüleri 211

Resim 4.35. Nanopartiküllere ait yalnızca etkin madde içeren formülasyonlara ait hücre görüntüleri..... 212

Resim 4.36. Nanopartiküllere ait etkin madde ve PEG içeren formülasyonlara ait hücre görüntüleri..... 213

Resim 4.37. Nanopartiküllere ait etkin madde ve PEGFA içeren formülasyonlara ait hücre görüntüleri..... 214

Resim 4.38. QD-İMA formülasyonuna ait farklı sıcaklıklardaki TEM görüntüleri (sol: 25ºC (x150000), orta: 30ºC (x68000), sağ: 40ºC (x98000)) 231

Resim 4.39. QD-İMA-PEG formülasyonuna ait farklı sıcaklıklardaki TEM görüntüleri (sol: 25ºC (x150000), orta: 30ºC (x49000), sağ: 40ºC (x49000)) 231

Resim 4.40. QD-İMA-PEG-FA formülasyonuna ait farklı sıcaklıklardaki TEM görüntüleri (sol: 25ºC (x68000), orta: 30ºC (x68000), sağ: 40ºC (x30000)). 231

Resim 4.41. QD-ERLO formülasyonuna ait farklı sıcaklıklardaki TEM görüntüleri (sol: 25ºC (x180000), orta: 30ºC (x98000), sağ: 40ºC (x150000)) 232

Resim 4.42. QD-ERLO-PEG formülasyonuna ait farklı sıcaklıklardaki TEM görüntüleri (sol: 25ºC (x150000), orta: 30ºC (x49000), sağ: 40ºC (x68000)) 232

Resim 4.43. QD-ERLO-PEG-FA formülasyonuna ait farklı sıcaklıklardaki TEM görüntüleri (sol: 25ºC (x98000), orta: 30ºC (x120000), sağ: 40ºC (x30000)) 232

Resim 4.44. NP-İMA formülasyonuna ait farklı sıcaklıklardaki TEM görüntüleri (sol: 25ºC (x13000), orta: 30ºC (x23000), sağ: 40ºC (x30000)) 245

Resim **Sayfa**

Resim 4.45. NP-İMA-PEG formülasyonuna ait farklı sıcaklıklardaki TEM görüntüleri (sol: 25ºC (x30000), orta: 30ºC (x18500), sağ: 40ºC (x49000)) 245

Resim 4.46. NP-İMA-PEG-FA formülasyonuna ait farklı sıcaklıklardaki TEM görüntüleri (sol: 25ºC (x49000), orta: 30ºC (x30000), sağ: 40ºC (x49000)) 245

Resim 4.47. NP-ERLO formülasyonuna ait farklı sıcaklıklardaki TEM görüntüleri (sol: 25ºC (x11000), orta: 30ºC (x49000), sağ: 40ºC (x18500)) 246

Resim 4.48. NP-ERLO-PEG formülasyonuna ait farklı sıcaklıklardaki TEM görüntüleri (sol: 25ºC (x18500), orta: 30ºC (x49000), sağ: 40ºC (x49000)) 246

Resim 4.49. NP-ERLO-PEG-FA formülasyonuna ait farklı sıcaklıklardaki TEM görüntüleri (sol: 25ºC (x49000), orta: 30ºC (x49000), sağ: 40ºC (x49000)). 246

Resim 4.50. QD-İD-PEGFA liyofilize toz görüntüsü..... 248

Resim 4.51. Kapsüllerin metal sinker'lar içerisindeki görüntüsü..... 249

Resim 4.52. Kapsül formunda uygulanmış formülasyona ait histopatoloji görüntüsü (HEx20) 250

Resim 4.53. Kapsül formülasyonu ile çözelti formülasyonunun karşılaştırılması 251

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	**Açıklamalar**
ºC	Santigrat derece
%	Yüzde
µm	Mikrometre
µL	Mikrolitre
mM	Milimolar
M	Molar
mL	Mililitre
nm	Nanometre
kDa	Kilodalton

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
ACN	Asetonitril
AFM	Atomic Force Microscope (atomik güç mikroskobu)
AML	Akut miyeloid lösemi
ATP	Adenozin trifosfat
BCS	Biyofarmasötik sınıflandırma sistemi
BSS	Bağıl standart sapma
CML	Kronik miyeloid lösemi
CO_2	Karbondioksit
COX	Siklooksijenaz
Çöz.	Çözelti
DEX	Deksketoprofen tremetamol
dk	Dakika
DLS	Dinamik ışık saçılımı
DMEM	Dulbecco'nun modifiye kartal ortamı
DMSO	Dimetil sülfoksit

Kısaltmalar	Açıklamalar
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSC	Diferansiyal taramalı kalorimetre
EAA	Eğri altında kalan alan
EPR	Artmış permeabilite ve tutulum
ERLO	Erlotinib HCl
EtOH	Etanol
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektroscopy
GALT	Gut ilişkili lenfoid doku
GIST	Gastro intestinal stromal tümör
GSK	GlaxoSmithKline
HCl	Hidroklorik asit
HCO_3^-	Bikarbonat
HNO3	Nitrik asit
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
ISO	Uluslar arası standartlar örgütü
İMA	İmatinib mesilat
KH_2PO_4	Potasyum dihidrojen fosfat
MA	Molekül ağırlığı
MeOH	Metanol
Na_2HPO_4	Disodyum hidrojen fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
NP	Nanopartikül
NSAID/NSAII	Steroidal olmayan antiinflamatuvar ilaçlar
O_2	Oksijen
PBS	pH 7,4 fosfat tamponu
PDGFR	Platelet türevli büyüme faktör reseptörü
PEG	Polietilen glikol
PG	Prostaglandin
PL	Fotolüminesans
PLGA	Polilaktik ko glikolik asit
QD	Quantum Dots (kuantum noktacıkları)

Kısaltmalar	Açıklamalar
RES	Retikülo endotelyal sistem
RTK	Reseptör tirozin kinaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEM	Scanning Electron Microscopy
SS	Standart sapma
STAT	Signal Transduction and Activators of Transcription
TEM	Transmission Electron Microscopy
UPLC	Ultrayüksek basınçlı sıvı kromatografisi
UV	Ultraviyole
VEGFR	Vasküler endotelyal büyüme faktör reseptörü
WHO	World Health Organization
$ZnCl_2$	Çinko klorür
ZnO	Çinko oksit

1. GİRİŞ

Kanser, son yıllarda insidansı artan ve pek çok insanın yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen ve vücudun herhangi bir parçasındaki hücrelerin kontrol dışı bölünmesi ile ortaya çıkan bir hastalıktır. Tedavisi cerrahi müdaheleler, radyoterapi, kemoterapi, immunoterapi gibi çeşitli yöntemlerle yapılabilmektedir. Ancak, ileri dereceye gelmemiş veya yüzeye yakın olmayan türlerde cerrahi müdahelede bulunulamaması, hastanın radyoterapi sonrası aşırı yorgunluk hali ve radyoterapinin doz aşımında kan kanserine yol açma ihtimaliyle kısıtlı dozda ve tedavinin yalnızca belirli zamanlarda uygulanabilmesi gibi sebepler ile ilaçla tedavi (kemoterapi) kanser tedavisindeki en etkin yöntemlerden birisi olmuştur. Bu amaçla üretilen antikanser ilaçların çoğu paranteral ilaçlar olup hastanın kendi kendine kullanamaması, taşınmalarının soğuk zincir gerektirmesi, yan etkilerinin fazla olması, kanser hastalarında damar yolunun kolaylıkla bulunamaması gibi nedenler ile oral kemoterapötiklere ihtiyaç duyulmuştur. Piyasada oral kullanılan kemoterapötikler yer almakta ise de sadece hastalıklı hücrelere değil sağlıklı hücrelere de sitotoksik etki göstermektedirler. Bu nedenle tedavi etkinliğini ve hasta uyuncunu olumsuz yönde etkilemektedirler. Son zamanlarda kanser tedavisinde ilaçların yan etkilerini azaltmak ve daha düşük doz ile daha etkin tedavi sağlamak amacıyla aktif hedeflendirilmiş nano boyutlu taşıyıcı sistemler kullanılmaya başlanmış ve bu alandaki çalışmalar hız kazanmıştır.

Doktora tez çalışması kapsamında kanser türlerinden biri olan fibrosarkoma, model kanser türü olarak seçilmiştir. Fibrosarkoma; hücre kontrolü olmaksızın, aşırı derecede çoğalan histolojik olarak baskın fibroblastlar olup mezenkim hücre kökenli malign neoplazmadır. Çevre dokulara ve vücudun uzak bölgelerine metastaz yapabilirler. Fibrosarkoma tedavisinde ana tedavi yöntemi cerrahi girişimdir. Genellikle ekstremitelerde görülen türleri için ampütasyon yapılmasını zorunlu kılmaktadır. Eğer tümör tam olarak alınamamışsa veya cerrahi müdaheleden sonra tekrarlayan tümörler görülüyorsa radyasyon tedavisi de kullanılabilmektedir. Fibrosarkoma oldukça agresif bir tümör türü olup kemoterapötik bir tedavi yöntemi henüz geliştirilememiştir. Bu çalışmanın amacı; fibrosarkoma için oral yolla kullanılabilen kemoterapötik bir tedavi yöntemi geliştirmektir. Bu amaç doğrultusunda; olası yan etkilerin minimum düzeyde tutulması ve daha düşük dozlar ile daha etkin bir tedavi sağlanması göz önünde bulundurularak, nano-taşıyıcı

sistemler ile kanser hücrelerine hedefleme yapılması düşünülmüştür. Tez kapsamında; nano-taşıyıcı sistem olarak nanopartiküller ve kuantum noktacıkları ile çalışılmıştır. Nanopartiküller; antibakteriyel özelliği bulunan, biyouyumlu ve doğal bir polimer olan kitozan kullanılarak üretilmiştir. Ayrıca bir başka taşıyıcı sistem olarak, suda çözünebilirliği ve çinko oksitin yara iyileştirici özelliği göz önüne alınarak çinko oksit (ZnO) kuantum noktacıkları üretilmiştir. Antikanser etkinliğin sağlanması için ise; adenozin trifosfat ile yarışmalı olarak epidermal büyüme faktör reseptörünü (EGFR) ve sinyalizasyonunu inhibe ederek etki gösteren imatinib mesilat ve erlotinib hidroklorür etkin madde olarak seçilmiş ve taşıyıcı sistemler içerisine yüklenmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda; siklooksijenaz-2 (COX2) enzim miktarının premalign ve malign tümörlerde arttığı gözlenmiştir. İnsan kolorektal kanseri gibi bazı kanser türlerinde COX-2 varlığı tespit edilmiştir. Fare modellerinde yapılan çalışmalarla da COX2 inhibisyonunun tedavi etkinliğini büyük ölçüde artırdığı görülmüştür. Kanser tedavisinde non steroidal antienflamatuar etkin madde kullanımı oldukça yeni bir yaklaşım olup tümör boyutunu küçültücü etkinliğinden yararlanılması amacıyla kombine bir tedavi sunulması bu doktora tezinin ana hedeflerinden biri olmuştur. Bu amaç doğrultusunda; nano-taşıyıcı sistemlerde etkin madde yanı sıra non steroidal antienflamatuar bir ilaç olan deksketoprofen trometamol de yardımcı etkin madde olarak kullanılmıştır. Deksketoprofen trometamol; ketoprofenin dekstrorotatori (polarize ışığı sağa çeviren) enantiyomerinin suda çözünen bir tuzudur ve siklooksijenaz (COX) enzim inhibitörüdür. Deksketoprofen trometamolün de antikanser ilaçlar ile kombine kullanıldığında sinerjik etki oluşturarak tümör büyümesini önemli oranda engelleyeceği düşünülmüştür.

Her iki taşıyıcı sistem de; taşıyıcı sistemlerin vücutta kalış sürelerini ve hedef bölgede tutulumlarını artırmak için kullanılan polietilen glikol ile, ayrıca kanser hücrelerine hedeflemeyi sağlayabilmek için kullanılan folik asit ile geliştirilmiştir.

Tez çalışmasının hedefleri aşağıdaki şekilde sıralanabilmektedir;

- ✓ Etkin maddeler için uygun miktar tayini yöntemi geliştirmek
- ✓ Etkin ve yardımcı maddelerin sağlıklı hücrelere zarar vermeyen uygun dozlarını belirlemek
- ✓ Etkin madde içeren, kan sirkülasyonunda uzun süre kalabilen ve kanser hücrelerine hedeflenebilen kuantum noktacıkları geliştirmek

- ✓ Etkin madde içeren, kan sirkülasyonunda uzun süre kalabilen ve kanser hücrelerine hedeflenebilen nanopartiküller geliştirmek
- ✓ Nano boyutlu taşıyıcı sistemlerin (kuantum noktacıkları ve nanopartiküller) etkinliklerini hem *in vitro* hem *in vivo* ortamlarda değerlendirerek etkinliği en uygun olan disperse haldeki formülasyonu belirlemek
- ✓ Sıvı halde en uygun olarak belirlenen formülasyonu katı hale getirmek ve kapsül dozaj şekli halinde üretebilmek
- ✓ Kapsül formunda verilebilecek tedavi etkinliği yüksek katı dozaj şekli geliştirmek

Çalışma; henüz ilaçlarla tedavisi mümkün olmayan fibrosarkoma kanseri tedavisinde umut verici sonuçlar vermesi bakımından önem taşımaktadır. Ayrıca antikanser ajanlarla non steroidal antienflamatuvar bir ilacın kombine kullanımı ilk defa gerçekleştirilecektir. Temel amaç; çok daha düşük etkin madde kullanımı ile yüksek etkinlik elde edilebilmesidir. Bu sayede az miktarda antikanserojen ilaç kullanılarak maliyetin azaltılabileceği, hedefleme ile sağlıklı dokulara zarar vermeyecek, yan etki profili düşük, doğrudan tümör bölgesine etkili, vücutta kalış süresinin ve antikanser etkinliğinin artırılabileceği düşünülmüştür. Kanser hastalarının; ilaçlarını, hastaneye gereksinim duymadan kendi başlarına karşılayabilmelerinin sağlanması amacı ile etkinliği yüksek katı bir dozaj formu geliştirmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Bugün "kanser" olarak adlandırdığımız hastalık ile ilgili ilk bulgulara Mısır papirüslerinde, Babil çivi yazısı tabletlerinde rastlanmaktadır. Tümörün öldürücü olabileceği ifadesinin kullanılması ise 15.yy'a dayanmaktadır (Atıcı, 2007). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kanseri hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve yayılması yanısıra vücudun hemen hemen her bölgesini etkileyen bir hastalık olarak tanımlamaktadır. Ayrıca, sadece oluştuğu dokuyu veya etrafını değil dokudan uzak bölgeleri de tehdit ettiğini belirtmiştir. Kanser hücreleri bir araya gelerek tümörleri oluşturmaktadırlar. Tümörler; benign (iyi huylu), sınırları belirgin kitleler ve malign (kötü huylu), sınırları belirsiz ve çevre dokuya yapışık bulunan kitleler olmak üzere iki çeşittir (Talmadge ve Fidler, 2010; Sarı ve diğerleri, 2016). Benign tümörler; cerrahi operasyon ile çıkarılabilmekte ve pek çok vakada hastalık kendini tekrarlamamaktadır. Bunun yanı sıra vücudun diğer kısımlarına sıçrayarak diğer dokulara yayılmamaktadır. Malign tümörler ise; yakınındaki doku ve organlara sıçrayarak bu bölgelerde hasar oluşturmaktadır. Benign tümörlerden farklı olarak malign tümörlerde metastaz da görülmektedir. Metastaz; kanser hücresinin tümörden ayrılıp kan dolaşımına veya lemfatik sisteme geçmesi ve vücudun diğer kısımlarında ikincil tümörler oluşturması olarak tanımlanmaktadır. Zaman içerisinde benign tümörler, malign tümörlere dönüşebilmektedir (Kızılbey ve Mustafaeva Akdeste, 2013). Ancak, her iki kanser türü de ölüme sebebiyet verebilmektedir.

Kanserden ölüm oranı hızla artış göstermekle birlikte malign kanserden ölüm oranı Ulusal Kanser Enstitüsü'nün 2010 yılı verilerine göre %23,3'e çıkmış ve ölüme sebebiyet veren hastalıklar sıralamasında kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almıştır. Dünya Sağlık Örgütü; 2012 yılında dünya çapında 8,2 milyon insanın ölümüne yol açtığını rapor etmiştir. Bu ölümlerin yaklaşık %60'ının Asya, Afrika gibi az gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelerde meydana geldiği ve bunların %30'unun ise önlenebilir olduğu belirtilmiştir.

2.1. Kanser Fizyolojisi

Kanser, vücudumuzdaki hücrelerin ihtiyacın dışında kontrolsüz çoğalması ve büyümesi ile karakterize bir hastalıktır. Tümör oluşumları, hücrelerin bölünmesi sırasında gerçekleşen mutasyonların sınırsız şekilde tekrarlanması ile gerçekleşir (Saha ve Khuda-Bukhsh, 2013). Kanser gelişimi çok aşamalı bir süreçtir ve normal hücreleri kanser hücreleri

oluşumuna zorlayan temel bir takım değişimleri de içerir.

Meydana gelen bu hücresel değişimler;

- büyüme sinyallerine karşı kendiliğinden cevap verebilme,
- programlı hücre ölümü olarak tanımlanan apoptozisden kaçabilme özelliği,
- sınırsız çoğalabilme kapasitesi,
- büyümenin baskılanmasından kaçınabilme,
- komşu dokulara yayılabilme (invazyon),
- metastaz ve sürekli yeni damarların oluşması (anjiyogenezis)

olarak çeşitlendirilebilmektedir (Singh, 2013; Bodduluru ve diğerleri, 2014).

Normal hücrelerden farklılık gösteren kanser hücrelerinin yapısının anlaşılması için bu değişimlerden daha ayrıntılı olarak bahsedilmesi gerekmektedir. Normal dokular hücre büyüme ve bölünmesini sağlayan büyüme sinyallerinin salımını kontrollü bir şekilde düzenlemektedir. Ancak, kanserli hücrelerde bu sinyal iletiminde düzensizlik görülmektedir ve büyüme faktörlerinin çok büyük oranlarda iletimi söz konusu olmaktadır. Hücre büyüme ve bölünmesini durdurmak üzere pek çok baskılayıcı (supresör) bulunmaktadır. Hasarlı DNA'ya sahip olan veya ihtiyaçtan fazla sayıda oluşmuş bu hücreleri dengelemek adına vücutta programlı hücre ölümleri (apoptozis) gerçekleşmektedir. Ancak kanser hücreleri bu supresörlerin devreye girmesine rağmen duyarsızlaşabilmekte ve büyüme ve bölünme döngülerini sürdürmektedirler. Böylece kanser hücreleri sınırsız çoğalma olanakları sayesinde makroskopik tümörler oluşturabilmektedirler. Normal dokular gibi tümör dokuları da büyümeleri için besin ve oksijene ihtiyaç duymaktadır. Ayrıca metabolik artıkları ve karbondioksiti de uzaklaştırmaya gereksinim duymaktadırlar. Bu ihtiyacı karşılamak üzere tümör dokusunda yeni damarlanmalar meydana gelmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Tümör kan hücreleri düzensiz ve kıvrımlı arteriyal-venöz yan yollara veya ucu kapalı, gevşek, zayıf damarlanmalara sahip olabilmektedir. Dolayısıyla normal dokulardan çok daha düzensiz ve

zayıf kan akışı göstermektedirler. Damar yapısı ve kanlanmadaki bu durum, yüksek geçirgenliğe de yol açmaktadır (Brown ve Giaccia, 1998). Tümör hücrelerinde normal hücrelerden farklı olarak epitel dokusundan karsinomaların ayrılması da söz konusu olabilmektedir. Bölgesel yayılmalar invazyon, uzak bölgelere yayılmalar ise metastaz olarak adlandırılmaktadır. Tümör hücreleri bu alanlarda da tehdit oluşturmaktadırlar (Hanahan ve Weinberg, 2011).

2.1.1. Fibrosarkom fizyolojisi

İnsanları etkileyen yüzden fazla kanser türü olduğu bilinmektedir (Açıkgöz ve diğerleri, 2011). Mezenkimal hücrelerden köken alan iğsi hücre tümörlerine sarkoma adı verilmektedir. Sarkomanın da osteosarkom (kemik dokusunda görülen türü), leyomiyosarkom (düz kaslarda görülen türü), rabdomiyosarkom (çizgili kaslarda görülen türü) gibi pek çok alt türü bulunmaktadır. Fibrosarkoma ise fibroblast hücrelerinin hücresel kontrol olmaksızın bölünmesi ile oluşan bir sarkoma türüdür (Krygier ve Lewis, 2009).

Fibroblastik büyümeler; tümör yapısı olmayan hiperplazi, neoplastik olabilen fibröz büyüme ve fibrosarkoma olmak üzere üç çeşit olarak sınıflandırılabilmektedir. Fibrosarkoma, yalnızca ipliksi yapılardan köken alan bağ doku hücrelerinden oluşmuş bir tümördür. Deri, yara, subkutan bölgeler, kas, tendon, üst solunum yolları, ağız bölgesi, akciğer, gastrointestinal sistem, böbrek yanı sıra baş, boyun, ekstremiteler gibi vücudun pek çok bölgesinde meydana gelebilmektedir ve deride görülen türü hariç oldukça malign özellik göstermektedir. Uzun yıllar invaziv olarak yavaş ve istikrarlı bir şekilde büyüyebildikleri gibi genelde durgun fakat zaman zaman çok hızlı büyüme gösteren uzun periyotlu kesintili büyüme de gösterebilmektedirler. Biyopsi ile teşhis edilebilmektedirler.

Fibrosarkoma için tedavi yöntemi genellikle cerrahi girişimdir. Tekrarlayan tümörlerde veya tümörün tamamen alınamadığı durumlarda radyasyon tedavisi uygulanabilmektedir. Ancak radyoterapi yönteminde hücrelerde direnç gelişimi gözlenebilmektedir (Stout, 2006). Kemoterapi yöntemi de tedavi türleri arasında sayılabilmektedir ancak başarı yüzdesi düşük olmakla beraber pek çok vakada amputasyon riskini gidememektedir. Ayrıca kemoterapötik ajanların sağlıklı dokular üzerine olan yan etkileri ve sağlıklı hücrelere zarar vermesi, toksisite riski ve bazı kemoterapötiklerin kan kanserine sebebiyet vermesi gibi nedenlerden dolayı kullanımları kısıtlıdır. Cerrahi girişim yapılması mümkün

olmayan vakalarda veya cerrahi girişim ile sonuç alınamadığında kemoterapi düşünülmektedir (Kurkchubasche ve diğerleri, 2000; Ferrari ve diğerleri, 2012).

2.2. Kanser Tedavisi

Günümüzde kanser hastalığının tedavisinde uygulanan pek çok yöntem bulunmaktadır. Cerrahi müdahele, kriyocerrahi, kemoterapi, radyasyon tedavisi, immunoterapi, gen tedavisi, termal terapi, lazer tedavisi ve fotodinamik tedavi bu amaçla kullanılan tedavi yöntemleridir. Ancak, bu yöntemlerin her birinin belirli üstünlükleri ve bir takım zorlukları bulunmaktadır (Subramani ve Ahmed, 2012). Birçok vakada kanser için cerrahi müdahele, radyasyon ve kimyasal kemoterapi gibi konvansiyonel tedaviler klinik başarılar gösterseler de bazı kısıtlamalar sergilemektedirler. Cerrahi müdahele ve radyoterapi bölgeselleşmiş/yerleşmiş tümör tedavisinde bazı başarılar göstermişlerdir ancak ulaşması zor veya tehlikeli bölgelere yerleşmiş tümörler veya yayılan tümörler için yararlı olmayabilirler. Klasik kemoterapi, efektif olmasına rağmen normal dokular için ciddi anlamda toksik olabilmektedirler (Price and Rao, 2013). Örneğin, bugün kanser kemoterapisinde kullanılan antineoplastik ilaçların çoğu gerek tümörü gerekse barsak epiteli, kıl folikülleri, kemik iliği kök hücreleri gibi proliferatif indeksi yüksek olan sağlıklı dokuları etkilemektedir. Hücre proliferasyonunun belirgin olmadığı karaciğer, böbrek ve sinir dokusunda da toksisiteye yol açabilen kemoterapötiklerin varlığı bilinmektedir. Bu ilaçların mutajenik, teratojenik ve karsinojenik etkileri de söz konusudur (Türker ve Kayaalp, 2005).

2.2.1. Kanser tedavisinde kemoterapi

Kanser tedavisinde kemoterapötik ajanların sağlıklı dokular üzerine olan yan etkileri nedeni ile son yıllarda hedefleme sistemleri ile tedavi yaklaşımları ilgi görmektedir. Kanser tedavisinde hedefleme ile yüksek dozda ilacı kanser hücresine vermek, tümörlü hücreler tarafından ilaç alımını artırmak ve ilacın sağlıklı hücreler tarafından alınmasını en düşük seviyeye indirmeyi amaçlamaktadır (Bryant ve diğerleri, 2013). Hedeflenmiş ilaç taşıyıcı sistemler sistemik kemoterapiye alternatif olarak geliştirilmiştir. Karsiyojenez ile ilişkili yolakların bloke edilmesi, kanser hücrelerinde apoptozisi artırarak tümör büyümesinin engellenmesi, kanser hücreleri proliferasyonundan sorumlu büyüme faktör reseptörlerinin ve spesifik enzimlerin baskılanması veya kanser hücrelerinde hücresel fonksiyonlarını ve

gen ekspresyonunu düzenleyen protein yapılarının değiştirilmesi gibi stratejilerle antikanser ilacın terapötik etkinliği artırılmakta ve yan etkileri azaltılmaktadır (Zhao ve diğerleri, 2012; Joo ve diğerleri, 2013).

Tümöre hedeflenmiş ilaç salım sistemlerinin etkinliği; sistemik dolaşımda parçalanmadan kalması, hedefe ulaşması ve hedef bölgede salımı gerçekleştirmesi ile değerlendirilmektedir. İntravenöz (iv) uygulanan bir formülasyon için; ilacın taşıyıcı sisteme etkin olarak yüklenmesi gerçekleşmiş, taşıyıcı sistem istenen bölgeye ulaşabilmiş, ulaşana kadar sistemik dolaşımda kalabilmiş ve etkinliğini koruyan, sistem içerisine hapsolmuş ilacın bu bölgede salımını gerçekleştirebilmiş olması istenmektedir (Kong ve diğerleri, 2013). Kanserli dokuya ilaç etkin maddesini hedefleme yaklaşımının temelinde nanoteknoloji önemli bir yer tutmaktadır.

Nanoteknoloji, nanometre boyutlarındaki maddeler ve bunların ihtiyaca yönelik olarak düzenlenmesi üzerine çalışmaktadır. Bu teknolojinin geliştirilmesi ve tasarlanmasında hedefleme, transport ve ilaç salım sistemlerinin salım kapasiteleri temel oluşturmaktadır. İlaç taşıyıcı sistemler; terapötik ajan, görüntüleme ajanı ve birtakım fonksiyonel gruplar ile bir araya getirilerek kullanılabilmektedir. Böylece, taşıyıcı moleküllerin çözünürlükleri, biyoyararlanımları artırılabilmekte ve vücuttaki sirkülasyonları, dağılımları, salım oranları ve etkinlikleri kontrol edilebilmektedir (Hsu ve Muro, 2011). Nanopartiküllerin uygun boyutlara getirilmesi ve yüzeylerinde yapılabilecek olan modifikasyonlar ile tümör dokusunda antikanser ilacı içeren nanopartiküllerin birikimi ve antikanser ilacın tümör bölgesine etkin salımı gerçekleşmektedir. Tümör dokusunda ilacın birikebilmesi için ise sistemik dolaşımdaki yarılanma ömrünün uzun olması gerekmektedir (Oh ve diğerleri, 2012). Vücuda giren yabancı moleküller veya organizmalar opsonin ismi verilen protein ile kaplanmaktadırlar. Opsonizasyon adı verilen bu işlem ile fagositik hücreler (makrofajlar, hepatik Kupffer hücreleri gibi) tarafından daha kolay tanınır hale gelmektedirler. Opsonizasyon sonrasında ise fagositoz ile kandan uzaklaştırılmaktadırlar. Mononükleer fagositik sisteme retiküloendotelyal sistem (RES) adı verilmektedir (Qwens ve Peppas, 2005). İntravenöz enjeksiyon sonrası taşıyıcı sistemler, RES tarafından dakikalar içerisinde kandan uzaklaştırılmaktadırlar. Ancak, taşıyıcı sistemlerin partikül büyüklükleri, yüzey grupları ve kaplandıkları polimerin karakteristiklerine bağlı olarak yarılanma ömürleri kan sirkülasyonunda 2 saatten 45 saate kadar artabilmektedir (Moghimi ve Szebeni, 2003).

Normal hücrelerden farklı olarak tümör hücreleri tarafından kansere özgü vasküler permeabilite faktörü (vasküler endotelyal büyüme faktörü) salgılandığı bulunmuştur. Bu faktör sebebiyle de kanser hücrelerinin artmış permeabilite ve tutulum (Enhanced Permeability and Retention, EPR) etkisi gösterdiği saptanmıştır. EPR etkisi, kan komponentleri ile hiçbir ilişkisi bulunmayan, RES tarafından parçalanmayan, nötrale yakın zayıf negatif yüklü, molekül büyüklüğü 40 kDa'un üzerinde olan tüm ilaç veya moleküller üzerinde görülmektedir. Bu bulgular, tümör üzerine ilaç salımında polimer veya nanoilaçların kullanılması ile hem etkin maddenin salımını düzelterek terapötik etkinliği arttıracağı hem de sistemik toksisiteyi azaltacağı konusunda öncü olmuştur (Maeda ve diğerleri, 2013). Kan dolaşımına geçen ilaç taşıyıcı sistemlerin, RES tarafından parçalanmasını önlemek üzere, yüzeyleri polietilen glikol (PEG) gibi hidrofilik bir polimer ile modifiye edilerek sterik açıdan stabil hale getirilebilmektedirler. Dolaşımda daha uzun süre kalmaları sağlanan sistemler, EPR aracılığıyla tümör bölgesinde sürekli olarak birikmektedirler (Yang ve diğerleri, 2007; Tavano ve diğerleri, 2013). Tümör hücreleri normal kapillerden daha fazla açıklıklara sahiptir. Bu vasküler zayıflıkları makromoleküllerin veya ilaç taşıyıcı sistemlerin ekstravazasyonuna (damar dışına kaçmalarına) yol açmaktadır ki tümöre hedeflemenin temel prensibini oluşturur. Buna ilaveten tümör hücrelerinin zayıf lenfatik drenaj göstermeleri sebebiyle penetre olan moleküllerin hücre dışına çıkışı azalmakta hücre içerisinde birikimi söz konusu olmaktadır. Özetle EPR, kan dolaşımında uzun süre kalan terapötiklerin pasif hedeflenmesine aracılık etmektedir (Duncan, 1999). Yapılan pek çok çalışmada hazırlanan taşıyıcı sistemlerde PEG kullanılması ile sistemlerin RES tarafından çok çabuk alınarak parçalanmadan korunduğu, EPR etkisinden daha çok yararlanıldığı ve buna paralel olarak da pasif hedeflemenin, hücresel alımın ve ilaç etkinliğinin artığı görülmüştür (Yang ve diğerleri, 2007; Biswas ve diğerleri, 2012; Shen ve diğerleri, 2012; Yao ve diğerleri, 2013).

Hedefleme ile ilgili diğer stratejilerden biri de; hücre yüzeyinde bulunan reseptörlere spesifik olarak bağlanan ligandlar kullanmaktır. İnsan tümör hücrelerinde oldukça fazla miktarlarda folat reseptörleri bulunmaktadır (Li ve diğerleri, 2014). Hücre membranlarına gömülü bulunan ve folik asite çok yüksek afinite gösteren folat reseptörleri, endositoz ile bu molekülü hücre içerisine alır (Nazki ve diğerleri, 2014). Folik asitin reseptör aracılı hücre içi alımı; ligand bağlı reseptörün içe gömülerek intraveziküler azalma ile reseptörden ligandın salımını gerçekleştirmesi ve sonrasında ligand taşımayan bu reseptörün hücre yüzeyine geri dönmesi temeline dayanmaktadır (Goren ve diğerleri, 2000). Folat içerikli

nanotaşıyıcılar, antikanser etkin maddenin bölgeye özgü salımını (site specific delivery) gerçekleştirmeleri yanı sıra antikanser ilacın etkinliğini artırmakta ve toksisitesini azaltmaktadırlar (Jain ve diğerleri, 2014). Özellikle polimerik taşıyıcılara kolaylıkla yüklenebilmektedir (Zhang ve diğerleri, 2014).

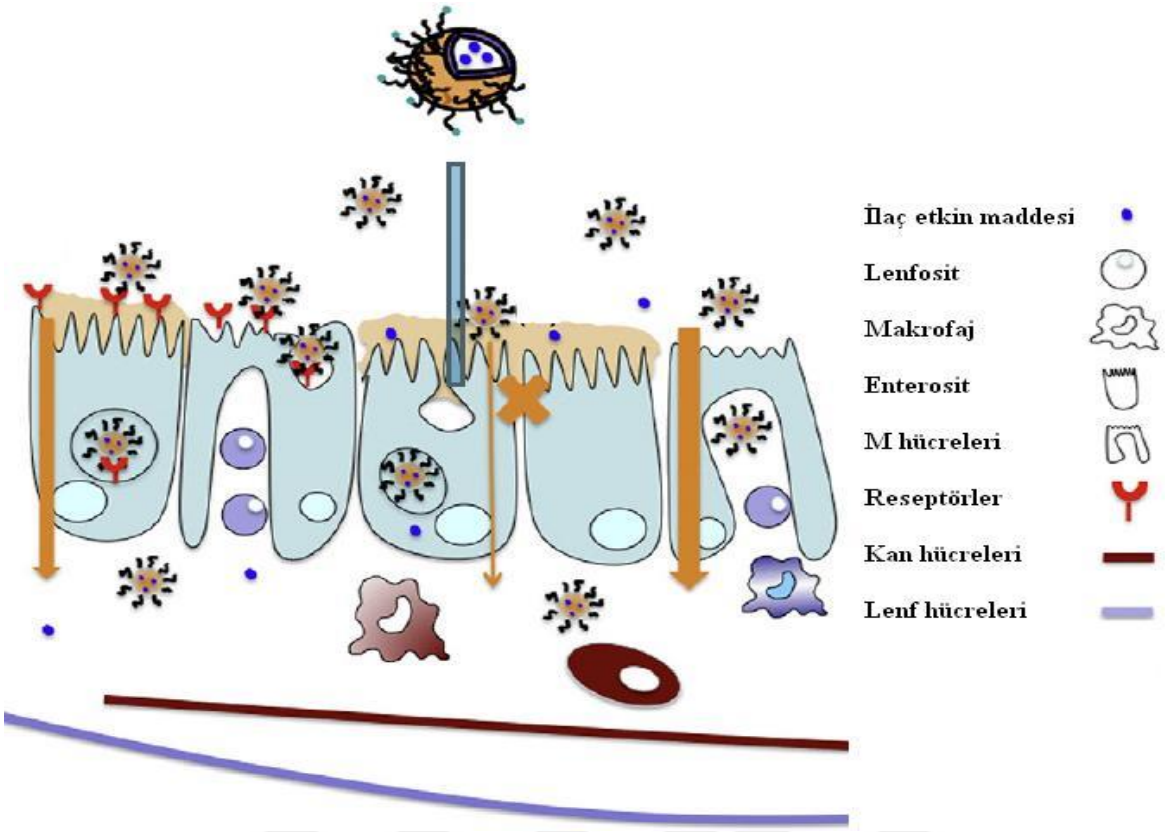
2.3. Oral Yoldan Kullanılan Antikanser İlaçlar

Kemoterapide antikanser ilacın verilişi yaygın olarak, intravenöz enjeksiyon veya infüzyon şeklinde olmaktadır. Bu yolla verilen ilaçlarda plazmadaki ilaç seviyesi maksimum kabul edilebilir limitlerin üzerine çıkabilmekte ve hızla düşerek dolaşım sisteminden atılabilmektedir. İlacın yüksek konsantrasyonlarda oral yoldan kullanımı ise yüksek eğri altında kalan alan (EAA, area under the curve (AUC)) değerini sağlamasına rağmen ciddi yan etkilere neden olmaktadır (Mei ve diğerleri, 2013).

Son 15 yıldır geliştirilen yeni formüller sayesinde klinik olarak oral yol ile de antikanser ilaç tedavisinden bahsedilebilmektedir. Hastanede tedavi şartının ortadan kalkmasına olanak tanıması, katater takılmasına gerek duyulmaması, iv ilaç uygulamanın zorluğundan kaçınılmış olması, hastalar için iş gücü kaybı olmaması ve uygulama kolaylığı gibi pek çok neden ile iv veriliş yerine oral yol ile ilaç uygulanmasına gereksinim duyulmuştur. İv ilaç uygulanmasında görülen enfeksiyon riskini azaltması yanısıra deneyimli personel veya klinik yardım gerektirmemesi sebebi ile de oral antikanser ilaçların maliyet açısından da daha uygun olduğu söylenebilmektedir (Banna ve diğerleri, 2010). Ancak oral yolla verilen ilaçların fizikokimyasal özellikleri ve vücutta bulunan fizyolojik bariyerler antikanser ilaçların oral yolla kullanımında bir takım kısıtlamalara neden olmaktadır. Antikanser ilaçların düşük çözünürlük ve zayıf intestinal permeabilite göstermeleri, yüksek oranda P-glikoprotein (P-gp) etkisine maruz kalmaları, pre-sistemik metabolizma, ilk geçiş etkisine uğramaları veya tümör hücrelerinde direnç gelişimine sebebiyet vermeleri özellikle formülasyon geliştirme açısından oldukça büyük önem kazanmaktadır. Ayrıca, dar terapötik aralığa sahip ilaçlar terapötik dozun altında bulunabilmeleri veya kolaylıkla toksik dozlara çıkılabilmesi açısından oral yolla verilişlerini sınırlamaktadır. Formülasyonların terapötik etkinliği ilacın doğru zamanda doğru yerde terapötik cevap yaratabilecek uygun ilaç dozunda verilmelerine bağlıdır (Thanki ve diğerleri, 2013). Tüm bunlar göz önüne alındığında farklı absorpsiyon mekanizmalarından yararlanma çalışmaları yürütülmüştür. Bu yönde en önemli gelişmelerden biri Peyer plaklarına

hedefleme olmuştur.

En büyük lenfoid organlardan biri olan sindirim sistemi ile ilişkili lenfoid doku (GALT; gut-associated lymphoid tissue); izole ve kümelenmiş lenfoid foliküllerden oluşmuştur. Kümelenmiş lenfoid foliküllere ise Peyer plakları adı verilmektedir. Peyer plakları folikül ile ilişkili epitel yapıları ile çevrelenmiştir ve bu epiteller özelleşmiş M hücrelerini içermektedirler. M hücreleri ise lüminal kanaldaki antijenleri veya bakterileri sistemik immün cevap oluşturan veya bu cevabı aktive eden immun hücrelere iletmektedirler (Jung ve diğerleri, 2010; Fröhlich ve Roblegg, 2012). Peyer plakları, intestinal kanalda kümelenmiş halde bulunmaktadır (Nishioka ve Yoshino, 2001). Peyer plakları epitellerinde bulunan özelleşmiş fagositik M hücreleri aracılığı ile oral yolla alınan küçük boyutlu partiküllerin lenf sisteminden sistemik dolaşıma katılması sağlanmaktadır. Böylece, partiküller enzimatik degredasyona ve ilk geçiş etkisine uğramamaktadır (Hussain ve diğerleri, 2001). Oral veriliş sonrası Peyer plaklarına hedefleme stratejisi ile mikropartiküller (van der Lubben ve diğerleri, 2001), lipozomlar (Mutlu ve diğerleri, 2011), dendrimerler (Sakthivel ve diğerleri, 1999), nanopartiküller (Borges ve diğerleri, 2006) gibi pek çok ilaç taşıyıcı sistem kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Şekil 2.1'de Peyer plakları, M hücreleri ve taşıyıcı sistemlerin bu yapılardan geçişi gösterilmiştir (Plapied ve diğerleri, 2011).



Şekil 2.1. Peyer plaklarından M hücreleri aracılığı ile nanopartiküler sistemlerin geçişi

Hedefleme yolu ile tedavide temel alınan yöntemlerden biri, reseptör aktivasyonunu önlemek için hücre yüzeyinde bulunan spesifik reseptörlere veya ligandlarına yönelik monoklonal antikor kullanımıdır. Diğer bir yöntem ise ATP (adenozin trifosfat) bağlarını yarışmalı olarak inhibe eden intraselüler kinaz bölgesine doğrudan bağlanan küçük molekül yapısındaki kinaz inhibitörlerdir. Bu yolla etki gösteren tarz farmasötik aktif içeriklerin isimleri –nib son eki ile bitmektedir (Gennigens ve diğerleri, 2009). Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) tarafından 2014 yılına kadar onaylanan 21 adet kinaz inhibitörü bulunmaktadır ve bunların büyük çoğunluğunu (%86'sını) *Tirozin Kinaz İnhibitörleri* oluşturmaktadır (Widmer ve diğerleri, 2014; Horizon Blue 2013).

Çizelge 2.1. Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin Türkiye İlaç Piyasasındaki Yeri

Aktif Farmasötik İçerik	FDA Onayı Aldığı Yıl	Türkiye İlaç Piyasasındaki Müstahzar Adı	Üretici Firma	Farm. Dozaj Şekli	Farmasötik Dozu
İmatinib	2001	Glivec	Novartis	Film tablet	100 ve 400 mg
		Glivec*	Novartis	Kapsül	100 mg
		İmatenil	Logus	Kapsül	100 ve 400 mg
		İmatenil**	Logus	Film tablet	100 ve 400 mg
		İmavec	Koçak	Kapsül	100 ve 400 mg
		İmagliv	Saba	Film tablet	100 ve 400 mg
		Imatis	Deva	Film tablet	100 ve 400 mg
		Fiximab***	Nobel	Film tablet	200 mg
Gefitinib	2003	Geftinat ve Iressa müstahzarları Türkiye'de bulunmamaktadır.			
Erlotinib	2004	Tarceva	Roche	Film tablet	25, 100, 150 mg
Sorafenib	2005	Nexavar	Bayer	Film tablet	200 mg
Sunitinib	2006	Sutent	Pfizer	Kapsül	12.5, 25, 37.5***, 50 mg
Dasatinib	2006	Sprycel	Bristol-Myers Squibb	Film tablet	20, 50, 70 mg
Lapatinib	2007	Tykerb	GSK	Film tablet	250 mg
Nilotinib	2007	Tasigna	Novartis	Kapsül	150***, 200 mg
Pazopanib	2009	Votrient	GSK	Film tablet	200, 400 mg
Vandetanib	2011	Caprelsa müstahzarı Türkiye'de bulunmamaktadır.			
Crizotinib	2011	Xalkori***	Pfizer	Kapsül	200, 250 mg
Bosutinib	2012	Bosulif müstahzarı Türkiye'de bulunmamaktadır.			
Axitinib	2012	Inlyta***	Pfizer	Film tablet	1.5 mg
Regorafenib	2012	Stivarga müstahzarı Türkiye'de bulunmamaktadır.			
Cabozantinib	2012	Cometriq müstahzarı Türkiye'de bulunmamaktadır.			
Ponatinib	2012	Iclusig müstahzarı Türkiye'de bulunmamaktadır.			
Afatinib	2013	Giotrif müstahzarı Türkiye'de bulunmamaktadır.			
İbrutinib	2013	Imbruvica müstahzarı Türkiye'de bulunmamaktadır.			

*İthal edilmemektedir, Türkiye ilaç piyasasında bulunmamaktadır; **Üretilmemektedir

***Kullanıma sunulmamıştır (Widmer ve diğerleri, 2014; Horizon Blue 2013; Rx Media Pharma 2014).

2.3.1. Tirozin kinaz inhibitörleri

Kanser hastalığının ve kanser hücrelerinin yapısının daha iyi anlaşılmasıyla birlikte tedavi yaklaşımları da iyileştirilmiştir. Bu amaçla; tümör hücrelerinin büyümesi için temel olan belirli moleküler bölgelerin baskılanması veya değiştirilmesi ve bunu sağlayabilecek terapötik ajanlar geliştirilmesi ön plana çıkmıştır. Hücreler, büyüme faktörleri adı verilen

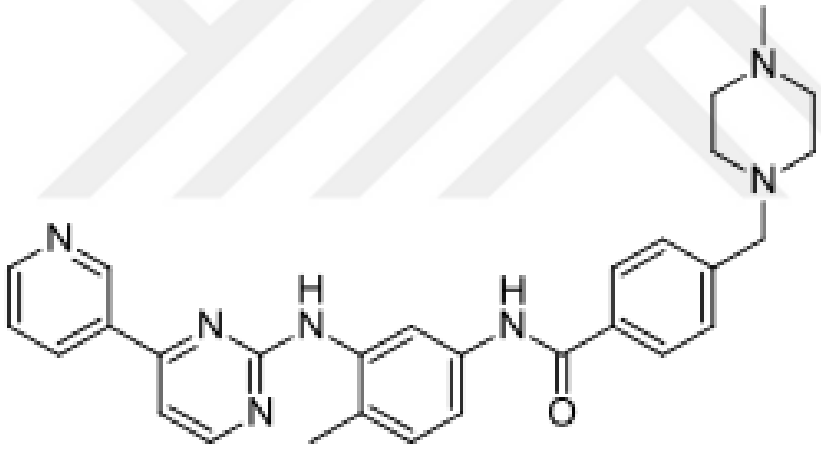
hücre dışı sinyallere cevap vermektedirler. Bu sinyallar hücre yüzeylerinde bulunan reseptörler ile etkileşerek DNA üzerinden hücre içi sinyal oluşturmakta ve bu hücre içi sinyaller de hücre bölünmesi, hücre göçü ve apoptosis gibi olayları başlatmakta, hücre döngüsünü artırmaktadırlar. Tümör hücrelerinde görülen çoğalma temel olarak; büyüme faktörlerinin üretiminin artması, büyüme faktör reseptör genlerinin değişmesi ile reseptörlerin kalıcı olarak aktif hale gelmesi veya ardışık olarak hücre içi büyümenin uyarılması gibi olaylar ile ilişkilendirilmektedir (Payne ve Miles, 2008). Tüm bu olaylar hatta hücre gelişimi sırasındaki hücre içi iletişim, hücre yüzeyinde yer alan reseptör tirozin kinaz (RTK) aktivitesi ile gerçekleşmektedir. RTK'ların anormal aktiviteleri ise kanser hücrelerinin oluşumuna sebep olmaktadır. RTK'lar ve bunların büyüme faktör ligandları; terapötik girişim amaçlı etkinliklerinin baskılanması yaklaşımında antikor veya küçük moleküllü ilaçların kullanımı için oldukça uygun bölgeler olarak değerlendirilmiştir. Büyüme faktörlerine ilişkin araştırmalar 1952 yılına dayanmaktadır, antiproliferatif amaçla tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanımları ise 1980'li yılların sonlarına denk gelmektedir. Küçük molekül yapılı inhibitörlerin büyüme faktör reseptörlerine hedeflendirilmesi ile büyüme faktör reseptörlerinin ATP bağlanma bölgelerinde mutasyonlar oluşmakta, tirozin kinaz aktivitesi engellenmekte ve onkojenik sinyal ortadan kaldırılmaktadır (Gschwind ve diğerleri, 2004).

Kinaz sinyal iletimi, esasında tüm sinyal iletim yolunun önemli olması kadar ATP bağlanma bölgesine spesifik olarak ilaç iletilebilirliği açısından da kanser tedavisinde oldukça dikkat çekmektedir (Sikkema ve diğerleri, 2012). Son 10 yıl içerisinde 12 farklı tirozin kinaz inhibitörü FDA onayı almış olup yüzlercesi de klinik olarak halen araştırılmaktadır. Bu ilaçların etkinliği RTK'ların ATP bağlanma bölgesine yüksek derecede tutulumudur. Tirozin kinaz inhibitörlerinden 2001 yılında FDA onayı almış imatinib ve 2004 yılında FDA onayı almış olan erlotinib oral olarak kullanılan anti-tümör etkili ilaçlardır (Slobbe ve diğerleri, 2012). Kanser tedavisi yaklaşımlarında en hızlı gelişme tirozin kinaz inhibitörlerinin geliştirilmesi olmuştur. RTK'lar; intraselüler yapısı ile sinyal iletimini sağlarken ekstraselüler yapısı ile de ligand bağlanmasını sağlamaktadırlar. Epidermal büyüme faktör reseptörü (epidermal growth factor receptor, EGFR), vasküler endotelial büyüme faktör reseptörü (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) ve platelet türevli büyüme faktör reseptörü (platelet derived growth factor receptor, PDGFR) bu tirozin kinaz reseptör proteinlerindendir (Slobbe ve diğerleri, 2012). Bazı kinazlar, sinyal iletimi ve transkripsiyon aktivitörü (Signal Tranducer and

Activator of Transcription, STAT) adı verilen molekülleri aktive etmektedirler. Hücre büyümesi ve sağ kalımına etki eden genlerin transkripsiyonunu indüklediği bilinen STAT'ların artmış aktivitelerinin onkojenik dönüşümde rolü olduğu düşünülmektedir. Aktive STAT5 molekülünün ise, BCR-ABL1'in büyüme faktöründen bağımsız olarak büyümeyi sağlamasına yardım ettiği ve dolayısıyla malign transformasyona katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Bulakbaşı Balcı, 2009).

İmatinib

İmatinib mesilat; imatinibin mesilat tuzu olup 4-[(4-Metil-1-piperazinil) metil]-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil] amino]-fenil] benzamid metansülfonat olarak isimlendirilmektedir. Molekül ağırlığı 589,7 olan imatinib mesilatın moleküler yapısı Şekil 2.2'de yer almaktadır (Savage ve Antman, 2002; Hegde ve diğerleri, 2012).



. CH_3SO_3H

Şekil 2.2. İmatinib mesilatın moleküler yapısı

İmatinib kullanımı kronik miyeloid lösemi (chronic myeloid leukemia, CML) hastalığı tedavisi için molekül hedefleme teknolojisinde çığır açan en önemli olaylardan biridir (Kumar ve Prud'homme, 2009). Klinik olarak CML, gastrointestinal stromal tümör (gastrointestinal stromal tumour, GIST) tedavilerinde kullanılan imatinib diğer bir takım malign tümör tedavilerinde de kullanılır (Kralj ve diğerleri, 2014). Örneğin nörofibromalar üzerinde imatinib kullanımı ile ilgili yapılan bir çalışmada nörofibromalı hastalara 3 ay boyunca 350 mg dozluk imatinib mesilat uygulanmış ve bu süre içerisinde tümör boyutlarında %50'den fazla azalma gözlemlenmiştir (Robertson ve diğerleri, 2012). İmatinibin farmakolojik özelliklerinden bahsetmek gerekirse; birçok kinaz enzimini inhibe eden ve immunomodülatör özellikli birçok fare modellerinde antienflamatuvar etkisi

olduğu gösterilmiş bir moleküldür (Sanchez ve diğerleri, 2013). C-kit olarak bilinen kök hücre faktörü, PDGFR ve BCR-ABL1 olmak üzere 3 tirozin kinaz enziminin seçici ve etkili bir inhibitörü (Kralj ve diğerleri, 2014) olarak bilinen imatinib bu inhibisyon ile anti-tümör aktivite göstermektedir (Nakagawa ve diğerleri, 2006). Onay alan ilk tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib BCR-ABL kinaz üzerinde ATP bağlanma bölgesini bloke eder. İlk defa interferon α ile tedavide başarısızlığa uğrayan hastalarda etkili olduğu gösterilmiştir (Fausel, 2007). İmatinib mesilat nükseden veya iyileştirilmesi güç veya tedaviye/ilaca cevap vermeyen (refrakter) akut miyeloid lösemili (AML) hastalarda da aktivite göstermektedir. İmatinib kullanımıyla tirozin- kinaza duyarlı AML blast hücrelerindeki c-kit sinyal iletimi baskılanabilmektedir. Ayrıca imatinib lösemili insan kök hücrelerinin varlığını uzun süre sürdürülebilmesi için önemli rol oynamakta olan STAT5'e efektif bir şekilde hedeflenebilmektedir (Advani ve diğerleri, 2010).

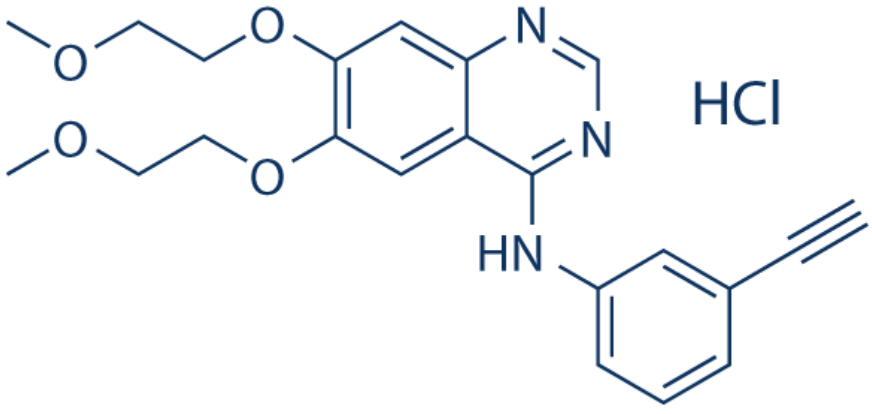
İmatinib mesilat pH 5,5'in altında oldukça iyi çözünürlük göstermektedir. Yüksek pH'larda çözünürlüğü düşmektedir ancak en düşük çözünürlüğü 1 mg/mL olarak belirtilmiştir. Amerikan Farmakopesi'nde yer alan çözünürlük sınıflandırmasına göre "rahatça çözünür" olarak kabul edilmektedir (Budha ve diğerleri, 2012). İmatinib, mide ortamında çözünürken intestinal kanala geldiğinde (intestinal kanal pH: 6,8 (O'Neilla ve diğerleri, 2013)) düşük çözünürlük göstererek çökeceği düşünülse de yeterince hızlı absorbe olursa intestinal kanalda çökmesi beklenmez. Bu da iyi biyoyararlanım olarak açıklanmaktadır. Hücre membranlarından pasif difüzyonu hızlı olduğundan taşıyıcılarla etkileşimi ilacın biyoyararlanımını etkilemez. *İn vitro* Caco-2 permeabilite sonuçları düşük permeabilite gösterdiğini belirtmektedir ancak %98'lik bir oranla oldukça yüksek bir oral biyoyararlanım göstermektedir (Budha ve diğerleri, 2012). *İn vitro* ortamda intestinal kanalda düşük çözünürlük göstermesine rağmen, *in-vivo* ortamda oldukça iyi intestinal absorpsiyon gösterir ve karaciğerde ilk geçiş etkisine uğramaz bu sayede *in vivo* ortamda absorbsiyonu oldukça iyidir. Nötral pH'da düşük çözünürlük ve *in vivo* absorbsiyonu göz önüne alındığında imatinibin biyofarmasötik sınıflandırma sistemi (BCS, Biopharmaceutical Classification System) Sınıf 2 grubuna dahildir. İmatinib CYP3A4 enziminin substratıdır ve N-desmetil imatinib (NDI) ana metabolitine dönüşür. NDI de imatinib gibi BCR-ABL1 tirozin kinaza karşı aktif rol oynar. Eliminasyonu ise aktif transport mekanizmasına dayanır ve feçes ile elimine edilir (Kralj ve diğerleri, 2014). Kullanım kolaylığı sağlayan, güvenliliği bildirilen imatinib 400mg/gün standart dozda uygulandığında ise kemik iliğinde baskılanma (supresyon), ödem, gastrointestinal

bozukluk ve kas ağrılarını da iyi tölere edebilmektedir (Fausel, 2007). İmatinib tabletleri kronik miyeloid lösemi ve gastro intestinal stromal tümör tedavilerinde günlük 100-800 mg'lık dozlarda kullanılmaktadır (Kralj ve diğerleri, 2014) ve 30ºC altında orijinal kutusunda saklanması gerekmektedir. Ancak bu etkilerin daha da artırılması gerekmektedir.

İmatinibin piyasada bulunan klasik tablet formu bulunmaktadır ancak bunun yanı sıra, denetimli salım yapan tabletleri ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Bu amaç ile modifiye salım yapan tablet formları (Vasanthavada ve diğerleri, 2010) ve hidrofilik matris sistemli kontrollü salım tabletleri (Devi ve diğerleri, 2013) de geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu çalışmalara ek olarak son yıllarda taşıyıcı sistemlere yüklenmesi ile ilgili çalışmalar da sürdürülmektedir. Taşıyıcı sistemlerden; uzatılmış salım yapan mikroküre (Ramazani ve diğerleri, 2015), katı lipit nanopartikül (Gupta ve diğerleri, 2016) ve lipozom (Pinto ve diğerleri, 2011; Pinto ve diğerleri 2012) formülasyonları geliştirilmiştir.

Erlotinib

Erlotinib hidroklorür; erlotinibin hidroklorür tuzu olup N-(3-etilfenil)-6,7-bis (2-metoksietoksi)-4-kinazolinamin olarak isimlendirilmektedir. Molekül ağırlığı 429,9 olan erlotinib HCl'in moleküler yapısı Şekil 2.3'de yer almaktadır (Pujeri ve diğerleri, 2009).



Şekil 2.3. Erlotinib HCl'in moleküler yapısı

Erlotinibin de içinde bulunduğu FDA onayı almış 3 EGFR inhibitörü bulunmaktadır (Medina ve diğerleri, 2011). EGFR bir transmembran reseptörüdür ve birçok kanser türünde hücre yüzeyindeki reseptörlerde EGFR'nin aşırı üretimi gözlenmiştir. Bu

reseptörün uyarılması yanlış düzenlendiğinde tümör oluşumu anormal proliferasyona, invazyona ve metastaza neden olan intraselüler yolakları etkin hale getirmektedir. Erlotinib, EGFR tirozin kinazın intraselüler katalitik etkin bölgesine ATP ile yarışmalı olarak ve geri dönüşümlü bağlanmaktadır. Böylelikle, EGFR otofosforilasyonu ve alt sinyal iletimi baskılanmaktadır.

Erlotinib pH'ya bağlı çözünürlük göstermektedir. pH değeri 1,4'ten 9,6'ya yükseldikçe çözünürlüğü azalmaktadır. En yüksek çözünürlüğü 0,4 mg/mL olarak pH 2'de göstermektedir. Amerikan Farmakopesi'nde yer alan çözünürlük sınıflandırmasına göre "çok az çözünür" olarak kabul edilmektedir. Düşük çözünürlük yanı sıra, yüksek *in-vitro* Caco-2 permeabilite oranı göstermesi sebebi ile BCS Sınıf 2 grubuna dahil edilmektedir (Budha ve diğerleri, 2012).

Erlotinibin Faz III çalışmalarını tamamladığı, plasebo gruplarıyla karşılaştırıldığında günlük 150 mg'lık dozunun sağkalımı anlamlı derecede artırdığı tesbit edilmiştir. Yapılan in-vivo farmakolojik testler günlük dozunda verildiğinde %54 oranında tümör büyümesini inhibe ettiğini ortaya çıkartmıştır. Elde edilen farmakokinetik veriler ise absorbsiyonunun oldukça hızlı gerçekleştiğini (tmax: 2-4 saat), biyoyararlanımının %60 olduğunu ve yiyeceklerle alındığında ise bu oranın %100'e çıktığını, plazma konsantrasyonu- zaman eğrisi altında kalan alan (AUC) değerinin 15,2 µg.h/ml olduğunu göstermektedir. Erlotinibin metabolizasyonu ve eliminasyonu daha çok safra yoluyla olmaktadır, üriner klirensi ise minimum düzeydedir. Erlotinib ağırlıklı olarak CYP3A4 enzimi ile metabolize olsa da CYP1A2 ve CYP2D6 enzimlerinin de etkisi bulunmaktadır (Rukazenkov ve diğerleri, 2009).

Erlotinib hücre döngüsünü durdurmakta ve apoptosise neden olmaktadır. Böylece, anjiyogenez ve hücre invazyonunu inhibe etmektedir. İlaç piyasasında katı oral formu bulunmaktadır ve % 60 oranında sorunsuz olarak kullanılabilmektedir (Vrignauda ve diğerleri, 2012). Erlotinib, metastatik melanoma ve ileri düzey küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. Epidermal büyüme faktör reseptörünü inhibe etmektedir. Erlotinibin stabilitesi üzerine 3 farklı konsantrasyonlarda (160, 800, 4000 µg/L) 3 döngüde dondurup çözme deneyi yapılmıştır ve her 3 döngü için de ortalama %96 oranında stabilite gösterdiği görülmüştür. Oda sıcaklığında, +4 ºC'de ve -20 ºC'de yapılan stabilite çalışmalarında ise yine bu konsantrasyonlarda % 84 ile % 106 stabilite sonuçları

elde edilmiştir (Zheng ve diğerleri, 2013). Bu durum, sıcaklığa bağlı stabilite gösterdiğini ifade etmektedir.

Erlotinib metastastik küçük olmayan hücreli akciğer kanserine karşı kullanılmaktadır. Günlük oral standart dozu 150 mg'dır. Yemeklerden 1saat önce veya yemeklerden 2 saat sonra alınmalıdır. 10-25 °C'de saklanmalıdır.

Son yıllarda, çözünürlüğün, çözünme hızının ve oral biyoyararlanımının artırılması amacı ile erlotinib yüklü taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Kendi kendine emülsifiye olan sistemler (Truong ve diğerleri, 2015), siklodekstrin nanosüngerleri (Dora ve diğerleri, 2016) veya antikor ile işlevsellik kazandırılmış kitozan nanopartikülleri (Srinivasan ve diğerleri, 2014) gibi taşıyıcı sistemlerin tek başlarına kullanılmaları ile hazırlanmış formülasyon çalışmaları mevcuttur. Ayrıca, ters misel yüklü lipit nanotaşıyıcılar (Vrignaud ve diğerleri, 2012) veya lipit-polimer hibrit nanopartikülleri (Mandal ve diğerleri, 2016) gibi farklı taşıyıcı sistemlerin birlikte kullanılmaları ile etkinliğin artırılmasına yönelik çalışmalar da bulunmaktadır.

2.3.2. Kombine kullanım ile antikanser etkinliğinin artırılması

Kombine ilaç salımı; son yıllarda, biyolojik bariyerlerin aşılması ile tümör dokusuna nanoteknolojik ürünlerin daha fazla yer aldığı bir strateji olarak ortaya çıkmıştır. Günümüzde var olan tek bir ilaç ajanı ile tekrarlanan tedavi, kemoterapötiklere direnç gelişimini ortaya çıkartabilmekte veya tedavide çoklu ilaç direnci gelişebilmektedir. Ayrıca konvansiyonel tek bir ilaç etkin maddesi ile tedavi ilacın tümör dokusuna erişimini kısıtlamaktadır. Bu durum ise yüksek dozlarda ilaç kullanımını zorunlu kılmakla beraber spesifik olmayan bir hedeflemeye ve kabul edilemeyen sitotoksisiteye sebebiyet verir. Zaman içerisinde, kombine tedavi klinik olarak da uygulanmaya başlamıştır. Kombine tedavi; iki veya daha fazla terapötik ajanının eş zamanlı olarak salımı veya radyoterapi, immunoterapi, kemoterapi gibi çeşitli tedavi yöntemlerinin birlikte uygulanması olarak tanımlanmaktadır. Farklı kemoterapötik etkin maddelerin eş salımı en yaygın kombine tedavi modelidir. Tek bir ilacın yüksek dozlarda kullanımı nedeniyle meydana gelen yan etkiler iki veya daha fazla ajanın kombinasyonunda farklı biyolojik yolakların uyarımı ve her bir bileşimin daha düşük dozlarda kullanımı ile bertaraf edilmiştir. Kullanılan ilaç etkin maddeleri, daha iyi seçicilik ve daha yüksek terapötik etkinik elde edebilmek için sinerjik

etki gösterdiği bilinen yolaklara hedeflendirilebilir. Ayrıca yetersiz membran transport özellikleri, kötü biyoyararlanım ve düşük biyodağılım konvansiyonel ilaç salımıyla ilişkili en önemli kısıtlamalardır. Akıllı ilaç taşıyıcı sistemlerinin kullanımı ile kanser tedavisinde oldukça başarılı sonuçlar alınmıştır. Kanser dokusuna nanoteknoloji temelli kombine ilaç salım sistemleri EPR mekanizması ile tümörlü bölgeye daha fazla biyoyararlanımı da içeren daha iyi farmakokinetik parametreler sunmaktadır. Ayrıca normal dokulara karşı sistemik toksik etki ve konvansiyonel ilaç kaynaklı adverse etki bu yaklaşım ile azaltılmıştır. Kombine tedavi ile ilaç etkin maddelerin ayrı ayrı gösterdikleri etkinliklerin toplamından daha yüksek bir etki elde edilebilmektedir. İlk olarak 1940'larda uygulanan bu kombine kullanım stratejileri ile ilgili olarak yapılan çok fazla çalışma mevcuttur ancak selekoksib ve emodin, gemsitabin ve RAD001, paklitaksel ve RAD001 veya paklitaksel ve karboplatinin sinerjik kullanımı ile elde edilen başarılı sonuçlar, örnek teşkil etmesi açısından sayılabilmektedir (Parhi ve diğerleri, 2012).

Deksketoprofen

Antikanser ilaçlarının etkinliğini artırmak amacıyla taşıyıcı sistem formülasyonlarına ilave edilmesi düşünülen deksketoprofen ağrı düzenlemesinde santral ve periferal etkileri bulunan steroidal olmayan anti-inflamatuvar ilaçlardandır (NSAİİ veya NSAIDs; Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs) ve akut veya kronik birçok ağrı modelinde etkilidir (Miranda ve diğerleri, 2011; Zegpi ve diğerleri, 2009). Bu ilaçlar; araşidonik asitin prostaglandine (PG) dönüşümünü tetikleyen siklooksijenaz (COX) enzimini baskılamaktadırlar. COX'un ağrı oluşumu ve inflamatuvar süreci ile ilişkili 3 farklı izoformu vardır; COX1, COX2 ve COX3 (Zegpi ve diğerleri, 2009). Son yıllarda aspirin, ibuprofen gibi bazı NSAİİ'ın anti-kanser aktivite gösterdikleri ile ilgili de bulgular elde edilmiş ve NSAİİ, kanserin önlenmesiyle ilişkilendirilmiştir (Marques ve diğerleri, 2014). NSAİİ'ın kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği, apoptosisi baskıladığı ve katı tümör kütlesini küçülttüğü öne sürülmüştür (Ilbasmıs ve Degim, 2012). Bu veriler doğrultusunda COX enzim yolağında görevli NSAİİ'ın kanser hücreleri üzerine etki mekanizmaları ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Prostaglandinin bir çeşidi olan PGE2'nin proliferasyonu, sağkalımı, anjiyogenezi, migrasyonu ve invazyonu tetiklemesiyle kolorektal tümörlerde tek bir genin birden fazla fenotipik özelliği etkilemesi gibi etkileri açığa çıkartabildiği görülmüştür. PGE2'nin cAMP (siklik adenozin monofosfat)/protein kinaz A ve EGFR gibi sinyal yolaklarını ve ayrıca VEGF uyarımını aktive ettiği ve bu

reseptör sinyalleri üzerine olan etkisi nedeniyle de anjiyogenezi regüle ettiği ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca fibroblast büyüme faktörünü yükseltmekte olduğu da tesbit edilmiştir. PGE2 ile ilişkili bu yolağın tümör mikro ortamına ciddi anlamda etkisi olduğu ortaya konulmuştur (Greenhough ve diğerleri, 2009). NSAİİ'ın ise özellikle S(+) konfigürasyona sahip enantiyomerleri prostaglandin (PG) aktivitesini önemli ölçüde inhibe etmektedirler (Miranda ve diğerleri, 2011). COX enzimleri üzerinden yürüyen bu yolakta COX2 ve COX3'ü dengeyi bozmadan inhibe etmek oldukça zordur (Zegpi ve diğerleri, 2009). NSAİ bir ilaç olan rasemik ketoprofen COX1 (siklooksijenaz1) enziminin güçlü bir selektif inhibitörüdür ve bu etki S(+) enantiyomerinden kaynaklanmaktadır. Ketoprofenin S(+) dekstrojir enantiyomeri; deksketoprofen olarak adlandırılmaktadır. Yarı dozda verilen deksketoprofen iki katı dozda verilen rasemik ketoprofenden daha fazla etkilidir (Miranda ve diğerleri, 2007). Deksketoprofen, ayrıca antinosisepsiyona (ağrı toleransının artışı) neden olmaktadır (Miranda ve diğerleri, 2011). Ancak antinosiseptif etkinliği COX1 inhibisyonu ile açıklanamamaktadır (Zegpi ve diğerleri, 2009). Yapılan pek çok çalışmada deksketoprofenin birtakım ilaçlarla kombine kullanımının sinerjik etki yarattığı ortaya koyulmuştur. Deksibuprofen ile kombine kullanımı sinerjik bir antinosiseptif bir etki göstermiştir (Miranda ve diğerleri, 2011). Bir başka çalışmada ise deksketoprofen morfin ile birlikte uygulandığında DEX'in morfinin analjezik etkisini artırdığı ve aralarında sinerjik bir etki oluşturduğu gösterilmiştir. Bunun yanı sıra benzer sinerjik etki deksketoprofen ve parasetamol arasında da görülmektedir (Miranda ve diğerleri, 2007). Bunun yanı sıra tramadol ve deksketoprofen etkileşimi de rapor edilmiştir. Aralarındaki sinerjik etki santral veya periferal olabilmektedir (Zegpi ve diğerleri, 2009). NSAİİ'lardan biri olan ibuprofen ile yapılan bir çalışmada, nano-taşıyıcılarla tümör hücresinin içerisine ibuprofen salımının gerçekleştiği ve genellikle kullanılan kemoterapötiklerle karşılaştırılabilir düzeyde anti-tümöral etkinlik oluşturduğu gösterilmiştir (Marques ve diğerleri, 2014).

2.4. Kuantum Noktacıkları

Kuantum noktacıkları, birkaç atom büyüklüğünde optik ve kimyasal özellikleri açısından oldukça avantajlı tümöre doğal olarak hedeflenebilen nanotaşıyıcılardır (Chena ve diğerleri, 2013). Nanometre boyutlarındaki kristaller genellikle kuantum noktacıkları olarak adlandırılırlar. Boyutları hazırlanılışlarında kullanılan materyallere bağlı olsa da genellikle 10nm'nin altında olup 2 ila 20nm arasında değişebilmektedir. Metalik veya

yarıiletken olabilen bu yapılar, oldukça küçük boyutlara sahip olmaları nedeniyle kuantum etkileri göstermekte, geniş UV absorpsiyon spektrumunda dar bir bant emisyonu vermekte, parlak florosans ve yüksek fotostabilite göstermektedir (Ozkan, 2004). Yarı iletken nanokristaller olarak da tanımlanan kuantum noktacıkları optik özellikleri sayesinde biyo-görüntülemede (Kuang ve diğerleri, 2011) ve *in vivo* hayvan deneyleri sırasında hayvanı sakrafiye etmeksizin görüntüleme yöntemleri ile hücrenin *in vivo* izlenebilmesine olanak tanıyarak (Adeli ve diğerleri, 2011) kullanılabilmekte, ayrıca *ex-vivo* görüntüleme tekniklerinde de yüksek duyarlılıkla tesbit edilebilmektedirler (Singh ve Lillard, 2009).

2.4.1. Kuantum noktacıklarının yapısı ve özellikleri

Kuantum noktacıkları temelde yarı iletken bir çekirdek yapısından oluşmuşlardır, ancak bu çekirdek yapısı çekirdeğin belirli özelliklerinin bastırılması için kabuk ile çevrelenebilmekte, amaca yönelik olarak yapıya çeşitli maddeler eklenebilmekte veya yapı kaplanabilmektedir. Çekirdek genellikle biyolojik uygulamalara yatkınlıkları açısından periyodik cetveldeki 2. ve 6. (CdSe, CdTe, CdS, ZnSe) gruplarla oluşturulmaktadır. Çekirdek kısmının boyutu 2-10 nm arasında değişebilmektedir (Maysinger ve diğerleri, 2007). Kadmiyumun yanı sıra çinko elementi kullanılarak elde edilen kuantum noktacıkları da bulunmaktadır. Çinko yapısına sahip kuantum noktacıklarından ZnO kuantum noktacıklarının çevreye verdiği zarar çok daha az olmakla birlikte biyolojik sistemlerdeki uyumluluğu da çok daha yüksektir (Zhao ve diğerleri, 2013). Çok küçük boyutlara sahip olmaları dışında, ayarlanabilir dar bir emisyon spektrumuna sahiptirler ve bu sayede tek bir dalga boyunda pek çok fonksiyonu gerçekleştirebilmektedirler. Yüksek floresans özellikleri sayesinde oldukça parlak bir görünüm kazanmaktadırlar ve floresans mikroskopta gözle görülebilmektedirler (Rosenthal ve diğerleri, 2011). Tek başlarına kullanılabildikleri gibi çeşitli ilaç taşıyıcı sistemler ile kombine halde pek çok uygulamaları mevcuttur. Görüntüleme amacı ile lipozom, polimerik nanopartikül, misel veya nanojel yapıları ile kombine halde kullanılabildikleri gibi (Wang ve Chen, 2011), seçici hedeflemeyi artırmaya yönelik olarak lipit nanopartiküller içerisinde (Schroeder ve diğerleri, 2007), dokulara dağılımın eş zamanlı takibi amacı ile nanotüp yapısı ile konjuge halde de (Guo ve diğerleri, 2008 ve Yang ve diğerleri, 2009) kullanımları mevcuttur. Ayrıca daha duyarlı tesbit ve biyolojik görüntüleme alınabilmesi için canlı hücre içerisine yerleştirilerek kullanıldığı çalışmalar da bulunmaktadır (Wang ve diğerleri, 2012).

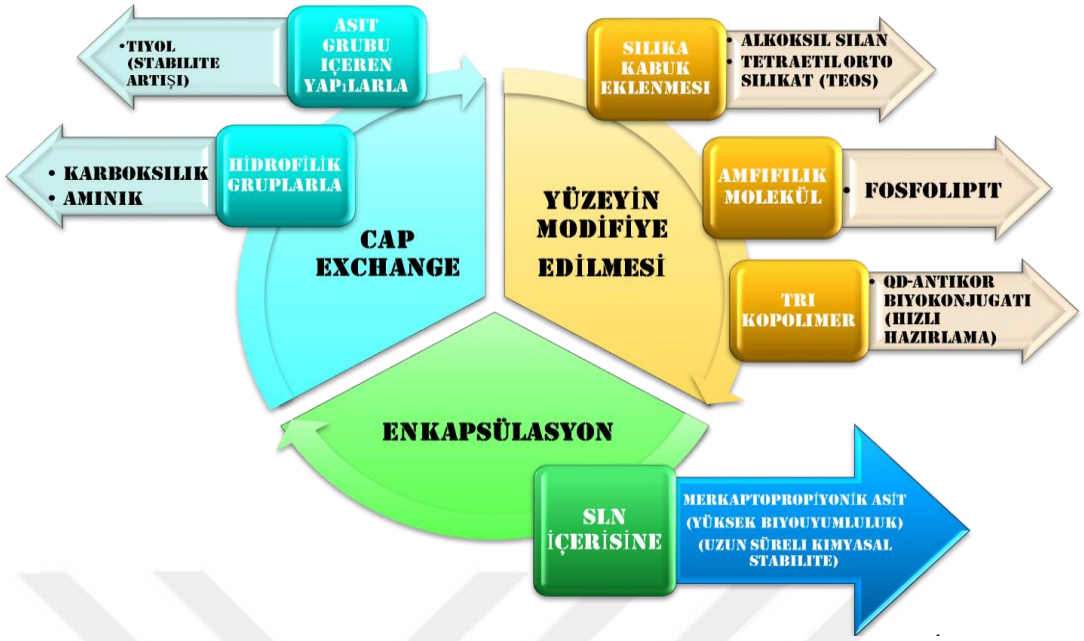
2.4.2. Kuantum noktacıklarının hazırlama teknikleri

Üretim yöntemleri boyutlarını ve yüzey özelliklerini etkilemektedir (Dantas ve diğerleri, 2005). Hazırlama yöntemleri için; biyolojik sistemlerde kullanımlarına uygun olan kolloidal kimya ile nano boyutlu yarı iletken partiküllerin eldesi ve optoelektronik amaçlı kullanıma uygun olan epitaksiyal büyüme adı da verilen nanoboyutlu işleme olmak üzere iki temel yaklaşım bulunmaktadır. Kolloidal kimya ile üretim organik solvan üzerine, elde edilmesi istenen yarı iletkenin prekürsör maddesinin enjeksiyonuna dayandırılmaktadır. Kolay ve az malzeme gerektiren bir yöntemdir (Drbohlavova ve diğerleri, 2009).Kuantum noktacıklarının eldesi için kullanım amacına bağlı olarak sol-jel metodu, dialkil yapısının değiştirilmesi, elektroliz gibi farklı pek çok yöntem bulunmaktadır (Schneider ve diğerleri, 2011).

2.4.3. Kuantum noktacıklarının suda çözünürlükleri

Düşük hidrofilik yapı gösteren kuantum noktacıklarının biyolojik sistemlerde kullanımları oldukça kısıtlıdır. Hidrofilik özelliklerinin ve dolayısıyla biyouyumluluklarının artırılması için yüzey ligandlarının hidrofilik yapılarla değiştirilmesi, fosfolipid miseller ve amfifilik kopolimer içerisine enkapsüle edilmeleri gibi çeşitli yöntemler gerçekleştirilmektedir (Tian ve diğerleri, 2011).

Hidrofobik ligandlar; bir ucu kuantum noktacıkları ile etkileşebilen diğer ucu hidrofilik yapıda olan suda çözünebilen moleküller ile değiştirilebilmektedir. Ancak ligand değişimi genellikle kuantum etkinliğinin azalmasına sebebiyet vermektedir. Uzun zincirli amfifilik polimerlerin kullanımı ile misel yapıları oluşturularak hem sudaki çözünürlük hem de yapının stabilitesi artırılabilmektedir. Bu yöntem kuantum etkilerini baskılamaması, kullanılan amfiflik polimerlerin maliyetinin düşük olması ve hidrofobik kısmın uzun tutulması ile sterik engel oluşturularak yapının stabilitesini artırması sebebi ile üstünlük sağlamaktadır. Ayrıca kuantum noktacıklarının silika tabakaları ile enkapsüle edilerek de suda çözünür ve biyouyumlu hale getirilebilmektedir (Yu ve diğerleri, 2006). Bu yaklaşımlar (Geszke-Moritz ve Moritz, 2013) Şekil 2.4'de şematize edilmiştir.

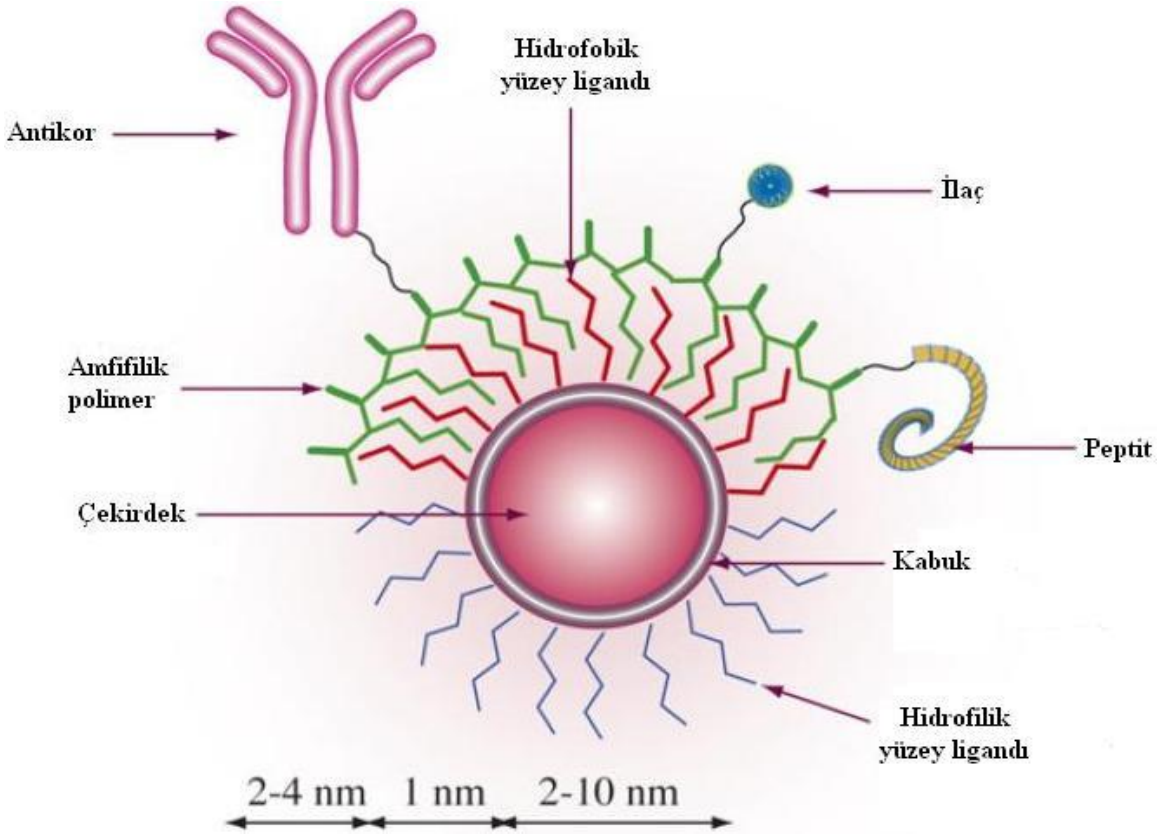


Şekil 2.4. Kuantum noktacıklarının suda çözünür hale getirilmesi için yaklaşımlar

Yapılarına farklı büyüklüklerdeki ve farklı negatif yüklere sahip bir seri hidrofilik ligand takılarak yapılan bir çalışmada yüzey modifikasyonlarının sudaki çözünürlüğü etkilediği, yüzey yükü ve hidrofobisitesi ile de hücre veya dokuya bağlanabilirliğinin değiştiği gösterilmiştir (Zhang ve diğerleri, 2012).

2.4.4. Kuantum noktacıklarına fonksiyonel grup ilavesi

Kuantum noktacıkları yüzeyi modifikasyonlara oldukça yatkındır. Kanser hücrelerine spesifik hedefleme için folik asit ile, yüksek yükleme kapasitesi elde etmek için mezoporöz silika ile veya biyouyumluluğu artırmak ve hücresel alımı artırmak için PEG ile konjuge halde kullanılabilmektedirler (Probst ve diğerleri, 2013). Yüzey fonksiyonelleştirilmesinde dikkat edilmesi gereken en önemli unsur fonksiyonelleştirme sonrasında lüminesans özelliklerinin korunması olmaktadır. Nanokristalin yüzeyindeki ligand ile polimer arasında hidrofobik etkileşimler yüzeyde ince bir polimerik kaplama gerçekleştirebilmektedir. Makromoleküllerin kuantum noktacığı yüzeyine tekli veya çoklu bağ ile bağlanması veya doğrudan polimerik zincir yapıları ile yüzeyde gerçekleşecek polimerizasyon ile de yüzeyde değişiklikler yapılabilmektedir (Tomczak ve diğerleri, 2009). Yüzeyde yapılabilecek değişiklikler (Maysinger ve diğerleri, 2007) Şekil 2.5'de yer almaktadır.



Şekil 2.5. Kuantum Noktacığına fonksiyonel grup ilave edilmesi

2.4.5. Kuantum noktacıklarının görüntüleme tekniklerinde kullanımı

UV ışık altında stabil olmaları, emisyon dalgaboylarının partikül büyüklükleri ile ayarlanabilir olmaları, tek bir eksitasyon ışığı altında farklı renklerde gözlenebilir olmaları ve klasik floresans organiklerden daha ucuz olmaları sebebi ile biyolojik işaretleme amacı ile kullanımları yaygındır (Xiong ve diğerleri, 2008). Kanser hücrelerinin tesbiti, tümör hücrelerinin görüntülenmesi, tüm vücudun görüntülenebilmesi ve hücre hareketi çalışmaları gibi biyolojik olayların görüntülenmesi gibi çok çeşitli uygulama alanları bulunmaktadır (Papagiannaros ve diğerleri, 2009). Buna ek olarak epidermal büyüme faktörü yüklü, amin grubu takılarak fonksiyonelleştirilmiş kuantum noktacıkları, iv enjeksiyon ile farelere uygulandıktan sonra 24 saatlik doku dağılımının takibine ve tümör bölgesindeki klirensinin ve birikiminin incelenmesine olanak tanımıştır (Diagaradjane ve diğerleri, 2008). Fareler ile *in vivo* olarak yapılan bir çalışmada ise kuantum noktacıklarının kullanımı ile hayvanın sakrifiye olması gerekmeden beynin kısımları görüntülenmiştir. Ayrıca bu çalışmada kuantum noktacıklarının Alzheimer ve beyin tümörü gibi rahatsızlıkların tedavisinde yüksek yükleme kapasiteleri, biyolojik ortamdaki

stabiliteleri, biyolojik bağlanma aktiviteleri ve yüzey değişikliklerine yatkınlıkları açısından büyük önem teşkil ettikleri vurgulanmıştır (Gao ve diğerleri, 2008). Kuantum noktacıklarının hem görüntülenebilmesi hem de ilaç yüklenebilirliği ile taşıyıcı sistem olarak kullanılması daha etkin bir kanser tedavisi sunmaktadır (Savla ve diğerleri, 2011).

2.4.6. Kuantum noktacıklarının ilaç salımında ve kanser tedavisinde kullanımı

İn vivo ortamda, küçük boyutları sayesinde kapilerlerden çok kolay penetre olabilmektedirler ve hatta hücre içerisinde bulunan organellere dahi hedeflenebilmektedirler. Salımları; fizikokimyasal özellikleri ile doğrudan pasif, yüzeylerinin fonksiyonelleştirilmesi ile endositoz aracılı kolaylaştırılmış ve hücreye doğrudan etkiyen aktif salım olmak üzere çeşitlenebilmektedir. Pasif salım elektrostatik etkileşimlere dayandırılmakta olup kolaylaştırılmış salım peptit, protein, küçük moleküller veya polimer aracılı ve aktif salım ise elektroporasyon veya mikroenjeksiyon ile gerçekleşmektedir (Delehanty ve diğerleri, 2009). Kuantum noktacıklarının ilaç salımında kullanımı ile ilgili yapılan bir çalışmada antikanser ajan yanı sıra folik asit ve kitozan ile çevrelenmiş ZnO kuantum noktacıkları ile yüksek ilaç yükleme kapasitesine ulaşıldığı ve başlangıçta hızlı sonrasında kontrollü salım elde edildiği rapor edilmiştir (Yuan ve diğerleri, 2010). Yapılan bir başka çalışmada ise ketoprofen ve deksketoprofen yüklü ZnO kuantum noktacıklarının deriden geçişleri değerlendirilmiş ve kuantum noktacıkları kullanımı ile deriden penetre olan ilaç miktarında artış gözlemlenmiştir (Değim ve Kadıoğlu, 2013).

2.4.7. Kuantum noktacıklarının analizleri için kullanılan teknikler

Kuantum noktacıklarının morfolojileri ve büyüklükleri; taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM), geçirimli elektron mikroskobu (Transmission Electron Microscope, TEM), atomik güç mikroskobu (Atomic Force Microscope, AFM) veya dinamik ışık saçılımı (Dynamic Light Scattering, DLS) ile gerçekleştirilebilmektedir. Yüzey kimyaları X-Ray fotoelektron spektroskopisi, NMR veya analitik ultrasantrifüj metodları ile belirlenebilmektedir. Optik karakterizasyonları ise; UV-VIS veya fotolüminesans (PL) spektroskopi ile tayin edilebilmektedir. Fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) ile de kuantum noktacığı yapısal olarak aydınlatılabilmektedir (Yang ve diğerleri, 2011; Drbohlavova, 2009).

2.4.8. Kuantum noktacıklarının toksisitesi

Biyolojik uygulamalarda kullanılan kuantum noktacıklarının pek çoğu yapısında ağır metal grubunda olan ve toksik etkilere sebep olan kadmiyum elementini içermektedir (Hild ve diğerleri, 2008). Kuantum noktacıklarının en önemli problemi yapısında bulunan kadmiyum elementine bağlı toksisitedir (Adamczak ve diğerleri, 2013). Kadmiyum (Cd)'dan yapılmış kuantum noktacıkları toksisiteleri; Cd^{+2} iyonunun serbest hale gelmesi, serbest radikal oluşumu ve hücre içi moleküller ile kuantum noktacıklarının etkileşimi gibi mekanizmalardan kaynaklanmaktadır (Adeli, 2011). Kuantum noktacığı çekirdek yapısının ZnS gibi bir kabuk ile çevrelenmesi toksisiteyi azaltmaktadır. Bunun yanı sıra polimer ile kaplama veya silika enkapsülasyonu işlemleri de toksisitenin azalmasını sağlamaktadır. Ancak özellikle *in vivo* uygulamalarda kuantum noktacıklarının toksisiteleri ve doku ve kan sirkülasyonundan klirensleri ile ilgili bilgiler henüz netlik kazanamamıştır (Hild ve diğerleri, 2008). Bunun yanı sıra yarı iletken nanomateryaller arasında ZnO yapıları düşük dozlarda non-toksik olarak kabul edilmektedir (Yan ve diğerleri, 2011).

2.4.9. Kuantum noktacıklarının stabiliteleri

Suda çözünebilen ZnO kuantum noktacıları üzerine yapılan bir çalışmada, hücre içerisinde yapısal bir bozukluk olup olmadığı araştırılmış, standart örnekler; endositoz ile hücre içerisine girmiş kuantum noktacıkları ile karşılaştırılmış ve kuantum noktacıklarının hücre içerisinde de yapılarını ve absorbsiyon spektrumlarını korudukları kanıtlanmıştır (Lu ve diğerleri, 2011).

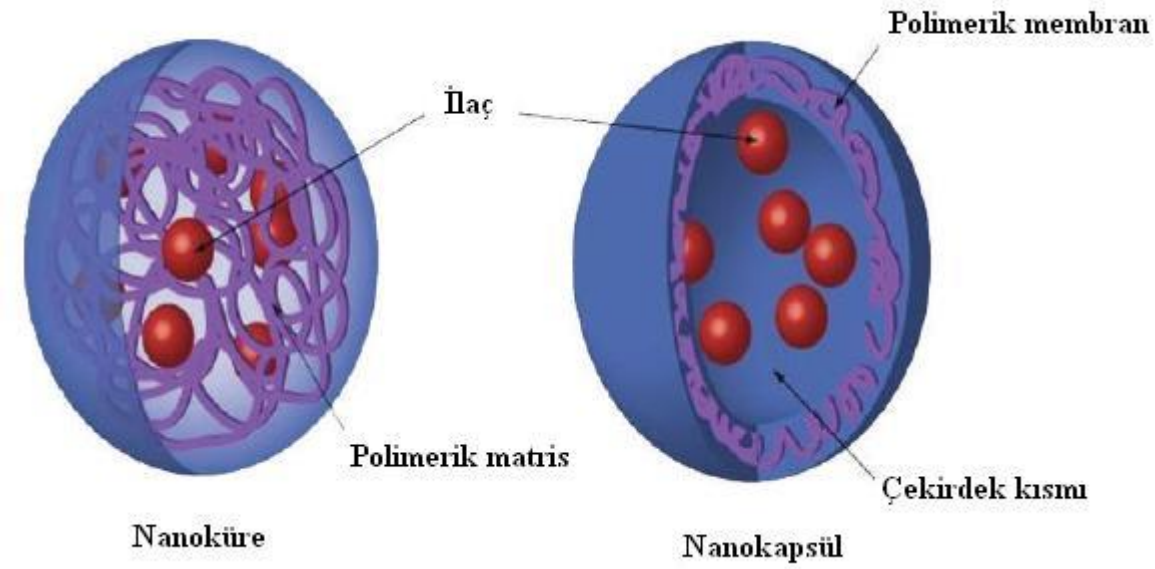
2.5. Polimerik Nanopartiküller

Nanopartiküller; yapılarında temel teşkil eden maddelere göre magnetik nanopartiküller, katı-lipit nanopartiküller ve polimerik nanopartiküller olmak üzere sınıflandırılmaktadırlar (Parhi ve diğerleri, 2012). Doğal veya sentetik polimerlerden meydana getirilmiş polimerik nanopartiküller, yüzey modifikasyonlarının kolaylığı ve stabiliteleri açısından ilgi çekici hale gelmiştir. Polimer karakteristiklerinin ve yüzey kimyasının değiştirilmesi ile ilaçların kontrollü salımları ve bölgeye özgü ilaç hedeflemesinin mümkün kılınması yanı sıra hassas moleküllerin degredasyondan korunması da sağlanmaktadır. Boyutları 10nm ila 1000nm arasında değişebilmektedir (Singh ve Lillard, 2009). İlacın zayıf çözünürlük göstermesi,

efektif dozun düşük olması, ilaç salımının gecikmesi gibi tutulum ve salım problemlerini azaltma ve ilacın dayanıklılığını artırma amacı ile kullanılmaktadırlar (Parveen ve Sahoo, 2011).

2.5.1. Nanopartiküllerin yapısı ve özellikleri

Polimerik nanopartiküller, terapötik olarak etkili ajanı yapısı içerisine enkapsüle edilmiş, yüzeyine adsorbe ettirilmiş veya konjuge halde taşıyabilen sistemlerdir (Roger ve diğerleri, 2011). Polimerik matris içerisine ilaç yapısının homojen olarak dağılması ile oluşmuş sistem nanoküre, ilacın polimerik membran içerisine hapsedilmesi ile elde edilmiş sistem ise nanokapsül olarak adlandırılabilmektedir (bkz. Şekil 2.6) (Christoforidis JB, 2012).



Şekil 2.6. Nanopartikül yapıları

Polimerik nanopartiküller; hidrofobik doğal veya sentetik polimer ve ko-polimerler kullanılarak oluşturulmaktadırlar (Roger ve diğerleri, 2011). Çizelge 2.2 ve Çizelge 2.3'de bazı polimer örnekleri kullanım alanları ile birlikte yer almaktadır.

Çizelge 2.2. Sıkça kullanılan doğal polimerlerden bazıları ve özellikleri

Polimerler	**Polimer Özelliği**	**Polimerin Kullanımı**	**Kaynak**
Albümin	585 aminoasitten oluşan polipeptit yapılı suda çözünür bir proteindir.	*Stabilizan *Kriyoprotektan *Paranterallerde kosolvan	(Rowe RC, 2009)
Aljinat	Suda çözünmez ancak ağırlığının 200-300 katı kadar suyu absorbe ederek şişebilir.	*Bağlayıcı *Dağıtıcı *Süspansiyon ajanı *Salım modifiye edici ajan	(Rowe RC, 2009)
Jelatin	Hayvansal kollojenin asit (Tip A) veya bazik hidrolizi (Tip B) ile oluşur. Suda, ağırlığının 5-10 katı kadar suyu absorbe edererek şişer, 40°C'nin üzerindeki suda çözünebilir.	*Sert veya yumuşak kapsül maddesi *Çözünürlük artırıcı *Kontrollü salım sağlama *Viskozite artırıcı *Süspansiyon ajanı	(Rowe RC, 2009)
Kitozan	Kitinin deasetilasyonu sonucu oluşmaktadır. Katyonik yapılıdır. Suda zor çözünür. Organik veya mineral inorganik asitlerde çözünür. Farklı molekül ağırlıkları ve farklı viskozitelere sahip tipleri bulunmaktadır.	*Bağlayıcı *Dağıtıcı *Kaplama ajanı *Mukoadhezif madde *Viskozite artırıcı ajan *Salım ayarlayıcı madde	(Rowe RC, 2009)

Doğal polimerlerin yanı sıra sentetik polimerler de nanopartikül yapılarında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu polimerlere örnekler aşağıdaki çizelgede yer almaktadır.

Çizelge 2.3. Sıkça kullanılan sentetik polimerlerden bazıları ve özellikleri

Polimerler	**Polimer Özelliği**	**Polimerin Kullanımı**	**Kaynak**
PLA	Suda çözünmez, organik solvanlarda çözünür. Biyo parçalanırdır.	*Kontrollü salım ajanı *Kaplama ajanı	(Rowe RC, 2009)
Polimetakrilat (Eudragit)	Farklı tiplerinin kullanımıyla farklı çözünürlük karakteristikleri elde edilebilmektedir.	*Tabletlerde film kaplama *Kontrollü salım sağlama *Farklı salım profilleri oluşturma	(Kondo ve diğerleri, 2013)
Polikaprolakton	Poliester yapılıdır. Suda çözünmez. Kloroform,benzen ve toluende çözünür. Reolojik ve viskoelastik özellikleri oldukça iyidir.	*Kontrollü salım sağlama *Uzatılmış salım sağlama *Farklı salım profilleri *Yapay kan damarları	(Woodruff ve Hutmacher, 2010)

2.5.2. Nanopartikül hazırlama yöntemleri

Nanopartiküller aşağıdan yukarı (bottom up) yöntemi ve yukarıdan aşağı (top down) yöntemi olmak üzere temelde iki farklı yaklaşımla üretilebilmektedirler. Aşağıdan yukarı yöntemi moleküler veya atomik düzeydeki bileşenlerden hareketle daha karmaşık yapılar üretimine dayanmaktadır. Yukarıdan aşağı yöntemi ise; yüksek boyutlu yapıların küçültülmesi ile daha küçük boyutlu maddelerin üretim yöntemini ifade etmektedir (Biswas ve diğerleri, 2012; Kumar ve diğerleri, 2015; Wais ve diğerleri, 2016). Nanopartiküller; misel polimerizasyonu, emülsiyon polimerizasyonu, emülsiyon-solvan buharlaştırma yöntemi, nanopresipitasyon yöntemi, yüzeylerarası polimerizasyon tekniği, aktif maddenin nanopartiküle adsorpsiyonu, su/yağ emülsiyonunda ısı denatürasyonu ve çapraz bağlanma veya sıcak mikroemülsiyon prekürsörlerinin kullanımı gibi teknikler ile hazırlanabilmektedirler (Şengel-Türk ve diğerleri, 2007).

Hazırlama yöntemlerinden en yaygın olarak kullanılanlardan bir tanesi su/yağ emülsifikasyon yöntemidir. Bu yöntemde suda çözünürlüğü zayıf etkin madde, organik fazı oluşturan polimer solüsyonunda çözündürüldükten sonra sulu faz ile emülsifiye edilmektedir. Sonrasında organik faz uçurularak su içerisinde süspande halde nanopartiküller elde edilmektedir (Song ve diğerleri, 2008).

Bir diğer hazırlama yöntemi ise özellikle kitozan nanopartikülleri için kullanılan iyonotropik jelasyon yöntemidir. Tripolifosfat polimerinin anyonları ile katyonik kitozanın reaksiyonuna dayanmaktadır. Bu yöntemde; asetik asit sulu çözeltisi içerisinde çözündürülmüş kitozan, tripolifosfatın sulu çözeltisi içerisine magnetik karıştırıcı altında damla damla ilave edilmektedir. Elde edilen opak süspansiyon nanopartikül yapılarını içermektedir. Nanopartikülleri toz halinde ayırmak için ise santrifüj işlemi sonrasında dondurularak kurutmak gerekmektedir (Dounighi ve diğerleri, 2012).

Püskürterek kurutma yöntemi ise; büyük yapıların küçültülmesi ile daha küçük boyutlu partiküller elde edilmesini sağlayan hızlı ve kesintisiz bir işlemdir. Sıvı maddeden katı ürün elde edilmesini sağlarken partikül büyüklüğünün de kontrol edilmesine olanak tanımaktadır. Yöntem üç temel basamağı kapsamaktadır. Bunlar;

- atomizer yardımıyla sıvı besleme ünitesinden küçük damlacıkların oluşması
- sıvı fazı uçurmak için küçük damlacıkların gaz akımıyla karşılaşması
- sonuç ürünün katı parçacıklar halinde sistemden ayrılması ve toplanması

adımlarıdır (Liu ve diğerleri, 2015; Kulkarni ve diğerleri, 2016; Wan ve Yang, 2016).

Pek çok konvansiyonel püskürterek kurutma cihazında sıvı kısım başlığa peristaltik pompa aracılığıyla gelmektedir. Atomizasyon basamağı; santrifüj, basınç veya kinetik enerji etkisiyle sağlanmaktadır. Daha sonraki adımda ise hızlı bir şekilde gerçekleşen çözücü buharlaştırma yöntemi ile damlacıklardan katı partiküller elde edilmektedir. Son basamakta katı partiküller siklon toplayıcıya iletilmektedir (Sosnik ve Seremeta, 2015).

Partikül büyüklüğü ürün kalitesi üzerine etkisi bulunan en önemli parametrelerden biri olup görünüşten salım oranına ve etkinliğe kadar birçok etmeni değiştirebilmektedir.

Genellikle küçük partiküller hızlı çözünme göstermektedir. Nano püskürterek kurutma teknolojisi ise püskürterek kurutma sistemleri için geliştirilmiş son teknoloji olup mikrometre boyutları altında partiküllerin elde edilmesine olanak tanımaktadır (Li ve diğerleri, 2010).

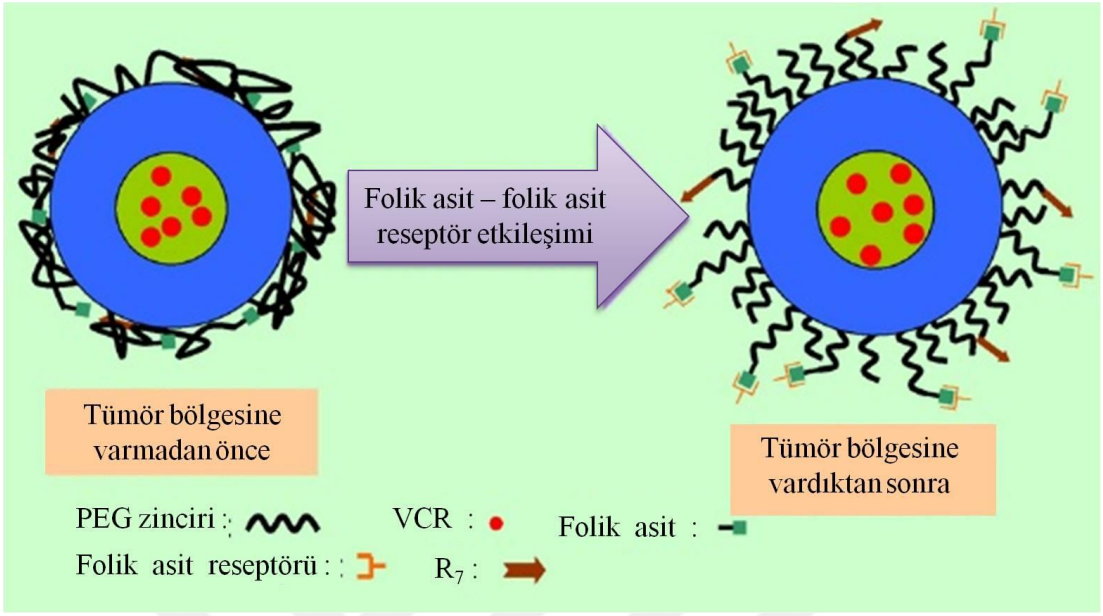
2.5.3. Nanopartiküllere fonksiyonel grup ilavesi

Nanopartiküllerin boyutları veya yüzey yükleri gibi karakteristikleri hücresel alım açısından büyük önem teşkil etmektedir. Bunun yanısıra nanopartiküllerin gastrointestinal sıvılardaki stabilitelerinin ve epitel doku ile yüzeysel etkileşimlerinin artırılması yüzey modifikasyonları ile mümkün kılınmaktadır (Casettari ve diğerleri, 2012).

Opsonin adsorbsiyonu hidrofobik yapıların yüzeylerine daha fazla olmaktadır. Hidrofobik yapılı nanopartiküllerin fagositik sistem tarafından opsonizasyonları yüzeylerinin hidrofilik polimerlerle kaplanması ile giderilebilmektedir. PEG bu amaçla en çok kullanılan polimerdir. Hidrofilik yapısı sayesinde sulu dış fazı oluşturarak fagositik etkiyi bastırmakta ve nanopartikülün vücutta kalış süresini arttırmaktadır. PEG kaplı nanopartiküller, PEG'in sulu ortamda hızlı hareketi ve bağlı PEG zincirlerinin konfigürasyonel olarak oluşturduğu sterik engel sayesinde RES'den korunmaktadırlar ve böylelikle ilacın dokulara dağılımını ve yarı ömrünü artırmaktadır (Parveen ve Sahoo, 2011).

İlaç tedavisindeki temel amaç ilacın etki göstereceği hedef bölgeye ulaşmasının artırılması ve bu bölge dışındaki alanların ilaca maruziyetinin en düşük seviyeye çekilmesidir. Bu amaçla ilaç taşıyıcı sistemler dokuyu tanıyan ligandlar ile fonksiyonelleştirilerek hedef bölgeye geçişleri artırılmaktadır. Özellikle kanser tedavisinde biotin veya folik asit kullanımı ile tümör hücrelerine nanopartikül birikiminin anlamlı derecede arttığı dolayısı ile de ilaç etkinliğinin geliştirildiği pek çok çalışmada gösterilmiştir (Patil ve diğerleri, 2009). Plazma membranlarının seçici permeabilitesi vücuda dışarıdan giren pek çok maddenin hücre içerisine girişini engellemektedir. Bu permeabilite bariyerini aşmak ve nanopartikül yapılarının hücre içerisine alımını sağlamak amacı ile hücre penetrasyonunu sağlayan peptit yapılı moleküller de ilaç taşıyıcı sistem yapısına dahil edilebilmektedir. Folik asit tümör hücresine aktif hedeflemeyi sağlarken, hücre penetre edici peptit yapılı ligand da hücresel alımı artırabilmektedir. PEG ve PLGA polimerleri kullanılarak oluşturulmuş bifonksiyonel nanopartikül sistemi üzerinde yapılmış yüzey modifikasyonları

Şekil 2.7'de şematik olarak gösterilmiştir (Chen ve diğerleri, 2012).



Şekil 2.7. Yüzey modifikasyonları yapılmış PLGA-PEG nanopartikül yapısı

2.5.4. Nanopartiküllerin ilaç salımında ve kanser tedavisinde kullanımı

Polimerik nanopartiküller çekirdeklerinde katı bir polimer taşımaları sayesinde suda çözünürlüğü düşük ilaçlar için yüksek yükleme kapasitesi sağlamaktadırlar. Polimerik nanopartikül yapısına ilaç enkapsülasyonu polimer solüsyonuyla ilacın karıştırılması işlemi ile yapılmaktadır. Partiküllerle kendiliğinden birleşen polimerler, fiziksel etkileşim ile ilaç içeriğini yakalamaktadırlar. Birden fazla hidrofobik özellikli terapötik bileşiğin aynı anda sisteme yüklenebilmesine olanak tanımaktadırlar (Hu ve Zhang, 2012). Yüksek yükleme kapasiteleri kadar salım özellikleri de önem teşkil etmektedir. Nanopartiküller küçük boyutları ve biyobozunur materyallerden oluşmaları sebebiyle ilaç salımı açısından da oldukça kullanışlıdır. Mikrokapillerden penetre olabildikleri gibi tümör, epitelyal veya enflamasyonlu dokulardaki endotel hücrelere de ekstravase olabilmektedirler. Etkin hücre içi tutulum ve hedef bölgede seçici olarak ilacın birikimini sağlamaktadırlar (Singh ve Lillard, 2009).

Nanopartikül yapılarına kombine ilaç yükleme çalışmalarına ilişkin olarak pek çok çalışma yapılmış ve çalışmalardan genellikle olumlu sonuçlar alınmıştır. PLGA nanopartikülleri ile yapılmış bir çalışma, nanopartiküllere antineoplastik ajan olan paklitaksel ve p-gp inhibitör etkinliği bilinen tarikuidar yüklenmesi ile yürütülmüştür. Nanopartiküllerin yüzey

modifikasyonunu sağlamak için ise biotin kullanılmıştır. Çalışmada; *in vitro* ortamda daha yüksek sitotoksisite etkisi gözlenmiş, *in vivo* ortamda fareler ile yapılan çalışmalarda ise nanopartiküllerin; tümör büyümesini, paklitakselin tek başına kullanımından çok daha etkin olarak baskıladığı bulunmuştur (Patil ve diğerleri, 2009). Bir başka çalışmada ise iyonidamin ve paklitaksel yüklü polimerik nanopartiküller EGFR hücrelerine hedeflenmiş ve meme ve ovaryum kanser hücrelerinde ilaçların artmış terapötik etkilerine paralel olarak hedefe yönelik daha etkin antitümör aktivite elde edilmiştir (Milane ve diğerleri, 2011). Vinkristine dirençli hücreler üzerinde yapılan bir çalışmada ise, sitotoksik etkili vinkristin ve kemosensitizer etkili verapamil yüklenmiş PLGA nanopartikülleri ile hücrelerde geri dönüşlü aktivite elde edildiği gösterilmiştir (Song ve diğerleri, 2009). Karaciğer kanser tedavisi amacıyla yürütülen bir çalışmada ise N-trimetil kitozan nanopartikülleri hazırlanmış ve bunlara laktozil-norkantaridin yüklenmiştir. Çalışmada kitozan ve kitozandan daha baskın olarak trimetil kitozanın hücreler arası sıkı bağlantıları (tight junctions'ı) açarak hücresel alımı artırdığı vurgulanmıştır. Hazırlanan N-trimetik kitozan nanopartiküllerinin çok küçük boyutları (120nm) sayesinde tümör hücrelerinde biriktiği ve kanser hücrelerinde daha anlamlı antitümör etki gözlendiği, ayrıca normal hücrelerde meydana gelebilecek yan etkileri de azalttığı belirtilmiştir (Guan ve diğerleri, 2012).

2.5.5. Nanopartiküllerin karakterizasyonları için kullanılan teknikler

Nanopartiküller partikül büyüklükleri, zeta potansiyelleri, morfolojileri, yükleme etkinlikleri ve salım davranışları bakımından değerlendirilmektedir. Partikül büyüklükleri foton korelasyon spektroskopisi veya lazer ışık saçılımı yöntemleri ile tayin edilmektedir. Morfolojileri geçirimli elektron mikroskopisi, taramalı elektron mikroskopisi veya atomik kuvvet mikroskopisi ile görüntülenmektedir. Yüzey modifikasyonlarının incelenmesi veya bağlı grupların tesbiti için FT-IR cihazı kullanılmaktadır. Karakteristiklerinin incelenmesi sırasında nanopartikül yapılarında polimer gruplarının varlığı diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC, differential scanning calorimetry) cihazı ile belirlenmektedir. Yükleme kapasiteleri ise; etkin maddenin UV spektroskopisinde veya HPLC'de tayin edilmesi ile ya da bikinkokininik asit gibi yapıların kullanıldığı kolorimetrik yöntemlerin kullanımı ile yapılmakta olup yüzde (%) değerleri ile ifade edilmektedir. Protein yapılı bileşiklerin kullanılması durumunda *in vitro* salım davranışları, *in vitro* hemoliz tayini ile yapılabilmektedir (Sonvico ve diğerleri, 2006; Zhu ve diğerleri, 2007; Rampino ve diğerleri, 2013; Guilherme ve diğerleri, 2014).

2.5.6. Nanopartiküllerin toksisitesi

Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması sırasında suda çözünmeyen polimerlerin çözünmesini sağlamak amacıyla organik solvanlar kullanılmaktadır. Bu solvanlar uçucu özellikte olup çevre ve insan sağlığı açısından tehlike oluşturmaktadırlar. Hazırlanan nanopartiküllerde solvan kalıntı miktarlarının izin verilen toksik limitlerin altında olması gerekliliği hazırlama işlemlerini zorlaştırmaktadır. Solvanlara ait spesifikasyonların analitik kontrolleri ise maliyetli olmaktadır (Ali ve Lamprechta, 2013).

2.5.7. Nanopartiküllerin stabiliteleri

Nanopartiküller gibi kolloidal sistemlerin fiziksel stabiliteleri yüzey kimyası ile doğrudan ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle fiziksel stabiliteleri agregasyon ve koagülasyon davranışları ile belirlenebilmektedir. Partiküller elektrostatik itme ve van der Waals çekme kuvvetleri etkisi altındadırlar ve zeta potansiyel olarak tanımlanarak ölçülen bu kuvvetler arasındaki denge durumuna göre hareket etmektedirler. Elektrostatik itme kuvvetlerinin baskın olduğu durumda yüksek negatif veya yüksek pozitif zeta potansiyeli göstermekte olan nanopartikül sistemi stabil olarak nitelendirilmektedir (Kulhari ve diğerleri, 2014). Nanopartikül sisteminde partiküller arasında oluşan yüksek van der Waals etkileşimleri ise geri dönüşsüz agregasyona sebebiyet vermektedir. Nanopartiküllerde yüzey modifikasyonu ile stabilizasyonun sağlanmadığı durumlarda veya yüzey yükü taşımayan nanopartiküllerde, nanopartiküllerin sulu ortamla temasları sonrasında hidrofobik nanopartiküllerin agregasyonu söz konusu olabilmektedir. Çok yüksek yüzey yüklerine sahip nanopartiküller ise, yüksek tuz konsantrasyonlarında veya kan proteinlerinin varlığında floküle olabilmektedirler. Bunun yanı sıra, Ostwald ripening etkisi adı verilen, partikül büyüklüğünün dağılımına bağlı olarak meydana gelen, küçük boyutlu partiküllerin büyük boyutlu partiküller üzerine presipitasyonu olayı gözlenebilmektedir (D'Addio ve Prud'homme, 2011). Nanopartikül üretimi sırasında sulu faz içerisinde ilacın çözünürlüğünün sağlanması veya artırılması amacı ile organik solvanlar kullanılmaktadır. Nanopartikül yapısındaki organik solvan varlığı ise Ostwald ripening etkisini hızlandırmaktadır (Kumar ve Prud'homme, 2009).

2.6. Antikanser İlaçların *İn Vivo* Etkinliğinin İncelenmesi

Temelde canlılar üzerinde yapılan bilimsel deneyleri en aza indirme çabaları, hücre kültürlerinin gerekliliğini ortaya koymuştur. HeLa adı verilen servikal kanser kökenli hücre kültürü bu amaçla geliştirilip kullanılan ilk hücre serisidir. Ayrıca, kanser hücrelerinin ölümsüz olmaları ve üretilmelerindeki kolaylık hücre kültürü gerektiren çalışmaları hızlandırmıştır (Akçalı, 2010). Ancak hücre kültürleri, insanlar üzerinde gerçekleştirilen klinik deneylerin yüksek doğrulukta tahmin edilmesi açısından tek başlarına yeterli olamamaktadırlar. Bu nedenle hücre kültürü çalışmaları yanı sıra hayvan çalışmalarına da yer verilmelidir. Özellikle yeni ilaçların etkinliklerinin, etki mekanizmalarının ve farmakodinamiklerinin belirlenmesi açısından multidisipliner bir çalışma sürdürülmesi gerekmektedir (HogenEsch ve Nikitin, 2012).

2.6.1. Hücre kültürleri

Son yıllarda daha da çoğalan ve yaygınlaşan hücre kültürü çalışmaları temelde 1885 yılına dayanmaktadır. Hücre kültürleri; özellikle biyokimya ve moleküler biyoloji alanlarında olmak üzere pek çok alanda normal hücrelerinin yapısının aydınlatılması, kanser hücrelerinin fizyolojileri ve normal hücrelerden farklılıkları gibi çalışmalar için temel oluşturmaktadır. Ayrıca, hücreler üzerinde ilaçların ve toksik maddelerin etkilerinin incelenmesi, mutajenezis ve karsinojenezisin incelenmesi, ilaçların izlenmesi ve geliştirilmesi veya aşı, terapötik protein gibi biyolojik maddelerin üretimleri gibi pek çok amaçla kullanılmaktadır.

Hücre kültürü; hücrelerin hayvan veya bitkiden alınması ve ardından yapay bir ortamda üretilmelerinin sürdürülmesi anlamına gelmektedir. İn vivo materyalden alınan ilk kültüre ilk vasat (birincil kültür), bu kültürden çoğaltılan diğer kültürlere de hücre serisi adı verilmektedir. İlk vasattan diğer kültürleri çoğaltma işlemine ise pasaj veya pasajlama adı verilmektedir. Bu işlem kültür ortamının atılması ve hücrelere yeni bir ortam sağlanması şeklinde yapılmaktadır. Hücre serisinin kısıtlı bir yaşam süresi vardır. Hücreler pasajlandıkça yüksek büyüme kapasitesine sahip hücreler oluşmaya devam edecektir ki bu da hücre popülasyonunda genotip ve fenotip olarak tekdüzeliği, homojenliği sağlamaktadır (Langdon, 2004).

Normal hücreler çoğalma yeteneklerini kaybetmeden önce sınırlı sayıda bölünebilmektedir. Bu hücreler "sonlu" veya "ölümlü" olarak tanımlanmaktadır. Ancak bazı hücre serileri dönüşüm (transformasyon) adı verilen bir işlem ile "sonsuz" veya "ölümsüz" olabilmektedir. Transformasyon işlemi kendiliğinden olabileceği gibi kimyasal veya viral olarak baskılanma sonucu da olabilmektedir (Nema ve Khare, 2012).

Hücre üretim koşulları; her hücre tipi için farklılık göstermektedir fakat hücrelerin sürekli olarak üretimi yapılacak yapay üretim koşulları için temel besinleri içeren bir büyüme ortamı ve bu içerisinde ortamın bulunduğu bir hücre üretim kabı gerekmektedir. Büyüme ortamı temel besinleri (amino asitler, karbonhidratlar, vitaminler, mineraller), büyüme faktörlerini, hormonları, O_2 ve CO_2 gazlarını içermekte ve fizikokimyasal çevreyi (pH, osmotik basınç, sıcaklık) düzenlemektedir. Hücre kültürlerinin en önemli avantajlarından biri de hücrelerin çoğaltılacağı fizikokimyasal (sıcaklık, pH, osmotik basınç, O_2 ve CO_2 dengesi) ve fizyolojik çevrenin (hormon ve besin konsantrasyonları gibi) ihtiyaca göre düzenlenebilmesidir. Kullanılacak bu ortamlar serum içeriği açısından bazal ortam, azaltılmış serum içeren ortam ve serum içermeyen ortam olmak üzere serum içeriği açısından farklılık göstermektedir. Memeli hücreleri genellikle pH:7.4'te iyi bir büyüme göstermektedirler ancak bazı hücre türleri biraz daha asidik (pH:7.0-7.4) bazı fibroblast hücreleri ise biraz daha bazik (pH:7.4-7.7) pH'larda üremektedirler. Kültür ortamında bulunan çözünmüş karbondioksit (CO_2) ve bikarbonat (HCO_3^-) iyonları arasında hassas bir denge vardır ve bu denge pH'yı doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle atmosferik CO_2 oranı %5-7 aralığında sabit tutulmalıdır. Bazı çalışmalarda ise bu oran %4-10 şeklinde genişleyebilmektedir. İnsan veya memeli hücre serilerinde optimum büyümenin elde edilebilmesi için sıcaklığın da 36-37ºC'de sabit tutulması gerekmektedir.

Bazı hücreler yüzeye tutunma özelliği göstermektedirler ve bu hücrelerin kültüre edilmesi işleminde yüzeye bağlanmaları için katı veya yarı-katı bir katman gerektirmektedirler (adhere veya tek tabakalı kültür). Bazıları ise kültür ortamında yüzerek büyüme göstermektedirler (süspande kültür) (Şekil 2.8). Dolayısı ile hücrelerin üretilebilmesi için adhere veya süspande olmak üzere iki yöntem bulunmaktadır. Adhere halde üretilebilen hücreler için, hücre ortamının hücre adhezyonuna ve yayılımına izin vermesi gerekmektedir. Süspande halde üretimde ise, hücre ortamının sürekli olarak karıştırılması

gerekmektedir. Karıştırma işlemi hücre kabına magnetik karıştırıcı ilavesi ile ortamın karıştırılması veya hücre kabının döndürülerek karıştırılması olarak gerçekleştirilmektedir.

Şekil 2.8. Farklı hücre kültürlerinin özellikleri

Daha önce belirtildiği gibi alt kültür oluşturma yani pasajlama; kültür ortamının alınması ve hücrelerin yeni bir büyüme ortamına alınması işlemidir. Adhere kültürlerde ölü hücreler yapışma özelliğini kaybetmekte ve kültür ortamında dağılmış halde bulunmaktadır. Canlı hücreler ise yapışma özelliklerini korumaları nedeniyle yüzeyel halde bulunmaya devam etmektedirler (Hanson ve diğerleri, 1996). Bu işlem hücrelerin çoğalmalarına olanak tanıması açısından önem kazanmaktadır. Kültür ortamı içerisinde hücrelerin büyümesi; durgunluk dönemi (lag phase), çoğalma dönemi (log phase) ve çoğalmanın durması dönemlerini kapsamaktadır. Adhere kültürlerde kısıtlı yüzey, süspande kültürlerde ise yüksek konsantrasyon sebebi ile hücre çoğalması azalmakta veya tamamen son bulmaktadır. Bu aşamaya durgun faz (stationary phase) adı verilmektedir. Hücrelerin sürekli çoğalmalarını sağlamak için, hücreler ayrılmalı ve kültür ortamı değiştirilmelidir. Hücreler bir araya gelmeden, çoğalma aşamasında pasajlama işlemi gerçekleştirilmelidir.

Pasajlama işlemi adhere kültürler için hücrenin yüzeyden ayrılmasını gerektirmektedir.

Hücreleri yüzeyden ayırabilmek için çeşitli işlemler uygulanmaktadır. Bu işlemler, Çizelge 2.4'te özetlenmiştir.

Çizelge 2.4. Hücrelerin yüzeyden ayrılma yöntemleri

İşlem	Ayırıcı Etmen	Uygulanan Hücre Cinsi
Çalkalama	Hücre kabının çalkalanması ve şiddetli pipetleme	Gevşek bağlı hücreler, mitotik hücreler
Kazıma	Hücre sıyırıcısı	Proteaza hassas hücreler
Enzimatik Ayırım	Tripsin	Kuvvetli yapışma gösteren hücreler
	Tripsin + Kollojenaz	Yüksek yoğunluklu hücreler, özellikle fibroblastlar
	Dispaz	Bağlanma yeri olmayan epidermal hücreler
	TrypLE™	Kuvvetli yapışma gösteren hücreler

Hücre kültürleri yapı ve görünüşleri yani morfolojileri açısından temelde üçe ayrılmaktadır.

- Fibroblastik yapılı hücreler; bipolar veya multipolardırlar ve uzatılmış halde bulunmaktadırlar. Büyümeleri için yüzeye tutunmaları gerekmektedir.

- Epitelyal yapıdaki hücreler; daha düzenli bir şekle sahip olup poligonal haldedirler ve büyümeleri ayrı bölgelerde yüzeye tutunma şeklinde gerçekleşmektedir.

- Lenfoblastik yapılı hücreler ise tamamen yuvarlak şekilde olup büyümeleri sırasında yüzeye tutunmaz ve süspansiyon halinde büyüme göstermektedirler.

Hücre kültürleri kullanılmayacakları zaman DMSO veya gliserol gibi koruyucu bir madde ile muamele edildikten sonra tekrar kullanılacağı zamana kadar -130°C sıcaklıkta saklanmalıdır (İnvitrogen cell culture).

2.6.2. Hücre canlılığının ve sitotoksisitenin incelenmesi

Pasajlama işlemi sonrasında hücre kültüründe istenilen oranda hücre bulunduğunun ve kültürün uygun şartlar altında olduğunun doğrulanması amacı ile hücre canlılıklarının tesbiti gerekmektedir. Hücre canlılıkları yani yaşayabilirlikleri hücre sayımı işlemi ile değerlendirilebilmektedir. Hücre sayımı hemasitometre ile mikroskop altında yapılmaktadır. 10 µL hücre alınarak grid üzerindeki hücrelerin sayımı yapılır ve 1 mL kültür ortamında; sayılan hücrelerin 10^4 katı kadar hücre bulunduğunu ifade eder. Hücre sayımı kadar hücre canlılıklarının da tayin edilmesi gerekmektedir. Bunun için tripan mavisi kullanılmaktadır. Mikroskop altında mavi görünen hücreler, hücre zarındaki seçici-geçirgen yapının kaybolması sebebi ile tripan mavisini içlerine almışlardır. Bu, ölü hücrelerin varlığını göstermektedir. Hücrelerin iyi bir çoğalma döneminde olduğu, en az %95 canlılık oranı ile doğrulanmaktadır. Hücre canlılığı yüzde olarak aşağıdaki formül ile hesaplanabilmektedir.

% Canlı Hücre = (1 - (mavi hücre sayısı / toplam hücre sayısı)) x 100

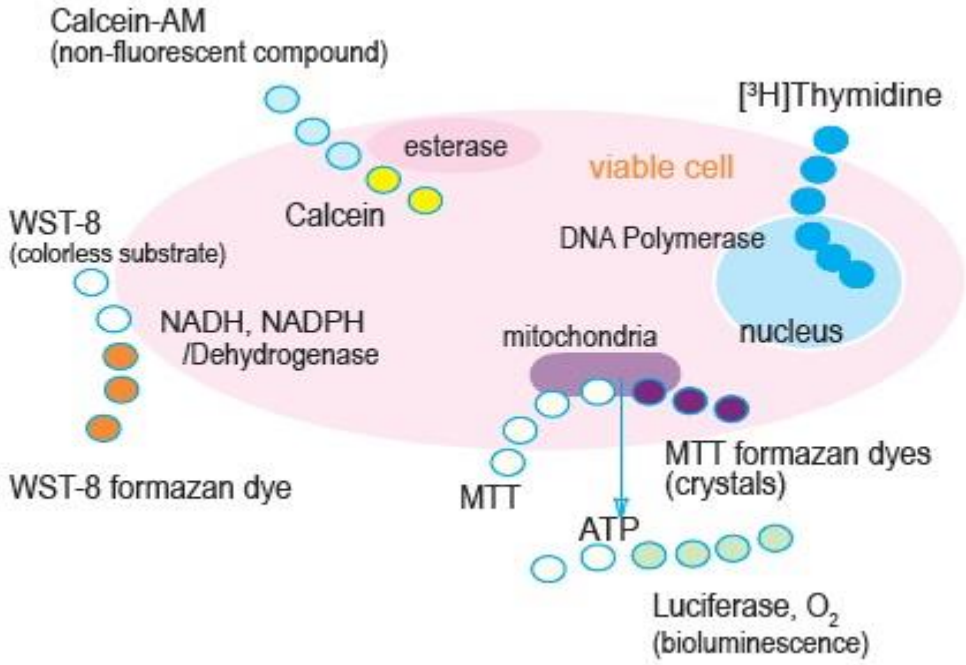
1mL kültür ortamındaki hücre sayısı ise;

Canlı hücre sayısı x 10^4 x dilüsyon faktörü = Hücre sayısı / mL kültür

formülü ile hesaplanmaktadır (İnvitrogen cell culture ve Zhang S, 2013).

Sitotoksisite toksik etkinin bir göstergesidir. Sitotoksisite ölçümleri kalitatif veya kantitatif olarak yapılabilmektedir. Uluslararası Standardizasyon Birliği (International Organization for Standardization (ISO)) tarafından belirtilmiş üç tip kalitatif sitotoksisite testi bulunmaktadır; ekstraksiyon yöntemi, direkt temas yöntemi, dolaylı temas yöntemi (Li ve diğerleri, 2015). Kantitatif yöntemler ise hücre fonksiyonu belirteçlerinden yararlanılarak canlı hücrelerin sayımına dayanmaktadır. Hücre fonksiyonu olarak enzim aktivitesi, hücre membran permeabilitesi, hücreye tutunma, ATP üretimi, ko-enzim üretimi veya nükleotit geri alım aktivitesi sayılabilmektedir. Temelde hücrelerin metabolik aktivitelerine dayanan bu yöntemler için; tripan mavisi, MTT, XTT, WST, resazurin, timidin veya kalsein-AM gibi maddeler kullanılmaktadır. Sitotoksisite tayini için kullanılan Tripan mavisi yöntemi yukarıda belirtilen hücre canlılığı ölçümü ile aynı prensibe dayanmaktadır. Canlı hücreler

seçici-geçirgen membranları sayesinde tripan mavisine karşı direnç gösterirken ölü hücreler hücre membranının olmaması sebebiyle mavi renge boyanmaktadır. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi ise mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesine dayanmakta olup canlı hücreler bu tetrazolyum maddesini mor renkli formazana çevirmektedirler. Formazan miktarı ise 570 nm dalgaboyunda spektrofotometrik olarak tayin edilebilmektedir. XTT ((2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid)) ve WST de tetrazol türevi maddelerdir. MTT ile aynı prensibe dayanmakta olup canlı hücreler tarafından formazan türevi bir maddeye indirgenmekte olup turuncu veya sarı renk göstermektedirler. Resazurin ise canlı hücreler tarafından resorufin maddesine dönüşmekte olup mavi renk almaktadır. Timidin ise canlı hücrelerde hücre çekirdeğinde gerçekleşen DNA polimerizasyonu üzerinden işlev göstermektedir. Radyoizotop kullanımını gerektiren bu yöntemde trityum işaretli timidin kullanılmaktadır. Kalsein-AM canlı hücrelerde esteraz enzimi ile hidroliz edilmekte ve sonuç ürün olarak güçlü floresans özellikli kalsein oluşmaktadır. Floresans spektroskopisi ile canlı hücre miktarı tayin edilebilmektedir (Francoeur ve Assalian, 1996; Riss ve diğerleri, 2004; Plumb ve diğerleri, 2004 ve Riss ve diğerleri, 2011). Şekil 2.9'da reaksiyon ajanları ve reaksiyon mekanizmaları şematize edilmiştir.



Şekil 2.9. Sitotoksisite tayininde uygulanan kantitatif yöntemler

2.6.3. İntestinal gerçirgenlik ve yapılan çalışmalar

İn vivo ilaç etkinliğinin saptanması ilacın yalnızca fizikokimyasal özellikleri ile ilişkilendirilmemelidir. İlacın çözünürlüğü dışında metabolik enzim etkinlikleri, membranların ilaca geçirgenliği ve taşıyıcı (transporter) etkisi de biyoyararlanımı etkilemektedir. Bu amaçla, ilaç taşınımı ve absorbsiyon mekanizmalarının aydınlatılması için *in vivo* metotlar, *ex vivo* barsak tekniği (*ex vivo* gut sac technique) veya *in vitro* metotlar kullanılmakta ve intestinal permeabilite tahmin edilebilmektedir. İn vivo metotlardan biri olarak farmakokinetik parametrelerden biri olan ve plazma ilaç miktarı-zaman grafiğinde eğri altında kalan alan olarak tanımlanan EAA değeri ile oral biyoyararlanım sayılabilmektedir. Ayrıca gama sintigrafi, magnetik rezonans görüntüleme gibi *in vivo* görüntüleme teknikleri ve in situ organ perfüzyon teknikleri de *in vivo* metotlar arasında yer almaktadır. *Ex vivo* barsak kese tekniği (*ex vivo* gut sac technique) absorbsiyon kinetiklerinin değerlendirilmesinde ve biyoaktif yardımcı maddelerin efflux taşıyıcılar (transporter) üzerine etkilerinin incelenmesinde kullanılmaktadır. İn vitro metotlara örnek olarak ise; diyaliz torba, hücre kültürleri veya matematiksel modeller sayılabilmektedir. İn vitro metotlardan tek tabakalı hücre kültürleri intestinal ilaç permeabilitesini tesbit etmede oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu teknikte, *in vivo* hayvan modellerinde görülen türler arası farklılıklar bertaraf edilmiştir. Ayrıca, 2 saat canlılık gösteren *ex vivo* tekniklere oranla çok daha fazla (24 saatten fazla) hücre canlılığı söz konusudur. Canlı ortamı taklit ettiği için ise; *in vitro* diyaliz torba metoduna göre daha güvenilir sonuçlar göstermektedir. Hücre kültürü temelli *in vitro* ilaç geçirgenliği için kullanılan hücre modelleri Çizelge 2.5'de verilmektedir (Elsheikh ve diğerleri, 2014; Balimane ve Chong, 2005).

Çizelge 2.5. Farklı hücre hatları ve özellikleri

Hücre Hattı	Tür veya köken	Özellik
Caco-2	İnsan kolon adenokarsinoma	İyi tanımlanmış bir hücre modeli İnsan dokusuyla birebir karşılaştırma yapılabilmesine olanak tanıyan sıkı tek tabakalı hücre yapısında Çeşitli ilaç taşıyıcılarına (influx/efflux transporters) sahip
HT-29	İnsan kolonu	Mukus üreten hücre hattına sahip Mukus-ilaç etkileşim çalışmalarına olanak tanır
MDCK	Madin-Darby köpek böbrek epital hücreleri	Barsak türevi değil (böbrek türevi) İnsan barsağındakinden farklı ilaç taşıyıcılarına ve metabolik aktivitelere sahip Üretim zamanı kısa ve laboratuar iş yükü az
TC7	İnsan Caco-2 Alt-klonu	Düşük P-gp seviyeli ve yüksek CYP3A enzim aktiviteli Yüksek homojeniteye sahip
2/4/A1	Rat fetal barsak epitel hücreleri	Sızıntı gösteren epitel yapıda İnce barsak benzeri yapılı
IEC-18	Rat ince barsak hücre hattı	Paraselüler yolla taşınan maddeler için partikül büyüklüğü seçiciliği gösterir

Bu hücre tipleri arasında Caco-2 hücre hattı, ilaç geçirgenlik çalışmalarında en çok kullanılan ve en iyi şekilde karakterize edilmiş hücre modelidir. Sıkı bağlantılı hücre yapısındadır. İlacın tek tabakalı Caco-2 hücrelerinde gösterdiği permeasyon özellikleri insan barsak mukoza permeasyon özellikleriyle doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle, insanlarda ilaçların oral absorpsiyonunun belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.6.4. Antikanser etkinin incelenmesinde kullanılan hücre tipleri

Tümör kökenli hücre hatları kanser araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. İn vitro tümör modelleri olarak kullanılan bu hücreler kanser biyolojisinin anlaşılmasına, ilaca karşı gösterilecek olan klinik cevabın tahmin edilmesine ve antikanser ilaçların etkinliğinin değerlendirilmesine olanak tanımaktadır (Domcke ve diğerleri, 2013; Niu ve Wang, 2015; Goodspeed ve diğerleri, 2016).

Kanser çalışmaları; ilkel tümörlerin, parafin gömülü örneklerin, kanser hücre hatlarının, ksenograftların, tümör ilkel hücre kültürlerinin ve genetiği değiştirilmiş farelerin kullanılmasıyla sürdürülmektedir. Bu çalışmalardan kanser hücre hatları yaygın olarak

kullanılmaktadır. Kanser hücre hatları yüksek homojenite, hücre üretimi yapılan tümör ile yüksek benzerlik, kolay erişebilirlik, hücre üzerinde manipülasyon ve çalışma kolaylığı sağlamaları yanısıra tekrarlanabilir sonuçlar da vermektedirler. Devamlı hücre hatları ile de sınırsız hücre çoğaltımı sağlanabilmektedir. Ancak; mikoplazma ile enfeksiyon riski taşımakta ve heterojenite kaybı gösterebilmektedirler, ayrıca hücre koşulları da hücre morfolojileri üzerinde etkilidir (Ferreira ve diğerleri, 2013).

Farklı kanser türleri üzerinde hücre çalışmaları yürütülmektedir. Kanser hücre hatları insanlardan izole edilebildiği gibi farelerden, sıçanlardan veya hamsterlardan da izole edilebilmektedir. İzole edilen hücre hatları morfolojik açıdan da çeşitlilik gösterebilmektedir. Çizelge 2.6'da çeşitli çalışmalarda kullanılmış hücre hatlarından bazılarına yer verilmiştir. Çizelgede hücre hatları; kullanılan kanser türü, izole edildiği doku, izole edildiği tür, morfolojik özelliği ve kullanıldığı literatür örneği ile birlikte verilmiştir.

Çizelge 2.6. Kanser çalışmalarında kullanılan hücrelere örnekler

Kanser Hücresi Hattı	Kanser Türü	Doku	Tür	Morfoloji	Kaynak
HT 1376	Mesane Kanseri	Mesane	İnsan	Epitelyal	Warrick vd., 2016
T24					
NBT-II	Mesane Kanseri	Mesane	Rat	Epitelyal	Suzuki vd., 2003
PANC-1	Pankreas Kanseri	Pankreas	İnsan	Epitelyal	Nguyen vd., 2002
CRI-D2	Pankreas Kanseri	Pankreas	Rat	Epitelyal	Namvaran vd., 2015
MCF-7	Meme Kanseri	Meme	İnsan	Epitelyal benzeri	Mutlu Ağardan vd., 2016
MDA-MB 231	Meme Kanseri	Meme	İnsan	Epitelyal	Mutlu Ağardan vd., 2014
WB2054M	Kolorektal Kanser	Kolon	Rat	Epitelyal	
CACO-2	Kolorektal Kanser	Kolon	İnsan	Epitelyal	
COLO 206F	Kolorektal Kanser	Kolon	İnsan	Dairesel, yuvarlak	Baek vd., 2004
DLD-1	Kolorektal Kanser	Kolon	İnsan	Epitelyal	
LOVO	Kolorektal Kanser	Kolon	İnsan	Epitelyal	
HT-29	Kolorektal Kanser	Kolon	İnsan	Epitelyal	Robertson vd.,
DHDK12	Kolorektal Kanser	Kolon	Rat	Epitelyal	2008
V79-4	Akciğer Kanseri	Akciğer	Hamster	Fibroblast benzeri	Chamberlain ve Brown, 1977
NCI-H358	Akciğer Kanseri	Akciğer (boyun metastazı)	İnsan	Bronş Alveol	Kawabata vd., 2003
NCI-H69	Akciğer Kanseri	Akciğer	İnsan	Akciğer	
WEHI 164	Deri Kanseri	Deri	Fare	Fibroblast	Rahnama vd., 2015
A375	Melanoma	Deri	İnsan	Epitelyal	Shirzad vd., 2011
B16	Melanoma	Deri	Fare	Epitelyal Fibroblast	Kloskowski vd., 2011
SK-OV 3	Ovaryum Kanseri	Ovaryum	İnsan	Epitelyal	Rasola vd., 2004
CTAT	Tiroid Kanseri	Tiroid	Köpek	Epitelyal benzeri	Hafeman vd., 2010

Çizelgede arka planda kullanılan renkler kanser türlerine göre farklılık göstermekte olup kansere karşı mücadeleyi temsil eden kurdele renkleri temel alınarak temsil ettikleri kanser türlerine göre seçilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Etkin maddeler

İmatinib mesilat	Biotang, ABD
Erlotinib HCl	Biotang, ABD
Deksketoprofen trometamol	Sigma-Aldrich, Almanya

3.1.2. Kullanılan kimyasal malzemeler

Folik Asit	Sigma-Aldrich, Almanya
Polietilen Glikol 2000	Sigma-Aldrich, Almanya
DSPE-PEG2000-FA	Sigma-Aldrich, Almanya
Metanol	Sigma-Aldrich, Almanya
Asetonitril	Sigma-Aldrich, Almanya
Amonyum Asetat	Merck, Almanya
Amonyum Hidroksit	Sigma-Aldrich, Almanya
UPLC Suyu	Sigma-Aldrich, İsviçre
Etanol	Sigma-Aldrich, Almanya
Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4)	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Sigma-Aldrich, Çek Cumhuriyeti
Dubelco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM)	Lonza, Belçika

MTT	Sigma-Aldrich, Almanya
Kitozan	Sigma-Aldrich, İzlanda
Tripolifosfat	Sigma-Aldrich, ABD
Asetik Asit	Fisher Scientific, ABD
Çinko Klorür ($ZnCl_2$)	Sigma-Aldrich, ABD
Nitrik Asit (HNO_3)	Merck Millipore, Almanya
Disodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_4)	Sigma-Aldrich, ABD
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich, ABD
Diyaliz Membran (M.A<12000 Da)	Sigma-Aldrich, ABD

3.1.3. Kullanılan alet ve cihazlar

Nanospray Dryer	Büchi, Almanya
Ultraturrax M,	Heidolph silent crusher Avustralya
Ultra Performance Liquid Chromatography-UPLC	Acquity Waters, ABD
CORTEKS C18 UPLC Kolonları	Acquity Waters, İrlanda
BEH C18 UPLC Kolonları	Acquity Waters, İrlanda
Xterra Kolon	Acquity Waters, ABD
Nylon Acrodisk Filtre 13mm 0,2µm	Acquity Waters, ABD
Otomatik Pipet Seti Plus,	Eppendorf Research Almanya
Pipet Uçları Seti Plus,	Eppendorf Research Almanya
Atomik güç mikroskobu (AFM) Cihazlar,	Nanomanyetik Türkiye
DSC	Shimadzu, Japonya
FT-IR	PerkinElmer, ABD

TEM	FEI, ABD
Hücre Üretim Kabı (Flask)	Granier Gmbh, Almanya
96 Kuyulu Plaka	Granier Gmbh, Almanya
Steril Pipetler	Granier Gmbh, Almanya
UPLC Vialleri ve 96 Kuyucuklu Miktar Tayini Plakası	Acquity Waters, ADB
Doku Kültürü Mikroskobu	Olympus IX71, Japonya
Bidistile su ünitesi	Branstead, ABD
Süzme Kiti	Merck Millipore, Almanya
Etüv (CO2'li)	Heraeus, Almanya
Etüv (CO2'siz)	Heraeus, Almanya
Laminar akış	Telstar Bio-II-A, İspanya
40◦C stabilite kabini	Nüve test cabinet TK 252, Türkiye
25◦C'lik stabilite kabini	Sanyo Versatile Environmental Test Chamber, Çin
pH Metre	Isolab Laborgeräte GmbH, Almanya
Franz Difüzyon Hücreleri	Çalışkan cam, Türkiye
Dikey Difüzyon Hücre Sistemi	HRV-DIF, Harvard, ABD
TEER Cihazı	Evom™Epithelial Voltohmmeter, ABD
Hassas Terazi	Phoenix Instrument, Almanya
Miligram Terazi	KERN pls, Almanya

Manyetik karıştırıcı	Snijders, Hollanda
Ultrasonik banyo	Isolab Laborgeräte GmbH, Almanya
Ultrasantrifüj	Isolab Laborgeräte GmbH, Almanya
UV Spektrofotometresi	Shimadzu UV 1700, Japonya
Vorteks	Firlabo, Fransa
Rotaevaporatör	Heidoplh, Almanya
Su banyosu	Nüve bath, Türkiye
Dağılma Testi Cihazı	Pharmatest, Almanya
IR Nem Tayin Cihazı	Sartorius, Almanya
Partikül Büyüklüğü ve Zeta potansiyel Ölçüm Cihazı	Malvern Zetasizer nanoseries, İngiltere
Partikül Büyüklüğü Ölçüm Cihazı	Sympatec Helos, Almanya
Yüzey Gerilimi Ölçüm Cihazı	Attension-Biolinscientific, Finlandiya
Nylon Membran Filtre 47mm 0,45µm	Pall Corporation, ABD
Tirozinkinaz Aktivite Kiti	Merck Millipore, ABD
COX Aktivite Ölçüm Kiti	Cayman Chemical, ABD
Folat Reseptör Kiti	Cloud-Clone Corp., ABD

3.2. Yöntem

Tez kapsamında yapılan çalışmalar; önformülasyon çalışmaları, formülasyon çalışmaları, hücre çalışmaları, deney hayvanı çalışmaları ve formülasyonlara ait stabilite çalışmaları olmak üzere 4 ana başlıkta incelenmiştir.

3.2.1. Önformülasyon çalışmaları

Önformülasyon çalışmaları kapsamında formülasyonlarda kullanılacak olan etkin ve yardımcı maddelerin karakterizasyonları; partikül büyüklükleri, erime noktası, yardımcı madde geçimlilikleri, yapı analizleri, dalga boyu taramaları, etkin madde çözelti hal stabilite çalışmaları ve miktar tayini yöntemlerinin geliştirilmesi ve valide edilmesi ile yapılmıştır.

Etkin madde ve yardımcı maddelere ait partikül büyüklüğü ölçümleri

İmatinib mesilat ve erlotinib HCl etkin maddelerine ait partikül büyüklüğü ölçümleri Sympatec Helos cihazı ile, deksketoprofen trometamol, folik asit ve polietilenglikol maddelerinin partikül büyüklüğü ölçümleri ise Malvern Zeta Sizer-Nano ZS aleti ile ölçülmüştür. Etkin maddelerin daha nüyük partikül büyüklüklerine sahip olmaları nedeniyle; etkin maddeler, partikül büyüklüğü ölçüm aralığı 0,1 - 875 µm olan Sympatec Helos cihazı ile ölçülmüştür. Öte yandan daha küçük partikül büyüklüklerine sahip maddeler 0,6nm - 8,9µm ölçüm aralığına sahip Malvern Zeta Sizer-Nano ZS aleti ile ölçülmüşlerdir. Etkin ve yardımcı maddelere ait polidispersite indeksleri Malvern zeta sizer cihazı ile ayrıca ölçülmüştür. Malvern zeta sizer cihazı, lazer ışık kırınımı yöntemi ile çalışmakta olup çalışma prensibi; partikül yüzeyine çarpan lazer ışığının optik özelliklerine (saçılma, absorpsiyon gibi) dayanmaktadır. Kırılma (difraksiyon), gelen lazer ışınının saçılma ve absorpsiyonundan sonra kalan kısmında gerçekleşmektedir. Maddelerin zeta potansiyel ölçümleri yine Malvern Zeta Sizer-Nano ZS aleti kullanılarak yapılmıştır.

Etkin madde ve yardımcı maddelerin erime noktası tayinleri, yardımcı madde geçimlilikleri ve yapı analizleri

Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) tekniği malzemelerin analizi için kullanılan termoanalitik bir yöntem olup temel prensibi; numune ve referansın üzerindeki ısı akışı farkına

dayanmaktadır. DSC ölçümü sonunda ısı akışına karşı sıcaklık grafikleri elde edilmektedir. Saf maddenin erime noktasının tayininde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. İmatinib mesilat, erlotinib HCl, deksketoprofen trometamol, polietilenglikol, folik asit ve dspe-peg2000-fa maddelerinin ayrı ayrı erime dereceleri Schimadzu DSC 60 cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Maddelerin karışım hallerinin erime dereceleri de bu cihaz ile ölçülmüş, elde edilen termogramlar, maddelerin saf halleri ile karşılaştırılarak maddeler arasında fiziksel veya kimyasal herhangi bir etkileşim olup olmadığı tesbit edilmiştir. Maddeler arasında etkileşim olması durumunda maddenin saf halde iken gösterdiği erime derecesi değişmektedir. Bu sonuçlar maddelerin termal kararlılıkları hakkında bilgi vermektedir.

Maddelerin yapısal analizleri Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR) cihazı ile aydınlatılmıştır. FTIR'nin çalışma prensibi; numuneye gönderilen infrared radyasyonun bir kısmı örnek tarafından absorbe olurken bir kısmının iletilmesidir (transmisyon). Moleküldeki fonksiyonel grupların belirlenmesinde ve kovalan bağlanma bilgilerinin karakterize edilmesinde etkili bir analitik yöntemdir. Maddelerin yapısal analizlerinin incelenmesi açısından Brouker markalı FTIR cihazı kullanılmıştır.

Etkin maddelerin dalga boyu taramaları

Miktar tayini yöntemlerinin geliştirilmesi amacı ile ilk olarak UV (ultraviole) dalga boyunda taramalar gerçekleştirilmiştir. Bu taramalarda Shimadzu marka UV-PharmaSpec1700 UV-visible spectrophotometer cihazı kullanılmıştır. Hangi dalga boyunda ne kadar absorbans verdiği belirlenmiş ve çalışmalar maddenin maksimum absorbans verdiği dalga boyunda sürdürülmüştür. Etkin maddelerin dalga boyu taramaları deneysel aşamada kullanılmış olan tüm ortamlarda (distile su, pH 7,4 fosfat tamponu, pH 3 asetat tamponu) yapılmıştır. Ayrıca ultra-yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (UPLC) cihazında da etkin maddelere ait dalga boyu taramaları yapılmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. İn vitro geçiş çalışmalarında ortam olarak kullanılan Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) çözeltisi içerisinde yer alan kompleks yapılı maddeler nedeniyle UV'de dalga boyu taraması ile UPLC sonuçları farklılık göstermiş bu ortam için UPLC cihazındaki tarama esas alınmış, tayinler bu dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

Etkin maddelerin çözeltideki stabilitesi ile ilgili çalışmalar

Çalışmalar sırasında kullanılmış olan ortamlarda etkin maddelerin çözelti hal stabiliteleri değerlendirilmiştir. Bu nedenle; etkin maddeler distile su ve pH 7,4 fosfat tamponunda çözelti hal stabilitesi çalışmaları imatinib mesilat, erlotinib HCl ve deksketoprofen trometamol için +4ºC, 25ºC ve 37ºC sıcaklıklarda 3gün boyunca sürdürülmüştür. Ayrıca erlotinib HCl için pH 3 asetat tamponunda da +4ºC, 25ºC ve 37ºC sıcaklıklarda 3gün boyunca stabilite çalışmaları yapılmıştır.

Etkin maddelerin *in vitro* çalışmalarda kullanılmak üzere miktar tayini yöntemlerinin geliştirilmesi ve validasyonu

Etkin maddelere ait miktar tayinleri formülasyonlarda kullanılan distile su ortamında, *in vitro* salım çalışmalarında ortam olarak kullanılan pH 7,4 fosfat tamponunda, *in vitro* geçiş çalışmalarında kullanılan DMEM ortamında gerçekleştirileceğinden bu ortamlarda çalışmalar sürdürülmüştür. İlk olarak UV spektrofotometre cihazında miktar tayini çalışmaları denenmiş ancak imatinib mesilat (İMA) ve erlotinib HCl (ERLO) ile deksketoprofen trometamol (DEX)'ün absorbans piklerinin girişim yapması nedeniyle miktar tayini çalışmaları UPLC cihazı kullanılarak sürdürülmüştür. Ayrıca hayvan deneylerinden elde edilen plazma örneklerinden etkin madde analizlerinin yapılabilmesi için plazmada da miktar tayini yöntemi geliştirilmiş ve tüm bu yöntemler valide edilmiştir.

Validasyon, herhangi bir yöntem, işlem, ekipman, materyal, sistem veya faaliyetin beklenen sonuçları verdiğinin iyi üretim uygulamaları prensiplerine göre kanıtlanması işlemidir. Validasyon, kullanılan yöntemin sürekli olarak doğru ve güvenilir bir şekilde beklenen sonuçlar verdiğini; seçicilik, kesinlik, doğruluk ve geri elde, doğrusallık, tayin (saptama) sınırı, duyarlılık sınırı ve stabilite parametrelerini inceleyerek kanıtlamaktadır.

İmatinib mesilata ait miktar tayini geliştirme çalışmaları

Analiz çalışmaları; UV spektrum taraması yapılarak maksimum dalga boyu tayin edildikten sonra bu dalga boyunda 258 nm'de yapılmıştır. Ayrıca UPLC ile dalga boyu taraması yapılmış sonuçların paralel olduğu gözlenmiştir. Literatür bilgileri doğrultusunda; ilk olarak CORTEKS C18 kolonunda, imatinib mesilatın distile su içerisindeki 8 farklı konsantrasyonu için analiz çalışmaları yürütülmüştür (Guetens ve diğerleri, 2007; Kralj ve diğerleri, 2014).

Çizelge 3.1. İmatinib mesilat miktar tayini yöntemi geliştirme çalışmaları

Mobil Faz Sistemi		Akış Oranı	Alınan Sonuç
%70 içeren 0,02M KH_2PO_4 ve %30 ACN karışımı		0,150 mL/dk	Tekrar edilebilir sonuçlar alınamadı.
0,02M KH_2PO_4 (% 70)	ACN (%)30	0,150 mL/dk	
%0,1 Formik Asit Sulu Çöz.(% 50)	ACN (%50)	0,150 mL/dk	Formik asit piki ile numune pikinde girişim gözlenmesi
		0,250 mL/dk	
		0,350 mL/dk	Kolonda istenmeyen oranda basınç artışı
%0,1 Formik Asit Sulu Çöz.(% 60)	ACN (%40)	0,250 mL/dk	
%0,1 Formik Asit Sulu Çöz.(% 40)	ACN (%60)	0,250 mL/dk	Absorbans değerinde azalma
%0,1 Formik Asit Sulu Çöz.(% 30)	ACN (%70)	0,250 mL/dk	Kötü ayırım, absorbansta azalma
		0,275 mL/dk	Piklerde tamamen ayrılma gözlenemedi
		0,300 mL/dk	
%0,1 Formik Asit Sulu Çöz.(% 25)	ACN (%75)	0,250 mL/dk	Piklerin yeniden birleşmesi
%0,1 Formik Asit Sulu Çöz.(% 20)	ACN (%80)	0,250 mL/dk	
%0,1 Formik Asit Sulu Çöz.(% 28)	ACN (%72)	0,250 mL/dk	Pikte aşırı eteklenme
%0,1 Formik Asit Sulu Çöz.(% 32)	ACN (%68)	0,250 mL/dk	Birbirine yakın piklerin eldesi
%0,1 Formik Asit Sulu Çöz.(% 35)	ACN (%65)	0,250 mL/dk	Asimetrik pik gözlenmesi
		0,150 mL/dk	Düzgün olmayan pik şekli
Metanol (% 30)	ACN (% 70)	0,250 mL/dk	Yüksek kolon basıncı
Metanol (% 30)	ACN (% 70)	0,150 mL/dk	Simetrik olmayan pikler elde edildi
Metanol (% 10)	ACN (% 90)	0,150 mL/dk	
UPLC Suyu (% 30)	ACN (% 70)	0,150 mL/dk	Pik şekli analize uygun değil
UPLC Suyu (% 30)	ACN (% 70)	0,250 mL/dk	Yayvan pik eldesi
UPLC Suyu (% 30)	ACN (% 70)	0,300 mL/dk	
UPLC Suyu (% 30)	Metanol(%70)	0,150 mL/dk	Pikte yarılmalar gözlendi ve pik yarılmaları giderilemedi
UPLC Suyu (% 50)	Metanol(%50)	0,150 mL/dk	
UPLC Suyu (% 25)	Metanol(%75)	0,150 mL/dk	
UPLC Suyu (% 20)	Metanol(%80)	0,150 mL/dk	
UPLC Suyu (% 15)	Metanol(%85)	0,150 mL/dk	
UPLC Suyu (% 10)	Metanol(%90)	0,150 mL/dk	
UPLC Suyu (% 20)	Metanol(%80)	0,250 mL/dk	Yüksek kolon basıncı
UPLC Suyu (% 20)	Metanol(%80)	0,200 mL/dk	

Literatür taraması sonucunda; UPLC cihazında yöntem geliştirilmesi amacı ile pek çok çalışma yürütülmüştür. İlk olarak trifloroasetik asit ilavesi ile pH'sı 2'ye ayarlanmış %60 ACN ve %40 UPLC suyu içeren karışım mobil faz olarak kullanılmış ve 0,150 ml/dakika akışta numune enjekte edilmiştir (Lepper vd., 2003). Bu analiz, mobil faz Metanol:Su (80:20) karışımı olacak şekilde trifloroasetik asit ilavesi ile pH'sı 2'ye ayarlanarak tekrarlanmıştır. Mobil faz pH'sı 4 olarak değiştirilmiş ve analiz tekrarlanmıştır. Alınan sonuçlar neticesinde mobil faz sisteminin değiştirilmesine karar verilerek %0,05 amonyum asetat içeren metanol ve %0,05 amonyum asetat içeren su çözeltileri 50:50 mobil faz sisteminde 0,150 ml/dakika akış hızında denenmiştir (Mlejnek vd., 2011). Ancak istenilen sonuçların elde edilememesi üzerine çalışmalarda kullanılan CORTEKS C18 kolonu yerine BEH kolon kullanılmasına karar verilmiştir (Nageswari vd., 2012). Çalışmada UV spektrum taramasında elde edilen maksimum dalga boyu (258 nm) yanı sıra makalede yer alan dalga boyunda (237 nm) da analiz yapılmıştır. BEH kolonda yapılan çalışmalar aşağıdaki çizelgede yer almaktadır.

Çizelge 3.2. İMA miktar tayini yöntem geliştirilmesi için BEH kolonda yapılan çalışmalar

Mobil Faz Sistemi		Akış Oranı
50mM amonyum asetat tamponu	ACN:MeOH (40:60)	mL/dk
58	42	0,300
20	80	0,300
40	60	0,300
30	70	0,300
50mM amonyum asetat tamponu	ACN:MeOH (20:80)	
30	70	0,300

Analizlerde 10 µL olarak kullanılan enjeksiyon hacmi ise; UPLC cihazının loop'u değiştirilerek 20 µL'ye çıkartılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda İMA için UPLC çalışma koşulunun; BEH kolonda, kolon sıcaklığı 30ºC olarak sabit tutulacak şekilde, analiz edilecek örnek hacmi 20 µL, akış 0,300 ml/dakika, dalga boyu 258 nm, mobil faz sistemi; 30:70 oranında; 50 mM amonyum asetat tamponu ve asetonitril:metanol (20:80) organik solvan karışımı olmasına karar verilmiştir.

Erlotinib HCl'e ait miktar tayini geliştirme çalışmaları

Analiz çalışmaları; UV spektrum taraması yapılarak maksimum dalga boyu tayin edildikten sonra bu dalga boyunda 246 nm'de yapılmıştır. Ayrıca UPLC ile dalga boyu taraması yapılmış ve sonuçların paralel olduğu gözlenmiştir. Miktar tayini için CORTEKS

C18 kolonunda çalışılmış ve imatinib mesilat için kullanılan UPLC çalışma koşulları denenmiştir. Waters marka ACQUITY–UPLC modelli cihazın dayanabileceği maksimum basınç 15000 psi'dır. Çalışmalar sırasında kolon basıncı kolonun yıpranmasına paralel olarak artmaktadır. Bu nedenle çalışma koşulları CORTEKS C18 kolonunda akış açısından farklılık göstermektedir. Yüksek kolon basıncının önlenmesi ve pik şeklinin daha da iyileştirilmesi amacı ile akış 0,2 mL/dakika'ya düşürülmüştür.

Miktar tayini yöntemlerinin validasyon çalışmaları

Validasyon çalışmaları ACQUITY UPLC – Waters cihazında yapılmıştır. İMA için; BEH kolonda, kolon sıcaklığı 30ºC olarak sabit tutularak, örnek hacmi 20 µL, akış 0,300 ml/dakika, dalga boyu 258 nm, mobil faz sistemi; 30:70 oranında; 50 mM amonyum asetat tamponu ve asetonitril:metanol (20:80) organik solvan karışımında çalışılmış ve analiz süresi 3 dakika olarak tayin edilmiştir. ERLO için ise; CORTEKS C18 kolonda, aynı kolon sıcaklığı (30ºC), örnek hacmi (20µL) ve mobil faz sisteminde (30:70 oranında, 50 mM amonyum asetat tamponu ve asetonitril:metanol (20:80) organik solvan karışımı), akış 0,200 ml/dakika (kolon basıncı göz önüne alınarak akış düşürülmüştür) ve dalga boyu 246 nm'de çalışılmış ve analiz süresi 5 dakika olarak tayin edilmiştir. Çizelge 3.3'de çalışma koşulları verilmiştir. Deksketoprofen tremetamol yardımcı etkin madde olarak her iki etkin madde için de formülasyonlara eklenmiştir. Bu nedenle deksketoprofen tremetamol için her iki etkin madde çalışma koşullarında da validasyon çalışmaları sürdürülmüştür.

Çizelge 3.3. UPLC cihazı ile etkin madde tayinleri için çalışma koşulları

Cihaz	**ACQUITY UPLC – Waters**	
Etkin Madde	**İmatinib mesilat**	**Erlotinib HCl**
Kolon	BEH	CORTEKS C18
Kolon Sıcaklığı	30◦C	30◦C
Mobil Faz Sistemi	%30 NH_4-asetat tamponu %70 ACN:MeOH(20:80) karışımı	
Akış Oranı	0,300 ml/dk	0,200 ml/dk
Enjeksiyon Hacmi (Loop volume)	20µL	20µL
Tutulma Süresi (Retention Time)	1,3 dakika	3,4 dakika
DEX tutulma süresi	0,9 dakika	1,8 dakika
Kolonun Yıkama Çözeltileri	ACN:Distile Su	

Değerlendirilen validasyon parametreleri için; maddelerin çeşitli ortamlarda çözündürülmesi ile örnekler hazırlanmış ve analizler 6 paralel üzerinden gerçekleştirilmiştir.

İMA için örnek hazırlama işleminde 10 mg imatinib mesilat tartılmış 100 mL'ye distile su, fosfat tamponu veya DMEM ile seyreltilmiştir. Her üç ortam içinde ayrı ayrı hazırlanan 100 µg/mL konsantrasyondaki çözelti, stok çözelti olarak kullanılmıştır. İMA içeren formülasyonların hepsinde de aynı zamanda DEX bulunacağından bu madde için de aynı dalga boyunda (258 nm'de) BEH kolonda aynı koşullar altında tüm ortamlarda validasyon çalışmaları yapılmıştır. Örnek hazırlama işleminde de benzer olası açısından 10 mg deksketoprofen trometamol tartılmış 100 mL'ye distile su, fosfat tamponu veya DMEM ile seyreltilerek yapılmıştır.

ERLO için örnek hazırlama işleminde ise; 10 mg ERLO tartılmış 20 mL etanol ilave edilerek iyice çalkalanmış ardından distile su ile 100 mL'ye seyreltilmiştir. 100 µg/mL konsantrasyondaki bu çözelti stok çözelti olarak kullanılmıştır. Fosfat tamponu için ise; 2 mg ERLO tartılması 20mL etanol ilave edilmesi ve 100 mL'ye pH:7,4 fosfat tamponu ile tamamlanılması şeklinde düzenlenmiştir. Tüm numuneler 20 µg/mL konsantrasyondaki bu çözelti stok çözelti üzerinden pH:7,4 fosfat tamponu ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Ayrıca pH 3 asetat tamponunda da ERLO için validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. pH 3 asetat tamponunda ERLO için örnek hazırlama; 2 mg ERLO tartılması ve 50 mL'ye pH 3 asetat tamponu ile tamamlanması şeklinde yapılmıştır. Tüm numuneler 40 µg/mL konsantrasyondaki bu çözelti stok çözelti üzerinden pH 3 asetat tamponu ile seyreltilerek hazırlanmıştır. ERLO'nun DMEM ortamındaki örnek hazırlama işlemi için ise; 2 mg ERLO tartılması 25 mL etanol ve 25 mL distile su ilave edilmesi ve DMEM ile 100 mL'ye tamamlanılması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Tüm numuneler 20 µg/mL konsantrasyondaki bu çözelti stok çözelti üzerinden %25 etanol, %25 distile su ve %50 DMEM karışımı ile seyreltilerek hazırlanmıştır. ERLO içeren formülasyonların hepsinde de aynı zamanda DEX bulunacağından bu madde için de CORTEKS kolonda, aynı dalga boyunda (246 nm'de) aynı koşullarda validasyon çalışmaları yapılmıştır. Örnek hazırlama işleminde de ERLO ile aynı numuneden analiz yapılabilmesi adına örnekler ERLO örnek hazırlama işlemleri ile birebir aynı olacak şekilde hazırlanmış yalnızca ERLO yerine DEX kullanılmıştır.

DMEM içerikli ortamlar için UPLC cihazında tekrar dalga boyu taraması yapılmış ve DMEM içerikli ortamlarda yapılan tüm analiz çalışmalarında 300 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

Tüm ortamlarda yapılacak olan seyreltme işlemleri için kullanılacak olan enjektör, membran ve pipet uçları stok çözelti ile doyurulduktan sonra seyreltme işlemleri ve süzme işlemleri yapılmıştır. Validasyon parametreleri tek tek değerlendirilmiştir.

Doğrusallık

Çalışılan konsantrasyon aralığı içerisinde hazırlanan numunedeki etkin madde miktarının derişimi ile elde edilen yanıtın orantılı olup olmadığını ifade etmektedir.

İMA ve DEX'in distile suda, pH:7,4 fosfat tamponunda ve DMEM'deki validasyonu; stok çözelti üzerinden 20 µg/ml – 0,05 µg/ml derişim aralığında stok çözeltide kullanılan ortam ile seyreltmeler yapılmış 9 farklı konsantrasyonda 6 paralel olacak şekilde hazırlanan örnekler üzerinden yapılmıştır.

ERLO ve DEX'in distile suda, pH:7,4 fosfat tamponunda, pH:3 asetat tamponunda ve DMEM'deki validasyonu; stok çözelti üzerinden 10 µg/ml – 0,05 µg/ml derişim aralığında seyreltmeler yapılarak 8 farklı konsantrasyonda 6 paralel olacak şekilde hazırlanan örnekler üzerinden yapılmıştır.

Etkin madde konsantrasyonlarına karşılık bulunan pik alanları değerleri grafiğe geçirilerek en küçük kareler yöntemi uygulanmış ve standart doğru denklemi elde edilmiştir.

Kesinlik

Miktar tayini için kullanılan analiz yönteminde, aynı derişimde hazırlanan numunenin ardı ardına yapılan ölçümlerinin birbirine yakınlığı yöntemin kesinliğini göstermektedir. Yöntemin farklı günlerde gösterdiği kesinlik de tekrar edilebilirliği göstermektedir. Bu; farklı günlerde aynı derişimde hazırlanan numunelerin ölçümlerinin birbirine yakınlığı ile değerlendirilmektedir. Kesinlik; standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri ile değerlendirilmektedir.

a) Deney içi Kesinlik:

İMA, ERLO veya DEX'in distile su, pH:7,4 fosfat tamponunda ve DMEM'de hazırlanan stok çözeltilerinden seyreltme işlemi yapılarak 10 µg/ml derişimdeki çözeltileri UPLC cihazında 10 kere ard arda analiz edilmiş ve pik alanları hesaplanmıştır. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyon değerleri hesaplanarak ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

b) Deneyler Arası Kesinlik:

İMA için 20; 5; 1 ve 0,2 µg/ml derişimlerindeki çözeltileri, ERLO ve DEX için ise; 10; 2; 0,5; 0,1 µg/ml derişimlerindeki çözeltileri stok çözeltisi üzerinden uygun seyreltme ortamı ile seyreltilerek hazırlanmış ve birbirini takip eden 3 gün içinde altışar kez UPLC cihazında analiz edilmiştir. Elde edilen piklerin alanları hesaplanmış ve bu alanlara karşılık gelen konsantrasyon değerlerinin ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması hesaplanmıştır.

Doğruluk ve Geri Elde

Doğruluk; ölçüm sonucu saptanan madde miktarı ile numune içerisindeki gerçek etkin madde miktarının yakınlığıdır. Yöntemin doğruluğunu kanıtlamak için bilinen konsantrasyonda örneklerin analizi yapılarak değerlendirilmektedir ve yöntemin doğruluğu geri elde etme yüzdesine bağlıdır. Elde edilen değer % 95 olasılıkla daha önceden kabul edilen aralıkta olmalıdır.

Etkin maddeler için stok çözeltileri üzerinden %120, %100 ve %80 oranında etkin madde içeriken üç ayrı konstantrasyonu (BEH kolonda İMA ve DEX için sırasıyla 12; 10 ve 8 µg/mL; CORTEKS C18 kolonda ERLO ve DEX için sırasıyla 6; 5 ve 4 µg/mL) altışar kez analiz edilmiştir. Elde edilen pik alanları hesaplanarak bu alanlara karşılık gelen konsantrasyon değerlerinin ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması hesaplanmıştır.

Özgünlük ve Seçicilik

Kullanılan analiz yönteminin yalnızca analiz edilmesi istenilen maddeyi saptayabilmesi gerekliliği özgünlük ve seçicilik olarak ifade edilmektedir. Formülasyona giren etkin madde dışındaki diğer maddelerin aynı dalga boyunda aynı yerde pik verip vermediğinin kontrolü yapılmaktadır. Bu amaçla imatinib mesilat yanı sıra deksketoprofen trometamol maddesi ile karışım halindeki çözeltisi hazırlanarak imatinib mesilat için geliştirilen yöntemde analiz edilmiştir.

Duyarlılık ve Saptama Sınırı

Analiz yönteminin güvenilir şekilde analiz edebildiği en küçük derişimi saptamak için yapılan işlemlerdir. Duyarlılık ve saptama sınırı aşağıdaki denklemlerle hesaplanır:

Duyarlılık sınırı (LOD) = (3,3 x σ) / S

Saptama sınırı (LOQ) = (10 x σ) / S

σ: kalibrasyon aralığındaki en düşük derişimin standart sapması

S: kalibrasyon eğrisinin eğimi

Etkin maddelerin *in vivo* çalışmalarda kullanılmak üzere plazma ortamında miktar tayini yöntemlerinin geliştirilmesi ve validasyonu

Aynı yöntem kullanılarak farmakokinetik çalışmalar için plazmada etkin madde miktar tayini çalışmaları yapılmış ancak başarılı sonuçlar elde edilememiştir. İmatinib mesilat miktar tayini için nihai yöntem oluşturulana kadar BEH ve XTerra olmak üzere iki farklı kolonda çeşitli çalışmalar yapılmıştır. BEH kolonda yapılan çalışmalarda pH:9,5 amonyum asetat ve MeOH:ACNT organik solvanı karışımı mobil faz olarak kullanıldığında; farklı oranlarda karışımları kullanılmasına rağmen maddeye ait düzgün bir pik elde edilmemiştir. Akış değiştirildiğinde ise madde piki elde edilememiştir. Mobil faz %0,1 formik asit (suda) ve MeOH:ACNT olarak değiştirildiğinde ise; plazma pikine bitişik bir pik elde edilmiş olup, mobil faz oranı, akış ve dalga boyu değiştirilmesine rağmen maddeye ait belirgin bir pike rastlanamamıştır. Kullanılan BEH ve CORTEKS kolonlarının iç çapları sırasıyla 1,7 µm ve 1,6 µm olup, sistem basıncını fazla artırdığından plazma sistemlerinde kullanılmak

için oldukça küçük olduğu düşünülerek XTerra kolon kullanımına gidilmiştir. Yapılan literatür taraması sonucunda kullanılan kolon XTerra ve mobil fazın Trietilamin:ACNT olarak değiştirilmesine karar verilmiştir (Neville vd., 2004). XTerra kolonda %67 trietilamin %33 ACNT, akış hızı 0,35 ml/dakika şartlarında 18. dakikada 20 µg/mL'lik konsantrasyondaki maddeye ait bir pik gözlenmiştir. Ardından alt doz olarak 1 µg/mL'lik konsantrasyondaki plazma numunesi sisteme enjekte edildi ve bu maddeye ait de azalan miktarda pik elde edilmiştir. Pikin daha erken çıkması ve böylece analiz süresini kısaltması adına akış hızı 1,5 ml/dakika yapılmıştır. Ayrıca pikin yayvanlığını azaltmak ve daha dik bir pik elde etmek için mobil faz oranları %60 trietilamin %40 ACNT olarak değiştirilmiştir. Kolon sıcaklığı ise 40°C'de sabit tutulmuştur. Çalışmada ayrıca UPLC spektrum taramasında elde edilen maksimum dalga boyu olan 320 nm yanı sıra makalede yer aldığı üzere 264 nm'de de analiz yapılmış ancak 320 nm dalga boyunda maddeye ait pikin daha yüksek alan verdiği gözlenmiştir ve bu nedenle çalışmalara 320 nm'de devam edilmiştir. Bu kolon ve mobil faz sisteminde yapılan çalışmalar aşağıdaki çizelgede yer almaktadır.

Çizelge 3.4. Plazmada İMA miktar tayini yöntemi geliştirilmesi için yapılan çalışmalar

Mobil Faz Sistemi		Akış Oranı mL/dk
3 mM Trietilamin (%)	ACNT (%)	
67	33	0,350
67	33	0,500
67	33	0,800
40	60	0,800
50	50	0,800
60	40	0,800
60	40	1,500

Çalışma koşulları; XTerra kolon, kolon sıcaklığı 40ºC olacak şekilde sabit, analiz edilecek örnek hacmi 20 µL; akış hızı 1,500 ml/dakika ve dalga boyu 320 nm, mobil faz sistemi; 60:40 oranında; 3 mM trietilamin ve asetonitril karışımı. Bu koşullarda plazmada İMA tayini yapılmışken; ERLO, akış hızı 0,8 ml/dakika olacak şekilde değiştirilerek analiz edilmiştir.

Plazma örnekleri hazırlanmasında; 4mg İMA veya ERLO tartılmış ve sırasıyla 20 mL'ye distile su veya 20 mL'ye %20 etanol içeren distile su ile seyreltilmiştir. Analizler için bu

200 µg/mL konsantrasyondaki çözeltiler, stok çözelti olarak kullanılmıştır. Seyreltme işlemleri için kullanılacak olan enjektör, membran ve pipet uçları stok çözelti ile doyurulduktan sonra seyreltme işlemleri yapılmıştır. Stok çözeltiden ve seyrelmiş çözeltilerden 200 µL alınıp bir eppendorfa konulmuş üzerine 200 µL plazma eklendikten sonra birkaç saniye vortekslenmiştir. Son olarak üzerine 600 µL asetonitril ilave edilerek 30 saniye daha vorteks ile karıştırılıp 4°C'de İMA için 15000 rpm'de 10 dakika ve ERLO için 10900 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Süpernatanlar membrandan süzüldükten sonra sisteme enjekte edilmiştir.

Validasyon parametreleri tek tek değerlendirilmiştir.

Doğrusallık

İMA ve ERLO'nun plazmadaki validasyonu; stok çözelti üzerinden 40 µg/ml – 0,5 µg/ml derişim aralığında stok çözeltide kullanılan ortam ile seyreltmeler yapılıp 7 farklı konsantrasyonda 6 paralel olacak şekilde hazırlanan örnekler üzerinden yapılmıştır. Madde konsantrasyonlarına karşılık bulunan maddenin verdiği pik alanı değerleri grafiğe geçirilerek en küçük kareler yöntemi ile standart doğru denklemi elde edilmiştir.

Kesinlik

Deney içi kesinlik için etkin maddelerin 10 µg/ml derişimdeki çözeltileri UPLC cihazında 10 kere ard arda analiz edilmesi ve pik alanlarının hesaplanması ile ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri ile birlikte değerlendirilmiştir.

Deneyler arası kesinlik için ise; maddelerin 20; 5; 1 µg/ml derişimlerindeki çözeltileri birbirini takip eden 3 gün içinde altışar kez UPLC cihazında analiz edilmiştir. Elde edilen piklerin alanları hesaplanıp bu alanlara karşılık gelen konsantrasyon değerlerinin ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması hesaplanmıştır

Doğruluk ve Geri Elde

Maddelerin stok çözeltisi üzerinden %120, %100 ve %80 etkin madde içerikli üç ayrı konsantrasyonu (sırasıyla 12; 10 ve 8 µg/mL) altışar kez analiz edilmiş kromatogramdan

elde edilen alanlara karşılık gelen konsantrasyon değerlerinin ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması hesaplanmıştır.

Özgünlük ve Seçicilik

Formülasyona giren etkin madde dışındaki diğer maddelerin aynı dalga boyunda aynı yerde pik vermediğinin kontrolünü yapmak amacı ile maddelerin plazmada karışımları halindeki çözeltileri hazırlanarak analiz edildi.

Duyarlılık ve Saptama Sınırı

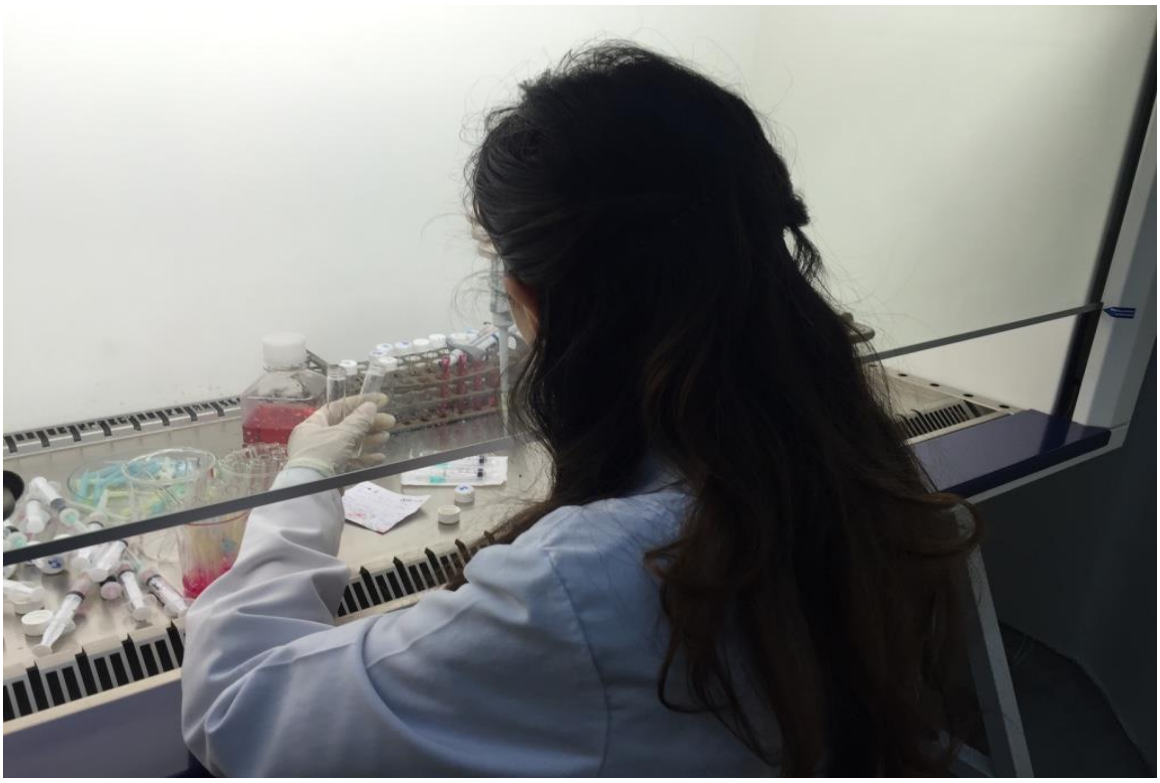
"*Miktar tayini yöntemlerinin validasyon çalışmaları*" alt başlığında ifade edildiği üzere hesaplanmıştır.

Formülasyonlarda kullanılan maddelere ait sitotoksisite testleri

Hücre kültürü çalışmaları ŞAP Enstitüsünde yapılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında L-929 sağlıklı fibroblast hücreleri kullanılmıştır. L-929 hücreleri çalışma için pasaj edilmiştir. 37°C'den oda sıcaklığına getirilen hücreler laminar hava akımı altında tripsinizasyon işlemi ile yapıştıkları yerden ayırılmıştır. Doku kültürü mikroskobunda sayım yapılmıştır. Sayım sonucu hücre sayısı $4x10^4$'e seyreltilmiştir ve flaska eklenmiştir. Flask içindeki hücreler 37°C'de CO_2'li etüvde hafif ağzı açık şekilde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyondan sonra hücreler etüvden alınarak tripsinizasyon işlemi yapılmıştır ve hareketlenen hücreler 96 kuyucuklu plakalara konulmak için 9,6 mL olarak DMEM ile tamamlanarak hazırlanmıştır. Hazırlanan hareketli hücreler plakalara yerleştirilmiştir.

Sitotoksisite çalışmalarında ise; hücre yaşayabilirliğinin ölçülmesinde kullanılan testlerden olan Tetrazolyum Redüksiyon Testi temel alınmıştır. Tetrazolyum redüksiyon testinde en fazla kullanılan testlerden biri olan uygulanmış ve L-929 hücrelerine İMA, ERLO, DEX, folikasit, PEG2000, kitozan ve tripolifosfat maddelerinin farklı konsantrasyonları literatür taraması yapılarak bulunmuş ve eklenmiştir. İMA'nın 0,048 mg/ml; 0,48 mg/ml; 4,8 mg/ml konsantrasyonları ve ERLO'nun ise; 1 mg/ml; 3 mg/ml; 9,6 mg/ml konsantrasyonları hazırlanmıştır. Deksketoprofen trometamol için 0,045 mg/ml; 0,09 mg/ml; 0,9 mg/ml; 9 mg/ml konsantrasyonlar; folik asit için 1,34 mg/ml; 5,49 mg/ml;

10,98 mg/ml; 16,47 mg/ml konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan konsantrasyonlarda çözücü olarak DMEM kullanılmıştır. Hazırlanan çözeltiler 0,22 µm'lik filtrelerden geçirilmiştir. Formülasyon içeriği olarak %12,5; 25; 50; 75 ve %100 kitozan (sırasıyla 25; 50; 100; 150; 200 µg/mL konsantrasyonlarında), %25-50-75-100 PEG 2000, %25-50-75-100 tripolifosfat çözeltileri steril ortamda hazırlanmış ve 0,22 µm'lik filtrelerden geçirilmiştir.



Resim 3.1. MTT testinde kullanılmak üzere, örnek hazırlama sırasında çekilmiş görüntü

Hazırlanan örnekler plakalara eklenmiştir ve hücreler 24 saat 37°C'de CO_2'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonra MTT eklenmiştir. MTT eklendikten 4 saat sonra üzerlerine izopropil alkol eklenmiştir. Daha sonra da hücre sayımı yapılmıştır.

3.2.2. Formülasyon çalışmaları

Formülasyon çalışmaları başlığı altında; geliştirilecek nano-taşıyıcı sistem formülasyonlarında yer alacak maddelerin ve madde miktarlarının belirlenmesi, üretim için uygun yöntemin seçilmesi, uygun yöntem ile hazırlanmaları, karakterizasyonlarının (partikül büyüklüğü ve dağılımı, morfolojik incelemeleri, zeta potansiyel ölçümleri ve etkin madde yükleme kapasiteleri) belirlenmesi, sitotoksisitelerinin belirlenmesi ve *in vitro*

etkinlik açısından değerlendirilmesi sürecinde yapılan tüm çalışmaları kapsamaktadır. Nano-taşıyıcı sistemlere etkin maddeler sitotoksisite testleri ile belirlenen dozlarda yüklenmiştir. Nano-taşıyıcı sistemler elde edildikten sonra imatinib mesilat veya erlotinib HCl etkin maddeleri yüklenmiş bunların yanı sıra yardımcı etkin madde olan deksketoprofen trometamol ve fonksiyonellik kazandırmak amacı ile formülasyonlarda yer alan polietilen glikol (PEG) ve dspe-peg-fa (folik asit (FA) bağlı PEG) yüklenmiştir. Değerlendirme aşamasında etkin madde içermeyen taşıyıcı sistem (taşıyıcı sistem-BOŞ), polietilen glikol bağlı taşıyıcı sistem (taşıyıcı sistem-PEG) ve dspe-peg-fa bağlı taşıyıcı sistem (taşıyıcı sistem-PEGFA)'ler bir arada karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Kuantum noktacıklarının hazırlanması

Kuantum noktacıkları (quantum dots, QD) hazırlanışında bir seri formülasyon çalışması denenmiş kuantum noktacıkları hazırlanışına ilişkin kritik parametreler ortaya çıkartılmaya çalışılmıştır. Formülasyonlarda; çinko klorür, nitrik asit, metanol, sodyum hidroksit ve disodyum hidrojen fosfat kullanılmıştır. Bu formülasyonlar ve yapılan işlemler Çizelge 3.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. Kuantum noktacıkları formülasyonları

		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
1	$ZnCl_2$ (g)	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,04	0,2	0,2	0,2	0,2
	HNO_3 (mL)	0,12	0,06	0,06	0,06	0,06	0,012	0,29	0,29	0,29	0,06
	Metanol (mL)	2	1	1	1	1	0,2	1	1	1	1
	Sonikasyon	4dk	4dk	4dk	4dk	4dk	4dk	4dk	4dk	4dk	4dk
	Etüv(ºC)	80	80	100	90	40	80	80C	80C	80C	80
	Metanol	10	5	5	5	5	1	5	5	5	5
2	NaOH (g)	4	2	2	2	2	0,4	2	0,24	0,24	1
	Metanol (mL)	100	50	50	50	50	10	50	50	5	50
3	Na_2HPO_4 (mL)	100	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Çinko klorür üzerine nitrik asit ve metanol ilave edilmiş, sonrasında ise 4 dakika sonike edilmiştir. Çinko klorür ve nitrik asit reaksiyonu sonucu çinko nitratın metanoldeki çözeltisi elde edilmiştir. Bu çözelti kurutularak çözücü olan metanol uçurulmuştur. Elde edilen jel kıvamındaki katı madde üzerine metanol ilave edilmiş ve tekrar çözelti haline getirilmiştir (1). Sodyum hidroksit metanolde tamamen çözündürülmüştür (2). Bu çözelti

(2) üzerine, çinko nitratın metanoldeki çözeltisi (1) ilave edilmiştir. 30 dakika sonike edilmiş ardından elde edilen bu çözelti karışımı ((1) ve (2) karışımı) disodyum hidrojen fosfatın metanoldeki doygun çözeltisi (3) üzerine ilave edilmiştir.

(1) numaralı çözeltinin (2) numaralı çözeltiye ilavesi sırasında magnetik karıştırıcı, ince uçlu ultraprobe ve ultratorax cihazları denenmiş ve karışımda kullanılan cihazın etkisine bakılmıştır. Bunun yanı sıra; (1) numaralı çözeltinin (2) numaralı çözeltiye ilavesi hem birden ilave etme hem de damla damla ilave etme şeklinde denenmiştir. Ayrıca damla damla ilave etme işlemi için de 10; 5 ve 1mL'lik farklı büyüklükteki iğneye sahip enjektörler denenmiştir. Yine ilave etme işleminde formülasyonda meydana gelebilecek kirliliklerin engellenmesi ve büyük boyutlu partiküllerin elimine edilmesi açısından (1) ve (2) numaralı çözeltilerin ayrı ayrı membran filtrelerden süzüldükten sonra karıştırılması denenmiştir.

Elde edilen sonuç ürün çözelti halinde olduğundan bunun kuru toz haline getirilmesi için çözeltinin evaporatörde veya etüvde uçurulması üzerine 40, 60, 80, 90 ve 100ºC'lerde çalışmalar yapılmıştır. Bunun yanı sıra katı ürün elde etmek için santrifüj cihazı da kullanılmıştır.

Formülasyonlardaki yüzey etkin madde etkisini görmek amacı ile kuantum noktacıkları hazırlandıktan sonra üzerlerine SDS veya farklı molekül ağırlıklarında ve farklı miktarlarda PEG kullanımına gidilmiştir. PEG4000 içerikli kuantum noktacıklarının partikül büyüklükleri lazer dalga boyu 632,8 nm olan Malvern CGS-3 serisine ait ışık saçılımı (LS) cihazı ile ölçülmüştür. Ayrıca Atomic Force Microscope (AFM) cihazı ile kuantum noktacıklarına ait morfolojik görüntüleme de yapılmıştır.

Ancak bu yöntemle hazırlanan formülasyonlarda zamana bağlı olarak agregasyon buna bağlı olarak da partikül büyümesi gözlenmiştir. Bu nedenle farklı üretim tekniği denenmiştir. Bu üretim şeklinde; çinko asetattan hareketle çinko oksit kuantum noktacıkları elde edilmiştir. Yönteme ait işlem basamakları Şekil 3.1.'de yer almaktadır.

Şekil 3.1. Kuantum noktacıklarının üretim basamaklarının şematik gösterimi

Yöntemde ilk olarak partiküllerin bir araya gelmesinin engellenmesi amacıyla yüksek oranda oleik asit kullanımı denenmiş olsa da kuantum noktacıklarının oluşumunu engellediği için oleik asit oranı düşürülmüştür. Sonuçta; 0,1M çinko asetat sulu çözeltisi; 0,2 M dietanolamin ve 14 mmol oleik asit içeren sulu çözelti içerisine eklenmesiyle elde edilmiştir.

Kuantum noktacıklarına etkin madde yüklenmesi amacıyla ilk olarak; %1'lik kitozan çözeltisi hazırlanmıştır. Çözelti; kitozanın, glasiyal asetik asit içeren distile suda 1 gece magnetik karıştırıcı altında bekletilmesi ile elde edilmiştir. Daha sonra bu karışıma ERLO ve DEX ilave edilmiştir. Distile su içerisinde dağıtılmış kuantum noktacıkları içerisine Ultraturrax® altında 10000 rpm hızda, etkin maddeleri içerisinde barındıran kitozan çözeltisi cam damlalık ile damla damla ilave edilerek formülasyonlar oluşturulmuştur. İşlem bitiminde 5000 rpm'de 6 saat karıştırılmıştır. Aşağıdaki çizelgede erlotinib HCl etkin maddesinin kuantum noktacıklarına yüklenmesi çalışmalarına ilişkin hazırlanmış formülasyonlar Çizelge 3.6'da gösterilmektedir.

Çizelge 3.6. Asidik ortamdaki kuantum noktacıklarına ERLO yüklenmesi

Formülasyon içeriği	DEXER1	DEXER-PEG2	DEXER-PEG-FA3
%1'lik kitozan çözeltisi	100mg/10mL	99,74mg/10mL	99,68mg/10mL
Erlotinib (mg)	5,02	4,95	4,95
Deksketoprofen (mg)	0,200	0,200	0,206
PEG 2000 (mg)	-	1,2	-
PEG-FA (mg)	-	-	2,03
Kuantum Noktacığı (mg)	11,16	10,12	10,35
Distile su (mL)	20	20	20

Formülasyonlarda kullanılan %1'lik kitozan çözeltisi 100 mg kitozanın tartılması sonrasında glasiyal asetik asit içeren distile su içerisinde magnetik karıştırıcı altında 1 gece karıştırılarak tamamen çözündürülerek elde edilmiştir. Bu çözeltiye etkin maddeler; ERLO'nun 1 mL etanol:su (1:1) karışımında çözündürülmesi ve deksketoprofen, PEG2000 veya PEGFA'nın suda çözündürülmesi ile ilave edilmiştir. İlave etme işlemi kitozan çözeltisinin Ultraturrax® altında 10000 rpm hızda karıştırılması esnasında yapılmıştır. Daha sonra kitozan çözeltisi bir tarafa ayrılmış ve suda disperse edilmiş kuantum noktacıkları Ultraturrax® altına alınmıştır. Kitozan ve etkin madde içerikli karışımın, 10000 rpm hızda, etkin maddenin plastik yüzeyleri adsorbe olması dolayısıyla cam damlalık kullanılarak damla damla kuantum noktacığı sulu çözeltisi üzerine ilave edilmesi ile hazırlanmıştır.

İmatinib etkin maddesi de benzer şekilde yüklenmiştir. Ancak imatinibin suda çözünür bir madde olması dolayısıyla maddelerin hepsi katı halde doğrudan kitozan çözeltisi üzerine eklenmiştir. Yapılan formülasyon çalışmaları Çizelge 3.7'de yer almaktadır.

Çizelge 3.7. Asidik ortamdaki kuantum noktacıklarına imatinib yüklenmesi

Formülasyon içeriği	DEXİMA1	DEXİMA-PEG2	DEXİMA-PEG-FA3
%1'lik kitozan çözeltisi	99,85mg/10mL	99,74mg/10mL	99,77mg/10mL
İmatinib (mg)	5,03	5,32	5,62
Deksketoprofen (mg)	0,206	0,200	0,206
PEG 2000 (mg)	-	2,64	-
PEG-FA (mg)	-	-	2,12
Kuantum Noktacığı (mg)	10,05	10,25	9,88
Distile su (mL)	20	20	20

Formülasyonların elde edilmesi sırasında Ultraturrax® cihazının çözelti seviyesi nedeniyle zarar görmemesi açısından formülasyonlar önce cam santrifüj tüplerinde hazırlanmış daha sonra behere geçilmiştir. Madde kaybı yaşanmaması açısından numunelerin aktarımı sırasında kullanılan malzemeler distile su ile yıkanarak ilave edilmiştir. Dolayısıyla maddelerin total hacimlerinde bir artış olmuştur. Sonrasında ise 18000 rpm'de yarım saat santrifüjlenmiş ancak çökme gözlenmemiştir.

Çinko oksitin, glasiyal asetik asit dolayısıyla oluşmuş asidik ortamda reaksiyon vermiş olabileceği bu nedenle de yapısının değişebileceği düşünülmüş ve kitozan çözeltisinin pH'sının sodyum hidroksit ilavesiyle bazik pH'ya çekilmesi düşünülmüştür. Bu amaçla başlangıçta pH'sı 2,8 olarak ölçülen 100mg kitozan içeren çözelti üzerine NaOH ilave edilmiş ve pH değişimleri incelenmiştir. İlk olarak 0,1N NaOH kullanılmış ancak pH üzerine etkisinin düşük olması sebebiyle 0,9N NaOH kullanılmıştır. Ancak bunun için de çok fazla çözelti harcanması gerekince 1,55N NaOH ile çalışılmıştır (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. Kitozan çözeltisine NaOH ilavesi ile pH'sının bazik değerlere çekilmesi

NaOH	pH:2,8	NaOH	pH:2,8
0,1N 5mL	3	1,55N 2mL	3,6
0,1N 10mL	3,3	1,55N 5mL	4,1
0,1N 20mL	3,6	1,55N 10mL	4,7
0,1N 20mL + 0,9N 5mL	4,1	1,55N 15mL	5,6
0,9N 10mL	4,5	1,55N 17mL	6,1
0,9N 20mL	5,1	1,55N 18mL	11,2

pH değerinin 11,2'ye birden ulaşarak çökme göstermesi asidik pH'da çözünme gösteren kitozanın pH:6'nın üzerinde bir dönüm noktasına sahip olduğu sonucunu doğurmuştur. Bu nedenle formülasyonların pH:6'da hazırlanmasına karar verilmiş ve etkin madde yüklenmesi işlemi tekrarlanmıştır. ERLO için yapılan formülasyon çalışmaları, Çizelge 3.9'da yer almaktadır.

Çizelge 3.9. Bazik ortamdaki kuantum noktacıklarına erlotinib yüklenmesi

Formülasyon içeriği	DEXER4	DEXER-PEG5	DEXER-PEG-FA6
%1'lik kitozan çözeltisi	100,54mg/10mL	100,04mg/10mL	100,07mg/10mL
2,24 N NaOH	6mL (pH:6,04)	5mL (pH:6)	4mL (pH:6)
Erlotinib (mg)	5,05	5,15	6,60
Deksketoprofen (mg)	0,208	0,208	0,208
PEG 2000 (mg)	-	2,12	-
PEG-FA	-	-	1,34
Kuantum Noktacığı (mg)	10,22	9,99	12,02
Distile su (mL)	20 mL	20	20

İşlemler imatinib yüklenmesi için de benzer şekilde formülasyonlar geliştirilmiştir. İMA için yapılan formülasyon çalışmaları ise Çizelge 3.10'da yer almaktadır.

Çizelge 3.10. Bazik ortamdaki kuantum noktacıklarına imatinib yüklenmesi

Formülasyon içeriği	DEXİMA4	DEXİMA-PEG5	DEXİMA-PEG-FA6
%1'lik kitozan çözeltisi	99,49 mg/10mL	100,18 mg/10mL	100,07 mg/10mL
2,14N NaOH	5 mL (pH:6)	5,5 mL (pH:6)	5,5 mL (pH:6)
İmatinib (mg)	5,38	5,07	5,60
Deksketoprofen (mg)	0,206	0,206	0,206
PEG 2000 (mg)	-	1,60	-
PEG-FA (mg)	-	-	1,80
Kuantum Noktacığı (mg)	11,03	10,07	10,37
Distile su (mL)	20	20	20

Miktar tayinlerinin yapılabilmesi için kuantum noktacığı formülasyonları için kör hazırlanması yani etkin madde içermeyen QD hazırlanması düşünülmüştür. Bu amaçla; 10,05 mg QD, 10 mL distile suda dağıtılmıştır. 99,09 mg kitozan 10mL distile suda glasiyal asetik asit varlığında çözündürüldükten sonra 5mL NaOH ilave edilmiştir. QD sulu çözeltisi üzerine kitozan çözeltisi 10000 rpm hızdaki Ultraturrax® altında cam damlalıkla ilave edilmiştir.

Hazırlanan formülasyonların partikül büyüklüklerinin beklenildiği gibi düşük çıkmaması ve hazırlama sırasında karşılaşılan bir takım problemler nedeniyle etkin madde içermeyen QD, kitozan içermeyen kuantum noktacığı ve yalnızca etkin maddelerden oluşan örnek hazırlanmış ve karşılaştırma yapılmıştır. Bu çalışmalara Çizelge 3.11'de yer verilmiştir.

Çizelge 3.11. Çeşitli içeriklerde kör hazırlanması

Formülasyon içeriği	KÖR-1	KÖR-2	KÖR-3
%1'lik kitozan çözeltisi	99,09 mg/10mL	-	-
2,14N NaOH	5 mL (pH:6)	-	4 mL (pH:6)
Erlotinib (mg)	-	5,21	5,11
Deksketoprofen (mg)	-	0,266	0,266
PEG 2000 (mg)	-	-	-
PEG-FA (mg)	-	-	-
Kuantum Noktacığı (mg)	10,05	10,11	-
Distile su (mL)	10	20	-

Hazırlanan formülasyonların UV lamba altında incelenmesi sonrasında mavi ışımanın düşük oranda olması veya ışımanın alınamaması nedeniyle kitozan miktarının azaltılması düşünülmüştür. Bu amaçla DEXER formülasyonu daha düşük miktarda (1/10 oranında) kitozan içerecek şekilde tekrarlanmıştır. Seyreltik formülasyon (DEXER7) ve derişik haldeki bazik formülasyon (DEXER8) aynı anda hazırlanarak karşılaştırılmışlardır. Ayrıca buna ilaveten yeniden kuantum noktacığı hazırlanmış ve stok kuantum noktacığı üzerinden formülasyon hazırlanması yerine taze hazırlanmış kuantum noktacığı kullanılarak (DEXER9) yeni bir formülasyon hazırlanmıştır. Formülasyon içerikleri Çizelge 3.12'de yer almaktadır.

Çizelge 3.12. Farklı kitozan oranları kullanılarak kuantum noktacıkları hazırlanması

Formülasyon içeriği	DEXER7	DEXER8	DEXER9
Kitozan çözeltisi (mg/mL)	9,91 mg/10mL	100,14 mg/10mL	99,22 mg/10mL
2,24 N NaOH	0,5 mL (pH:6)	5 mL (pH:6)	4 mL (pH:6)
Erlotinib (mg)	6,00	5,75	5,07
Deksketoprofen (mg)	0,208	0,200	0,226
Kuantum Noktacığı (mg)	10,52	9,96	11,98
Distile su (mL)	10	10	10

Yapılan çalışmalar sonrasında kitozanın tamamen sertleşmesi açısından formülasyona tripolifosfat ilave edilmesi düşünülmüştür. Tripolifosfat ilave edilerek hazırlanmış kuantum noktacıkları özetle; kitozan çözeltisi üzerine NaOH eklenerek pH'sının bazik pH'ya yaklaştırılması sonrasında 10000 rpm hızdaki Ultraturrax® altına alınmış, üzerine alkolde çözünmüş erlotinib ve suda çözünmüş deksketoprofen cam damlacıkla ilave edilmiştir. Ardından kuantum noktacıkları karışıma ilave edilmiştir. Tamamen karışma sağlandıktan sonra distile suda çözünen TPP 10000 rpm hızdaki Ultraturrax® altına alınmış ve cam damlalıkla kitozan-QD-etkin madde karışımı damla damla ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan kuantum noktacıklarının boyutlarında çok ciddi büyümeler gözlenmiştir. Bunun üzerine farklı kitozan konsantrasyonları denenmiştir. İlk olarak TPP içermeyen formülasyonlarla karşılaştırmak adına 100mg kitozan kullanılmış (DEXER10), daha sonra önce yarı yarıya kitozan konsantrasyonu azaltılmış (DEXER11) ve son olarak da konsantrasyon 1/10 oranına çekilmiştir (DEXER12). Bu formülasyonların içerikleri Çizelge 3.13'de yer almaktadır.

Çizelge 3.13. Tripolifosfat (TPP) içerikli kuantum noktacıkları hazırlanması

Formülasyon içeriği	DEXER10	DEXER11	DEXER12
Kitozan çözeltisi (mg/mL)	100,52mg/10mL	99,98mg/20mL	20,00mg/20mL
3,19 N NaOH	2mL (pH:6)	1mL (pH:6)	0,6mL (pH:6)
Erlotinib (mg)	3,02	3,40	3,42
Deksketoprofen (mg)	0,260	0,200	0,230
Kuantum Noktacığı (mg)	11,09	12,63	26,19
TPP (mg)	250,51	248,91	50,21
Distile su (mL)	100	125	100

Partikül büyüklüğünün polimer miktarı ile ilişkili olduğu göz önüne alınarak kitozan miktarı daha da azaltılmıştır. Kitozan miktarı azaltılarak formülasyon tekrarlanmıştır (DEXER13). Kuantum noktacıklarının daha iyi dağıtılabilmesi ve küçük boyutlarını koruyabilmeleri için alkolde çözündürülerek ilave edilmesi denenmiştir (DEXER14). TPP'ın konsantre halde kullanımının formülasyon üzerine etkisi incelenmiştir (DEXER15). PEG ilave edilerek DEXER13 formülasyonu gibi doğrudan kuantum noktacıkları ile hazırlanmış ve formülasyonlarda PEG etkisi incelenmiştir (DEXER-PEG16). Çizelge 3.14'de bu formülasyonların içerikleri yer almaktadır.

Çizelge 3.14. Düşük kitozan içerikli erlotinib yüklü kuantum noktacıkları formülasyonları

Formülasyon içeriği	DEXER13	DEXER14	DEXER15	DEXER-PEG16
Kitozan çözeltisi	5,00mg/10mL	5,04mg/10mL	5,04mg/10mL	5,17mg/10mL
2,43 N NaOH	0,3mL (pH:6)	0,3mL (pH:6)	0,3mL (pH:6)	0,3mL (pH:6)
Erlotinib (mg)	5,21	6,10	6,52	6,55
Deksketoprofen (mg)	0,200	0,200	0,252	0,232
PEG2000 (mg)	-	-	-	2,08
Kuantum Noktacığı (mg)	13,11	10,73 (alkolde)	11,10	14,11
TPP (mg)	25,02	25,02	25,21	25,02
Distile su (mL)	100	100	50	100

Kitozan çözeltisinin pH'sı NaOH ilavesiyle bazik pH'ya yaklaştırılmış sonrasında ise kuantum noktacıkları üzerine kitozan çözeltisi kısım kısım eklenerek su banyosunda sonike edilmiştir. Karışım vibracell altına alınmış ve titreşim halindeyken erlotinibin alkoldeki, deksketoprofenin sudaki çözeltileri ilave edilmiştir. Distile suda çözünmüş TPP, 10000

rpm hızdaki Ultraturrax® altına alınmış ve üzerine, cam damlalık yerine 1 mL'lik cam enjektör kullanılarak, sonuç karışım damla damla ilave edilmiştir.

Formülasyonlara imatinib yüklenmesi de erlotinib yüklenmesine benzer şekilde gerçekleştirilmiştir (DEXİMA7). Kuantum noktacıklarının daha iyi disperse edilebilmesi için tartıldıktan sonra, tartılan miktarın kapladığı hacim kadar kitozan çözeltisi ilave edilerek karıştırılmış ve her defasında bu şekilde geometrik seyreltme yaparak kitozan çözeltisi içerisinde tamamen dağılmaları sağlanmıştır (DEXİMA8). Ayrıca bir başka formülasyon da PEG ilave edilerek bu şekilde hazırlanmıştır (DEXİMA9). Kuantum noktacıklarının tamamen disperse olmasını sağlayabilmek adına alkolde çözerek de formülasyon denenmiştir (DEXİMA10). Formülasyonların içeriklerine Çizelge 3.15'de yer verilmiştir.

Çizelge 3.15. Düşük kitozan içerikli imatinib yüklü kuantum noktacıkları formülasyonları

Formülasyon içeriği	DEXİMA7	DEXİMA8	DEXİMA-PEG9	DEXİMA10
Kitozan çözeltisi	5,17mg/10mL	5,14mg/10mL	5,14mg/10mL	5,17mg/10mL
2,43 N NaOH	0,3mL (pH:6)	0,3mL (pH:6)	0,4mL (pH:6)	0,4mL (pH:6)
İmatinib (mg)	7,13	6,28	6,08	6,35
Deksketoprofen (mg)	0,252	0,232	0,202	0,232
PEG2000 (mg)	-	-	2,56	-
Kuantum Noktacığı (mg)	12,53	10,08	10,67	10,27
TPP (mg)	26,52	25,52	25,44	26,42
Distile su (mL)	100	100	100	100

Erlotinib yüklü kuantum noktacıkları ile benzer şekilde hazırlanmışlardır. Ancak imatinibin suda çözünme problemi göstermemesinden dolayı etkin maddelerin çözeltileri yerine doğrudan katı halleri ilave edilmiştir. Sonrasında ise distile suda çözünmüş TPP, 10000 rpm hızdaki Ultraturrax® altına alınmış ve üzerine, cam damlalık yerine 1mL'lik cam enjektör kullanılarak, sonuç karışım damla damla ilave edilmiştir.

Kuantum noktacıklarının suyla kolayca karışamamasından dolaylı üretimlerinde değişikliğe gidilmiştir ve yapılarına mangan asetat eklenmiştir. 0,1 M çinko asetat ve 0,2 mM mangan asetat sulu çözeltisi; 0,2 M dietanolamin ve 14mmol oleik asit içeren sulu çözelti içerisine ilave edilmiştir. 30 dakika karıştırıldıktan sonra 80ºC'ye ısıtılmış ve bu sıcaklıkta 2 saat daha karıştırılmıştır. Daha sonra 20ºC'ye soğutulan bu çözelti

santrifüjlenmiş ve 2-propanol ile yıkanarak tekrar santrifüjlenmiş ve çökelti etüvde kurutularak ZnO kuantum noktacıkları kuru toz halinde elde edilmiştir. Bu şekilde çok daha küçük partikül boyutuna sahip kuantum noktacıkları elde edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan kuantum noktacıklarına etkin maddeler yüklenmiştir. Ayrıca azalmış kitozan konsantrasyonunda kör oluşturulmuştur (Çizelge 3.16).

Çizelge 3.16. Azalmış kitozan konsantrasyonunda kör hazırlanması

M a d d e	KÖR-4	KÖR-5
Kitozan çözeltisi (mL)	5,00mg/10mL	5,00mg/10mL
2,14N NaOH	0,5 mL (pH:6)	0,5 mL (pH:6)
PEG 2000 (mg)	-	1,94
PEG-FA	-	-
Kuantum Noktacığı (mg)	10,27	10,12
TPP (mg)	25,57	23,18
Distile su (mL)	100	100

5 mg kitozan tartıldıktan sonra glasiyal asetik asit içeren 10 mL distile suda dağıtılmış ve magnetik karıştırıcı altında bir gece bekletilmiştir. Kitozan çözeltisi (CH) NaOH sulu çözeltisi ile bazik pH'ya çekildikten sonra, cam bir tüpe tartılan QD üzerine 100 µL ile başlanarak geometrik seyreltme yöntemi ile kısım kısım kitozan çözeltisi eklenerek tamamen dağılması sağlanmıştır. Tamamı ilave edildikten sonra CH&QD karışımına etkin maddeler eklenmiştir. Tamamen berrak yapıda olan bu karışım, distile suda çözünmüş TPP içerisine 1 mL'lik cam enjektör ile damla damla ilave edilmiştir. QD kullanılarak hazırlanmış formülasyonların içerikleri Çizelge 3.17'de yer verilmiştir.

Çizelge 3.17. Suda kolayca dağılabilen kuantum noktacıkları formülasyonları

*	BOŞ-QD	BOŞ-QD-PEG	BOŞ-QD-PEG-FA	QD-İMA	QD-İMA-PEG	QD-İMA-PEG-FA	QD-ERLO	QD-ERLO-PEG	QD-ERLO-PEG-FA
QD	10	10	10	10	10	10	10	10	10
İMA	-	-	-	6	6	6	-	-	-
ERLO	-	-	-	-	-	-	6	6	6
DEX	-	-	-	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
PEG	-	2	-	-	2	-	-	2	-
PEG-FA	-	-	0,1	-	-	0,1	-	-	0,1
CH	5 mg / 10 mL konsantrasyonda kitozan çözeltisi								
NaOH	2,4 N sodyum hidroksit çözeltisi 0,4 mL								
TPP	25	25	25	25	25	25	25	25	25
D.Su	100	100	100	100	100	100	100	100	100

*Çizelge 3.17'de yer alan distile su mililitre diğer tüm maddeler ise miligram cinsinden verilmiştir.

Hazırlanan formülasyonlar 18000 rpm'de santrifüjlenmiş, süpernatant üzerinden miktar tayini yapılmış ve çökelti üzerinden de karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.16'da yer alan tüm formülasyonlar üzerinden elde edilen çökelti suda disperse edilmiş ve etkinlik çalışmaları yapılmıştır. Etkinlik çalışmaları *in vitro* ortamda yapılan etkin madde çıkış çalışmaları yanı sıra hücre kültürü üzerinde yapılan antikanser etkinliği ve hayvan çalışmalarını kapsamaktadır. Bu çalışmalar neticesinde en iyi formülasyon seçilmiş, seçilen formülasyon liyofilize edildikten sonra kapsüllere doldurularak karakterizasyon çalışmaları, *in vitro* ortamda etkin madde çıkış çalışması ve deney hayvanları üzerinde antikanser etkinlik çalışmaları tekrarlanmıştır.

Nanopartiküllerin hazırlanması

Nanopartikül (NP) formülasyonlarında; düşük molekül ağırlıklı kitozan ve asetik asit kullanılmıştır. İlk olarak çözünür halde kitozan elde etmek için uygun glasiyal asetik asit miktarı bulunması amacı ile Çizelge 3.18'de verilen formülasyon çalışmaları yapılmıştır.

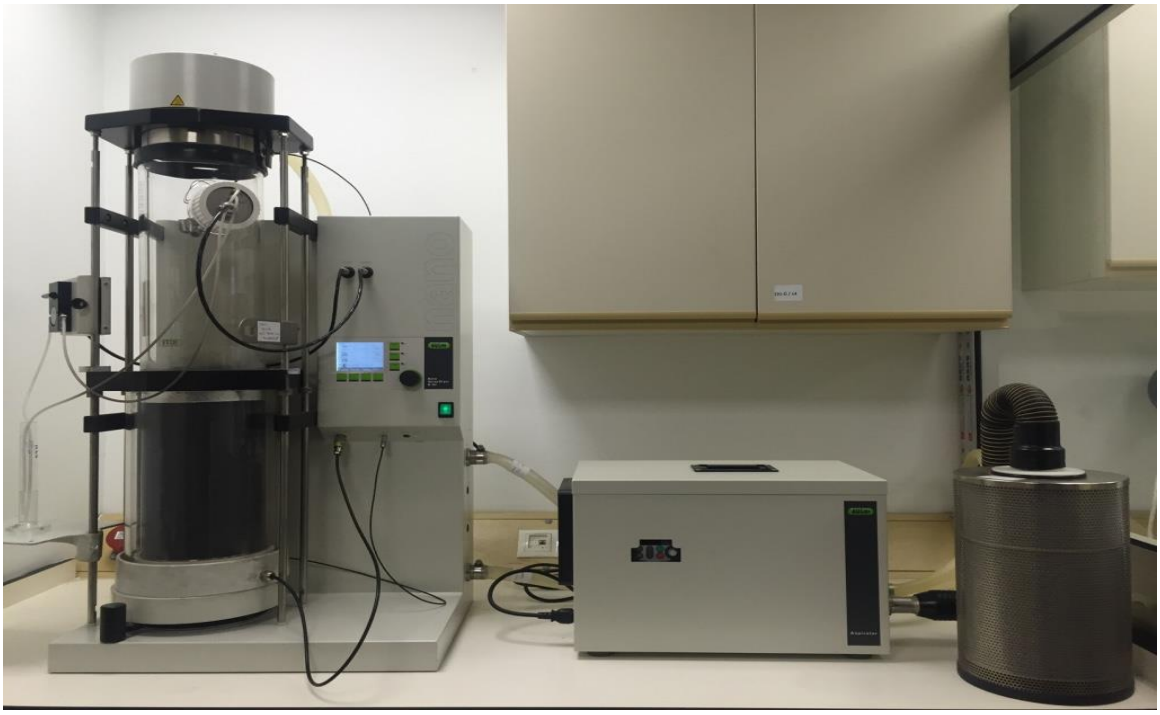
Çizelge 3.18. Farklı miktarlarda glasiyal asetik asit içeren kitozan formülasyonları

Formülasyon içeriği	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**
Kitozan	10mg	10mg	10mg	10mg
Glasiyal asetik asit	0,25 mL	0,10 mL	0,05 mL	0,025 mL
Distile su	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL

Formülasyonlar hazırlanırken; distile suyun bir yarısına glasiyal asit ilave edilmiş, diğer yarısında ise kitozan disperse edilmiştir. Daha sonra bu iki karışım birbirleri ile karıştırılmış ve magnetik karıştıcı altında 24 saat bekletilmiştir.

Uygun glasiyal asetik asit miktarı bulunduktan sonra kitozan çözeltileri Nano Spray Dryer B-90 (BUCHI) cihazında püskürterek kurutulmuştur. Nano Spray Dryer B-90 cihazı laboratuar ölçekli bir cihaz olup sprey başlığı, kurutma sistemi ve partikül toplayıcısı yönünden farklılık göstermektedir. Konvansiyonel püskürterek kurutma cihazlarında püskürtme başlığında atomizasyon merkezkaç kuvveti veya kinetik enerji ile elde edilirken bu sistemde piezoelektrik kristalinden enerji alan bir membranın yukarı-aşağı hareketi ile atomizasyon sağlanmaktadır. Kurutma sistemi ise, türbula akış yerine laminar akış ile sağlanmaktadır. Ayrıca, siklon partikül toplayıcı yerine elektrostatik partikül toplayıcı yer

almaktadır. Böylelikle bu yeni sistemde, yüksek ürün verimliliği ile daha homojen partiküller elde edilebilmektedir (Bürki ve diğerleri, 2011; Heng ve diğerleri, 2011; Lee ve diğerleri, 2011; Schmid ve diğerleri, 2011; Baba ve Nishida, 2012). Cihaza ait görüntü Resim 3.2'de yer almaktadır.



Resim 3.2. Nano Spray Dryer B-90 (BUCHI) cihazına ait görüntü

Kurutma öncesinde cihazda püskürtülecek sıvıya ilişkin belirli parametrelere bakılması ve cihazın etkinliğinin anlaşılması açısından farklı çözeltilerin kurutulması denenmiştir. Bu çalışmalar Çizelge 3.19'da yer almaktadır.

Çizelge 3.19. Nano Spray Dryer B-90 cihazında püskürtme etkinliği çalışmaları

Formülasyon içeriği	K1	K2	K3	K4
Etanol	x	5 mL	x	x
Tween80	x	x	500 mg	x
PEG	x	x	x	500 mg
Distile su	50 mL	45 mL	50 mL	50 mL

Çizelge 3.19'da yer alan çalışmalarda kullanılacak olan çözeltinin cihazın püskürtme özelliği üzerine etkisi incelenmiştir. Bunun için çözeltilerde yüzey gerilimi düşük etanol ve yüzey etkin maddelerinden olan Tween 80 veya PEG kullanılmıştır.

Kitozan nanopartikülleri eldesi için öncelikle etkin madde içermeyen kitozan çözeltileri püskürtülerek cihazda optimum çalışma koşulları belirlenmiştir. Cihaza ait değişkenlerin belirlenmesi amacı ile farklı sprey gücü yanı sıra farklı por çapına sahip püskürtme başlıkları (cap'ler) kullanılmıştır. Ayrıca polimer konsantrasyonun sonuç ürün kalitesi üzerine etkisinin incelenmesi amacı ile çözeltiler üzerinde de yoğunluk, damlacık büyüklüğü ve yüzey gerilimi özellikleri incelenmiştir.

Cihaza ait bazı parametreler cihazın kullanımı sırasında değiştirilebilirken bazı parametreler ise değiştirilememekte, çalışma koşullarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Cihazın değiştirilebilen parametreleri; pompa, püskürme gücü (spray gücü), püskürtmeyi sağlayan membran kısmının boyutu (spray cap boyutu), sıcaklık ve gaz akışıdır. Püskürtülecek sıvıyı püskürtmeyi gerçekleştiren başlık kısmına taşımaktan sorumlu pompa; püskürtülecek olan sıvının özelliğine göre seçilmektedir. Uygun pompa kullanılmaması durumunda herhangi bir şekilde püskürtme gözlenmemektedir. Çalışmalar sırasında hazırlanan tüm kitozan çözeltileri pompa 2 ile püskürtülmüştür. Spray gücü 10-100 arasında değişebilmekte olup yarı kapasite ve tam kapasite olmak üzere iki farklı spray gücü ile çalışılmıştır. Cihaza ait spray cap boyutları 4 µm; 5,5 µm ve 7 µm olmak üzere üç çeşittir. En küçük (4 µm) ve en büyük (7 µm) spray cap boyutları kullanılarak çalışmalar sürdürülmüştür. Ayrıca, püskürtme üzerine polimer konsantrasyonunun da etkisi olduğu düşünülerek iki farklı konsantrasyonda (10mg/100mL ve 20mg/100mL) çalışılmıştır.

Faktöriyel tasarım, birbirleri ile etkileşim içinde olabileceği düşünülen en az iki faktörün, en az ikişer seviyesinin ele alınması ile yapılan çalışmalardır (Akşehirli ve diğerleri, 2012). Cihaza ait bazı parametrelerin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli, çalışma süresi ve elde edilen ürün verimi üzerine etkisi faktöriyel tasarım yapılarak incelenmiştir. Faktöriyel tasarım incelenen parametrelerin belirlenen en düşük ve en yüksek değerleri göz önüne alınarak yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda "n" değeri parametre sayısını ifade etmek üzere 2^n formülü ile çalışılması gereken formülasyon sayısı bulunmaktadır. Çalışmada; polimer konsantrasyonu, spray gücü ve spray cap boyutu olmak üzere üç parametre belirlenmiş ve faktöriyel tasarım yapılarak 8 (2^n ve n:3 olmak üzere 2^3:8) farklı formülasyon üzerinden incelenmiştir. Bu formülasyonlara Çizelge 3.20'de yer verilmektedir. Bu parametrelerin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli, çalışma süresi ve elde edilen ürün verimi üzerine etkilerine ise "4. Bulgular" başlığı altında Çizelge 4.25'de yer verilmiştir.

Çizelge 3.20. Nano Spray Dryer B-90 cihazında kitozan NP'leri için optimizasyon çalışmaları

Formülasyon No	Kitozan Konsantrasyonu	Spray Gücü	Spray Cap Boyutu
N1	10µg/100mL	%100	7µm
N2	10µg/100mL	%100	4µm
N3	10µg/100mL	%50	7µm
N4	10µg/100mL	%50	4µm
N5	20mg/100mL	%50	4µm
N6	20mg/100mL	%50	7µm
N7	20mg/100mL	%100	4µm
N8	20mg/100mL	%100	7µm

Cihazın iç sıcaklığı ayarlanabilmekte olup 0-120ºC arasında değişebilmektedir. Sıcaklık, püskürtülecek olan çözeltinin sıvı kısmının uçurulması ile ilişkili olup yüksek sıcaklıklarda daha hızlı bir kurutma elde edilmektedir. Sıcaktan bozunmayan maddeler ile çalışıldığından; çalışmalar, cihaz en yüksek sıcaklık olan 120ºC'ye ayarlanarak gerçekleştirilmiştir. İç sıcaklığın (inlet sıcaklığı); oda sıcaklığından ayarlanan sıcaklığa kadar çıkması beklenmiş, iç sıcaklık istenilen sıcaklığa (120ºC'ye) ulaşınca püskürtme gerçekleştirilmiştir. Dış sıcaklık (outlet sıcaklığı) ve püskürtme başlığı sıcaklığı (head sıcaklığı) ise çalışma koşulları ve çalışma süresine göre değişmektedir. Basınç ise ayarlanabilen bir parametre olup püskürtme gücünü etkilemektedir. Gaz akışı ise basınca ve cihazın parçalarının birleştirilmesine göre değişkenlik gösterebilmektedir. Çalışmalar; 36 mbar basınç; 120 L/dk gaz akışında gerçekleştirilmiştir. Faktöriyel tasarım ile belirlenen formülasyonlara ait; cihazın çalışma koşullarına Çizelge 3.21'de yer verilmektedir.

Çizelge 3.21. Formülasyon üretiminde kullanılan çalışma koşulları

Parametreler	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8
Inlet sıcaklığı	120ºC	120ºC	120ºC	120ºC	120ºC	120ºC	120ºC	120ºC
Outlet sıcaklığı	45ºC	50ºC	52ºC	41ºC	52ºC	45ºC	40ºC	21ºC
Head sıcaklığı	70ºC	58ºC	80ºC	55ºC	75ºC	81ºC	54ºC	69ºC
Sıcaklık	120ºC	120ºC	120ºC	120ºC	120ºC	120ºC	120ºC	120ºC
Basınç (mbar)	38	37	34	38	35	36	36	36
Gaz akışı (L/dk)	120	118	110	120	112	117	117	115

Her bir kitozan çözeltisi için 20-50 mL çözelti püskürtülmüş ve elde edilen katı madde üzerinden karakterizasyon çalışmaları sürdürülmüştür. Resim 3.3'de cihazın püskürtme yapmasına ilişkin görüntüsüne yer verilmiştir.

Resim 3.3. Nanospray Dryer cihazı ile örneğin püskürtme görüntüsü

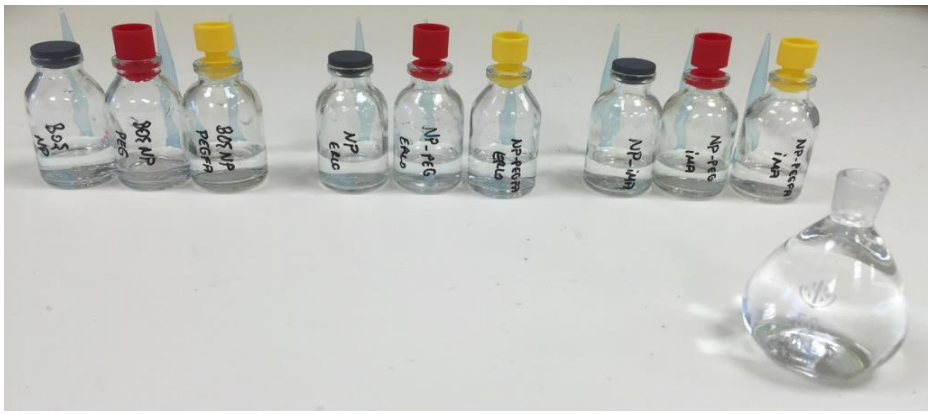
Etkin madde yüklenmesi için optimum çalışma şartları için N2 formülasyonu (10mg/mL kitozan konsantrasyonu, %100 spray kapasitesi, 4µm spray cap ile 120ºC sıcaklıkta, 38 mbar basınç altında) seçilmiştir. Ancak püskürtme işlemi sırasında gözlenen tıkanma ve buna bağlı olarak püskürtmenin durması gibi bazı aksaklıklar nedeniyle formülasyonlar 60 mbar basınç altında püskürtülmüştür. Bu koşullar altında temel alınan N2 formülasyonu yanı sıra PEG2000 ve DSPE-PEG2000-FA yüklü N2 formülasyonları da püskürtülmüş ve fonksiyonel grupları içeren NP'ler de elde edilmiştir. N2 formülasyonuna her iki etkin madde de yüklenmiştir. Püskürterek kurutma sistemi ile nanopartikül üretimi için etkin madde içermeyen kontrol grupları yanı sıra etkin madde içeren deney grupları ile 9 farklı formülasyon üzerinde çalışılmıştır. Nanopartiküllere ait formülasyon içerikleri Çizelge 3.22'de yer almaktadır.

Çizelge 3.22. Nanopartiküllerin formülasyon içerikleri

*	BOŞ-NP	BOŞ-NP-PEG	BOŞ-NP-PEG-FA	NP-İMA	NP-İMA-PEG	NP-İMA-PEG-FA	NP-ERLO	NP-ERLO-PEG	NP-ERLO-PEG-FA
CH	10	10	10	10	10	10	10	10	10
İMA	-	-	-	4,8	4,8	4,8	-	-	-
ERLO	-	-	-	-	-	-	3	3	3
DEX	-	-	-	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
PEG	-	2	-	-	2	-	-	2	-
PEG-FA	-	-	0,1	-	-	0,1	-	-	0,1
D.Su	100	100	100	100	100	100	100	100	100

*Çizelge 3.22'de yer alan distile su mililitre, diğer tüm maddeler ise miligram cinsinden verilmiştir.

Etkin madde içeren ve içermeyen tüm formülasyonlarda kullanılan kitozan konsantrasyonuna bağlı olarak püskürtme verimini etkileyebileceği düşünülen yoğunluk, yüzey gerilimi, damla hacmi ve viskozite değişimleri incelenmiştir. Bu amaçla ilk olarak formülasyonların gerçek dansiteleri piknometre ile ölçülmüş daha sonra ise Attension-Biolinscientific marka Theta Lite modelli yüzey gerilimi ölçüm cihazı ile formülasyonların damla hacimleri ve yüzey gerilimleri ölçülmüştür. Piknometre ile yoğunluk ölçümü sırasında çekilen görüntü Resim 3.4'te yer almaktadır.



Resim 3.4. Piknometre ile gerçek dansiteleri bulunan formülasyonlara ait görüntü

Ayrıca tüm formülasyonlar için elde edilen katı madde üzerinden de karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Formülasyonlara ait karakterizasyon çalışmaları; partikül

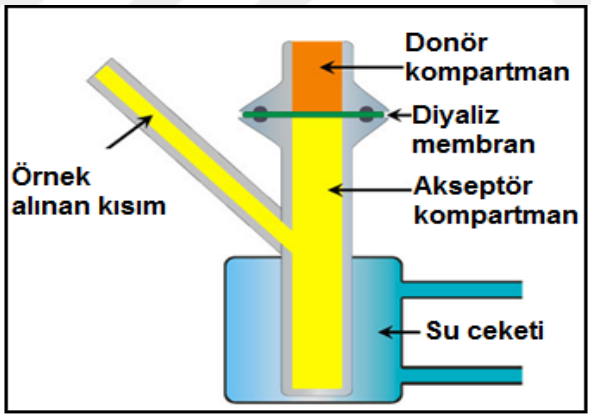
büyüklükleri ve dağılımları, zeta potansiyel ölçümleri, morfolojik incelemeleri, etkin madde yükleme kapasiteleri, cihaza ait verimlilik açısından incelenmiştir.

Taşıyıcı sistemlerin karakterizasyonları

Nano-taşıyıcılar üzerinde karakterizasyon çalışmaları; partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi ölçümleri, zeta potansiyel ölçümleri, morfolojilerinin görüntülenmesi, yükleme kapasiteleri ve ilaç yükleme etkinlikleri açısından değerlendirilmiştir. Ayrıca kuantum noktacıkları için AFM cihazında görüntüleme işlemi yapılmış; UV cihazında emisyon dalga boyunda ışıma yapıp yapmadıklarına ve partikül büyüklükleri ile ilişkilendirilen ışıma rengine bakılmıştır. Kitozan nanopartikülleri için ise; çözeltide yer alan katı madde içeriği ve elde edilen kuru toz üzerinden % verim hesaplanmıştır.

Formülasyonlarda yapılan *in vitro* salım çalışmaları

Diyaliz membran geçişleri ilk olarak Franz difüzyon hücreleri kullanılarak yapılmıştır. Franz difüzyon hücresinin şematik görünümü Şekil 3.2'de görülmektedir.



Şekil 3.2. Franz Difüzyon Hücresinin şematik görünümü

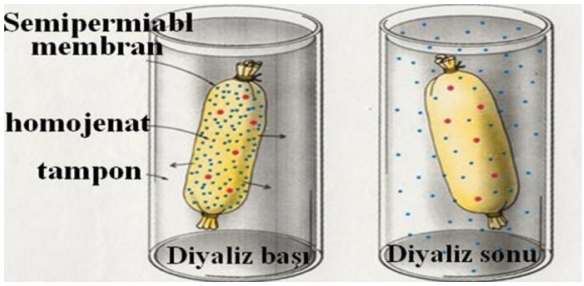
Donör kompartman, verici kısmı ifade etmekte olup etkin madde salımı takip edilecek formülasyon bu kısma yerleştirilmektedir. Akseptör kompartman ise; alıcı kısmı ifade etmekte olup etkin maddenin salım sonucu yer aldığı bölgedir. Bu kısımdan belirli aralıklarla numuneler alınarak bu zaman aralıklarında ne kadar madde yer aldığı tayin edilebilmektedir. Su ceketi, çalışma sıcaklığını korumaktadır. Diyaliz membran, Franz hücrelerinin orta kısmına yerleştirilmiştir. Hücrelerin alt kısmına ortam, üst kısmına ise geçişi incelenecek numune (1,5 mL) eklenmiştir. Ortam sıcaklığı 37ºC'de sabit tutulup,

sabit hızda karıştırma ile deney gerçekleştirilmiştir. 0,25.; 0,5., 1.,2., 4., 6., 12., 24., 48. ve 72. saatlerde alt kısımdan 2,5 mL örnek alınmış ve yerine 37ºC'ye getirilmiş taze ortam ilave edilerek deney sürdürülmüştür. Alınan örneklerdeki etkin madde miktarları UPLC ile tayin edilmiştir. Hücrelerden geçen % kümülatif etkin madde miktarları zamana karşı grafiğe geçirilerek, 72 saat sonunda % kümülatif geçen miktarlar hesaplanmıştır. Erlotinib çözeltisinin geçişi ile ilgili yapılan çalışmalar Çizelge 3.23'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.23. Erlotinib çözeltisinden geçiş çalışmaları

Membran	**Donör kompartman**	**Reseptör kompartman**
Diyaliz	%20EtOH:%80 Su	pH 7,4 Fos. Tmp:PG (40:60)
	%20EtOH:%80 Su	DMEM:PG (40:60)
	%20EtOH:%80 Su	%1 SDS 0,1 N HCl
	%20EtOH:%80 Su	pH 7,4 Fos. Tmp
	%20EtOH:%80 Su	DMEM
	%20EtOH:%80 Su	%20EtOH:%80 Su
Selofan	%20EtOH:%80 Su	%20EtOH:%80 Su
	%20EtOH:%80 Su	DMEM:PG (40:60)
	%20EtOH:%80 Su	DMEM
Diyaliz	%20PG:%80 Su	pH 7,4 Fos. Tmp:PG (40:60)
	%20PG:%80 Su	DMEM:PG (40:60)
	%20PG:%80 Su	pH 7,4 Fos. Tmp:PG (80:20)
	%20PG:%80 Su	pH 7,4 Fos. Tmp:PG (70:30)
	%20PG:%80 Su	pH 7,4 Fos. Tmp:PG (60:40)
	%5PG:%95 Su	pH 7,4 Fos. Tmp:PG (70:30)
	%20PG:%80 Su	pH 3 Asetat Tamponu
	%20EtOH:%80 Su	pH 3 Asetat Tamponu
	%20PG:%80 Su	pH 5,2 Asetat Tamponu
	%20EtOH:%80 Su	pH 5,2 Asetat Tamponu
	%20PG:%80 Su	1,875 mM Na-Taurokolat içeren pH 7,4 Fosfat Tamponu
	%20EtOH:%80 Su	1,875 mM Na-Taurokolat içeren pH 7,4 Fosfat Tamponu
	%20PG:%80 Su	pH 3 Ase. Tmp:DMEM (40:60)
	%20EtOH:%80 Su	pH 3 Ase. Tmp:DMEM (40:60)
	%20PG:%80 Su	pH 3 Ase. Tmp:DMEM (60:40)
	%20EtOH:%80 Su	pH 3 Ase. Tmp:DMEM (60:40)
	%40PG:%60 pH3 Asetat Tamp.	pH 3 Ase. Tmp:PG (60:40)
	%40PG:%60 pH7,4 Fos	pH 7,4 Fos. Tmp:PG (60:40)
	%20PG:%80 Su	pH 3 Ase. Tmp

Franz hücresi kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda en yüksek etkin madde salımı pH 3 asetat tamponu sisteminde elde edilmiştir ancak çözeltinin salımı %100'e ulaşmadığı için Franz hücresi yerine diyaliz torbası kullanılarak bu tamponda salım çalışmaları tekrarlanmıştır. Şekil 3.3'de diyaliz torbanın şematik görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 3.3. Diyaliz torbası yönteminin şematik görünümü

Diyaliz membran alt ucundan bağlanmış, geçişi incelenecek numune (1,5 mL) torbanın iç kısmına eklenmiş ve torba oluşturmak üzere membran üst ucundan tekrar bağlanmıştır. Torbanın beher içinde dik konumda durmasını sağlamak için torbanın alt ucuna ayrıca ağırlık bağlanmıştır. Ortam sıcaklığı 37ºC'de sabit tutulup, 200 mL ortam hacmi ile sabit hızda karıştırma yapılarak deney gerçekleştirilmiş, belirli saatlerde alt kısımdan 2 mL örnek alınıp yerine 37ºC'ye getirilmiş taze ortam ilave edilerek deney sürdürülmüştür. Alınan örneklerdeki etkin madde miktarları UPLC ile analiz edilmiştir. Hücrelerden geçen % etkin madde miktarları zamana karşı grafiğe geçirilerek, 72 saat sonunda % salınan etkin madde miktarları hesaplanmıştır. Her iki taşıyıcı sistem için de; bu sistemlerde yalnızca etkin madde içeren, etkin madde yanı sıra PEG içeren ve etkin madde yanı sıra PEGFA içeren formülasyonlar için salım çalışmaları sürdürülmüştür. İsimlendirme aşağıdaki çizelgede verildiği gibi yapılmıştır.

Çizelge 3.24. Taşıyıcı sistemlerin isimlendirilmeleri

Formülasyon İsmi	Taşıyıcı Sistem	Etkin Madde*	Fonksiyonel Grup
QD-ERLO	Kuantum noktacığı	Erlotinib	x
QD-ERLO-PEG	Kuantum noktacığı	Erlotinib	PEG
QD-ERLO-PEGFA	Kuantum noktacığı	Erlotinib	PEGFA
QD-İMA	Kuantum noktacığı	İmatinib	x
QD- İMA-PEG	Kuantum noktacığı	İmatinib	PEG
QD- İMA-PEGFA	Kuantum noktacığı	İmatinib	PEGFA
NP-ERLO	Nanopartikül	Erlotinib	x
NP -ERLO-PEG	Nanopartikül	Erlotinib	PEG
NP -ERLO-PEGFA	Nanopartikül	Erlotinib	PEGFA
NP -İMA	Nanopartikül	İmatinib	x
NP - İMA-PEG	Nanopartikül	İmatinib	PEG
NP - İMA-PEGFA	Nanopartikül	İmatinib	PEGFA

*Etkin madde içeren tüm formülasyonlarda DEX de yardımcı etkin madde olarak yer almaktadır.

Formülasyonların reaksiyon kinetiklerinin belirlenmesi

Formülasyonlarda yapılan *in vitro* salım çalışmaları sonucunda elde edilen çözünme hızı grafikleri değerlendirilerek hangi formülasyonun hangi salım kinetiğine uyduğu belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla; sıfırıncı derece, birinci derece, Weibull salım kinetiği, Higuchi salım kinetiği, Korsmayer-Peppas salım kinetiği ve Hixon-Crowell salım kinetiği değerlendirilmiştir. Kinetikler ile ilgili formüller ve bu kinetiklerin kullanım yerleri aşağıda yer almaktadır (Eryol ve Öner, 2005; Dash ve diğerleri, 2010).

Sıfırıncı Derece Salım Kinetiği;

$$Q_t = Q_0 - k_0 t$$

Eşitlikte; t, zamanı; Q_t, t zamanında çözünmüş etkin madde miktarını; Q_0, başlangıçtaki etkin madde miktarını ve k_0 ise sıfırıncı derece salım sabitini ifade etmektedir.

Zamana karşı çözünmüş etkin madde miktarının grafiğe geçirilmesi ile r^2 doğrusallık değeri, eğim (m) değeri ve kesişim (n) değeri hesaplanmaktadır.

Bu salım kinetiği; transdermal sistemler, suda az çözünen etkin madde yüklü kaplı matris tabletler veya osmotik sistemler için olduğu gibi modifiye salım yapan farmasötik dozaj formları için de uygulanabilmektedir.

Birinci Derece Salım Kinetiği;

$$\ln Q_t = \ln Q_0 - k_1 t$$

Eşitlikte; t, zamanı; Q_t, t zamanında çözünmüş etkin madde miktarını; Q_0, başlangıçtaki etkin madde miktarını ve k_1 ise birinci derece salım sabitini ifade etmektedir.

Zamana karşı çözünmüş etkin madde miktarının "*ln*" değerinin grafiğe geçirilmesi ile r^2 doğrusallık değeri, eğim (m) değeri ve kesişim (n) değeri hesaplanmaktadır.

Bu salım kinetiği; poröz matrislerden suda çözünebilirliği yüksek etkin maddeleri içeren farmasötik dozaj şekilleri için uygun bulunmaktadır.

Weibull Salım Kinetiği;

$$\log [-\ln (1 - m)] = b \log (t - T_i) - \log a$$

Eşitlikte; *a*, işlem sırasındaki zaman skalasını; *b*, şekil faktörünü; T_i, salım öncesinde gerçekleşen gecikme süresini (lag time); m ise zamana bağlı olarak açığa çıkan etkin madde miktarını belirtmektedir.

Zamanın logaritmik değerine karşı –ln(1-çözünmüş etkin madde miktarı)'nın logaritmik değeri grafiğe geçirilerek yorumlanmaktadır. r^2 doğrusallık değeri, eğim (m) değeri yani şekil faktörü ve kesişim (n) değeri hesaplanmaktadır. Şekil faktörü; 1, 1'den büyük veya 1'den küçük olmak üzere üç farklı biçimde değerlendirilmektedir. Şekil faktörünün 1 değerinde olması eğrinin eksponansiyel; 1 değerinden büyük olması, eğrinin sigmoidal ve 1 değerinden küçük olması da eğrinin parobolik olduğunu belirtmektedir.

Bu salım kinetiği; genel bir kinetik olup hemen her çözünme eğrisine uygulanabilmektedir. Özellikle matris tipi yapılardan etkin madde salımını değerlendirmek için kullanılmaktadır.

Higuchi Salım Kinetiği;

$$Q = A \sqrt{D (2C - C_s) C_s t}$$

Eşitlikte; t, zamanı; Q, birim alandan birim zaman aralığında çıkan etkin madde miktarını; A, yüzey alanını; C, etkin maddenin başlangıç konsantrasyonunu; C_s, etkin madde çözünürlüğünü; D, ise difüzyon katsayınısı ifade etmektedir.

Zamanın karekökü değerine karşı birim zamanda açığa çıkan etkin madde miktarının grafiğe geçirilmesi ile r^2 doğrusallık değeri, eğim (m) değeri ve kesişim (n) değeri hesaplanmaktadır.

Bu kinetik; pek çok modifiye salım gösteren farmasötik dozaj şekillerine, transdermal sistemlere ve suda çözünebilir etkin madde içerikli matris yapılı tabletler için uygulanabilmektedir.

Hixon-Crowell Salım Kinetiği;

$$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = k_s \ t$$

Eşitlikte; t, zamanı; W_0, dozaj şeklinde yer alan etkin maddenin başlangıç miktarını; W_t, t zamanında farmasötik dozaj şekli içerisinde kalan etkin madde miktarını ve k_s ise yüzey-hacim ilişkisini içeren sabiti ifade etmektedir.

Zamana karşı, dozaj şeklinde bulunan etkin maddenin başlangıç değerinin küp kökü ile birim zamanda açığa çıkan etkin maddenin küp kökü arasındaki farkın grafiğe geçirilmesi ile r^2 doğrusallık değeri, eğim (m) değeri ve kesişim (n) değeri hesaplanmaktadır.

Bu model; etkin maddenin tablet dozaj formu gibi düz bir yüzeyden salım gerçekleştirdiğini göstermektedir. Tablet çapının küçülmesine paralel olarak etkin maddenin salımının gerçekleştiği yüzey de küçülmektedir. Bu modele bağlı olarak etkin madde salımını gerçekleştiren dozaj şekillerinde, dozaj formu geometrik yapısını zaman içerisinde korumaktadır.

Korsmayer-Peppas Salım Kinetiği;

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n$$

Eşitlikte; t, zamanı; M_t/M_∞, birim zamanda açığa çıkan etkin madde miktarını; K, salım sabitini ve n ise salım sembolünü ifade etmektedir. “n” salım sembolü ise aldığı değerlere göre etkin maddenin Fick difüzyon kanununa uyduğunu veya bu kanundan sapmalar gösterdiğini belirtmektedir.

Zamanın logaritmik değerine karşı, açığa çıkan etkin madde miktarının kümülatif yüzdesinin logaritmik değerinin grafiğe geçirilmesi ile r^2 doğrusallık değeri, eğim (m) değeri ve kesişim (n) değeri hesaplanmaktadır.

Silindirik yapılı matris film tabletleri için uygunluk göstermektedir.

3.2.3. Hücre çalışmaları

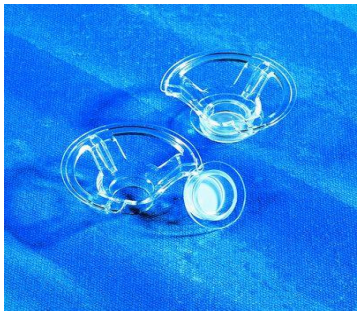
Caco-2 hücrelerinden geçiş çalışmaları

Caco-2 hücrelerinin üretilmesi

-196ºC'de dondurularak saklanmış hücreler çıkartılarak 37ºC'lik su banyosunda çözülmüş 800 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış ve çökelti, 5 mL %10'luk fötal bovin serum, %1 sodyum bikarbonat (toplamda %7.5 olacak şekilde) ve %1 içeren DMEM ile homojenize edilip 25 cm^2'lik doku kültürü şişesine alınmıştır. Hücreler, 48 saatte bir ortam taze DMEM'le değiştirilerek doku kültürü şişesi içinde 37ºC'de CO_2'li etüvde üremeye bırakılmıştır. Hücrelerin üreme durumları mikroskop ile kontrol edilerek hücrelerin %100 tek tabaka şeklinde ürediği görüldükten sonra 75 cm^2'lik doku kültürü şişesine pasajlama yapılmıştır. Doku kültürü şişesinin yüzeyine tutunmuş hücreleri uzaklaştırmak için tripsinizasyon işlemi uygulanmıştır. Tripsinizasyon işleminin ardından hücreler tripan mavisi ile boyanarak, bruker lamında mikroskop ile sayılmıştır. Hücre yoğunluğu hesaplanmış, Caco-2 hücrelerinin mililitresinde 80000 hücre olacak şekilde DMEM ile seyreltme yapılmıştır. Hücreler hazırlandıktan sonra filtreler üzerine aktarılıp 48 saatte bir ortam tazelenmiştir. Caco-2 hücrelerinin tek tabaka oluşturması için gerekli süre 21 gündür. Hücre kültürü geçişi için kullanılan bu hücreler ŞAP Enstitüsü Hücre ve Virüs Bankası'nda üretilmiştir.

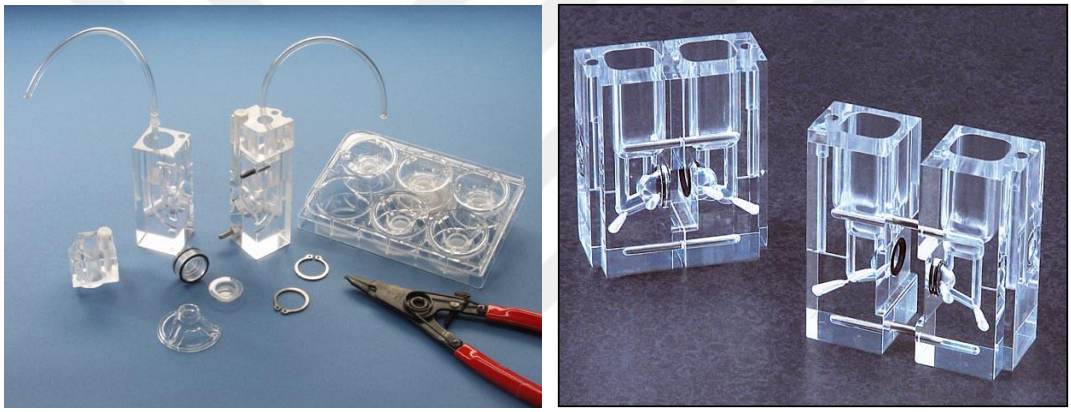
Geçiş çalışmaları

Geçiş çalışmalarında kullanılan Caco-2 hücreleri, Resim 3.5'de görülen 0,4 µm por çaplı polikarbonat filtreler üzerinde üretilmiştir. Üzerinde hücre tek tabakası olan filtreler, dikey difüzyon hücresinin apikal ve bazolateral kısımlarının ara bölümüne yerleştirildikten sonra apikal kısımdan bazolateral kısma doğru geçişler incelenmiştir.



Resim 3.5. Dikey difüzyon hücreleriyle kullanılan polikarbonat membranlar

Geçiş çalışmalarında dikey difüzyon hücresinin (Resim 3.6) apikal kısmına DMEM içerisinde hazırlanan çözelti, basolateral kısmına da 4mL DMEM ilave edilmiştir. Bazolateral kısma İMA ve DEX formülasyonları için 4mL DMEM, ERLO ve DEX formülasyonları için ise 4mL PG:DMEM (40:60) ilave edilmiştir. Apikal kısma ise; kontrol grubu olarak kullanılacak olan etkin madde çözeltileri için; İMA ve DEX'in belirlenen miktarları, 4 mL DMEM içerisinde; ERLO ve DEX'in belirlenen miktarları ise 4 mL PG:DMEM (40:60) içerisinde çözülmüş ve yaklaşık 2,5 mL kadarı ilave edilmiştir. Formülasyonlarda yapılan geçiş çalışmaları için ise; belirlenen miktarda etkin madde içeren kuantum noktacıkları ve nanopartiküller içeriğindeki etkin maddeye göre DMEM veya PG:DMEM (40:60) ile 4 mL hacme tamamlanmış ve yaklaşık 2,5 mL kadarı ilave edilmiştir.



Resim 3.6. Hücre geçiş çalışmalarında kullanılan dikey difüzyon hücresi ve parçaları

0,25.; 0,5.; 1.,2., 4., 6., 12., 24., 48. ve 72. saatlerde bazolateral kısımdan 4 mL örnek alınmış ve yerine 37 ºC'ye getirilmiş taze ortam ilave edilmiştir. Alınan 4mL örneklerdeki etkin ve yardımcı etkin maddeler için miktar tayini UPLC ile yapılmıştır. Hücrelerden geçen % kümülatif ilaç miktarları zamana karşı grafiğe geçirilerek madde geçişleri yorumlanmıştır.

Salım ve geçiş çalışmalarına göre permeabilite katsayılarının hesaplanması

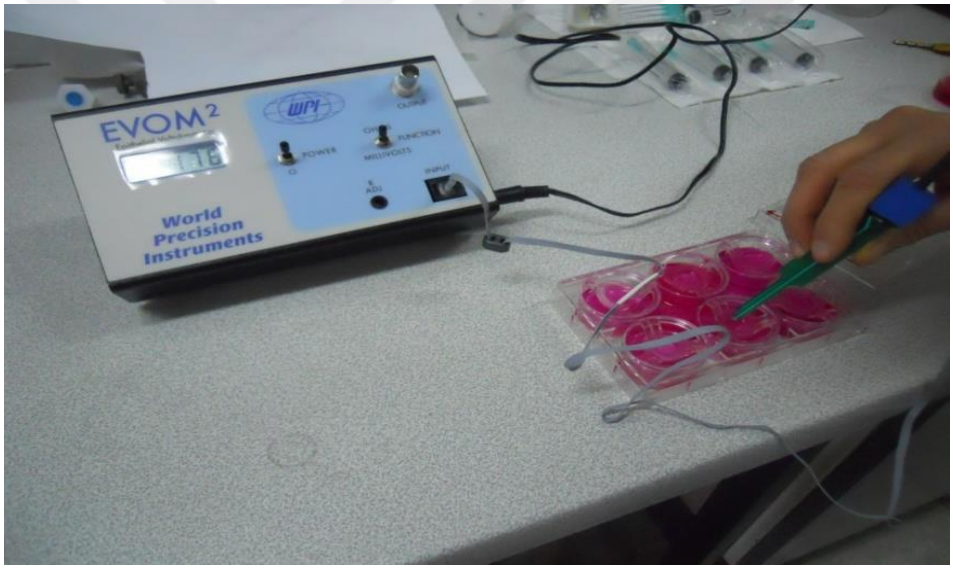
Permeabilite katsayısı, membran yüzeyinden etkin maddenin geçişini ifade eden bir değer olup aşağıdaki formül ile hesaplanmaktadır.

$P_{app} = (dQ / dt) / (A \times C_0)$

Eşitlikte belirtilen; P_{app}, permeabilite katsayısı; (dQ / dt), birim zamandaki permeabilite hızı; A, membran alanı ve C_0, başlangıç konsantrasonu anlamına gelmektedir.

Hücre bütünlüklerinin değerlendirilmesi

Hücre kültürlerinde hücre bütünlüğünün tespitinde kullanılan yöntemlerden biri elektriksel direncin ölçülmesidir. Bu amaçla, çalışmamızda Evom Voltmeter direnç ölçüm aleti kullanılmıştır. Cihaz transepitelyal elektriksel direnci (Transepithelial Electrical Resistance (TEER)) ölçmeye yaramaktadır ve bu dirençteki azalma veya düşüş membran yapısının bozulduğuna işaret etmektedir. Elektrotlardan biri DMEM'li ortama (basolateral kısım), diğeri ise hücre tabakasına (apikal kısım) daldırılarak değerler ohm (Ω) cinsinden ölçülmüştür (Resim 3.7).



Resim 3.7. Evom Voltmeter ® aleti ile TEER ölçümü

Antitümöral etkinliğin değerlendirilmesi

Fibrosarkomalı hücreler ŞAP Enstitüsünde üretilmiştir. Fibrosarkomalı hücreler üzerine formülasyonlar eklenerek formülasyonun etkisi incelenmiştir.

Fibrosarkomalı hücrelerinin üretilmesi

Fibrosarkomalı hücreler ŞAP Enstitüsünde üretilmiştir. WEHI 164 (ATCC® CRL-1751™) adlı fibrosarkomalı farelerden elde edilmiş fibrosarkom hücreleri kullanılmıştır. ATCC®

Numarası CRL-1751™ Organizma olarak fare kullanılmıştır. Metilkolantrenle uyarılarak fibrosarkoma oluşturulmuş hücreler kullanılmıştır.

Fibrosarkomalı hücreler üzerinde antitümöral etkinliğin incelenmesi

Antitümöral etkinliğin incelenmesi amacı ile fibrosarkoma oluşturulmuş WEHI 164 hücreleri kullanılmıştır. Değerlendirme çalışmalarında MTT yöntemi esas alınmıştır. Bu yöntem; daha önce bahsedildiği üzere tetrazolyum redüksiyonuna dayanmaktadır. Çözünmüş MTT maddesi, dehidrogenaz enzimleri aracılığı ile katalizlenerek mor renkli formazana dönüşmektedir. Çalışma, dikeyde 8 yatayda 12 kuyucuk olmak üzere 96 kuyucuklu plakalarda gerçekleştirilmiştir. Her bir plakada yer alan ilk ve son üç sıra kuyucuklar kontrol grubu olarak bırakılmış orta alanda yer alan kuyucuklarda her bir formülasyon 24 paralel olacak şekilde çalışılmıştır.

Fibrosarkomalı hücreler üzerine formülasyonların antikanserojen etkileri incelenmiştir. Bunun için yapılan literatür taramasından sonra; erlotinib HCl için farelerde dağılma hacmi (Vd) 84,8 ml, imatinib mesilat için ise 43,2 ml olarak bulunmuştur. Formülasyonlar fibrosarkoma hücrelerine etkin maddelerin dağılma hacimlerine göre hesaplanan miktarları laminar akış altında DMEM ortamında hazırlanıp süzülerek verilmiştir ve 72 saat CO_2'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 72 saat sonra hücre sayımı yapılmış ve formülasyonların fibrosarkomalı hücreler üzerine etkinliği spektrofotometrik yöntem ile kontrol grubuna karşı değerlendirilmiştir.

Kontrol grubu antitümöral ajana maruz kalmadığından kontrol grubunda hücre canlılığının yalnızca çevresel koşullardan etkileneceği düşünülmüştür. Bu nedenle kontrol grubunun canlılığı yüzde 100 kabul edilmiştir. Spektrofotometrik analiz sonucu kontrol grubunun absorbans değerleri 100 alınarak, deney gruplarının (formülasyon uygulanan tüm hücreler) absorbans değerleri yüzde olarak bulunmuştur. Yüzde canlılık olarak bulunan bu değer; formülasyon uygulaması sonrasında sağ kalımı ifade etmektedir. Formülasyonların antitümöral etkinliklerinin hesaplanması amacı ile bu değer 100'den çıkarılmıştır. Bu sayede, ölen hücre yüzdesi bulunmuştur.

3.2.4. Deney hayvanı çalışmaları

Farmakokinetik parametrelerin hesaplanması

Sağlıklı, 30 g ağırlığındaki, erkek Balb-C tipi fareler deney hayvanı olarak kullanılmıştır. Her bir grupta 5 hayvan olacak şekilde gruplara ayrılan hayvanlara belirlenen dozda etkin madde içeren formülasyonlar oral olarak uygulanmış, ilaç uygulamasını takiben hayvanlardan 0,25.; 0,5.; 1., 2., 4.; 6. ve 24. saatlerde intrakardiyak kan alınmıştır. Alınan kan örnekleri üzerine 0,3 mL heparin ilave edilmiş, karıştırılmış, sonrasında ise 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Bu şekilde elde edilen süpernatant yani plazma ile işlem yapılmıştır. Alınan plazma üzerine, plazma miktarının 3 katı kadar asetonitril ilave edilmiş, 30 saniye vorteks ile karıştırılmış ve 4ºC'de 15000 rpm'de 10dakika santrifüj edilmiştir. Miktar tayinleri; süpernatant üzerinden UPLC cihazı kullanılarak validasyon kısmında belirtilen koşullarda yapılmış elde edilen sonuçlar ile ilaca ait farmakokinetik parametreler hesaplanmıştır.

Kalibrasyon örnekleri İMA ve DEX içeren asetonitril çözeltisinde veya ERLO ve DEX içeren asetonitril çözeltisinde hazırlanmıştır. Tayinler 348 kuyucuklu UPLC plakalarında, tüm numunelerin 0,22 µL membran filtreden süzülmesi işlemini takiben gerçekleştirilmiştir. Miktar tayinleri sonrasında; numunelere ait verilerin kan konsantrasyonları-zaman grafikleri Kinetica 5.0 programı kullanılarak çizilmiştir. Ayrıca bu program ile Cmax (maksimum kan konsantrasyonu), tmax (maksimum kan konsantrasyonuna ulaştığı zaman), AUC (eğri altında kalan alan), $t_{1/2}$ (yarılanma ömrü) gibi farmakokinetik parametreler hesaplanmıştır.

Deney hayvanlarında antikanser etkinliğin incelenmesi

Formülasyonların antikanser etkinliğinin deney hayvanları ile incelenmesi için öncelikle deney hayvanlarında fibrosarkoma oluşturulmuş, sonrasında ise fibrosarkoma oluşturulmuş hayvanlara ilaç uygulaması yapılmıştır. İlaç etkinlikleri; tümör büyüklüklerinin ölçülmesi, tümörlerin histopatolojik olarak incelenmesi, ilaca ait doku dağılımlarının incelenmesi, ilacın tümör bölgesindeki enzim aktivitelerinin kitler aracılığıyla değerlendirilmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Deney hayvanlarında fibrosarkoma oluşturulması

Deney hayvanlarında fibrosarkoma oluşturulması için Balb-C tipi, erkek, ortalama 30 gram ağırlığındaki farelere subkutan olarak ense kısımlarına 5mg/mL dozda susam yağında çözündürülmüş metilkolantren 200µL hacimde uygulanmıştır. Fibrosarkoma oluşumu 4-6 haftada gözlemlenmiştir.

Fibrosarkomalı deney hayvanlarına ilaç uygulanması

Fibrosarkomalı deney hayvanları kontrol grubu ve uygulanacak her formülasyon için 5 hayvan olacak şekilde gruplara ayrılmıştır. Hazırlanan formülasyonlar gruplara çözelti halinde; ERLO içeren formülasyonlarda 0,5 mg/µl/kg; İMA içeren formülasyonlarda ise 0,8 mg/µl/kg dozda 2 hafta boyunca gün aşırı uygulanmıştır. Hayvanlar Resim 3.8'de görüldüğü gibi tutulup çözelti halindeki formülasyonlar oral yoldan uygulanmıştır.

Resim 3.8. Deney hayvanları çalışmaları

Çözelti halinde oral yoldan verilen formülasyonların deney hayvanları üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

Fibrosarkomalı deney hayvanlarında ilaç etkinliklerinin değerlendirilmesi

Fibrosarkomalı deney hayvanlarında ilaç verilmeden önce ve ilaç uygulamasını takip eden 1. ve 2. haftalarda ağırlık ölçümü ve tümör büyüklüğü ölçümü yapılmıştır. İlaç uygulamasının bitmesi ile deney hayvanları sakrifiye edilmiş ve deney hayvanlarının tümör, karaciğer, dalak ve akciğer dokuları alınmıştır. Tümörler histopatolojik olarak

incelenmiştir. İlaca ait doku dağılımları yanı sıra ilaçların tümör bölgesindeki enzimsel etkinliği de enzim aktivite kitleri kullanılarak incelenmiştir.

Tümör büyüklüklerinin ölçülmesi

Fibrosarkomalı deney hayvanlarına ilaç uygulamasından önce tümör büyüklükleri ölçülmüş, 15,62 ± 1,60 mm tümör çapındaki fareler ile çalışılmıştır. İlaç uygulanmasından hemen önce ve ilaç uygulandıktan sonraki ilk hafta ile tedavi bittikten sonra tümör büyüklükleri kumpas yardımı ile ölçülmüştür (Resim 3.9).

Resim 3.9. Fibrosarkomalı deney hayvanlarında tümör büyüklüklerinin ölçülmesi

Tümörlerin histopatolojik olarak incelenmesi

Histopatolojik incelemede bütün deney farelerinden alınan deri ve tümör örnekleri %10'luk formaldehid solüsyonunda tespit edilmiştir. Ardından, doku örnekleri alkol ve ksilen serilerinin bulunduğu histokinet'te (Leica, TP1020) dehidre edilerek parafine transversal olarak gömülmüştür. Parafine gömülen doku örnekleri mikrotomda (Leica, RM2125RT) 4 mikron kalınlığında kesilmiş, kesilen deri ve tümör örnekleri Hematoksilen Eozin boyama yöntemi ile boyanmıştır. Boyanan kesitler araştırma mikroskobunda (Nikon, Eclipse E600, Nikon Corporation, Japan) incelenerek değerlendirilmiş ve Nikon digital-sight görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir.

Meydana gelen tümörler semi-kantitatif olarak aşağıda detaylandırılan kriterlere göre değerlendirilmiştir. Bu değerlendirilmede WHO'nun insan yumuşak doku tümörlerinin tiplendirilmesi ve derecelendirilmesinde kullanılan kriterler dikkate alınmıştır (Fletcher ve ark., 2006). Bu bağlamda fibrosarkom ve rhabdomyosarkom özellikleri taşıyan tümörlerin derecelendirilmesinde; (a) hücresel farklılaşma, (b) tümörde nekroz ve (c) mitoz oranları

ayrı ayrı incelenmiş ve lezyon yok (0), hafif (1), orta (2) ve belirgin (3) olacak şekilde skorlanmıştır. Buna göre; tümör hücreleri (a) hücresel farklılaşma yönünden; olgun mezenkimal hücrelere benzer (1); tümör hücrelerinde orta derecede anizositozis ve anizokaryozis (2); tümör hücrelerinde belirgin anizokaryozis, anizositozis ve anaplastik özellikler (3) şeklinde derecelendirilmiştir. (b) Tümörde nekroz bulunup bulunmamasına göre ise; tümörde nekroz yok (1), tümör hücrelerinin %1-%49'unda nekroz (2), tümör hücrelerinin %50 ve üstünde nekroz (3) olarak belirtilmiştir. Tümörde mitoz bulunup bulunmamasına göre; mikroskopta 40x10'luk büyütme (400 final magnifikasyon) ile 10 ayrı alanda 1-9 arası mitotik figür (1), 10-19 arası mitotik figür (2), 20 ve üzeri mitotik figür (3) olacak şekilde derecelendirilmiştir. Her bir derecelendirmeden elde edilen skorların toplamına göre tümörler ayrıca derecelendirilmiştir (Grading). Buna göre final skoru toplam 1-4 arasında olan tümörler Derece I; final skoru 5-6 olanlar Derece II; final skoru 7-9 arasında olanlar ise Derece III olacak şekilde değerlendirilmiştir. Ayrıca, tümörlerin değerlendirilmelerinde lenfositik infiltrasyon, kanamalar, tek ve çok çekirdekli tümör hücrelerinin varlığı ve yaygınlığı da ayrı ayrı değerlendirilmiş ve hafif (1), orta şiddette (2) belirgin (3) olacak şekilde derecelendirilmiştir. Fakat bu derecelendirmeler tümör farklılaşmasının belirlenmesinde dikkate alınmamıştır.

Çalışmada, bazı farelerde şekillenen rhabdomyosarkom, fibrosarkom gibi mezenkimal kaynaklı tümörler yanında epitel kaynaklı, yassı (skuamöz) hücreli kansere (SCC) ait özellikler de sergilendiği dikkati çekmiştir. Bu nedenle, tesbit edilen SCC'lerin de derecelendirilmeleri ayrıca yapılmıştır. SCC'lerin derecelendirilmeleri yapılırken Carvalho ve ark. (2005) ile Goldschmidt ve Shofer (1992)'nın uyguladıkları sistem temel alınmıştır. Buna göre; histopatolojik incelemelerde hücreler arası belirgin köprüler ile birbirlerine bağlanan büyük tümör adacıkları, belirgin keratin incileri ve skuamöz farklılaşma sergileyen tümörler iyi differensiye olarak gruplandırılmıştır (Derece I). Yine, orta derecede keratinizasyon sergileyen ve küçük veya orta büyüklükte keratin incileri bulunduran fakat tümör adacıklarının boyutları daha küçük olan tümörler orta derecede differensiye olarak gruplandırılmıştır (Derece II). Diğer yandan, keratinizasyon sergilemeyen, ya da çok az keratinizasyon görülen, az sayıda küçük tümör adacıkları bulunduran ve keratin incileri bulundurmayan tümörler ise az differensiye olarak gruplandırılmıştır (Derece III).

Deney hayvanlarında ilaca ait doku dağılımlarının incelenmesi

Hayvanların sakrifiye edilmeleri sonrasında dalak, karaciğer ve akciğer dokuları alınmıştır. Deney gruplarındaki kontrol grupları dahil tüm hayvanların organları tartılmıştır. Organlardaki etkin maddenin açığa çıkması amacıyla tartılan organlar ilk olarak küçük küçük parçalara ayrılacak şekilde iyice parçalanmıştır. Parçalanan bu organlar tüplere alınmıştır. Tartılan dalak ve akciğer organları üzerine; bir gram organ üzerine 10 mL olacak şekilde asetonitril ilave edilmiştir. İlave edilen asetonitril miktarının mL'sine karşılık 0,75 dakika homojenize edilmiştir. Karışım 4ºC'de 15000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant üzerinden nanodrop aleti ile tayin yapılmıştır. Tartılan karaciğer organları üzerine ise; bir gram organ üzerine 2mL olacak şekilde asetonitril ilave edilmiştir. İlave edilen asetonitril miktarının mL'sine karşılık 0,75 dakika homojenize edilmiştir. Karışım 4ºC'de 15000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar 1:10 oranında seyreltildikten sonra nanodrop aleti ile tayin yapılmıştır. Nanodrop aleti; UV spektrofotometre prensibi ile çalışmakta olup maddenin verdiği absorbans değerleri üzerinden sonuç elde edilmektedir. Tayinler; kontrol grubu kullanılarak cihazın okuduğu değerin sıfırlanırlanması sonrasında örneklerin okutulması ile yapılmıştır. Kontrol grubundan alınan doku örneği ile cihaz sıfırlandıktan sonra formülasyon verilmiş hayvanların ilgili dokuları okutularak absorbans değerleri elde edilmiştir. Etkin maddelerin bilinen konsantrasyonları üzerinden kalibrasyon denklemi elde edilmiş ve bu denklem aracılığı ile miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir.

İlaçların tümör bölgesindeki enzimsel etkinlikleri açısından incelenmesi

ERLO, İMA ve DEX ile bunların kombine hallerini içeren çözelti formülasyonları, nanotaşıyıcı sistemler ve etkin madde içermeyen boş nanotaşıyıcı sistemler tedavi protokolüne göre 2 hafta boyunca gün aşırı olmak kaydıyla tümörlü hayvanlara uygulandıktan sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir ve tümör dokuları enzimatik açıdan da incelenmiştir. Kitlerle yapılan çalışmalar; kitin içerisinde yer alan kullanım klavuzuna göre yapılmıştır.

Tirozin Kinaz Analiz Kiti: Birer tirozin kinaz reseptör inhibitörü olan ERLO ve İMA için Millipore marka ve katalog numarası 17-315 olan tirozin kinaz analiz kiti kullanılmıştır. Analiz; tirozin kinazın fosfotransferaz aktivitesinin kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına

dayanmaktadır ve iki aşamalıdır. İlk aşamasında, Poli (Glu_4-Tyr) molekülünün tekrarından oluşan biotinlenmiş susbtrat peptidi, radyoaktif olmayan ATP ve Mn^{+2}/ Mg^{+2} karışımı varlığında tirozin kinaz enzim numunesi ile inkübe edilir. Kinaz analizi streptavidinle kaplı plakadaki hücrelere bağlı olan substrat peptidi ile gerçekleştirilir. İkinci aşamasında, monoklonal antikor konjugatı kullanılarak ELISA ile fosforillenmiş susbtrat ölçülür. Fosforillenmiş bitoinlenmiş peptid olan Poli (Glu_4-fosfo-Tyr) ise referans hücrelerine eklenir ve pozitif kontrol olarak kullanılır.

Analizi yapılan numuneler; ilaç tedavisi sonrasında sakrifiye edilen hayvanların tümör dokularıdır. Bu tümör dokuları tartılmış, gram başına 5 mL olacak şekilde dokuların üzerine distile su eklenmiş ve homojenize edilmiştir. ŞAP Enstititüsü'nün antiseptik ortam koşulları altında analiz sırasında kullanılacak ELISA Bloklama Tamponu, Substrat Çözeltisi, Referans Çözeltisi ve yıkama aşamasında kullanılan TBS-T 1X çözeltisi hazırlanmıştır. TBS-T 1X çözeltisinin hazırlanması için 50 mL %2 Tween20 içeren 20X TBS çözeltisi 950 mL distile su ile seyreltilmiştir. ELISA Bloklama Tamponunun hazırlanması; 90 mL TBS-T 1X çözeltisinden alınması, üzerine %10 BSA çözeltisinden 10 mL eklenmesi ve karıştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Substrat çözeltisi ise 240 µL Poli (Glu_4-Try) biotin konjugatı ile 11760 µL ELISA Bloklama tamponunun karıştırılması ile hazırlanmıştır. Son olarak ise referans çözeltisi, 2,5 µL Poli (Glu_4-fosfo-Try) biotin konjugatının 247,5 µL ELISA Bloklama tamponu ile karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Streptavidin ile kaplı olan plakanın her hücresine 100 µL ELISA bloklama tamponu eklenmiş, 15 dakika bekletildikten sonra plake ters çevirilerek tampon dökülmüştür. İlk beş hücreye çeşitli konsantrasyonlarda referans hücresi (kalibrasyon numuneleri), diğer tüm hücrelere ise 100 µL substrat çözeltisi konulmuştur ve 1 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Bir saat sonunda plaka ters çevrilerek dökülmüş, 3 kez TBS-T 1X çözeltisi ile yıkanıp 300 µL ELISA Bloklama tamponu eklenerek 1 saat boyunca 37°C'de tekrar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında ilk beş hücreye 200 µL ELISA Bloklama tamponu ve diğer hücrelere analiz edilecek numune çözeltilerinden 50 µL eklenmiş, 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda plaka ters çevirilerek sıvılar dökülmüş ve TBS-T 1X çözeltisi ile 6 kez yıkanmıştır. Her yıkama çözeltisi değişiminde 10 dakika bekletilmiş ve plaka hafifçe çalkalanmıştır. Yıkama işlemi bittikten sonra ELISA Bloklama tamponu eklenmiş, 10 dakika bekletilmiştir ve plaka ters çevrilerek tampon dökülmüştür. Tüm hücrelere 100 µL antikor eklenip 20 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından 7 kez TBS-T 1X çözeltisi ile yıkanmış, her yıkama çözeltisi

değişiminde plaka hafifçe çalkalanarak 10 dakika bekletilmiştir. Plaka son kez distile su ile yıkandıktan sonra tüm hücrelere 75 µL TMB A ve TMB B'nin 1:1 h/h oranındaki karışımından eklenmiştir. İlk renk oluşumu gözleninceye kadar (yaklaşık 2 dakika) bekletilmiş ve ardından reaksiyon durdurmak için 75 µL 2M Sülfürik asit tüm hücrelere eklenmiştir. 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır.

COX Aktivite Analiz Kiti: COX-1 reseptörünü seçici olarak inhibe eden DEX için Cayman marka ve katalog numarası 760151 olan COX aktivite analiz kiti kullanılmıştır. Siklooksijeneaz (COX) hem siklooksijenaz hem de peroksidaz aktivitesi gösteren çift fonksiyonlu bir enzimdir. Analiz; COX'un peroksidaz aktivitesinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Peroksidaz aktivitesi ise 590 nm dalga boyunda oksitlenmiş N,N,N' ,N'-tetrametil-p-fenilenediamin (TMPD) varlığının kolorimetrik olarak ölçülmesiyle analiz edilir.

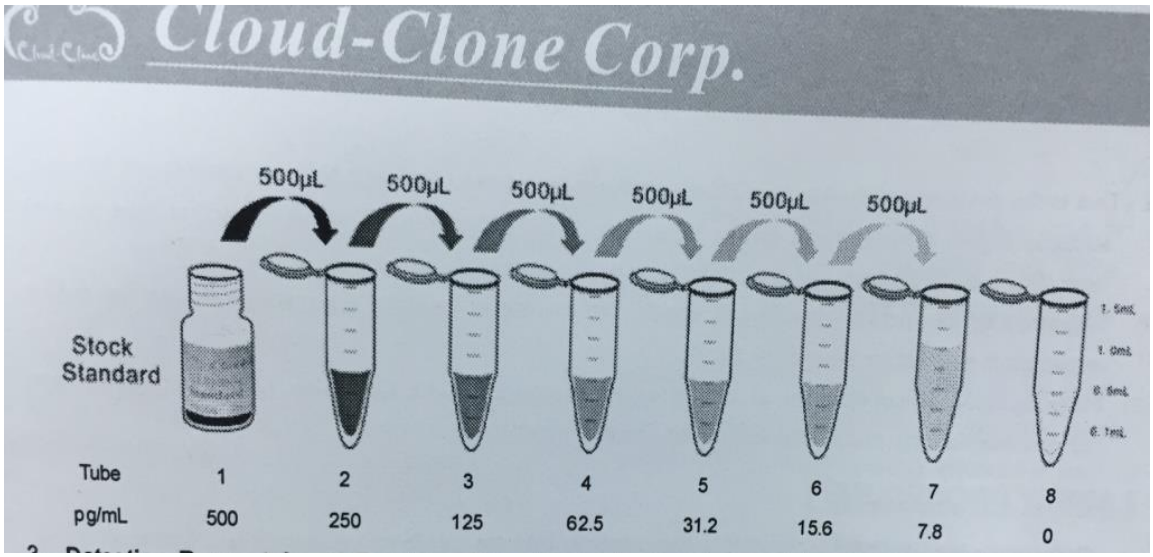
Analizi yapılan numuneler; ilaç tedavisi sonrasında sakrifiye edilen hayvanların tümör dokularıdır. Dokular kan içerikli yapılarından arındırmak için pH: 7,4 TRİS tamponu ile yıkanmış ve tartılmıştır. Gram başına 5-10 mL olacak şekilde dokuların üzerine soğuk haldeki 1mM EDTA içeren 0.1 M TRİS HCl; pH: 7,8 tamponu eklenerek homojenize edilmiştir. 10000g'de 15 dakika 4°C'de santrifüjlenip süpernatantlar analiz edilmek üzere alınıp analiz edileceği güne kadar -20°C'de saklanmıştır. ŞAP Enstititüsü'nün antiseptik ortam koşulları altında analiz sırasında kullanılacak Analiz tamponu, Heme çözeltisi ve Araşidonik asit çözeltisi hazırlanmıştır. Analiz tamponunun hazırlanması için 3 mL 10X konsantrasyonundaki analiz tamponundan alınmış ve 27 mL distile su ile seyreltilmiştir. Heme çözeltisi; 88 µL Heme çözeltisinden alınıp üzerine seyreltilmiş analiz tamponundan 1912 µL eklenerek karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Araşidonik asit çözeltisini hazırlanması ise; 100 µL araşidonik asit, 100 µL potasyum hidroksit ve 800 µL distile suyun karıştırılması ile gerçekleştirilmiştir. Reaktifler hazırlandıktan sonra analize geçmeden önce gürültü (background) değerleri belirtildiği gibi hazırlanmış; 500 µL'lik tüplere analizi edilecek her bir örneken 150 µL konulmuş ve 5 dakika kaynayan suda bekletilip ardından 8000 g'de 1 dakika santrifüjlenerek aktif olan reseptörler inaktive edilmiştir. COX standart hücreleri için belirlenen her bir hücreye 150 µL analiz tamponu, 10 µL Heme çözeltisi ve 10 µL kullanıma hazır bir şekilde kitte bulunan COX standardı eklenmiştir. Background hücreleri için belirlenen her bir hücreye 120 µL analiz tamponu, 10 µL Heme çözeltisi ve 40 µL background numuneleri (inaktif numunler) eklenmiştir. Son olarak örnek hücreleri

için ise belirlenen her bir hücreye 120 µL analiz tamponu, 10 µL Heme çözeltisi ve 40 µL analizi yapılacak numuneler eklenmiştir. Bu işlemler bittikten sonra plaka birkaç saniye hafifçe çalkalanmış ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında her bir hücreye 20 µL kolorimetrik substrat eklenmiş ve reaksiyonu başlatmak için ise yine her bir hücreye 20 µL araşidonik asit çözeltisi eklenmiştir. Plaka birkaç saniye hafifçe çalkalanmış ve tekrar 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmesini takiben 590 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır.

Folat Reseptör Analiz Kiti: Tümör dokularında yüksek miktarda bulunan folat reseptörlerine bağlanarak aktif hedeflendirmeyi gerçekleştiren ve taşıyıcı sistemlere konjuge edilen folik asit liganları için Cloud-Clone Corp. marka ELISA yöntemine dayanan folat reseptör analiz kiti kullanılmıştır. Kitle sağlanan plaka, FLOR1'e seçici olan antikor ile kaplıdır. Standart veya örnekler bu plaka eklenir ve ardından karaturp peroksidaza konjuge olan avidin eklenerek inkübe edilir. TMB substratı eklendikten sonra enzim-substart reaksiyonu ile renk değişimi olur ve bu renk değişimi spektrofotometrik olarak 450 nm dalga boyunda analiz edilir.

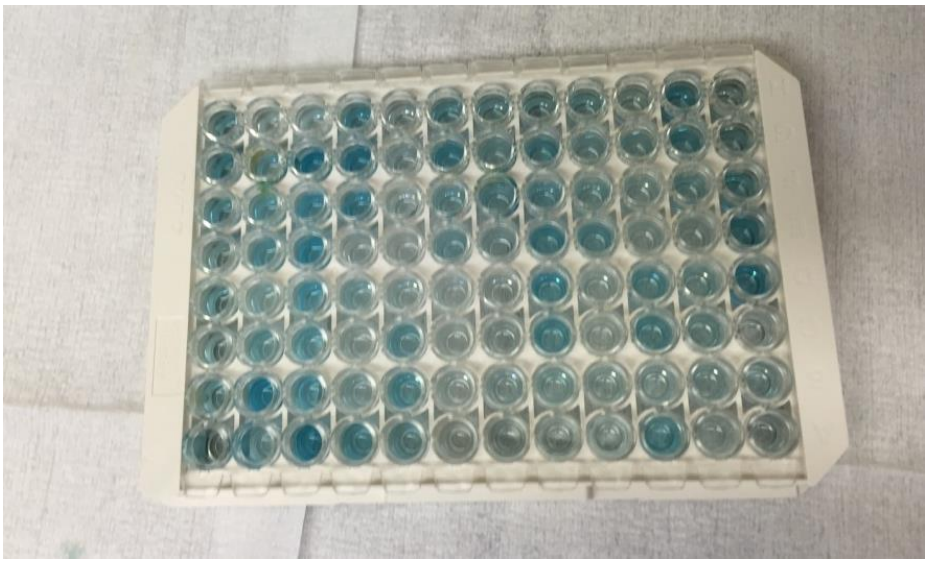
İlaç tedavisi sonrasında sakrifiye edilen hayvanların tümör dokuları analiz edilmiştir. Dokular kan içerikli yapılarından arındırmak için çok soğuk haldeki pH: 7,2 0,01M PBS tamponu ile yıkandıktan sonra tartılmıştır. Tartılan doku küçük parçalara ayrılarak bir kapsülde iyice parçalanmıştır. Üzerine 5 mL çok soğuk haldeki pH: 7,2 0,01M PBS tamponu eklenip homojenize edilmiştir. Hücre membranlarının parçalanması için tüm numunler 2 defa -20°C'de dondurulup oda sıcaklığında çözündürülmüştür. 5000g'de 5 dakika santrifüjlenip süpernatantları alınmış ve analiz edileceği güne kadar -20°C'de saklanmıştır. ŞAP Enstititüsü'nün antiseptik ortam koşulları altında analiz sırasında kullanılacak standart çözeltiler, reajan A ve reajan B çözeltileri ve yıkama çözeltisi hazırlanmıştır.

Standart çözeltilerinin hazırlanması için standart üzerine, 1 mL standart seyreltici eklenip 10 dakika oda sıcaklığında tutulmuş ve köpük oluşmamasına dikkat ederek hafifçe çalkalanmıştır. Bu şekilde 500pg/mL konsantrasyonunda stok standart çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltiden hareketle 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6 ve 7,83 pg/mL konsantrasyonlarında bir seri standart çözelti eldesi için seyreltilmiştir (Resim 3.10).



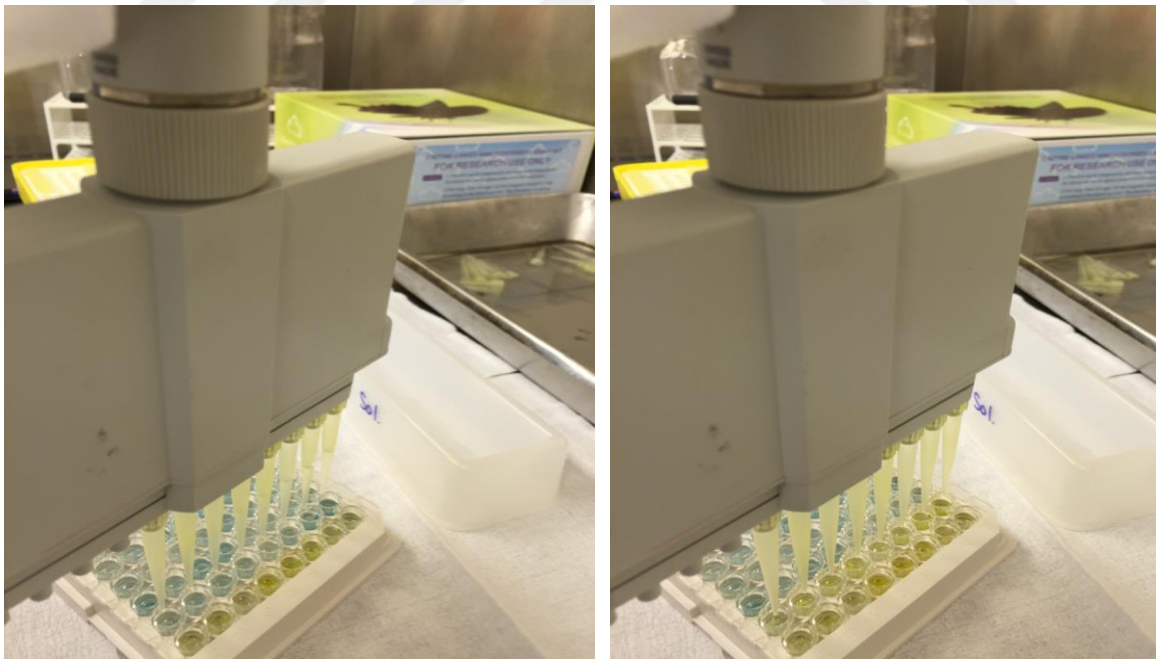
Resim 3.10. Standart çözeltilerin hazırlanması işlemine ait görüntü

Reajan A ve reajan B ise, bu maddelerin kendilerine ait olan analiz dilüent A ve B ile 1:100 oranında seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Son olarak yıkama çözeltisi ise, 20 mL konsantre yıkama çözeltisinden alınıp üzerine 580 mL distile suyun eklenmesiyle hazırlanmıştır. Belirlenen her bir hücreye standart, kör ve analiz edilecek numunlerden 100 µL eklenmiştir. Plakanın üstü kapatılıp 2 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Sonrasında sıvılar uzaklaştırılmış ve her bir hücreye 100 µL seyreltilmiş reajan A eklenmiştir. Plakanın üzeri tekrar kapatılıp 1 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra çözelti uzaklaştırılmış ve üzerine 350 µL yıkama çözeltisi eklenmiş 1-2 dakika beklendikten sonra çözelti uzaklaştırılarak yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde 2 kez daha yıkama yapıldıktan sonra yıkama çözeltisi tamamen uzaklaştırılıp her bir hücreye 100 µL seyreltilmiş reajan B eklenmiştir. Plakanın üzeri kapatılıp 30 dakika 37°C'de inkübe edilmiş, çözelti uzaklaştırılmış ve üzerine 350 µL yıkama çözeltisi eklenerek 1-2 dakika beklendikten sonra çözelti uzaklaştırılmıştır. Reajan A ilave edildikten sonra olduğu gibi bu şekilde de 2 kez daha yıkama işlemi yapılmıştır. Son yıkamadan sonra yıkama çözeltisi tamamen uzaklaştırılmış ve her bir hücreye 90 µL TMB substrat çözeltisinden eklenmiştir. Plaka kapatılıp 15 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında bazı hücrelerde mavi renk oluşumu gözlenmiştir (Resim 3.11).

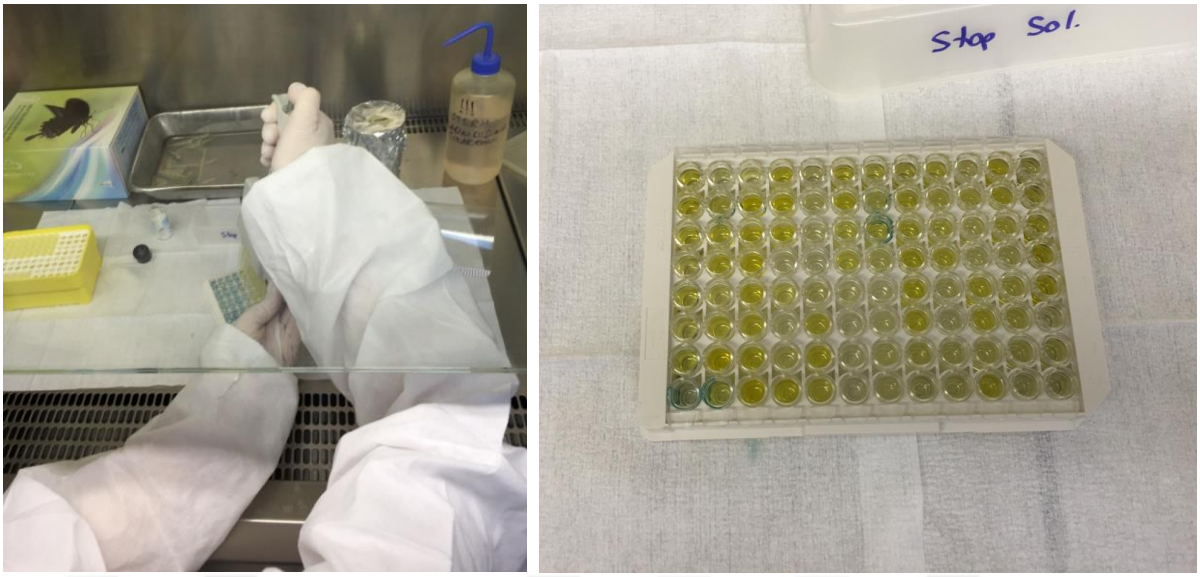


Resim 3.11. İnkübasyon sonrası hücrelerde gözlenen mavi renk oluşumu

İnkübasyon bitiminde reaksiyonu durdurmak için her bir hücreye sülfürik asit içeren durdurucu çözeltiden 50 µL eklenmiş ve mavi renk sarı renge dönüşmüştür (Resim 3.12 ve Resim 3.13).



Resim 3.12. Reaksiyonun durmasını gösteren mavi rengin sarı renge dönümüşü



Resim 3.13. Reaksiyon bitiminde folat reseptör tayinine hazır hücrelerin plakadaki görünümü

450 nm dalga boyunda koloritmetrik olarak analizi yapılmıştır.

3.2.5. Formülasyonlara ait stabilite çalışmaları

Formülasyonlar üzerinden yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen ve etken madde yükleme kapasitesi, zeta potansiyeli, partikül büyüklüğü ve polidispersite açısından en uygun formülasyonların stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

İMA içeren; kuantum noktacığı nano-taşıyıcı sistemleri için QD-İMA, QD-İMA-PEG, QD- İMA-PEGFA kodlu formülasyonlarda ve nanopartikül sistemleri için NP-İMA, NP-İMA-PEG ve NP-İMA-PEGFA kodlu formülasyonlarda stabilite testleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca; ERLO içeren; kuantum noktacığı nano-taşıyıcı sistemleri için QD-ERLO, QD-ERLO-PEG, QD-ERLO-PEGFA kodlu formülasyonlarda ve nanopartikül sistemleri için NP-ERLO, NP-ERLO-PEG ve NP-ERLO-PEGFA kodlu formülasyonlarda stabilite testleri gerçekleştirilmiştir. Stabilite testleri ICH Q1A (R2) klavuzuna göre; 25±2°C sıcaklıkta %60±5 bağıl nemde uzun ve 30°C sıcaklıkta orta dönem stabilite testleri olarak 12 ay süre ile yapılmıştır. Ayrıca hızlandırılmış koşul stabiliteleri açısından 40±2°C'de %75±5 bağıl nemde 6 ay boyunca takibe alınmıştır. Bu formülasyonların etken

madde miktar tayini, polidispersite indeksi, paritkül büyüklüğü ve zeta potansiyeli açısından değerlendirilerek kimyasal ve fiziksel stabilitesi incelenmiştir.

3.2.6. Kapsüllerde yapılan çalışmalar

Formülasyon çalışmalarının ardından formülasyonlar üzerinde salım çalışmaları, Caco-2 hücrelerinden hücre geçiş çalışmaları ve hücreler üzerinde antitümöral aktivite değerlendirmeleri çalışmaları yapılmıştır. Ayırca hayvanlar üzerinde de tümör ölçüm çalışmaları yanı sıra histopatolojik açıdan değerlendirme çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, elde edilen verilere göre tedavi amacına en uygun formülasyon seçilmiştir. Bu formülasyon liyofilize edilerek katı dozaj şekli haline getirilmiş ve tekrar değerlendirilmiştir.

Liyofilizasyon (dondurarak kurutma), bir solüsyonun içinden suyun alınarak kuru maddenin ortaya çıkarılmasıdır. Geriye kalan kuru madde solüsyondan çok daha stabildir. Bu teknikte, solüsyon ilk önce -40 ila -50 °C'ye kadar soğutulur ve vakumlandıktan sonra yavaşça ısıtılarak buzun buhara dönüşerek suyun solüsyondan ayrılması sağlanır. Bu işleme süblimasyon denir. Dondurarak kurutma işleminde değerlendirilmesi gereken en önemli parametreler ısı (ürün ve raf) ve basınçtır. Liyofilize işleminin optimum koşullarda sürdürülebilmesi için birtakım ön çalışmalar yapılmıştır ve tedavide kullanılacak formülasyon için en uygun sıcaklık ve basınç değeri ile işlem süresi saptanmıştır. Çalışmalar sonucunda tedavide kullanılacak kuantum noktacığı formülasyonu -55°C sıcaklıkta, 0,021 mbar basıçta ve 48 saat süreyle liyofilize edilmiştir.

En iyi çıkan formülasyon liyofilize toz haline getirilmiştir. Kullanılacak olan kapsülün farelere uygulanabilirliği göz önünde bulundurularak en küçük boyutta seçilmiş olup kapsül numarası "M" olarak belirtilmektedir. Bu boyutlu kapsüllere ait görüntüye Resim 3.14'te yer verilmiştir.

Resim 3.14. En iyi formülasyon için kullanılacak olan kapsüllerin görüntüsü

Elde edilen liyofilize toz kapsüllere kapsül doldurma aparatı ile doldurulmuştur ve bu kapsüller üzerinde dağılma testi ve nem içeriği gibi bir takım denetimler gerçekleştirilmiştir. Ayrıca kapsüller üzerine etkin madde miktar tayini ve çözünme hızı çalışmaları da sürdürülmüştür.

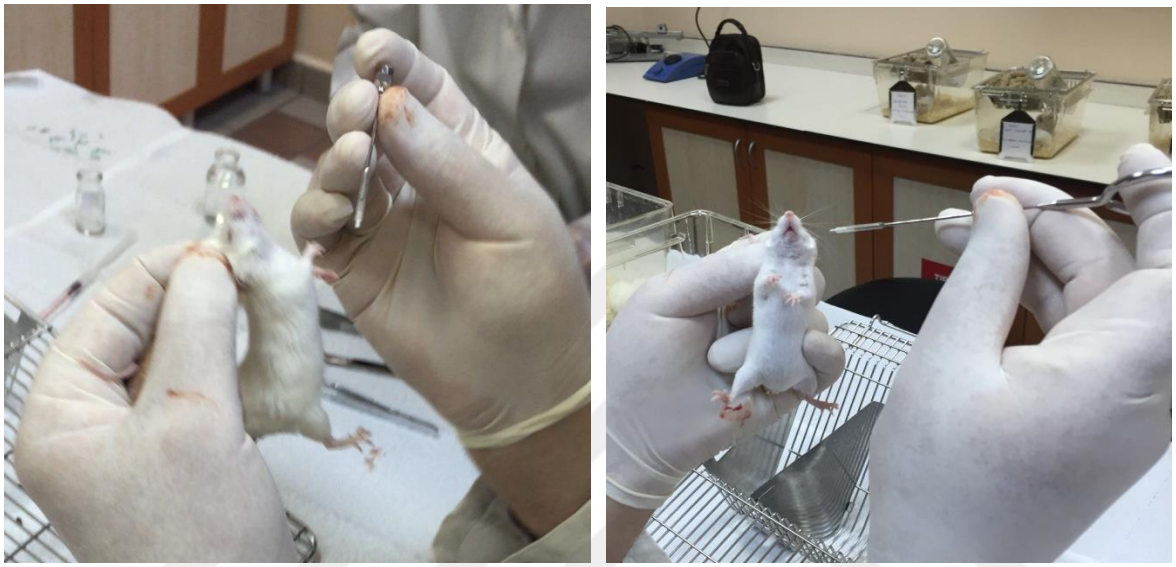
Dağılma testi pH 7,4 fosfat tamponu ortamında 250 mL hacimde Pharma Test Dist-3 cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Nem miktar tayini ise; IR nem tayin cihazı ile yapılmıştır. 4,8 mg İMA içeren kapsül içeriği tartıldıktan sonra nem miktar tayini cihazına konulmuş, ağırlık sabit kalana kadar bekletilmiştir. Başlangıç ağırlığı ile son ağırlık arasındaki fark üzerinden % nem miktarı hesaplanmıştır.

Etkin madde miktar tayini kapsül içerisinde yer alan tozun distile su ortamında dağıtılması sonrasında UPLC'de daha önce İMA için belirtilen UPLC koşullarında analiz edilmesi ile yapılmıştır.

Kapsülden etkin madde çıkış çalışmaları USP 2 – Palet Yöntemi ile pH 7,4 fosfat tamponunda, 250 mL örnek hacminde, 50 rpm hızda, 37±0,2 ºC sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Çok küçük boyuta sahip kapsüller Kapsüllerin suda batmasını sağlamak amacı ile metal sinker'lar kullanılmıştır. Belirli zaman aralıklarında 2 mL hacimde örnekler alınmış, yerine pH 7,4 fosfat tamponu ilave edilmiştir. alınan örnekler UPLC'de analiz edilmiştir. UPLC'de gerçekleştirilen günlük kalibrasyon grafiği ile numunelerde miktar tayinleri yapılmış etkin madde başlangıç dozu % 100 kabul edilerek hesaplanan % değerleri zamana karşı grafiğe geçirilerek değerlendirilmiştir.

Deney hayvanlarına kapsül uygulanması için ise; kapsül uygulama kitinde yer alan, farelere oral yolla kapsül uygulanmasını kolaylaştıran kapsül aparatı kullanılmıştır. Bu aparat ve uygulama sırasında çekilmiş görüntüler Resim 3.15'de yer almaktadır. Kapsül apartın ucuna takılmakta ve sonrasında ise aparat farenin midesine kadar indirilmektedir. Aparatın arka ucunda yer alan halka şeklindeki kısım itilerek kapsülün aparattan çıkışı sağlanmaktadır.



Resim 3.15. Fibrosarkomalı deney hayvanlarına ilaç uygulaması

Oral yolla verilecek olan kapsüllerin mideye ulaşıp ulaşmadığının kontrol edilmesi amacıyla ilk olarak kapsül boyutlarında renkli bir madde fareye uygulanmış, fare sakrifiye edilerek midesi açılmıştır. Resim 3.16'da farenin midesi içerisinde yer alan yeşil renkli madde görülmektedir. Kapsüller bu aparat ile farelerin direk olarak midelerine ulaşmaktadır.

Resim 3.16. Kapsüllerin mideye ulaştıklarının kontrolüne ait görüntü

En iyi çıkan formülasyon liyofilize edilerek toz haline getirildikten sonra kapsüllere doldurulmuş ve fibrosarkomalı deney hayvanlarına aynı doz rejimi ile 2 hafta boyunca, gün aşırı kapsül içerisinde verilmiştir. Antitümöral aktivite değerlendirmesine yönelik tüm çalışmalar (kumpas ile tümör boyutunun ölçülmesi, histopatolojik inceleme, enzim aktivasyonu çalışmaları ve doku dağılım çalışmaları) kapsül formu için tekrarlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Önformülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

Formülasyon geliştirme basamağı öncesinde etkin madde ve yardımcı madde üzerinde yapılan çalışmalar önformülasyon çalışmaları kapsamındadır. Bu bağlamda, etkin ve yardımcı maddelerin partikül büyüklükleri ölçülmüş, erime noktaları tayin edilmiş, etkin madde-yardımcı madde geçimlilikleri incelenmiş, etkin maddelerin yapı analizleri belirlenmiş, dalga boyu taramaları yapılmış, etkin maddelerin çözelti hal stabilite çalışmaları yürütülmüş ve etkin madde miktar tayini yöntemleri geliştirilerek bu yöntemler valide edilmiştir.

4.1.1. Etkin madde ve yardımcı maddelere ait partikül büyüklüğü sonuçları

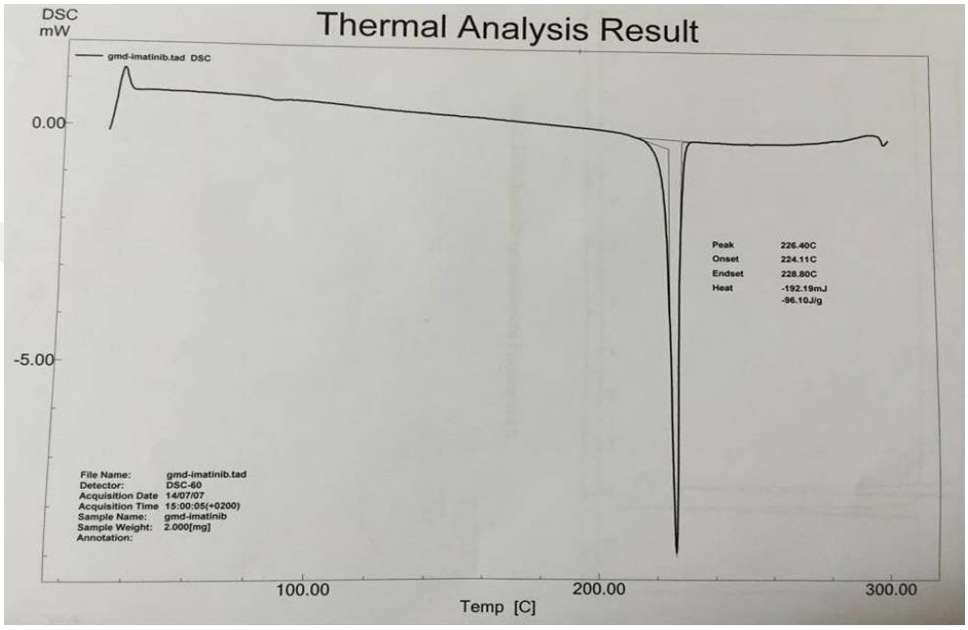
İMA ve ERLO için partikül büyüklüğü ölçümleri Sympatec Helos cihazı ile, diğer maddeler için partikül büyüklüğü ölçümleri ise Malvern Zeta Sizer-Nano ZS aleti ile yapılmıştır. Malvern Zeta Sizer-Nano ZS aleti ile tüm maddelerin partikül büyüklükleri ölçülebilmektedir ancak daha hassas sonuçlar elde etmek amacı ile etkin maddeler için Sympatec Helos cihazı kullanılmıştır. Tüm maddelere ait polidispersite indeksleri ve zeta potansiyel ölçümleri ise Malvern Zeta Sizer-Nano ZS aleti ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar İMA, ERLO, DEX, PEG2000, FA ve DSPE-PEG-FA için partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel ölçümleri açısından aşağıdaki çizelgede yer almaktadır. Ölçümler, maddelerin suda veya gliserinde dağıtılması sonrasında gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.1'de sonuçlar yer almaktadır.

Çizelge 4.1. Formülasyonlarda kullanılacak olan maddelerin partikül büyüklüğü ve dağılımı ölçüm sonuçları

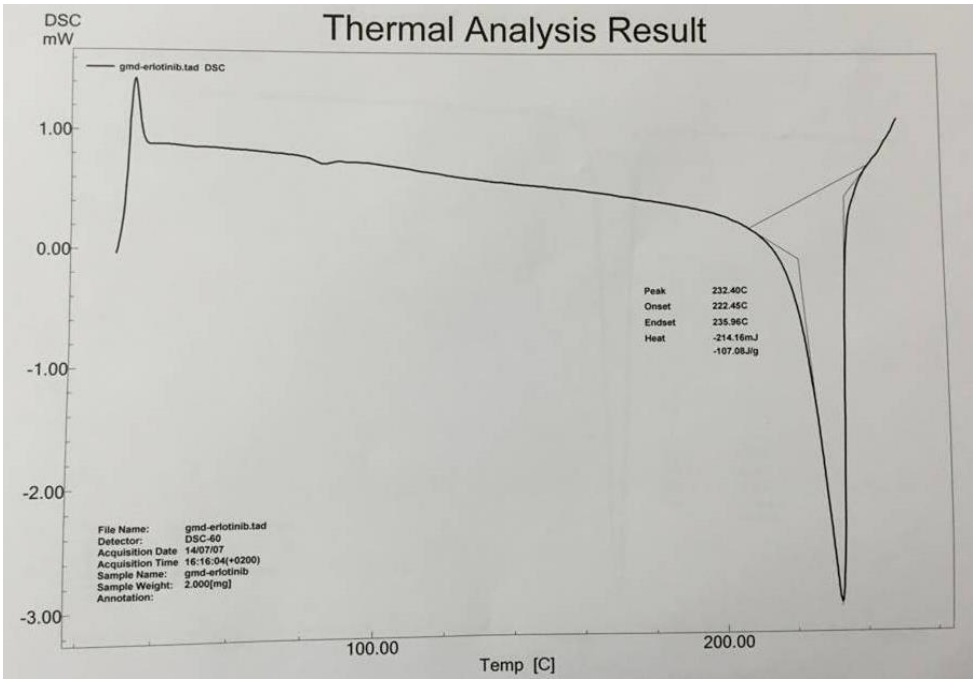
Maddeler	PB (µm) ± SS	PDI ± SS	ZP (mV) ± SS
İmatinib mesilat	3,13 ± 0,37	0,303 ± 0,068	-14,9 ± 2,8
Erlotinib HCl	71,70 ± 0,76	0,855 ± 0,229	+5,9 ± 0,7
Deks. trometamol	3,93 ± 0,37	0,976 ± 0,040	-16,4 ± 1,5
Folik asit	2,50 ± 0,64	0,980 ± 0,050	-26,7 ± 1,3
PEG2000	1,63 ± 0,16	0,936 ± 0,088	-2,3 ± 0,8
DSPE-PEG-FA	2,39 ± 0,08	0,913 ± 0,151	-9,8 ± 3,3

4.1.2. Etkin madde ve yardımcı maddelere ait çalışmalar

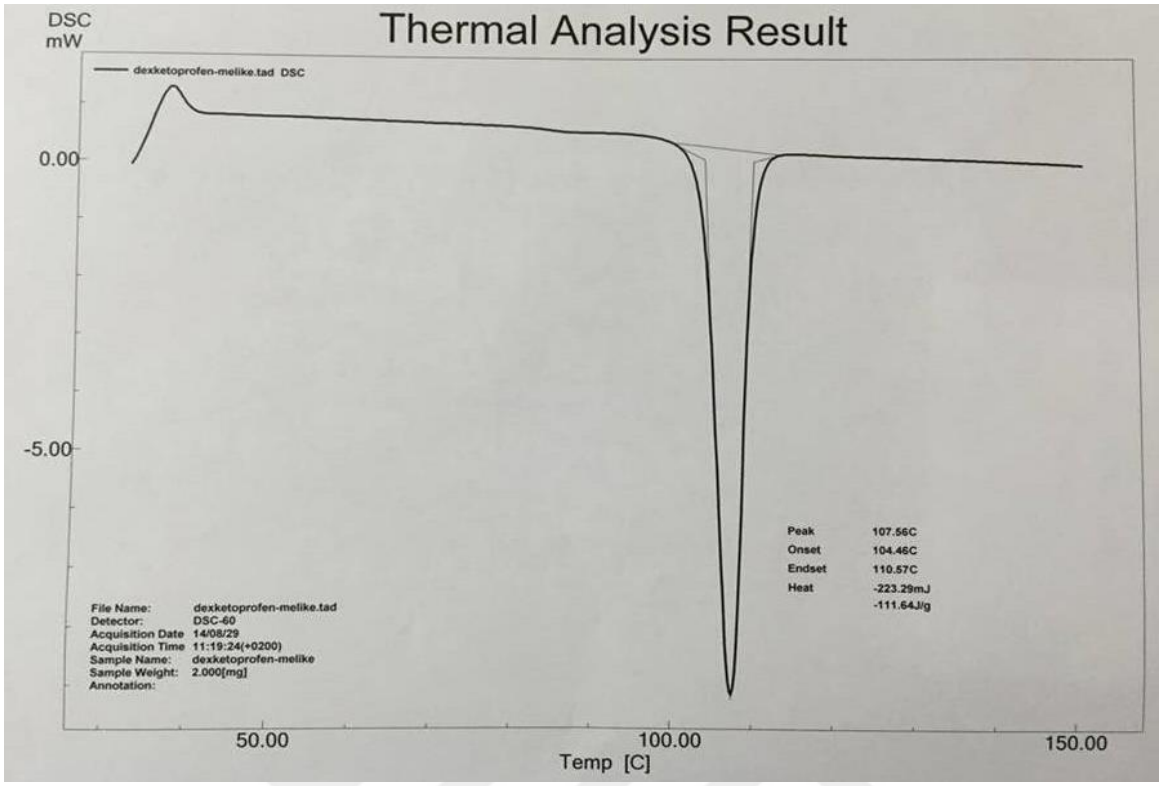
Maddelerin saf hallerinin erime noktalarını tayin etmek için Schimadzu marka DSC60 cihazı kullanılmıştır. Ayrıca maddelerin geçimliliklerini değerlendirmek amacıyla, eşit oranda madde içerecek şekilde madde karışımları hazırlanmış ve karışımlara ait DSC termogramları alınmıştır. Maddelere ve karışımlara ait termogramlar aşağıda yer almaktadır.



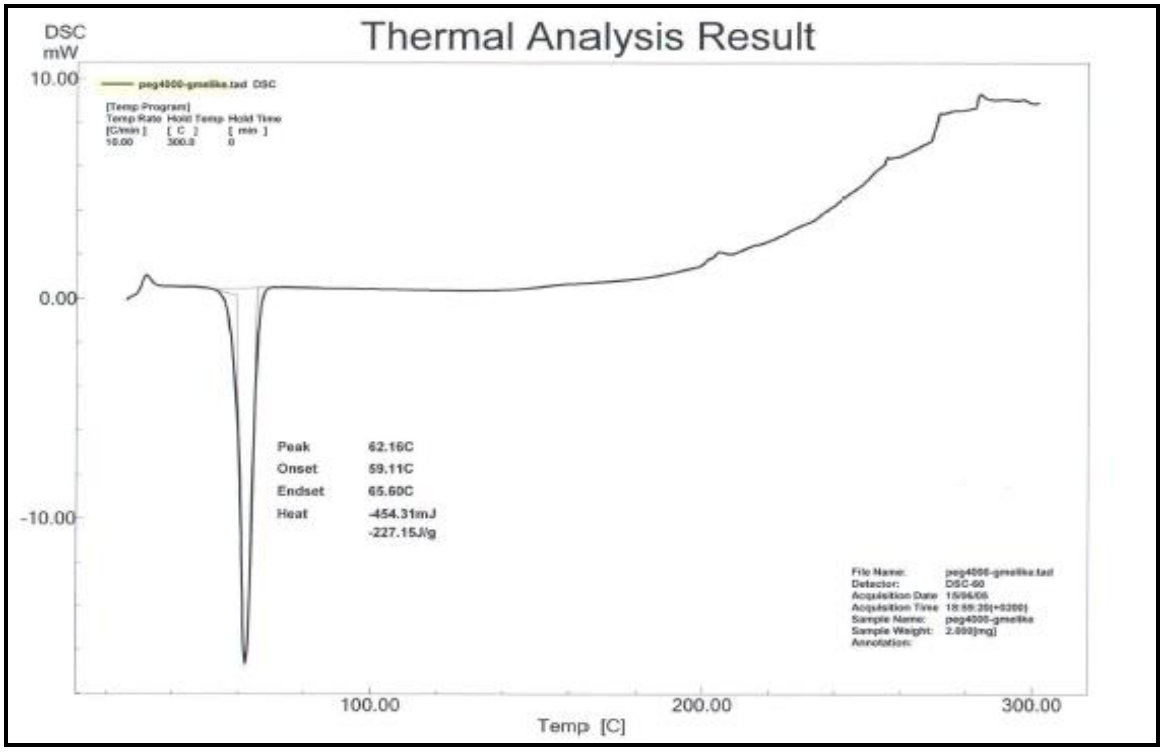
Şekil 4.1. İmatinib mesilatın DSC termogramı



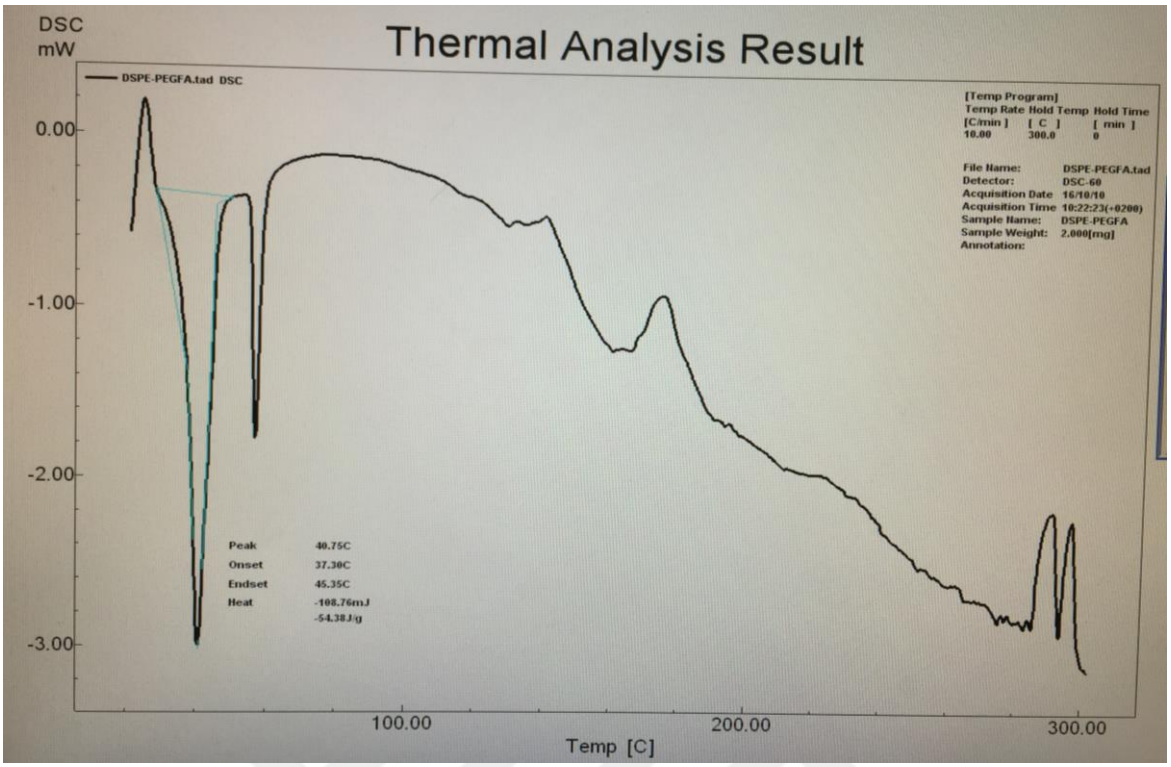
Şekil 4.2. Erlotinib HCl'in DSC termogramı



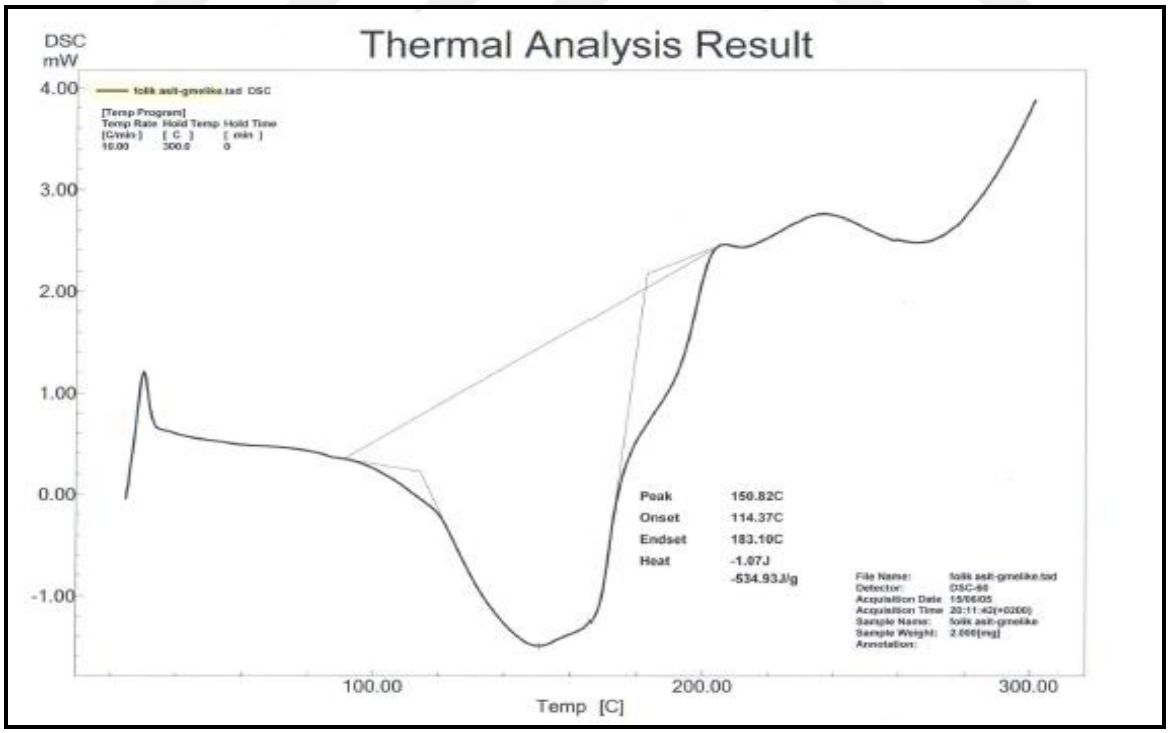
Şekil 4.3. Deksketoprofen trometamolün DSC termogramı



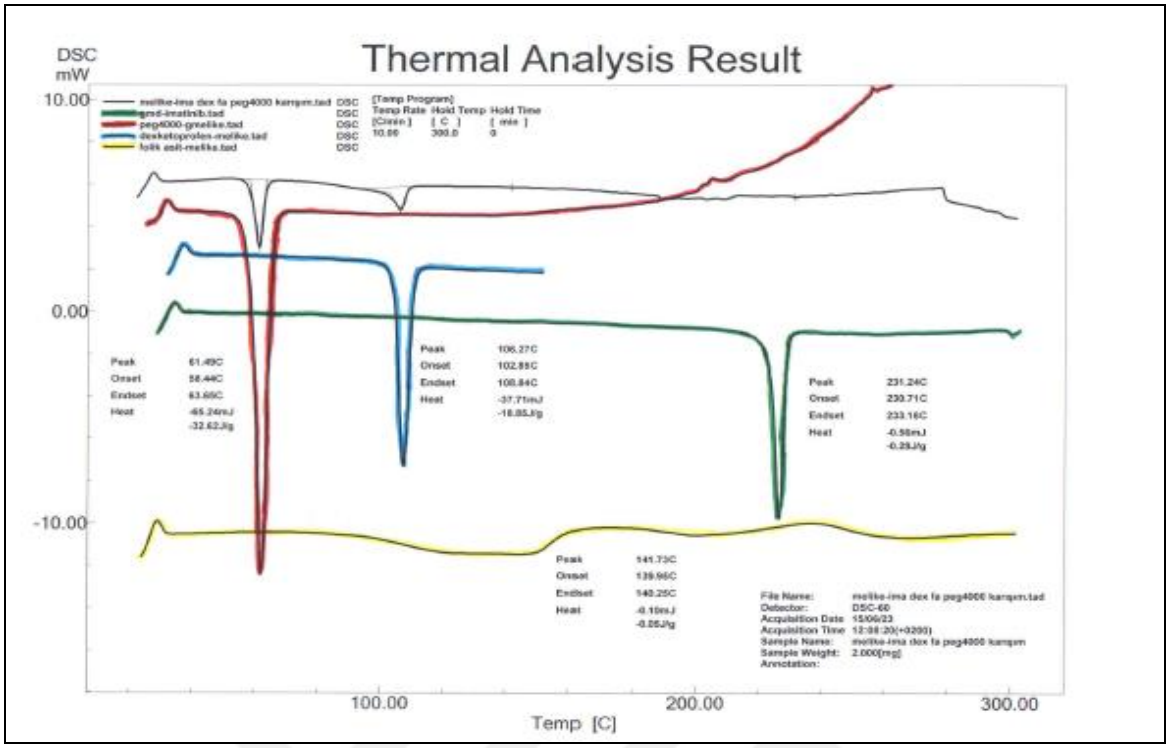
Şekil 4.4. PEG-2000'in DSC termogramı



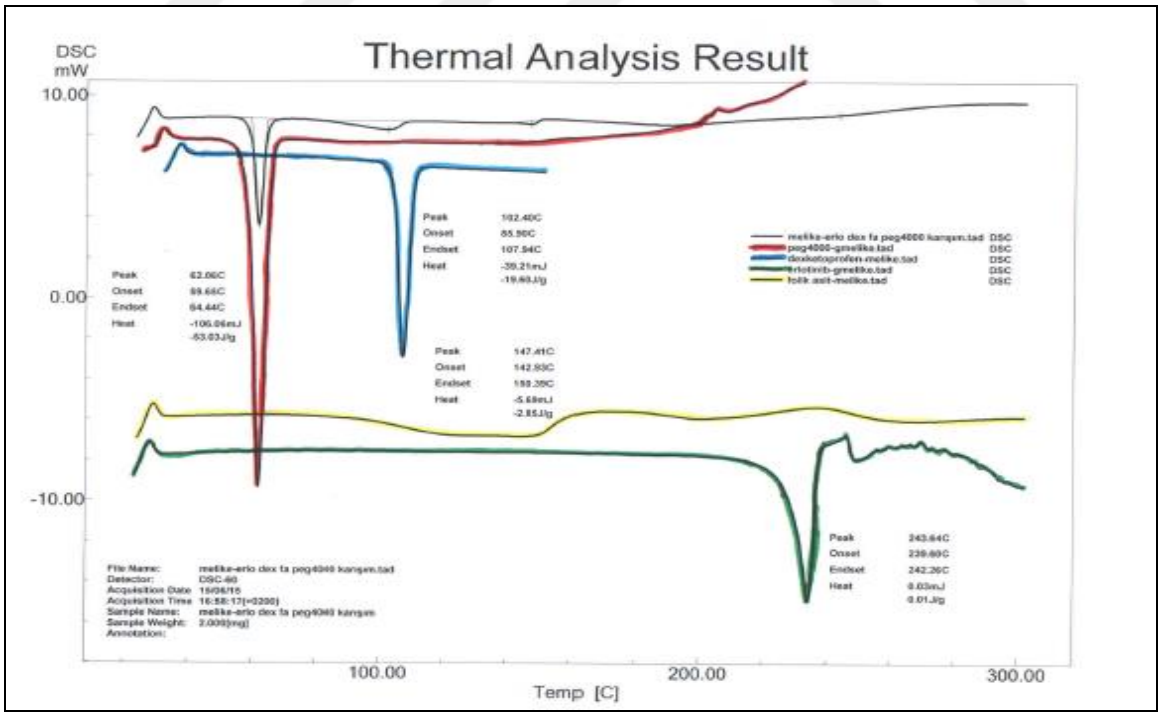
Şekil 4.5. DSPE-PEG2000-FA maddesine ait DSC termogramı



Şekil 4.6. Folik asit'in DSC termogramı

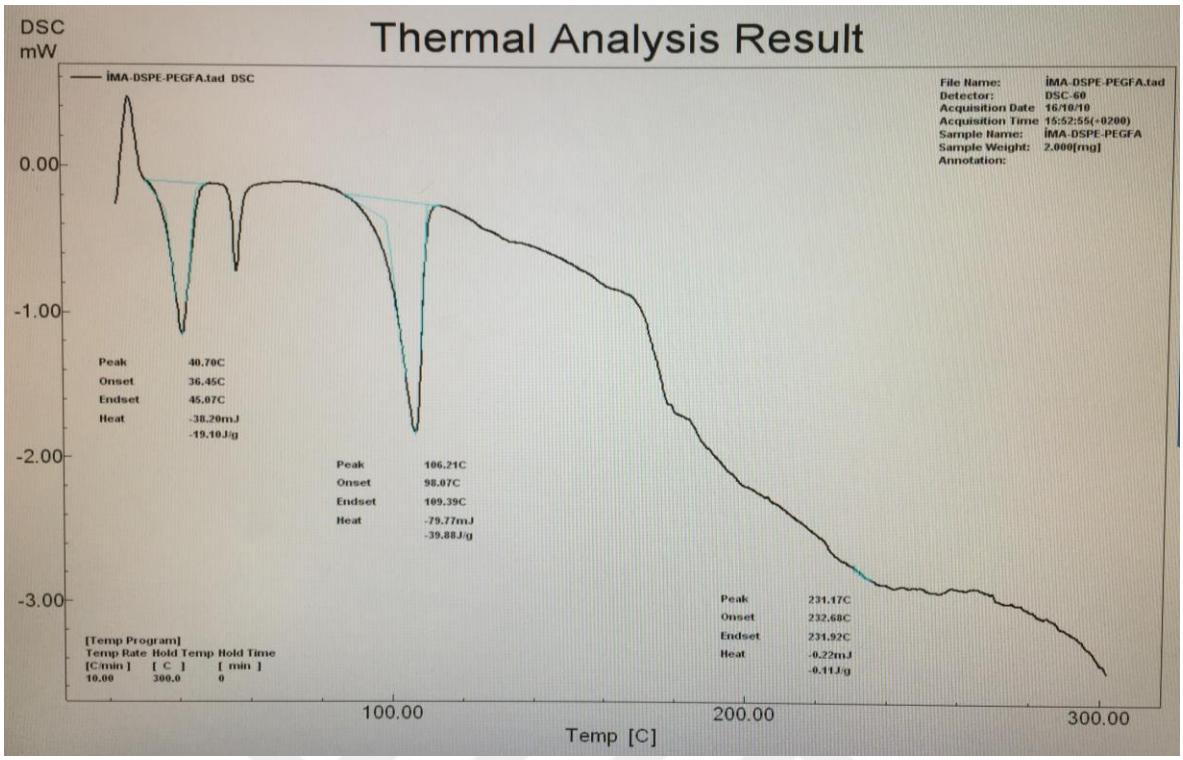


Şekil 4.7. İmatinib mesilat, deksketoprofen trometamol, folik asit ve PEG-2000 karışımına ait DSC termogramı

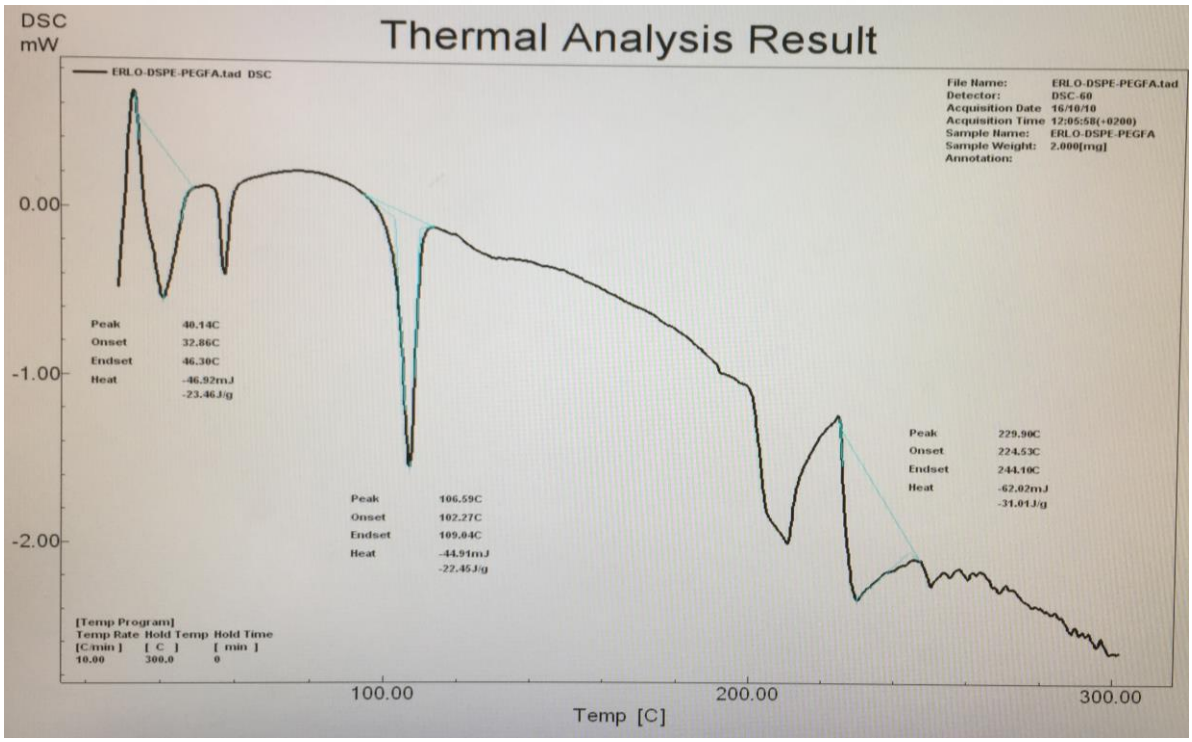


Şekil 4.8. Erlotinib HCl, deksketoprofen trometamol, folik asit ve PEG-2000 karışımına ait DSC termogramı

Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de yer alan termogramlarda; yeşil renkli termogram İMA/ERLO'ya; mavi renkli termogram DEX'e; kırmızı renkli termogram PEG2000'e; sarı renkli termogram FA'ya ve siyah renkli termogram karışımlara aittir.



Şekil 4.9. İmatinib mesilat, deksketoprofen trometamol ve DSPE-PEG-2000-FA maddeleri karışımına ait DSC termogramı



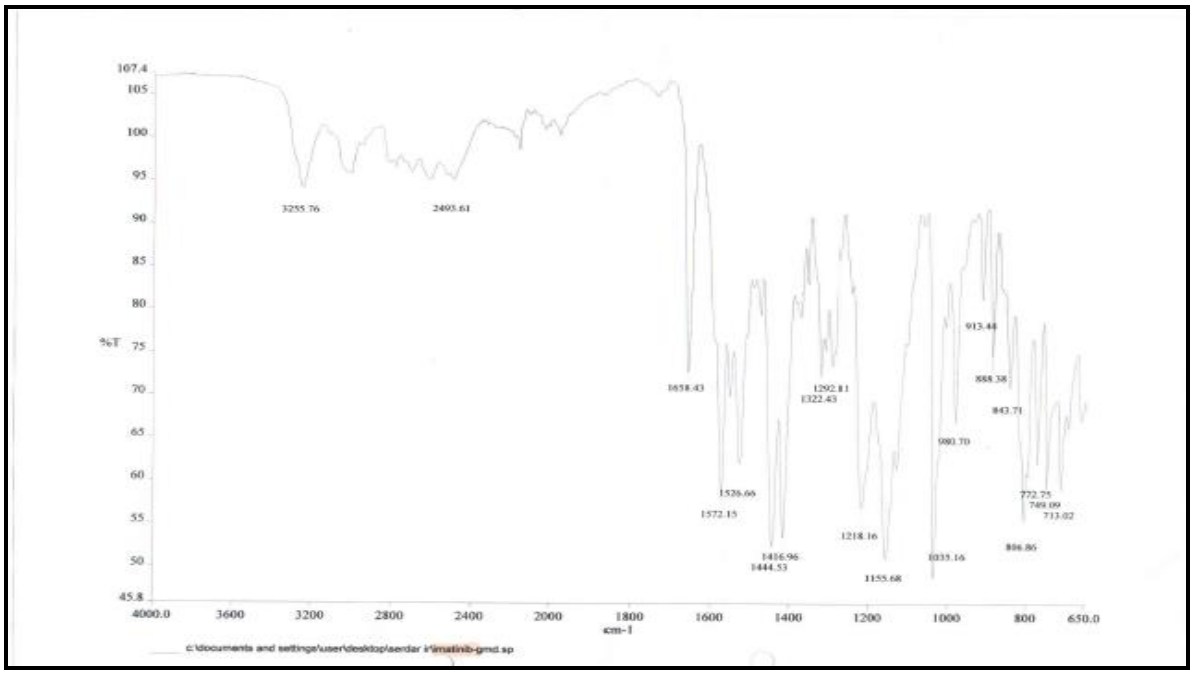
Şekil 4.10. Erlotinib HCl, deksketoprofen trometamol ve DSPE-PEG-2000-FA karışımına ait DSC termogramı

DSC termogramlarında x ekseni sıcaklığı ifade etmekteyken y ekseni de milivolt (mW) cinsinden ısıyı ifade etmektedir. Termogramlarda gözlenen aşağı doğru pikler maddelerin endotermik olduğunu gösterirken pikin en uç noktasının belirttiği değer maddenin erime noktasını ifade etmektedir. Karışımlar ise; karışımda yer alan her maddenin piki kendi erime derecesinde yer aldığından geçimli olarak değerlendirilmiştir. Maddelerin erime noktalarına ait bulgular Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Etkin ve yardımcı maddelere ait erime noktası tayin sonuçları

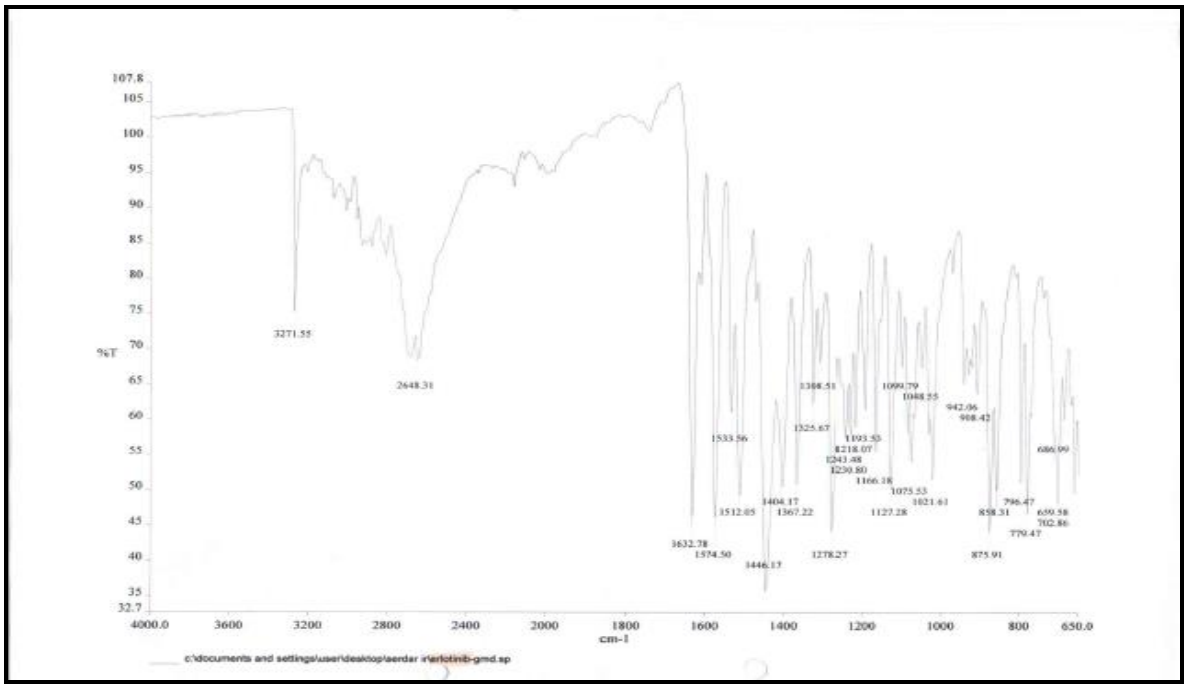
Erime noktası tayin edilen madde	Erime Noktası (ºC)
İmatinib mesilat	226
Erlotinib HCl	232
Deksketoprofen trematemol	107
PEG2000	62
Folik Asit	150
DSPE-PEG-FA	40
İMA-DEX-PEG2000-FA karışımı	Geçimli
ERLO-DEX-PEG2000-FA karışımı	Geçimli

Etkin maddelere ait yapı-analiz çalışmaları Brouker marka FTIR cihazı ile yapılmıştır. İmatinib mesilata ait analiz sonuçları Şekil 4.11'de yer almaktadır.



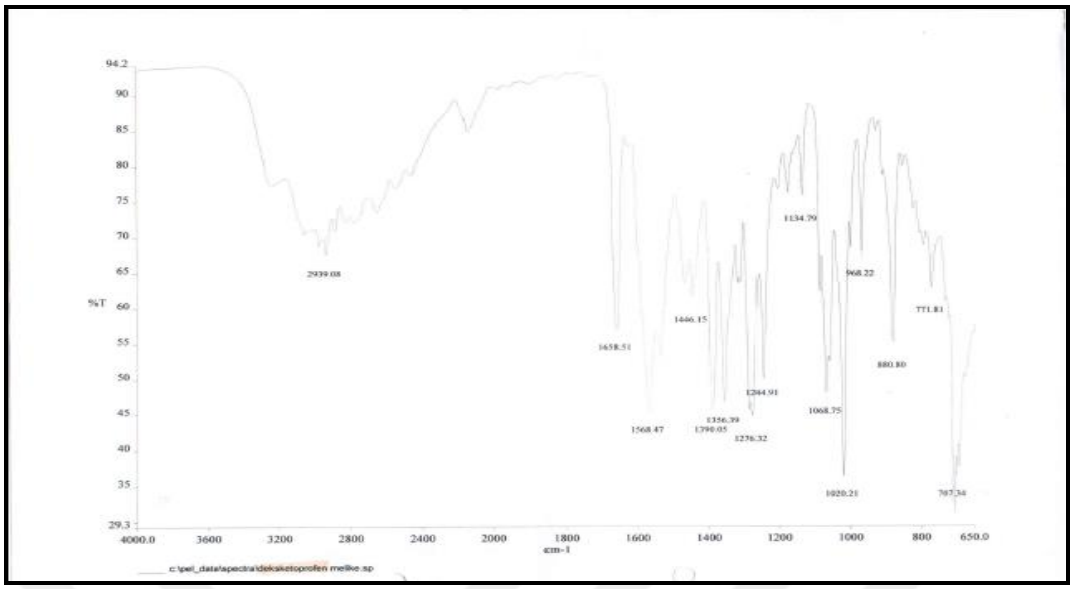
Şekil 4.11. İmatinib mesilat'in FTIR analiz sonucu

Şekil 4.11'deki FTIR spektrumu incelendiğinde; 3255 cm^{-1}'de imatinib mesilatın molekül yapısında bulunan N-H bağının; 1658 cm^{-1}'de C=O bağının ve 1528 cm^{-1}'de de aromatik C=C bağının olduğu görülmüştür. Alınan bu ölçüm sonuçları literatürlerle de paralellik göstermektedir (Babu ve diğerleri, 2014). Şekil 4.12'de ise ERLO'ya ait analiz sonucu bulunmaktadır.



Şekil 4.12. Erlotinib HCl'in FTIR analiz sonucu

Şekil 4.12'deki FTIR spektrumu incelendiğinde; 3271 cm^{-1}'de erlotinib HCl'in molekül yapısında bulunan N-H bağının; 1632 cm^{-1}'de pirimidin halkasında bulunan C=N bağının, 1075-1021 cm^{-1}'de C-O-C bağının ve 880-800 cm^{-1} bant aralığında ise aromatik halkadaki C–H bağının olduğu görülmüştür. Alınan bu ölçüm sonuçları literatürlerle de paralellik göstermektedir (Gontijo ve diğerleri, 2015).

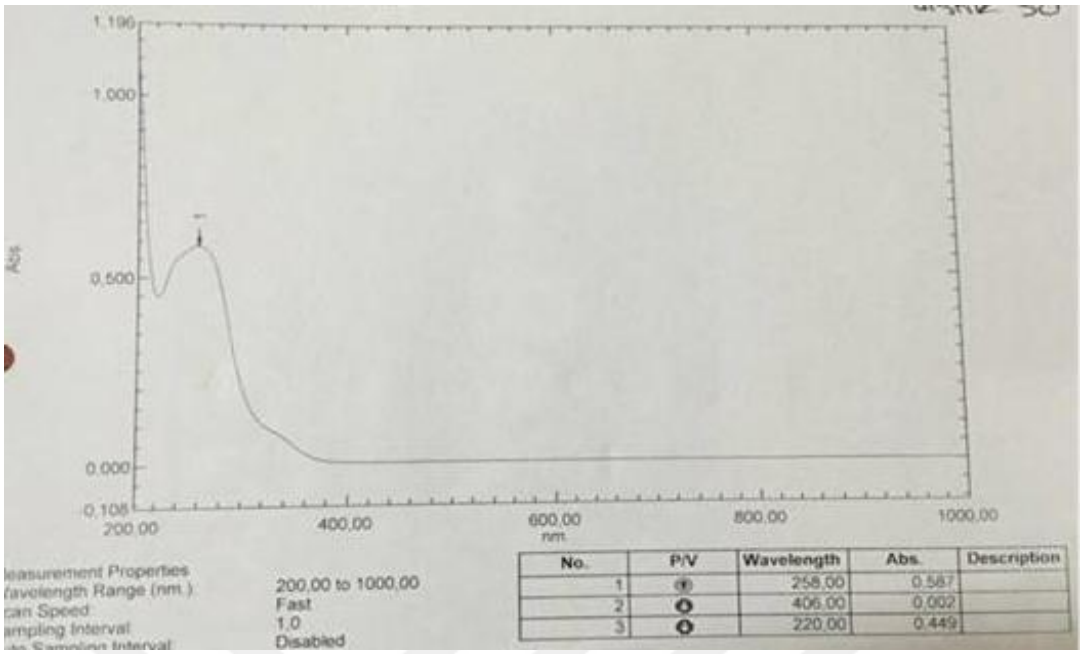


Şekil 4.13. Deksketoprofen trometamolün FTIR analiz sonucu

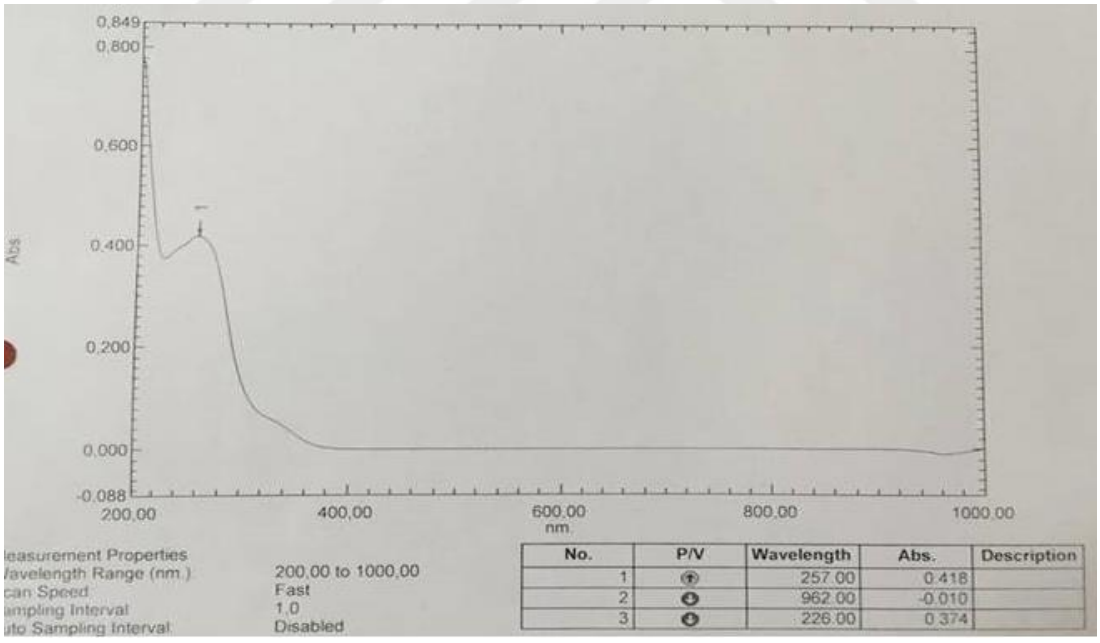
Şekil 4.13'deki FTIR spektrumu incelendiğinde; 293971 cm^{-1}'de deksketoprofen trometamol tuzunun molekül yapısında bulunan N-H bağının; 1658 cm^{-1}'de C=O bağının, 1568 cm^{-1}'de aromatik halka yapısında bulunan C=C bağının ve 880-800 cm^{-1} bant aralığında ise aromatik halkadaki C–H bağının olduğu görülmüştür.

4.1.3. Etkin maddelerin dalga boyu taramaları

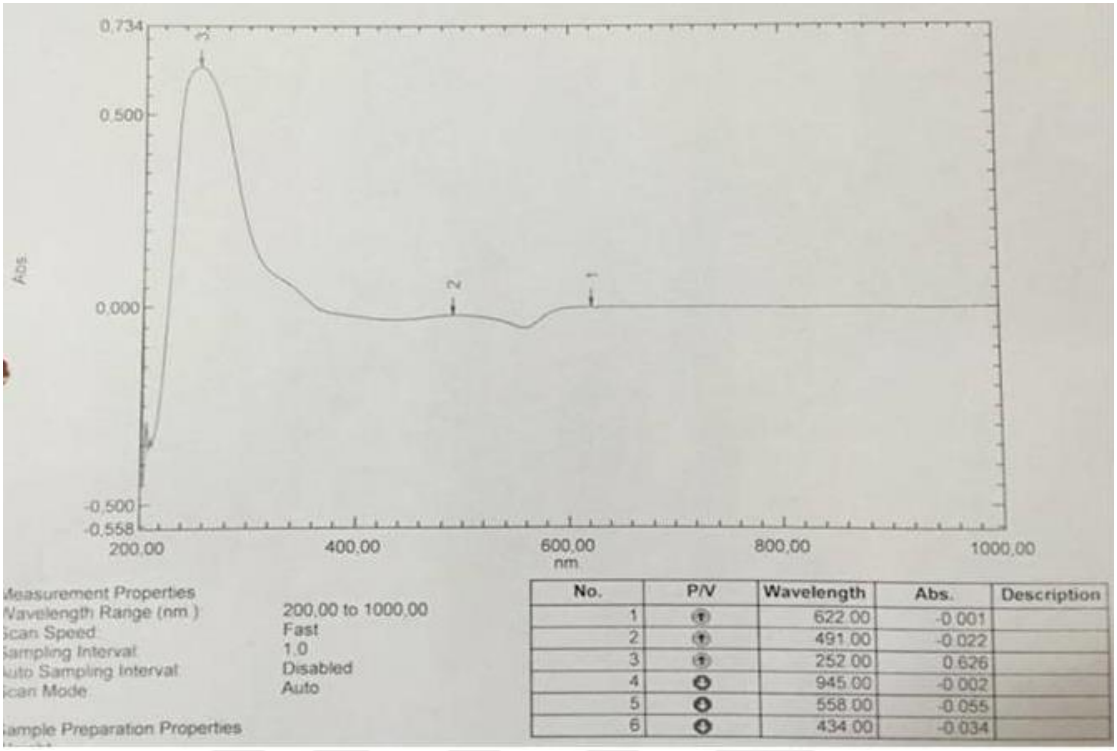
Dalga boyu taramaları daha sonra geliştirilecek olan miktar tayini yöntemleri için temel bir basamak teşkil etmektedir. Dalga boyu taramaları ile maddelerin hangi dalga boyunda en yüksek absorbansı verdiği bulunabilmekte ve bu sayede o dalga boyunda çalışılarak maddelerin düşük miktarları bile tayin edilebilmektedir. Dalga boyu taramalarında UV-visible spektrofotometre kullanılmıştır. Taramalar, deneysel aşamalarda kullanılacak olan her ortamda tekrarlanmıştır. Etkin maddeler için; distile su ve pH 7,4 fosfat tamponunda dalga boyu taramaları yapılmıştır. Ayrıca erlotinib HCl için pH 3 asetat tamponunda da dalga boyu taraması yapılmıştır. UV-visible spektrofotometre cihazında yapılan taramalar UPLC cihazında da tekrarlanmış ve sonuçların tutarlı olduğu gözlenmiştir.



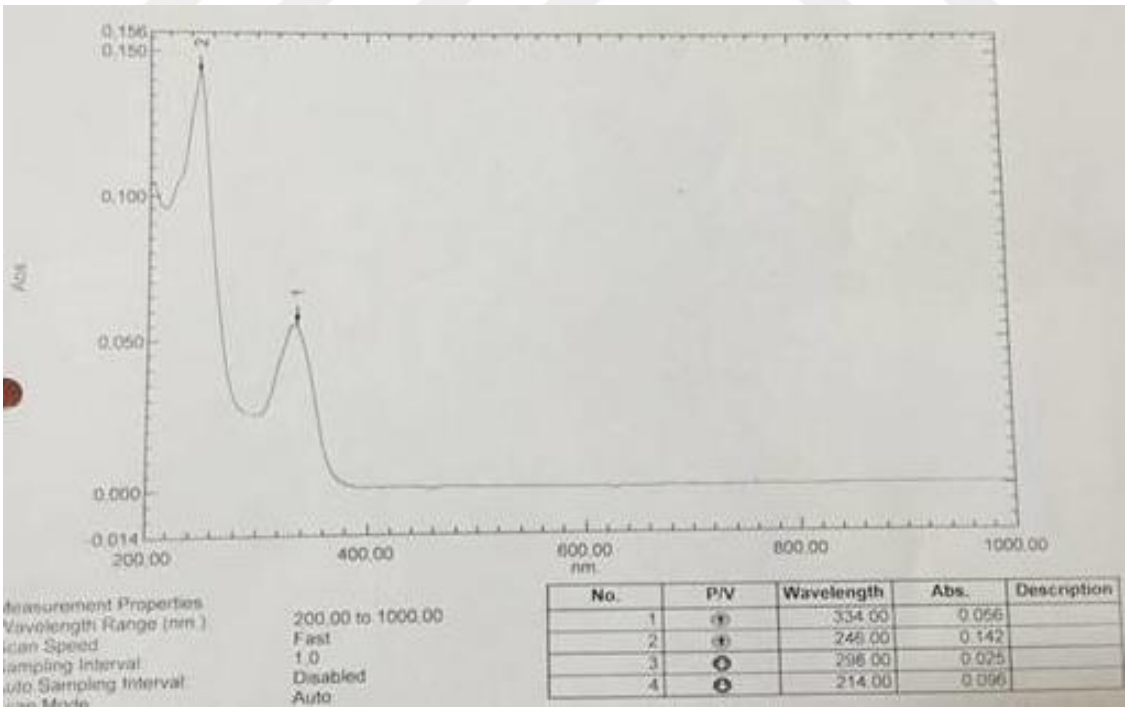
Şekil 4.14. İmatinib mesilatın *distile su* ortamındaki spektrum grafiği



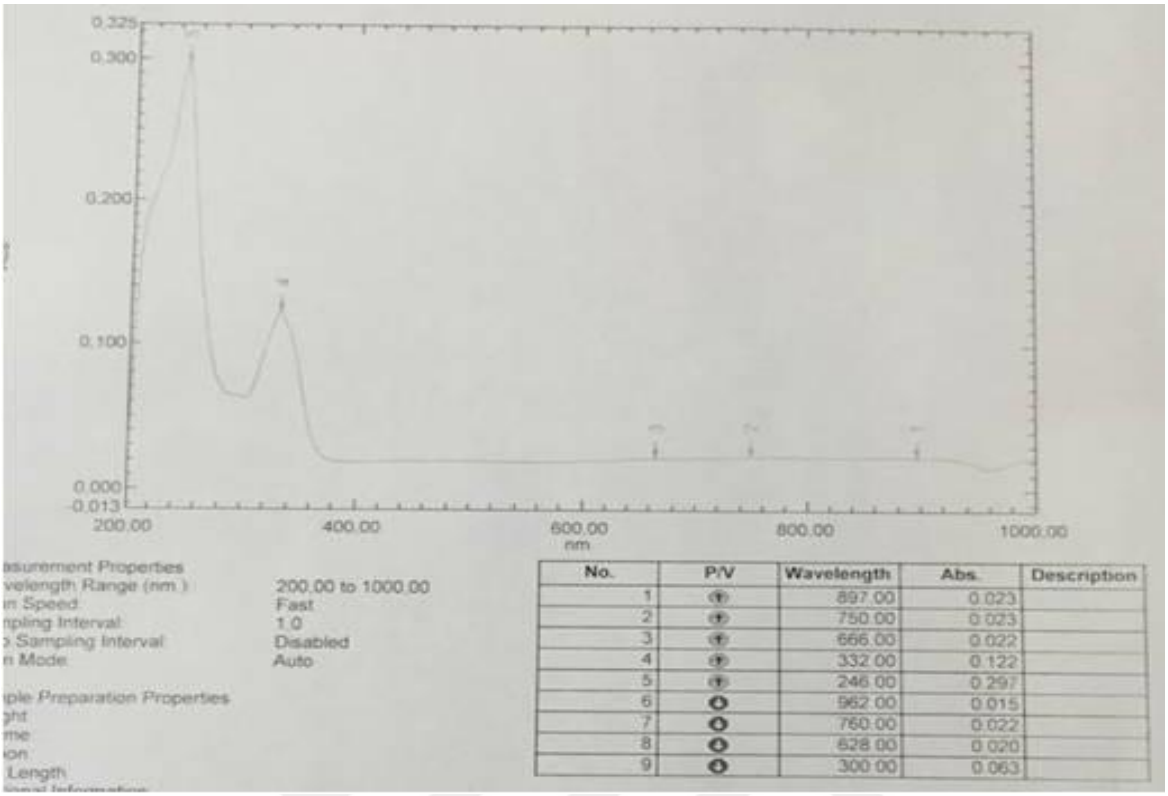
Şekil 4.15. İmatinib mesilatın *pH 7,4 fosfat tamponu*ndaki spektrum grafiği



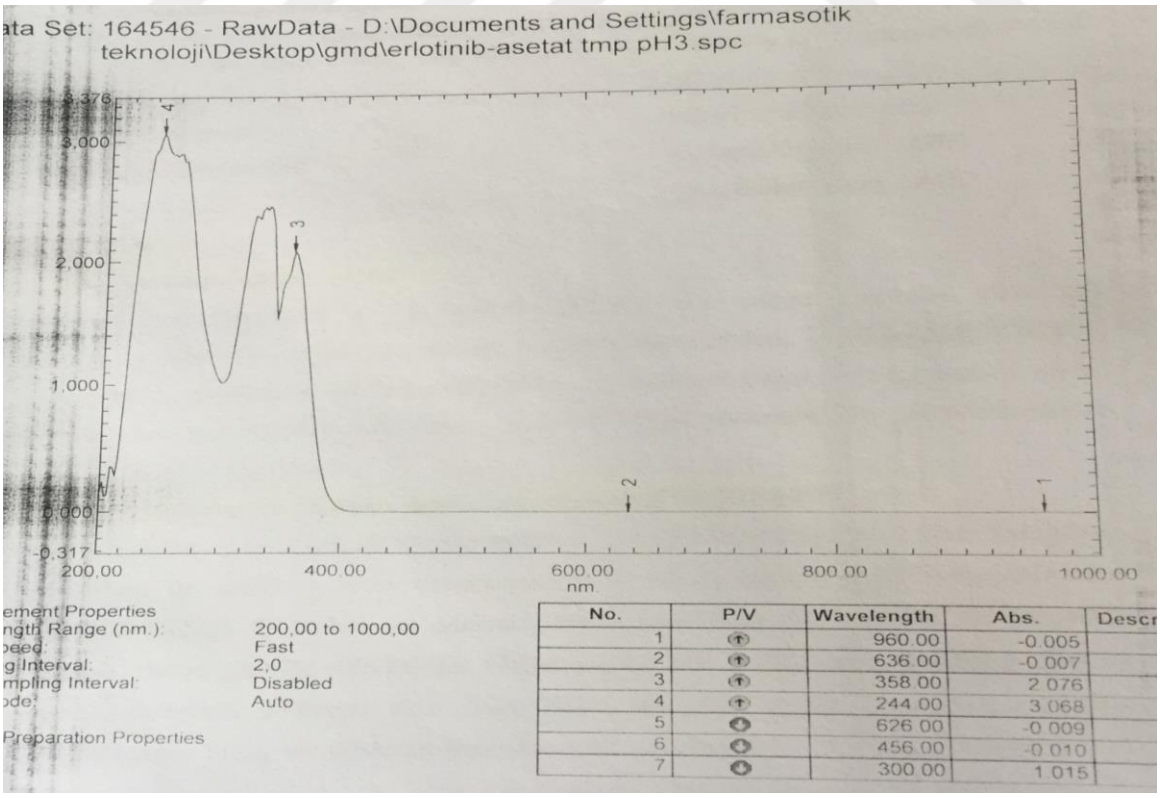
Şekil 4.16. İmatinib mesilatın *DMEM* ortamındaki spektrum grafiği



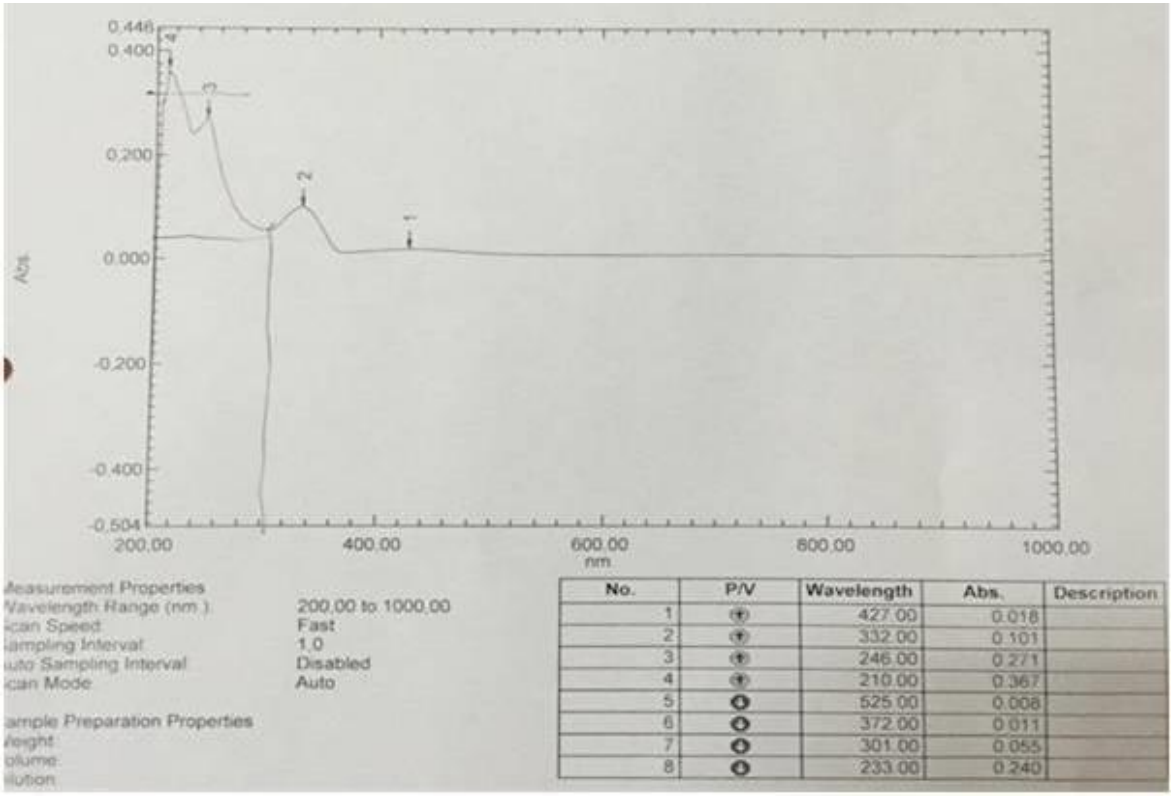
Şekil 4.17. Erlotinib HCl'in *distile su* ortamındaki spektrum grafiği



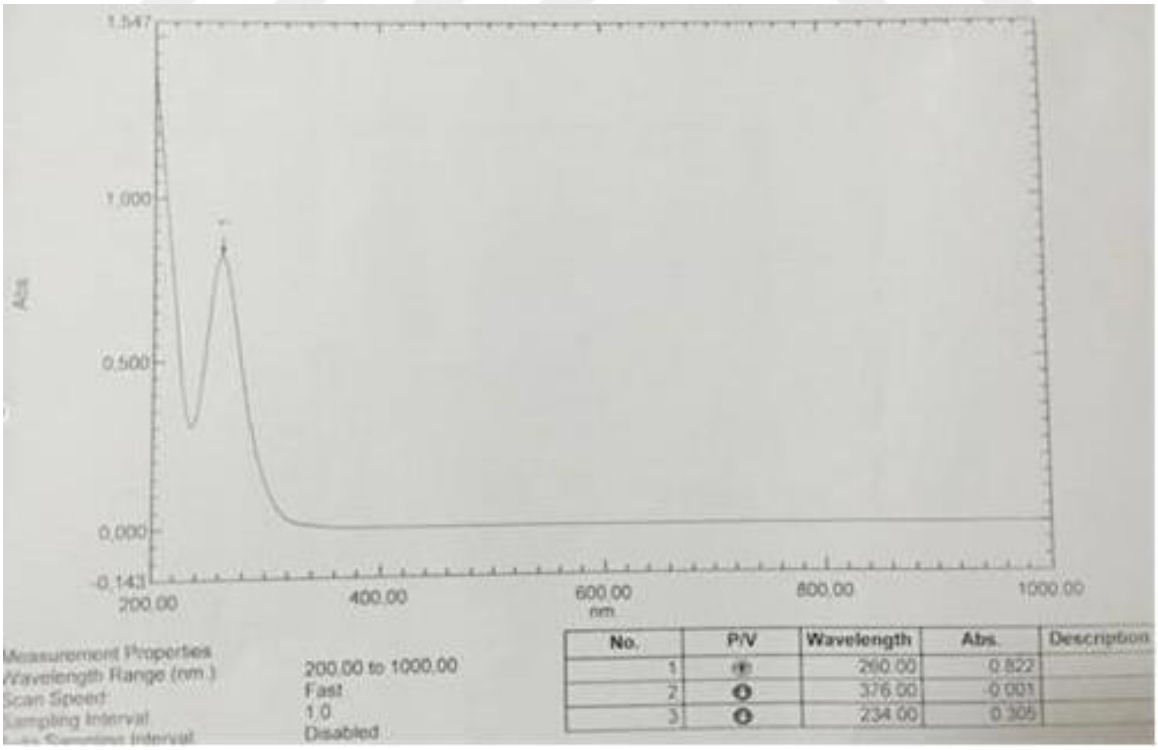
Şekil 4.18. Erlotinib HCl'in *pH 7,4 fosfat tampon*undaki spektrum grafiği



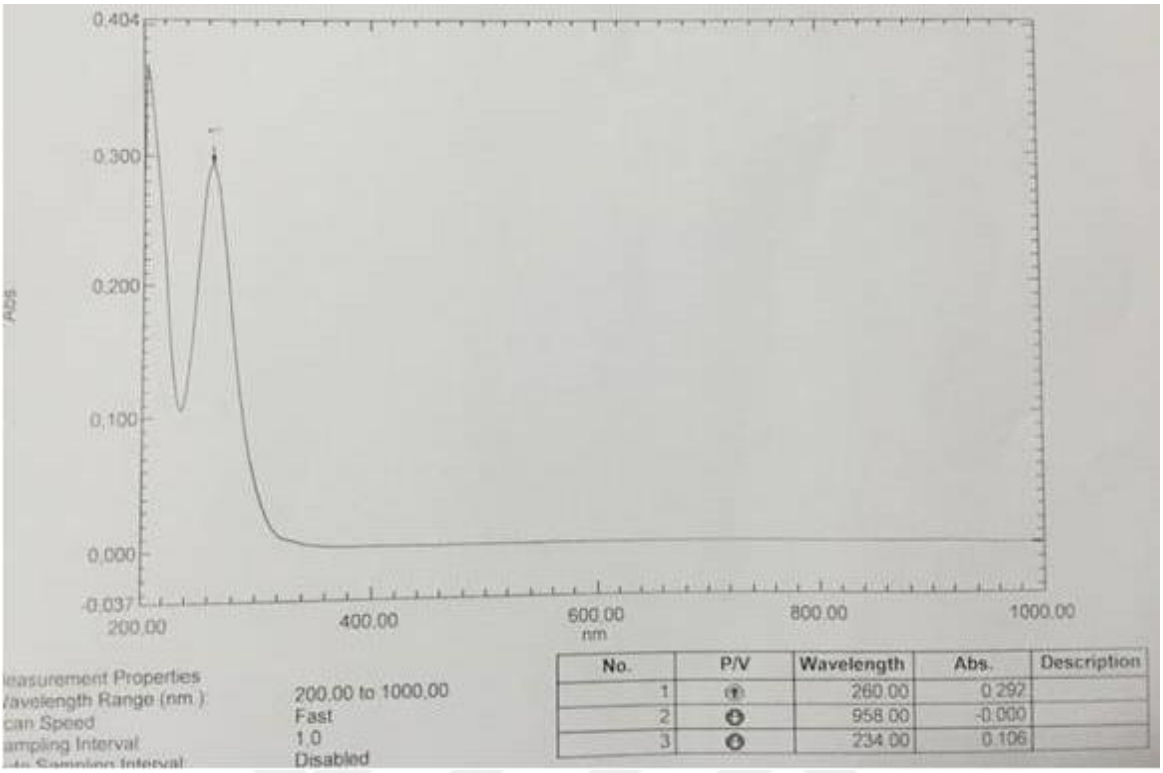
Şekil 4.19. Erlotinib HCl'in *pH 3 asetat tampon*undaki spektrum grafiği



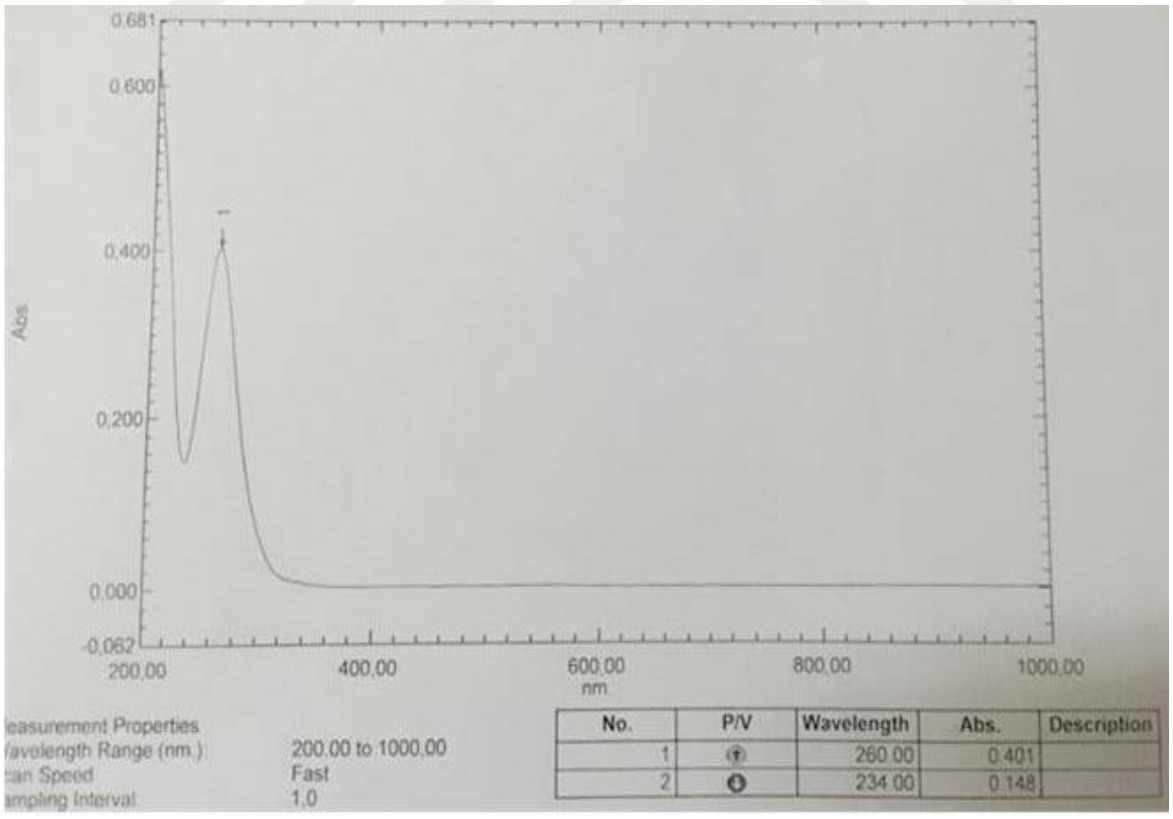
Şekil 4.20. Erlotinib HCl'in *DMEM* ortamındaki spektrum grafiği



Şekil 4.21. Deksketoprofen tremetamol'ün *distile su* ortamındaki spektrum grafiği



Şekil 4.22. Deksketoprofen tremetamol'ün *pH 7,4 fosfat tampon*undaki spektrum grafiği



Şekil 4.23. Deksketoprofen tremetamol'ün *DMEM* ortamındaki spektrum grafiği

Spektrum grafikleri verilen etkin ve yardımcı etkin maddelere ait dalga boyu taramaları sonucunda elde edilen maksimum absorbans değerleri aşağıda çizelge şeklinde belirtilmiştir.

Çizelge 4.3. Etkin ve yardımcı maddelere ait dalga boyu taraması sonuçları

Dalga Boyu Taraması Yapılan Madde	Kullanılan Ortam	Maksimum Absorbans Alınan Dalga Boyu (λ)
İmatinib mesilat	Distile Su	258
	Fosfat Tamponu	257
	DMEM	252
Erlotinib HCl	Distile Su	246
	pH 7,4 Fosfat Tamponu	246
	pH 3 Asetat Tamponu	244
	DMEM	246
Dexketoprofen tremetamol	Distile Su	260
	Fosfat Tamponu	260
	DMEM	260

4.1.4. Etkin maddelerin *in vitro* çalışmalarda kullanılmak üzere geliştirilen miktar tayini yöntemleri için validasyon sonuçları

0,150 ml/dakika akışta, trifloroasetik asit ilavesi ile pH'sı 2'ye ayarlanmış %60 ACN ve %40 UPLC suyu içeren karışım halindeli mobil fazda numune enjekte edilmiş ancak yayvan bir pik elde edilmiştir. Bunun üzerine mobil faz Metanol:Su (80:20) pH:2 olacak şekilde değiştirilerek analiz tekrarlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda sürdürülen analizlerde; düşük konsantrasyonlardaki numuneler için iyi absorbans alınamadığı ve pikte yarılmalar gözlenmiştir. Mobil faz pH'sı 4 olarak değiştirilmiş fakat kromatogramda örnek pikinin tek başına elde edilemediği, ortamın verdiği pik ile birlikte yer aldığı görülmüştür. Mobil faz sisteminin değiştirilmesine karar verilerek %0,05 amonyum asetat içeren metanol ve %0,05 amonyum asetat içeren su çözeltileri 50:50 mobil faz sisteminde 0,150 ml/dakika akış hızında denenmiş ancak iyi bir pik elde edilememiştir. Çalışmalarda kullanılan CORTEKS C18 kolonu yerine BEH kolon kullanılmasına karar verilmiştir. "3.

Gereç ve Yöntem" başlığı altında yer alan Çizelge 3.2'de BEH kolonda yapılan çalışmalar yer almaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda en iyi sonuç 50 mM amonyum asetat tamponu (%30) ve ACN:MeOH (40:60) (%70) mobil faz sisteminde alınmış olsa da, pik şeklinin iyileştirilmesi adına aynı mobil faz oranı kullanılacak şekilde sadece mobil fazı oluşturan ACN:MeOH karışımının oranı (40:60) yerine (20:80) olacak şekilde denenmiş ve en iyi kromatogramın bu şekilde alındığı düşünülerek bu çalışma koşullarında validasyon yapılmış ve deneyler sürdürülmüştür. Ayrıca analizlerde 10 µL olarak kullanılan enjeksiyon hacmi ise; UPLC cihazının loop'u değiştirilerek 20 µL'ye çıkartılmış ve çok daha iyi sonuçlar alması üzerine bu şekilde çalışılmasına karar verilmiştir.

Erlotinib HCl için örnek hazırlama işleminde ise; 10 mg, 5 mg veya 2 mg erlotinib HCl'in 100 mL distile suda tamamen çözünmediği gözlenmiştir. Bunun üzerine literatür taraması yapılmış ve erlotinib HCl'i tamamen çözebilmek için bir miktar etanol ilave edilmesi gerektiği görülmüştür. Deneysel olarak da etanol ilavesi ile kosolvan etkisi yaratılarak erlotinib HCl'in çözünürlüğünün arttığı gözlenmiştir. Bunun üzerine literatür ve piyasa ürünleri araştırılmış ve çeşitli ürünlerde %25'e kadar etanol kullanımının mevcut olduğu görülmüştür. 10 mg erlotinib HCl sırasıyla 5, 10, 15, ve 20 mL etanolde çözündürülmüş daha sonra da 100 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır. Erlotinib HCl'in 20 mL etanol ilavesi ile tamamen çözündüğü görülmüştür. 10 mg erlotinib HCl tartılmış 20 mL etanol ilave edilerek iyice çalkalanmış ardından distile su ile 100 mL'ye seyreltilmiştir. 100 µg/mL konsantrasyondaki bu çözelti stok çözelti olarak kullanılmıştır. Fosfat tamponu için örnek hazırlama işlemi sırasında ise 10 mg erlotinib HCl'in 20 mL etanol ilavesine rağmen total hacim olan 100 mL pH:7,4 fosfat tamponunda tam bir çözünme göstermediği gözlenmiştir. Bunun üzerine örnek hazırlama işlemi; 2 mg erlotinib HCl tartılması 20mL etanol ilave edilmesi ve 100 mL'ye pH:7,4 fosfat tamponu ile tamamlanılması şeklinde düzenlenmiştir. Tüm numuneler 20 µg/mL konsantrasyondaki bu çözelti stok çözelti üzerinden pH:7,4 fosfat tamponu ile seyreltilerek hazırlanmış 20 µg/mL konsantrasyondaki bu çözelti stok çözelti olarak kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar esnasında franz hücrelerinden salım deneylerinde erlotinib HCl içeren çözeltinin pH 7,4 fosfat tamponunda düşük % kümülatif salım değerlerine ulaşması nedeniyle ortamın değiştirilmesine karar verilmiştir. Gerçekleştirilen çeşitli çalışmalar sonucunda pH 3 asetat tamponu ortamının optimum ortam olduğu ve çözeltinin 96 saat sonunda %82 kümülatif salım değerine ulaştığı gözlenmiştir. Bu nedenle ayrıca pH 3 asetat tamponunda da validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. pH 3 asetat tamponunda ERLO için örnek hazırlama; 2 mg erlotinib

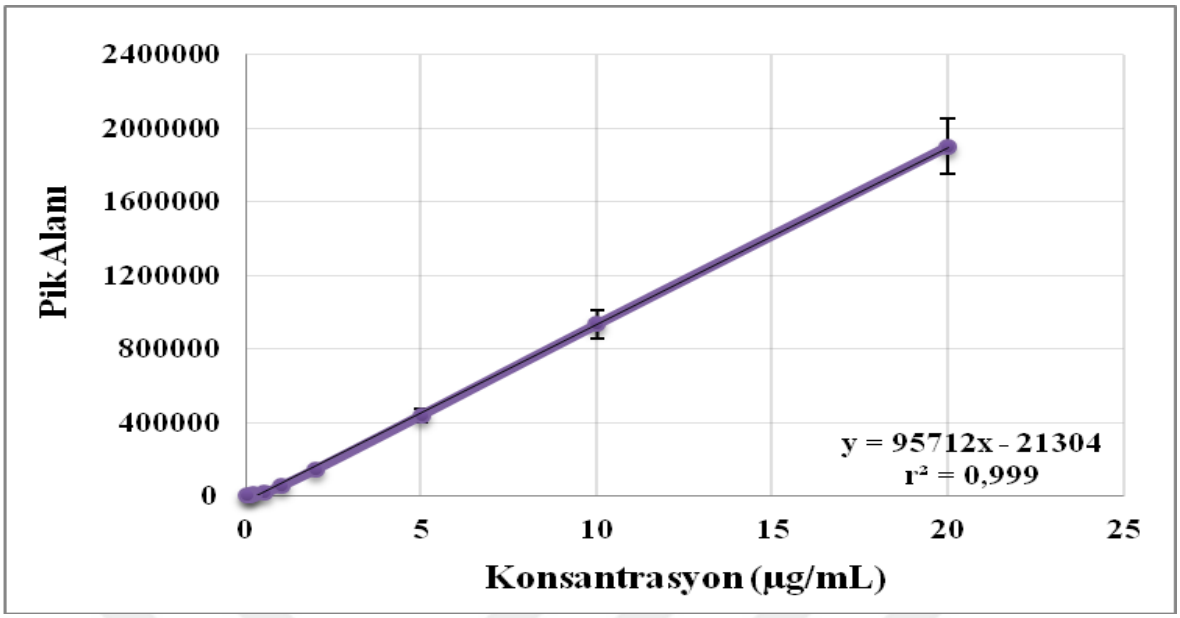
HCl tartılması ve 50 mL'ye pH 3 asetat tamponu ile tamamlanması şeklinde yapılmıştır. Tüm numuneler 40 µg/mL konsantrasyondaki bu çözelti stok çözelti üzerinden pH 3 asetat tamponu ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Erlotinib HCl'in DMEM ortamındaki örnek hazırlama işlemi sırasında ise 10 mg, 5 mg veya 2 mg erlotinib HCL'in 20 mL ve 25 mL etanol ilavesine rağmen total hacim olan 100mL DMEM ortamında tam bir çözünme göstermediği gözlenmiştir. Bunun üzerine örnek hazırlama işlemi; 2 mg erlotinib tartılması 25 mL etanol ve 25 mL distile su ilave edilmesi ve DMEM ile 100 mL'ye tamamlanılması şeklinde düzenlenmiştir. Tüm numuneler 20 µg/mL konsantrasyondaki bu çözelti stok çözelti üzerinden %25 etanol, %25 distile su ve %50 DMEM karışımı ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Çözünme probleminin giderilmesi ardından yapılan analiz işleminde erlotinib HCl pikinin yoğun içeriğe sahip olduğu bilinen DMEM'den kaynaklı piklere oldukça yakın olduğu ve özellikle düşük konsantrasyonların analizinde baseline almada problem yaşanacağı öngörülerek UPLC cihazında dalga boyu taraması yapılmıştır. Bu tarama sonuçlarına göre 300 nm'de çalışılmıştır.

ERLO ve DEX'in validasyonu; ilk olarak 20 µg/mL derişime sahip örnek ile başlatılmış ancak bu konsantrasyonda masa piki gözlenmiştir. Bunun üzerine validasyon işlemi; stok çözelti üzerinden 10 µg/ml – 0,05 µg/ml derişim aralığında seyreltmeler yapılarak 8 farklı konsantrasyonda 6 paralel olacak şekilde hazırlanan örnekler üzerinden yapılmıştır.

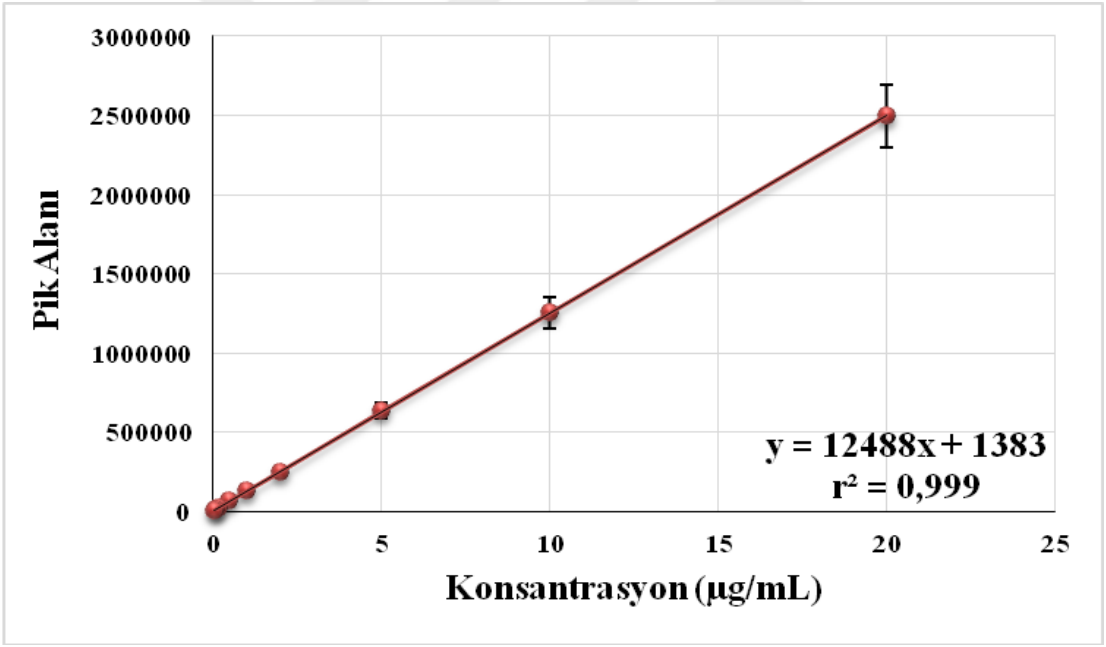
Doğrusallık

İmatinib mesilata ait doğrusallık çalışmaları 20 µg/mL – 0,05 µg/mL konsantrasyon aralığında 6 paralel üzerinden sürdürülmüş ve elde edilen pik alanı sonuçları konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmiştir.

10 mg İMA veya DEX tartılmış distile su ile 100 mL'ye seyreltildikten sonra 20 µg/mL – 0,05 µg/mL konsantrasyon aralığında 9 farklı numune hazırlanarak doğrusallık parametresi değerlendirilmiştir (Şekil 4.24 ve Şekil 4.25).

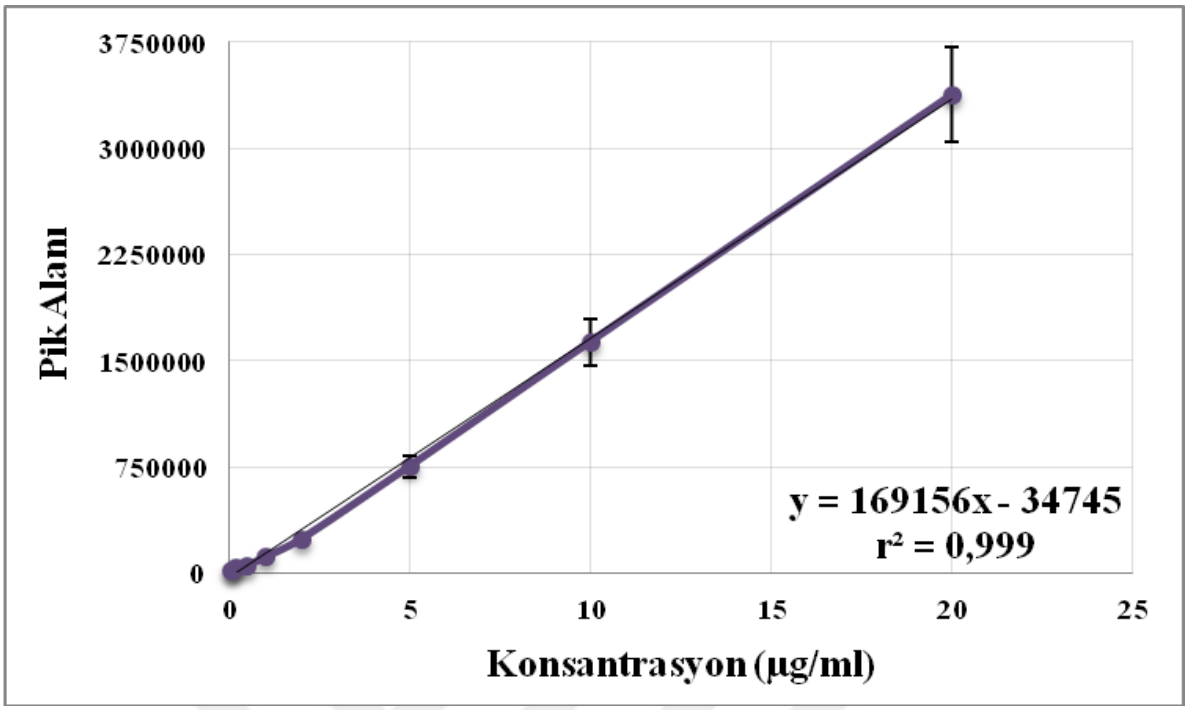


Şekil 4.24. Distile su ortamında çözülmüş imatinib mesilata ait doğrusallık grafiği (n=6)

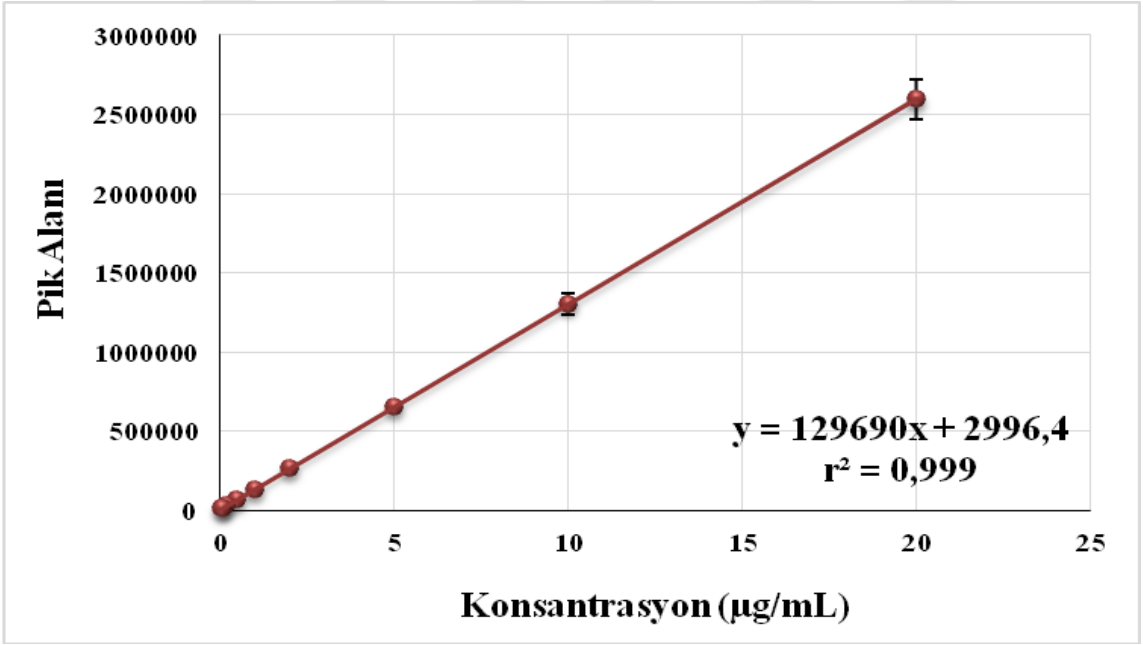


Şekil 4.25. BEH kolonda distile su ortamında çözülmüş DEX'e ait doğrusallık grafiği (n=6)

10 mg İMA veya DEX tartılmış, pH 7,4 fosfat tamponu ile 100 mL'ye seyreltildikten sonra 20 µg/mL – 0,05 µg/mL konsantrasyon aralığında 9 farklı numune hazırlanarak doğrusallık parametresi değerlendirilmiştir (Şekil 4.26 ve Şekil 4.27).

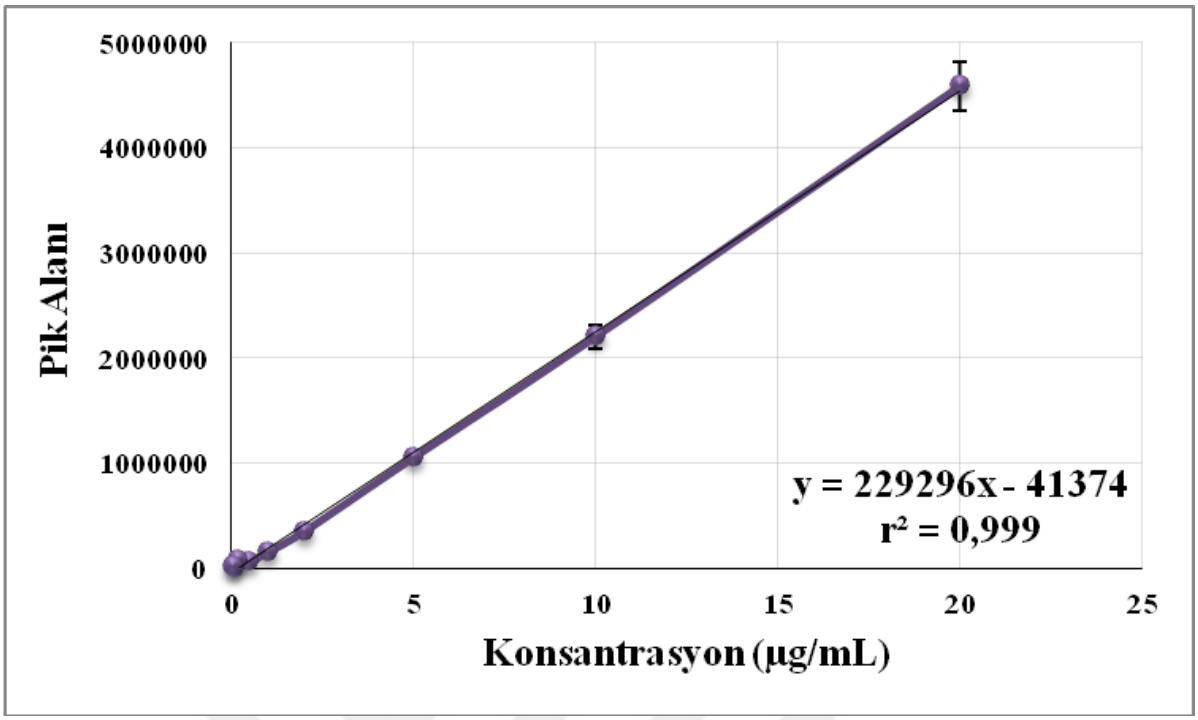


Şekil 4.26. pH 7,4 fosfat tamponu ortamında çözülmüş imatinib mesilata ait doğrusallık grafiği (n=6)

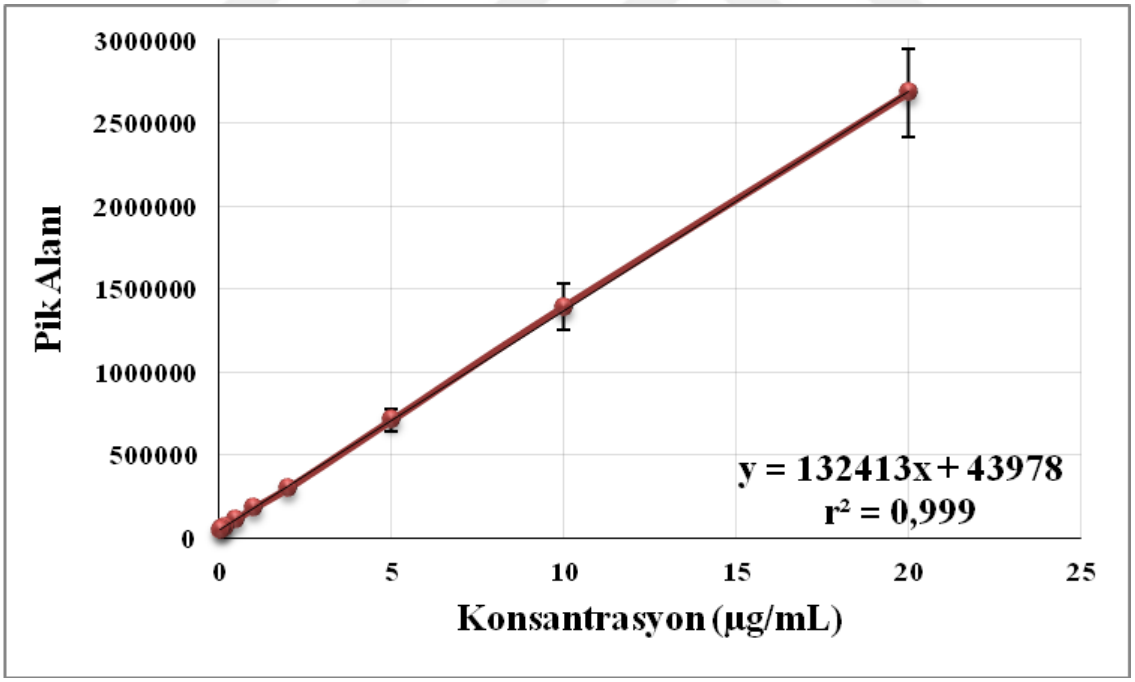


Şekil 4.27. BEH kolonda pH 7,4 fosfat tamponu ortamında çözülmüş DEX'e ait doğrusallık grafiği (n=6)

10 mg İMA veya DEX tartılmış DMEM ile 100 mL'ye seyreltildikten sonra 20 µg/mL – 0,05 µg/mL konsantrasyon aralığında 9 farklı numune hazırlanarak doğrusallık parametresi değerlendirilmiştir (Şekil 4.28 ve Şekil 4.29).

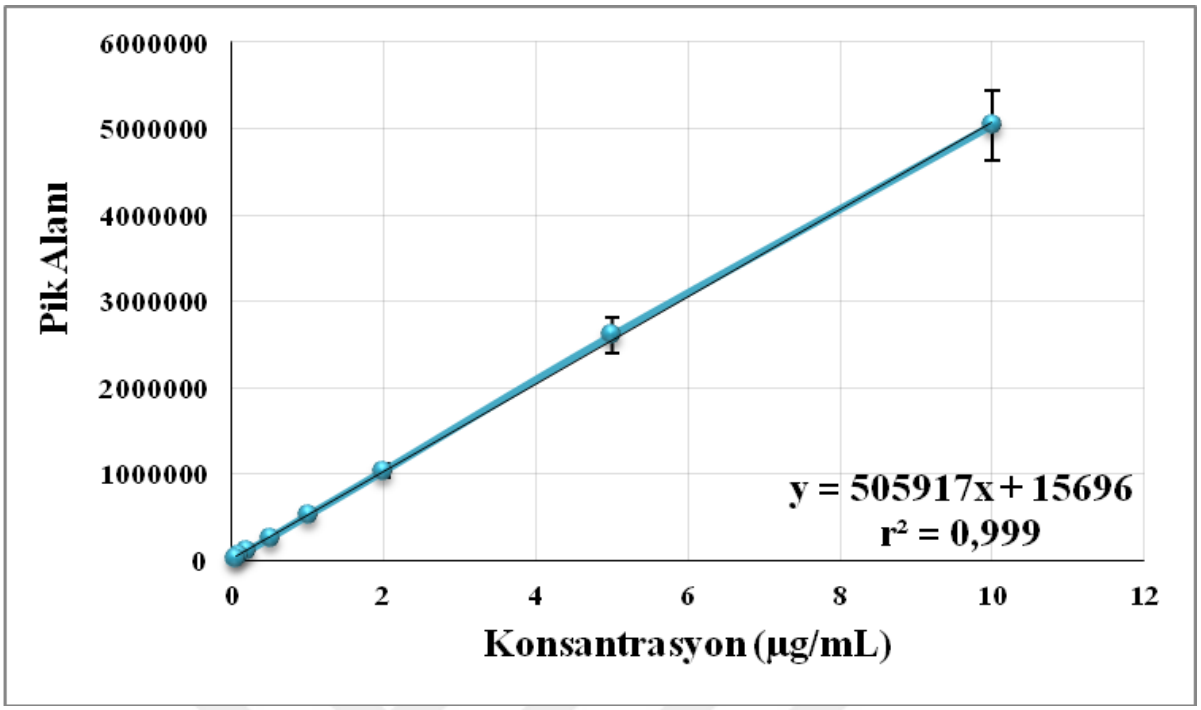


Şekil 4.28. DMEM ortamında çözülmüş imatinib mesilata ait doğrusallık grafiği (n=6)

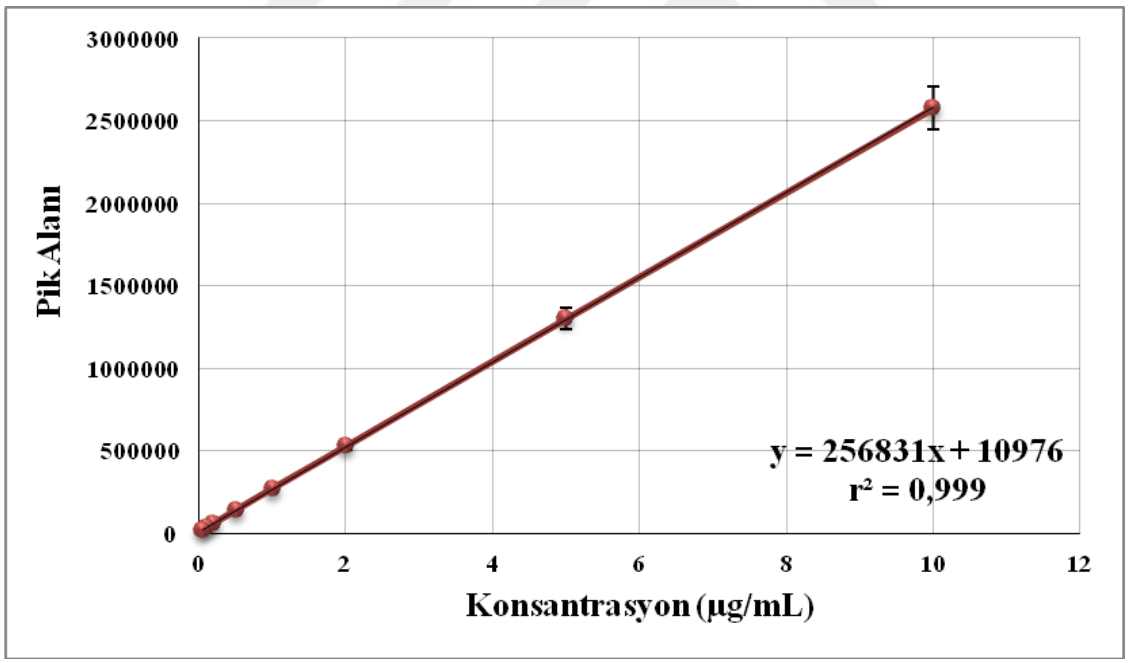


Şekil 4.29. BEH kolonda DMEM ortamında çözülmüş DEX'e ait doğrusallık grafiği (n=6)

10 mg ERLO veya DEX tartılmış 20 mL etanolde çözüldükten sonra distile su ile 100 mL'ye seyreltilmiştir. 10 µg/mL – 0,05 µg/mL konsantrasyon aralığında 8 farklı numune %20 etanol içeren distile su ortamı ile seyreltilerek hazırlandıktan sonra analiz edilerek doğrusallık parametresi değerlendirilmiştir (Şekil 4.30 ve Şekil 4.31).

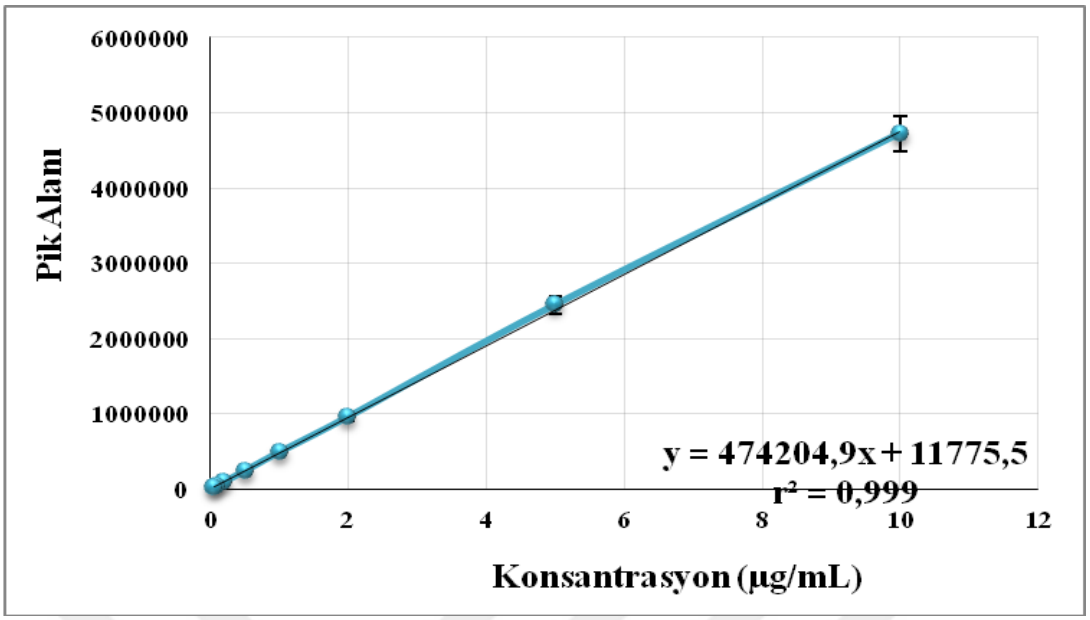


Şekil 4.30. Distile su ortamında çözülmüş erlotinib HCl'e ait doğrusallık grafiği (n=6)

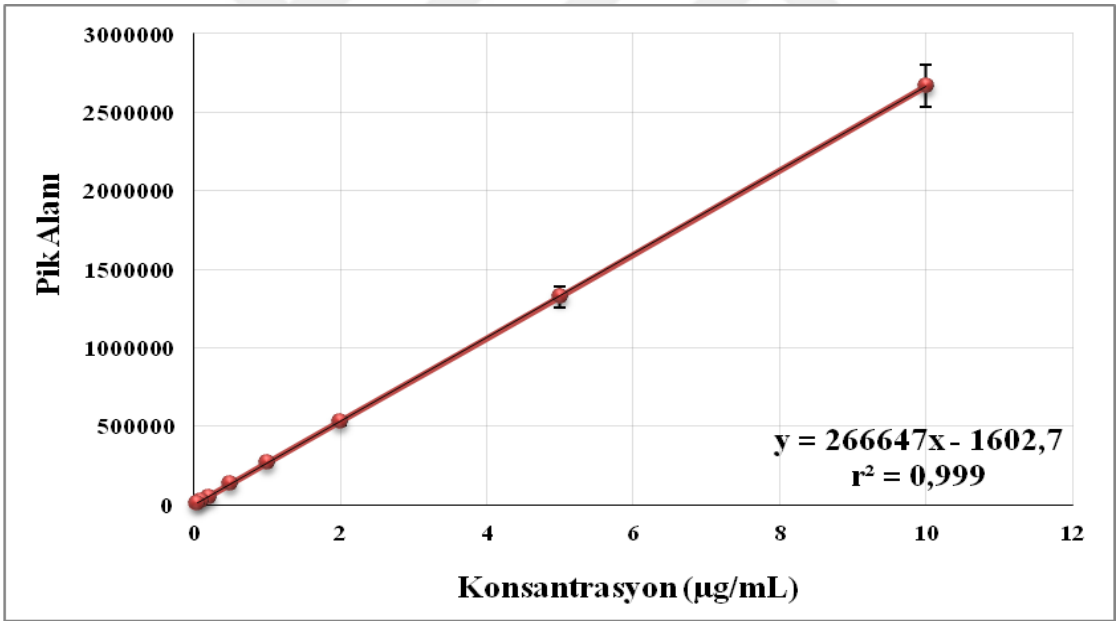


Şekil 4.31. CORTEKS C18 kolonunda distile su ortamında çözülmüş DEX'e ait doğrusallık grafiği (n=6)

10 mg ERLO veya DEX tartılmış 20 mL etanolde çözüldükten sonra pH 7,4 fosfat tamponu ile 100 mL'ye seyreltilmiştir. 10 µg/mL – 0,05 µg/mL konsantrasyon aralığında 8 farklı numune %20 etanol içeren pH 7,4 fosfat tamponu ile seyreltilerek hazırlandıktan sonra analiz edilerek doğrusallık parametresi değerlendirilmiştir (Şekil 4.32 ve Şekil 4.33).

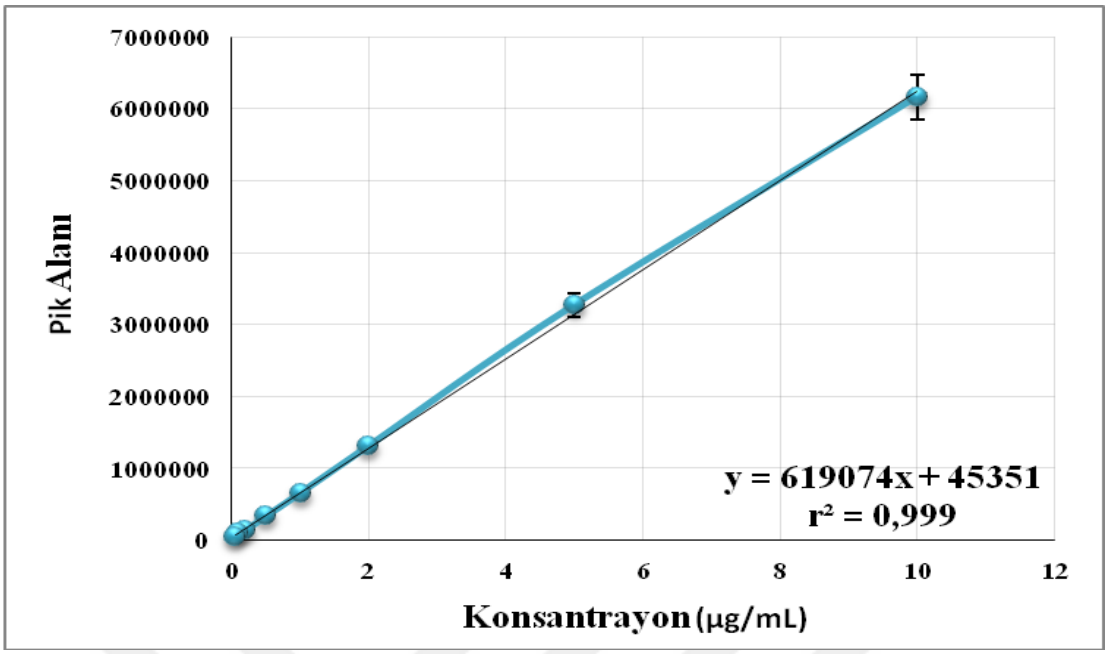


Şekil 4.32. pH 7,4 fosfat tamponu ortamında çözülmüş erlotinib HCl'e ait doğrusallık grafiği (n=6)

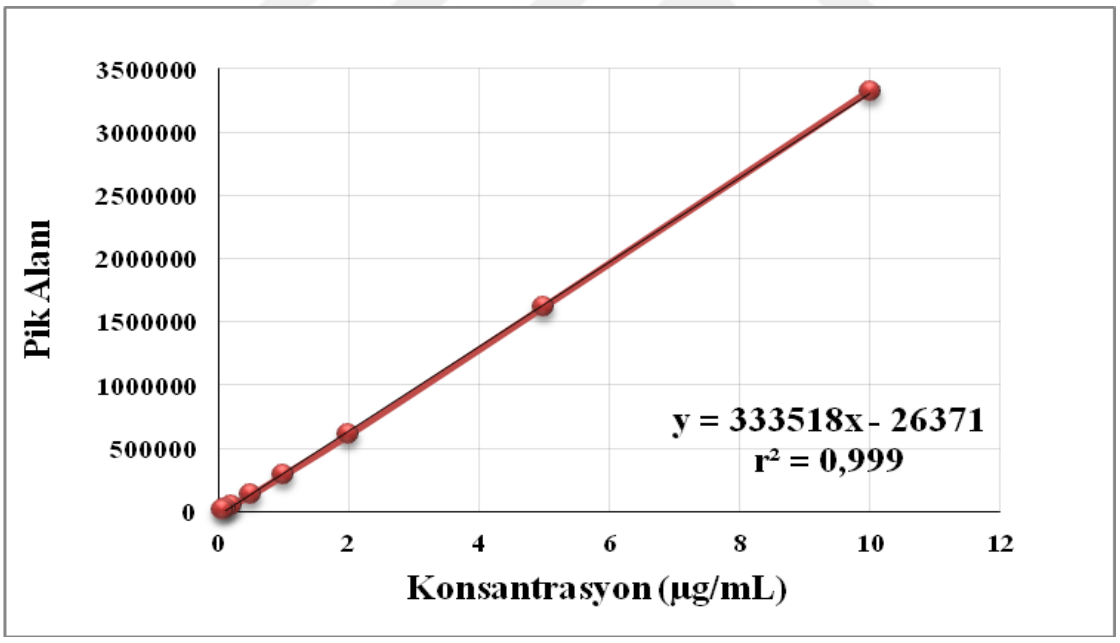


Şekil 4.33. CORTEKS C18 kolonunda pH 7,4 fosfat tamponu ortamında çözülmüş DEX'e ait doğrusallık grafiği (n=6)

ERLO için pH 3 asetat tamponunda da validasyon çalışmaları sürdürülmüştür. 10 mg ERLO veya DEX tartılmış ve pH 3 asetat tamponu ile 100 mL'ye seyreltilmiştir. 10 µg/mL – 0,05 µg/mL konsantrasyon aralığında 8 farklı numune pH 3 asetat tamponu ile seyreltilerek hazırlandıktan sonra analiz edilerek doğrusallık parametresi değerlendirilmiştir (Şekil 4.34 ve Şekil 4.35).



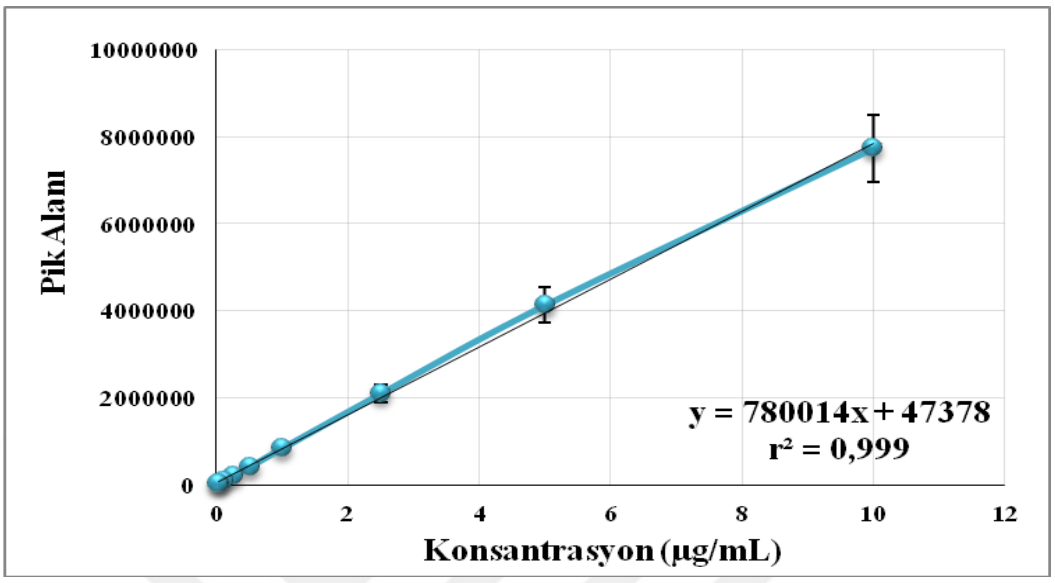
Şekil 4.34. pH 3 asetat tamponu ortamında çözülmüş ERLO'ya ait doğrusallık grafiği (n=6)



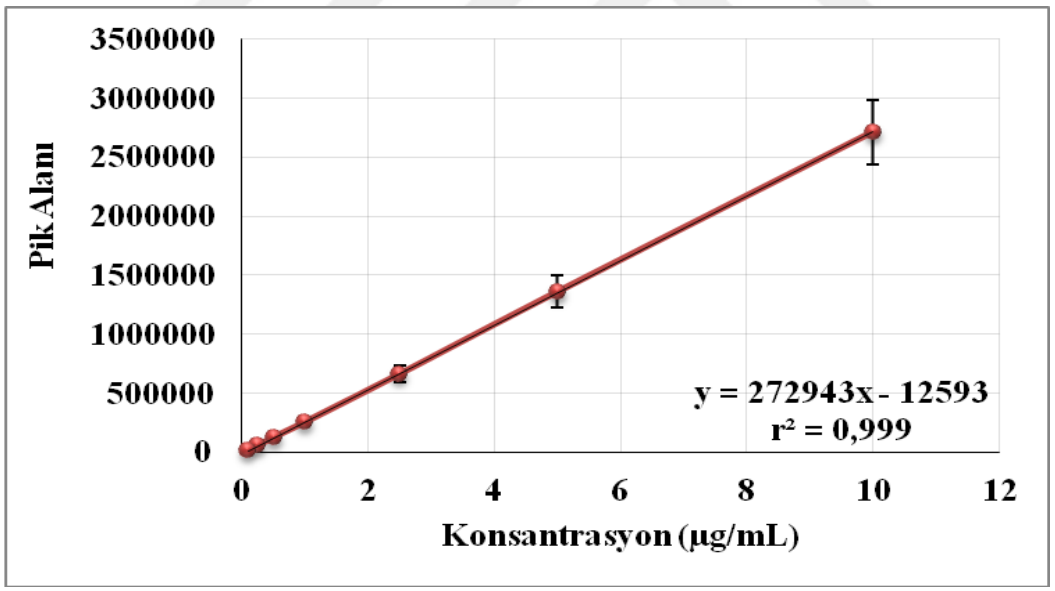
Şekil 4.35. CORTEKS C18 kolonunda pH 3 asetat tamponu ortamında çözülmüş DEX'e ait doğrusallık grafiği (n=6)

10 mg ERLO veya DEX tartılmış 25 mL etanolde çözüldükten 25 mL distile su ilave edilmiştir. Daha sonrasında ise DMEM ile 100 mL'ye seyreltilmiştir. 10 µg/mL – 0,05 µg/mL konsantrasyon aralığında 8 farklı numune %25 etanol, %25 distile su ve %50

DMEM içeren karışım ile seyreltilerek hazırlandıktan sonra analiz edilerek doğrusallık parametresi değerlendirilmiştir (Şekil 4.36 ve Şekil 4.37).



Şekil 4.36. DMEM ortamında çözülmüş erlotinib HCl'e ait doğrusallık grafiği (n=6)



Şekil 4.37. CORTEKS C18 kolonunda DMEM ortamında çözülmüş DEX'e ait doğrusallık grafiği (n=6)

Kesinlik

Deney içi ve deneyler arası olmak üzere iki farklı şekilde değerlendirilmiştir.

Deney içi kesinlik

Distile su, pH 7,4 fosfat tamponu ve DMEM ortamlarında İMA, ERLO ve DEX için aynı konsantrasyondaki numunenin ard arda 10 defa analiz edilmesi ile değerlendirilmiştir. ERLO için pH 3 asetat tamponunda da çalışmalar sürdürülmüştür.

Çizelge 4.4. İmatinib mesilat için deney içi kesinlik sonuçları

		Distile Su	**pH 7,4 Fosfat Tamponu**	**DMEM**
No	**Derişim (µg/mL)**	**Analiz Değeri**	**Analiz Değeri**	**Analiz Değeri**
1	10	9,992	9,796	9,906
2	10	9,990	9,966	9,946
3	10	9,999	9,980	9,929
4	10	9,882	10,016	9,877
5	10	9,886	10,012	9,879
6	10	9,995	9,987	9,879
7	10	9,989	10,037	9,905
8	10	9,993	10,076	9,888
9	10	9,988	10,120	9,890
10	10	9,989	10,151	9,893
Ortalama		9,970	10,014	9,899
Standart Sapma		0,046	0,098	0,023
Bağıl Standart Sapma		0,456	0,978	0,230

Çizelge 4.5. Erlotinib HCl için deney içi kesinlik sonuçları

		Distile Su	pH 7,4 Fosfat Tamponu	pH 3 Asetat Tamponu	DMEM
No	**Derişim (µg/mL)**	**Analiz Değeri**	**Analiz Değeri**	**Analiz Değeri**	**Analiz Değeri**
1	10	9,870	9,888	9,960	9,950
2	10	9,881	9,888	9,986	9,941
3	10	9,876	9,887	9,962	9,948
4	10	9,878	9,895	9,977	9,954
5	10	9,874	9,893	9,976	9,957
6	10	9,865	9,893	9,953	9,946
7	10	9,861	9,890	9,971	9,940
8	10	9,851	9,896	9,967	9,950
9	10	9,842	9,893	9,954	9,944
10	10	9,839	9,888	9,937	9,929
Ortalama		9,864	9,891	9,891	9,891
Standart Sapma		0,015	0,003	0,003	0,003
BSS		0,153	0,034	0,034	0,034

Çizelge 4.6. DEX için deney içi kesinlik sonuçları

		Distile Su		PBS		DMEM	
		Analiz Değeri		Analiz Değeri		Analiz Değeri	
No	**Derişim (µg/mL)**	**BEH**	**CORTEKS**	**BEH**	**CORTEKS**	**BEH**	**CORTEKS**
1	10	10,011	10,047	10,135	10,015	10,202	9,969
2	10	10,021	10,051	10,128	10,012	10,197	9,970
3	10	10,034	10,050	10,125	10,024	10,192	9,973
4	10	10,027	10,025	10,124	10,014	10,183	9,969
5	10	10,018	10,024	10,144	10,021	10,161	9,969
6	10	10,033	10,065	10,128	10,007	10,146	9,964
7	10	10,036	10,013	10,135	10,005	10,119	9,960
8	10	10,040	10,041	10,142	10,000	10,090	9,957
9	10	10,048	10,068	10,136	10,002	10,055	9,958
10	10	10,038	10,042	10,137	9,998	10,014	9,963
Ortalama		10,031	10,043	10,133	10,010	10,136	9,965
Standart Sapma		0,011	0,018	0,007	0,009	0,065	0,006
BSS		0,112	0,175	0,066	0,087	0,641	0,056

Deneyler arası kesinlik

Deneyler arası kesinlik maddelere ait farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerin birbirini takip eden 3 gün içerisinde 6 paralel üzerinden analizleri şeklinde yürütülmüştür.

Çizelge 4.7. Farklı ortamlarda çözülmüş İMA'ya ait deneyler arası kesinlik sonuçları

İMA	Derişim	1.GÜN	2. GÜN	3.GÜN	Ort.	SS	BSS
Distile Su	10	10,036	9,961	9,872	9,956	0,082	0,825
	2	2,047	2,075	2,020	2,047	0,027	1,332
	0,5	0,479	0,480	0,483	0,481	0,002	0,428
pH 7,4 fosfat tamponu	10	9,876	9,894	9,940	9,903	0,033	0,333
	2	1,992	1,977	1,962	1,977	0,015	0,759
	0,5	0,514	0,503	0,507	0,508	0,006	1,102
DMEM	10	9,962	10,101	10,110	10,058	0,083	0,825
	2	1,838	1,817	1,830	1,828	0,010	0,558
	0,5	0,463	0,453	0,449	0,455	0,007	1,593

Çizelge 4.8. Farklı ortamlarda çözülmüş ERLO'ya ait deneyler arası kesinlik sonuçları

ERLO	Derişim	1.GÜN	2. GÜN	3.GÜN	Ort.	SS	BSS
Distile Su	10	9,894	9,887	9,877	9,886	0,009	0,087
	2	2,026	2,026	2,027	2,027	0,001	0,026
	0,5	0,490	0,491	0,490	0,491	0,001	0,146
	0,1	0,094	0,093	0,094	0,094	0,001	0,884
pH 7,4 fosfat tamponu	10	9,920	9,932	9,902	9,918	0,015	0,154
	2	1,997	1,995	1,993	1,995	0,002	0,107
	0,5	0,487	0,482	0,483	0,484	0,002	0,471
	0,1	0,098	0,097	0,098	0,098	0,001	0,991
pH 3 asetat tamponu	10	9,880	9,939	9,968	9,929	0,045	0,454
	2	2,053	2,045	2,061	2,053	0,008	0,409
	0,5	0,468	0,461	0,464	0,464	0,004	0,812
	0,1	0,078	0,076	0,077	0,077	0,001	1,727
DMEM	10	9,978	9,955	10,015	9,983	0,030	0,303
	2	2,048	2,048	2,043	2,046	0,003	0,141
	0,5	0,497	0,497	0,496	0,497	0,001	0,116
	0,1	0,101	0,098	0,099	0,099	0,002	1,538

Çizelge 4.9. Farklı ortamlarda çözülmüş DEX'e ait BEH kolonda yapılan deneyler arası kesinlik sonuçları

DEX BEH	Derişim	1.GÜN	2. GÜN	3.GÜN	Ort.	SS	BSS
Distile Su	10	10,034	10,046	10,024	10,035	0,011	0,110
	2	1,963	1,965	1,963	1,964	0,001	0,065
	0,5	0,487	0,487	0,488	0,487	0,001	0,185
	0,1	0,097	0,097	0,096	0,097	0,000	0,381
pH 7,4 fosfat tamponu	10	9,947	9,890	9,840	9,892	0,053	0,541
	2	2,018	2,004	2,011	2,011	0,007	0,358
	0,5	0,499	0,503	0,496	0,499	0,004	0,713
	0,1	0,094	0,094	0,093	0,093	0,001	0,804
DMEM	10	9,845	9,889	10,004	9,913	0,082	0,829
	2	1,936	1,911	1,906	1,918	0,016	0,841
	0,5	0,502	0,509	0,500	0,504	0,005	0,968
	0,1	0,076	0,076	0,078	0,076	0,001	1,446

Çizelge 4.10. Farklı ortamlarda çözülmüş DEX'e ait CORTEKS C18 kolonda yapılan deneyler arası kesinlik sonuçları

DEX BEH	Derişim	1.GÜN	2. GÜN	3.GÜN	Ort.	SS	BSS
Distile Su	10	10,006	10,076	10,047	10,043	0,035	0,350
	2	2,019	2,020	2,020	2,019	0,001	0,034
	0,5	0,504	0,505	0,508	0,505	0,002	0,453
	0,1	0,087	0,091	0,091	0,091	0,000	0,376
pH 7,4 fosfat tamponu	10	10,016	9,999	10,006	10,007	0,009	0,086
	2	2,007	2,011	2,007	2,009	0,002	0,104
	0,5	0,503	0,504	0,502	0,503	0,001	0,172
	0,1	0,103	0,104	0,103	0,103	0,001	0,562
DMEM	10	10,051	10,046	9,959	10,019	0,051	0,513
	2	2,558	2,558	2,549	2,555	0,005	0,208
	0,5	0,505	0,512	0,508	0,508	0,003	0,663
	0,1	0,107	0,107	0,106	0,107	0,001	0,730

Doğruluk ve geri elde

Maddelerin distile su, pH 7,4 fosfat tamponu ve DMEM ortamlarında İMA, ERLO ve DEX için 3 farklı konsantrasyondaki numuneleri analiz edilerek ölçülen konsantrasyonların bilinen konsantrasyonlar ile karşılaştırılması ile değerlendirilmektedir. ERLO için pH 3 asetat tamponunda da çalışmalar sürdürülmüştür.

Çizelge 4.11. İmatinib mesilat için doğruluk ve geri elde sonuçları

Ortam	Madde Yüzdesi	Madde Konsantrasyonu	Hesapla Bulunan Konsantrasyon	Bağıl Sapma
Distile Su	% 120	12	11,920±0,098	0,826
	% 100	10	9,972±0,064	0,648
	% 80	8	7,925±0,070	0,902
pH 7,4 fosfat tamponu	% 120	12	11,987±0,039	0,328
	% 100	10	9,866±0,017	0,172
	% 80	8	7,963±0,002	0,030
DMEM	% 120	12	12,043±0,050	0,414
	% 100	10	9,993±0,002	0,021
	% 80	8	7,998±0,019	0,236

Çizelge 4.12. Erlotinib HCl için doğruluk ve geri elde sonuçları

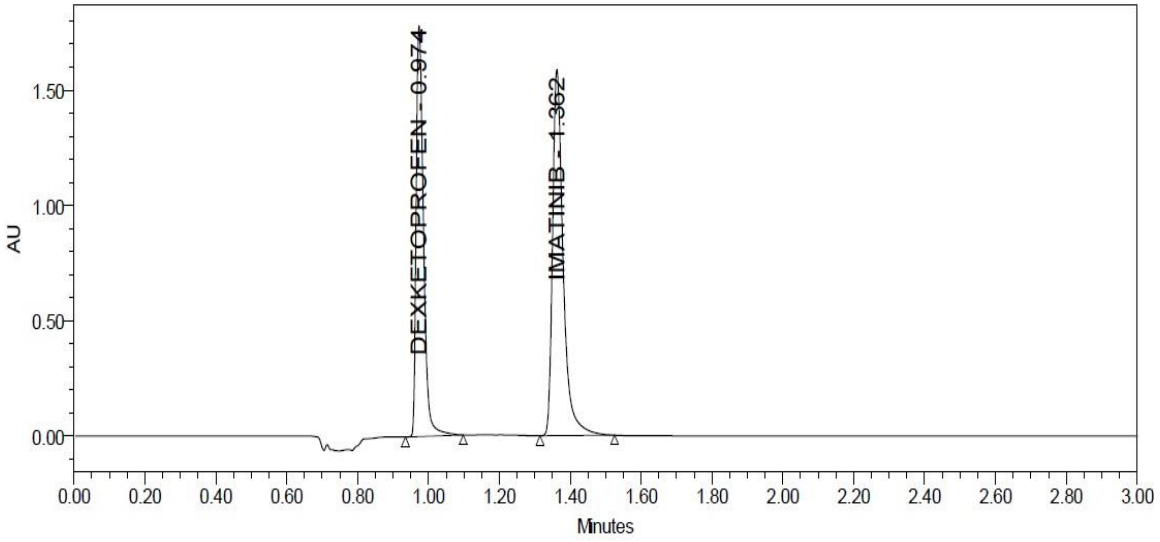
Ortam	Madde Yüzdesi	Madde Konsantrasyonu	Hesapla Bulunan Konsantrasyon	Bağıl Sapma
Distile Su	% 120	12	11,507 ± 0,070	0,604
	% 100	10	9,787 ± 0,078	0,795
	% 80	8	7,967 ± 0,058	0,725
pH 7,4 fosfat tamponu	% 120	12	11,967 ± 0,018	0,159
	% 100	10	9,902 ± 0,016	0,165
	% 80	8	7,975 ± 0,012	0,159
pH 3 asetat tamponu	% 120	6	6,039±0,009	0,141
	% 100	5	5,220±0,004	0,086
	% 80	4	4,152±0,003	0,064
DMEM	% 120	6	6,067 ± 0,024	0,382
	% 100	5	5,063 ± 0,023	0,432
	% 80	4	4,007 ± 0,017	0,393

Çizelge 4.13. Deksketoprofen tremetamol için doğruluk ve geri elde sonuçları

Kolon	Ortam	Madde Yüzdesi	Madde Konsantrasyonu	Hesapla Bulunan Konsantrasyon	Bağıl Sapma
BEH KOLON	Distile Su	% 120	12	11,911 ± 0,007	0,061
		% 100	10	10,012 ± 0,014	0,136
		% 80	8	8,032 ± 0,007	0,090
	pH 7,4 fosfat tamponu	% 120	12	12,113 ± 0,015	0,120
		% 100	10	10,071 ± 0,007	0,071
		% 80	8	7,932 ± 0,004	0,050
	DMEM	% 120	12	12,045 ± 0,042	0,344
		% 100	10	10,132 ± 0,044	0,432
		% 80	8	8,124 ± 0,040	0,489
CORTEKS C18 KOLON	Distile Su	% 120	6	6,015 ± 0,002	0,039
		% 100	5	4,918 ± 0,002	0,049
		% 80	4	3,966 ± 0,003	0,078
	pH 7,4 fosfat tamponu	% 120	6	6,006 ± 0,027	0,458
		% 100	5	5,047 ± 0,025	0,489
		% 80	4	4,050 ± 0,030	0,729
	DMEM	% 120	6	6,066 ± 0,003	0,042
		% 100	5	5,010 ± 0,003	0,053
		% 80	4	4,010 ± 0,007	0,163

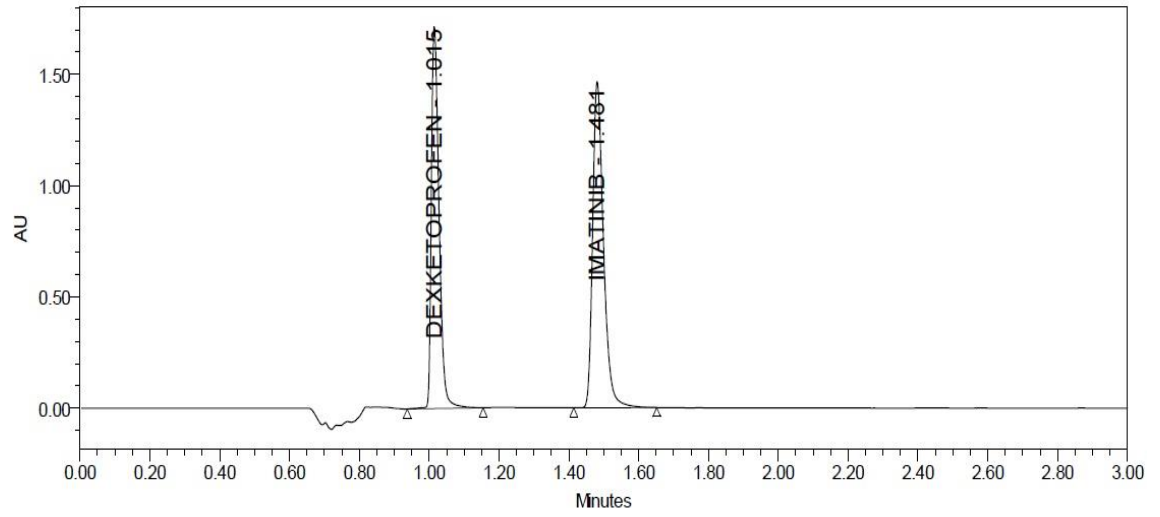
Özgünlük ve seçicilik

Geliştirilen analiz yönteminin yalnızca istenen maddeyi saptayabildiği ve analite ait pikin başka herhangi bir madde ile girişim yapmadığının kontrolü yapılmıştır. Maddelere ait kromatogramlar aşağıda yer almaktadır.



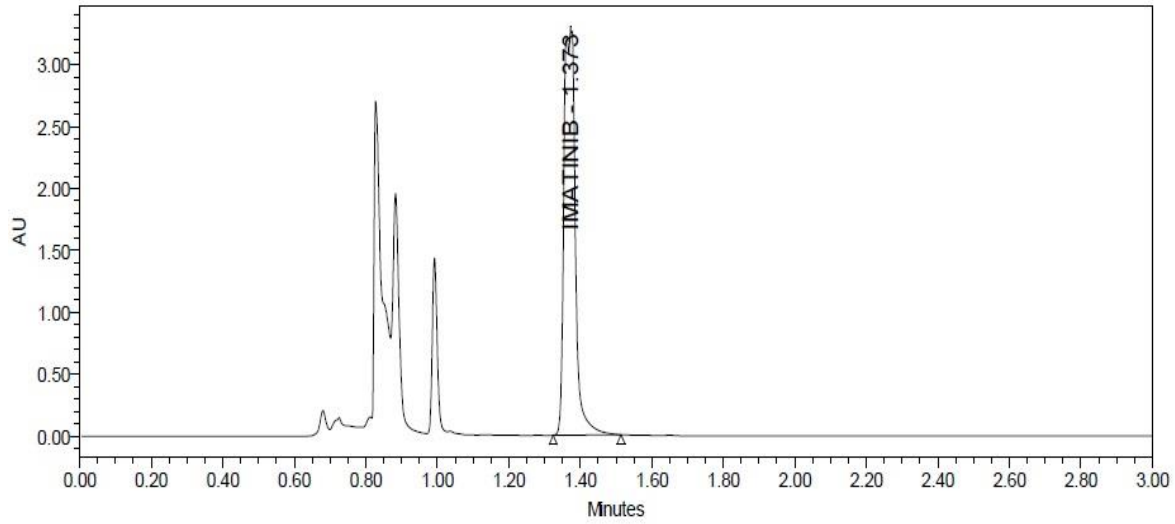
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Units
1	DEXKETOPROFEN	0.974	2558144	43.74	1781190	ug/ml
2	IMATINIB	1.362	3290663	56.26	1586784	ug/ml

Şekil 4.38. Distile su ortamında imatinib mesilata ait kromatogram sonucu



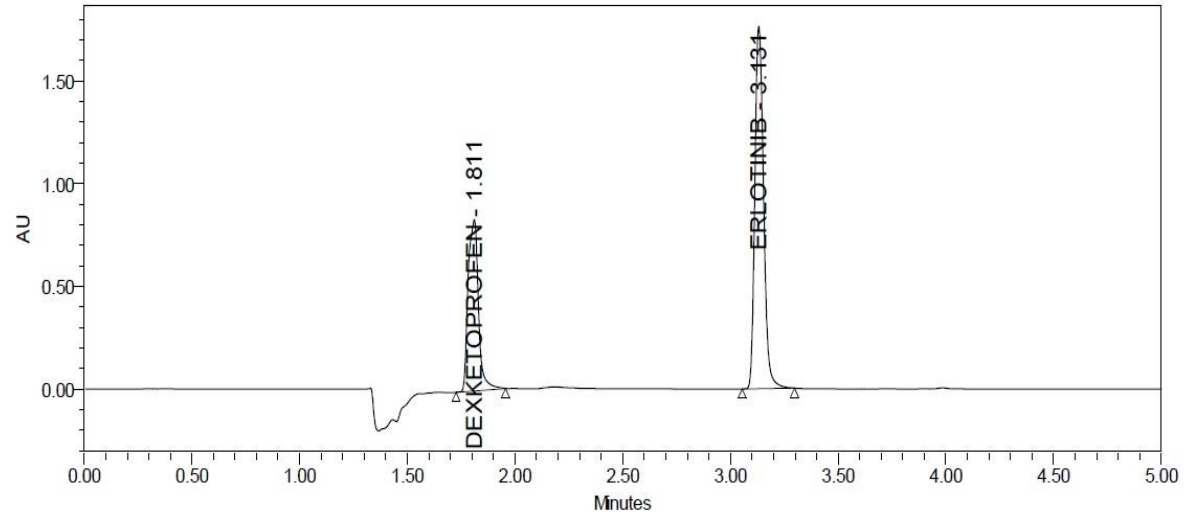
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Units
1	DEXKETOPROFEN	1.015	2615781	45.38	1715442	ug/ml
2	IMATINIB	1.481	3147825	54.62	1465980	ug/ml

Şekil 4.39. pH 7,4 fosfat tamponu ortamında imatinib mesilata ait kromatogram sonucu



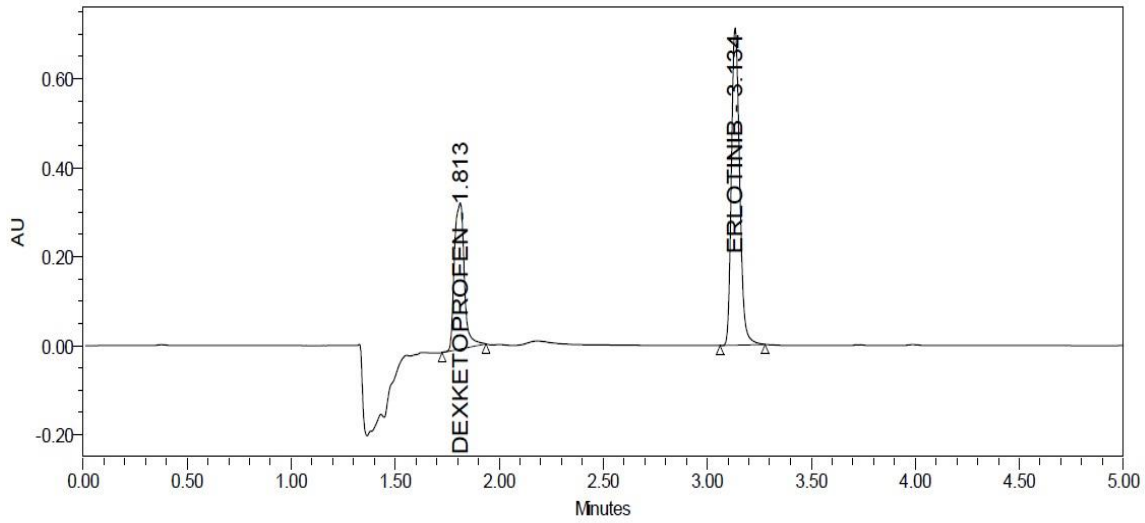
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	IMATINIB	1.373	7313789	100.00	3292650	32.937	ug/ml

Şekil 4.40. DMEM ortamında imatinib mesilata ait kromatogram sonucu



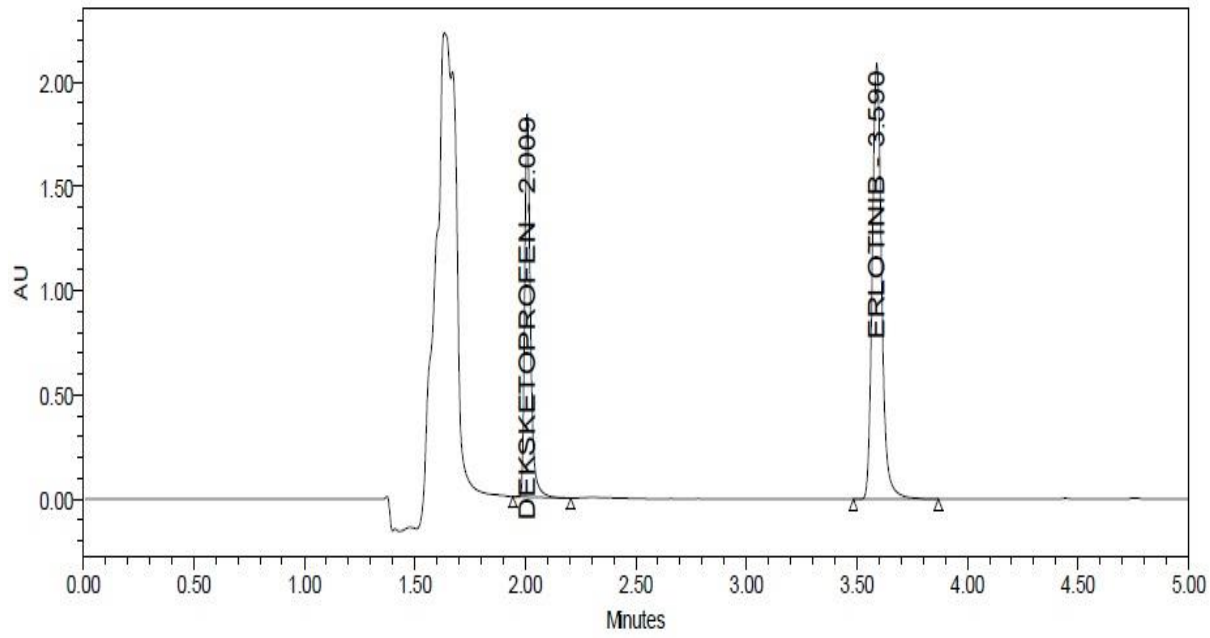
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	DEXKETOPROFEN	1.811	2777042	35.83	833549	10.385	ug/ml
2	ERLOTINIB	3.131	4974387	64.17	1765450	10.027	ug/ml

Şekil 4.41. Distile su ortamında erlotinib HCl'e ait kromatogram sonucu

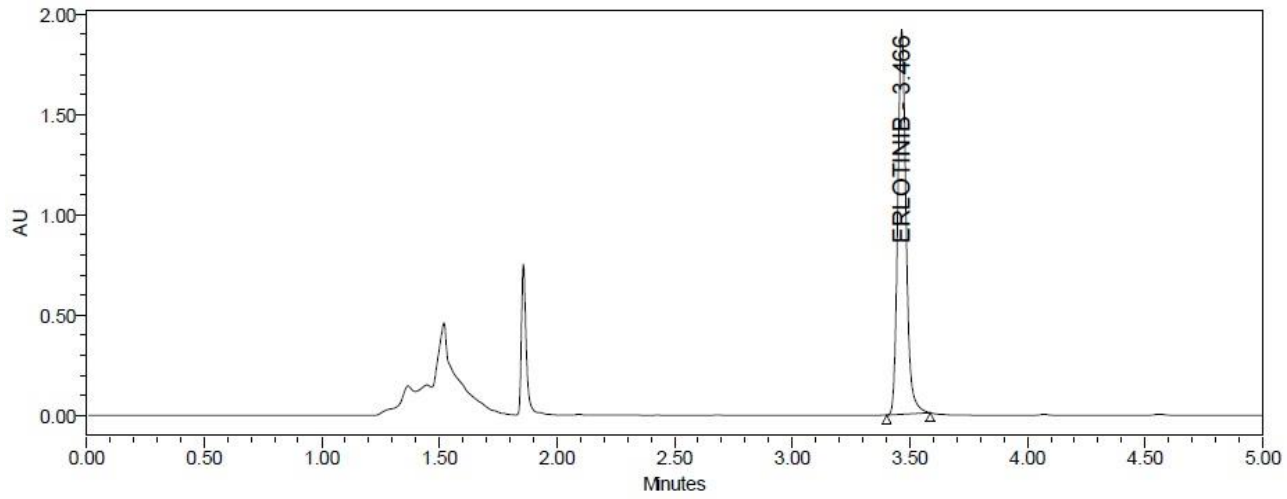


	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	DEXKETOPROFEN	1.813	1088712	35.59	328275	3.574	ug/ml
2	ERLOTINIB	3.134	1970230	64.41	712940	3.953	ug/ml

Şekil 4.42. pH 7,4 fosfat tamponu ortamında erlotinib HCl'e ait kromatogram sonucu



Şekil 4.43. pH 3 asetat tamponu ortamında erlotinib HCl'e ait kromatogram sonucu



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	ERLOTINIB	3.466	4743965	100.00	1919725	6.028	ug/ml

Şekil 4.44. DMEM ortamında erlotinib HCl'e ait kromatogram sonucu

Duyarlılık ve saptama sınırı

Analitin güvenilir şekilde tesbit edilebileceği en küçük derişimi ifade etmektedir. Bulgular Çizelge 4.14'de yer almaktadır.

Çizelge 4.14. Farklı ortamlardaki maddelere ait duyarlılık ve saptama sınırı sonuçları

		Duyarlılık Sınırı (LOQ) µg/ml	**Saptama Sınırı (LOD) µg/ml**
İMA	Distile Su	0,056	0,019
	pH 7,4 fosfat tamponu	0,041	0,014
	DMEM	0,012	0,004
ERLO	Distile Su	0,010	0,003
	pH 7,4 fosfat tamponu	0,005	0,002
	pH 3 asetat tamponu	0,014	0,005
	DMEM	0,002	0,001
DEX	Distile Su	0,006	0,002
BEH	pH 7,4 fosfat tamponu	0,013	0,004
KOLON	DMEM	0,099	0,033
DEX	Distile Su	0,008	0,003
CORTEKS C18	pH 7,4 fosfat tamponu	0,013	0,004
KOLON	DMEM	0,012	0,004

4.1.5. Etkin maddelerin çözeltideki stabilitesi ile ilgili çalışmalar

10 µg/mL derişimde bulunan etkin maddeler distile su veya pH:7,4 fosfat tamponunda çözündürülerek çözelti haline getirilmiştir. Çözeltiler +4ºC, 25ºC ve 37ºC sıcaklıklarda bekletilmiş ve 24, 48 ve 72saat sonra analiz edilmiştir. 3 gün boyunca sürdürülen çalışmalarda numuneler üzerinden 6 paralel olacak şekilde UPLC ile miktar tayinleri yapılmıştır. 0. gün ölçülen değer %100 kabul edilerek 1., 2. ve 3. günlerde elde edilen analiz değerleri ilk ölçüme kıyasla % cinsine çevrilmiştir. Alınan sonuçlar istatistiksel parametreler ile birlikte hesaplanmıştır.

Çizelge 4.15. pH 3 asetat tamponunda ERLO çözeltisi stabilite sonuçları

Sıcaklıklar	+4ºC	25ºC	37ºC
0. Gün	100	100	100
1. Gün	99±5	98±7	98±9
2. Gün	99±3	99±4	99±2
3. Gün	99±9	99±5	99±1

Çizelge 4.16. Maddelere ait çözelti hal stabilitesi sonuçları

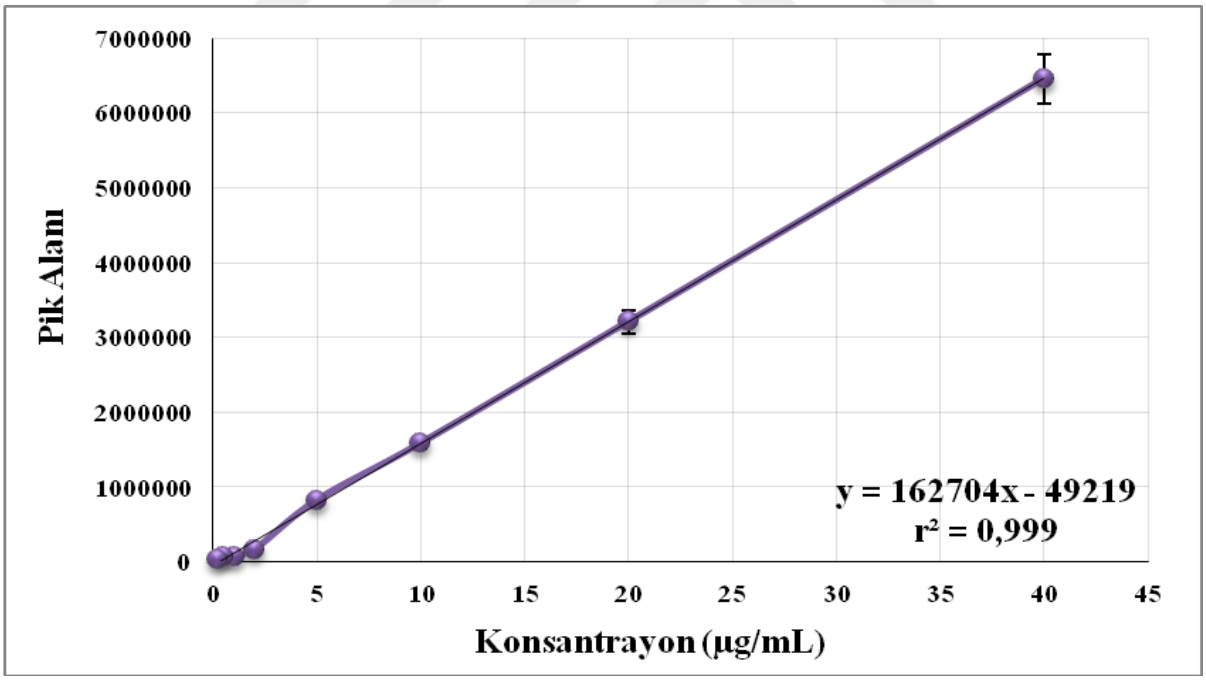
	Ortam	Distile Su			Fosfat Tamponu		
	Sıcaklıklar	+4ºC	25ºC	37ºC	+4ºC	25ºC	37ºC
İMATİNİB MESİLAT	0. Gün	100	100	100	100	100	100
	1. Gün	100±6	98±1	96±6	100±0	100±0	100±0
	2. Gün	99±5	97±2	96±1	100±0	100±0	100±0
	3. Gün	97±7	97±1	95±1	100±1	100±0	101±1
ERLOTİNİB HCl	0. Gün	100	100	100	100	100	100
	1. Gün	100±1	100±1	100±0	100±1	101±0	100±0
	2. Gün	96±2	100±0	100±0	94±1	100±0	101±0
	3. Gün	93±1	98±0	100±0	92±1	100±0	99±1
DEXKETOPROFEN TROMETAMOL	0. Gün	100	100	100	100	100	100
	1. Gün	100±0	100±0	100±0	101±0	100±1	100±0
	2. Gün	100±0	100±0	100±0	100±0	100±1	100±0
	3. Gün	100±0	101±0	100±0	100±0	99±1	100±0

4.1.6. Etkin maddelerin *in vivo* çalışmalarda kullanılmak üzere geliştirilen miktar tayini yöntemi için validasyon sonuçları

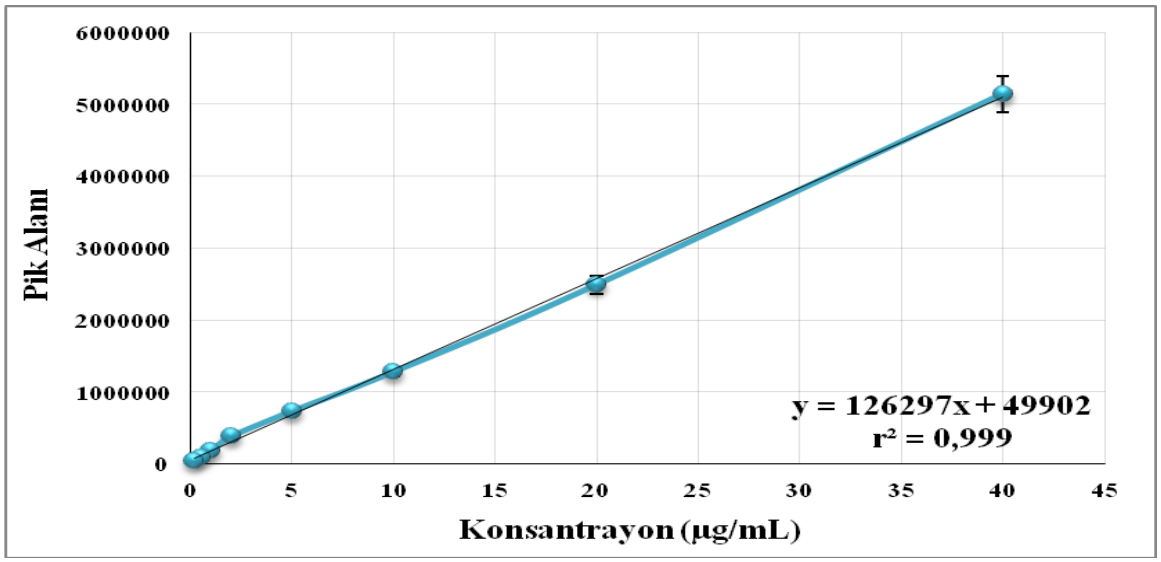
Deney hayvanlarıyla çalışmalarda elde edilen plazma örneklerinden etkin maddelerin tayin edilebilmesi için XTerra kolonda, kolon sıcaklığı 40°C'de sabit tutularak 320 nm dalga boyunda analizler gerçekleştirilmiştir. Mobil faz sistemi olarak; %60 3 mM trietilamin, %40 asetonitril karışımı kullanılmıştır. İMA için 1,5 mL/dk, ERLO için ise 0,8 mL/dk akış hızında çalışılmıştır.

Doğrusallık

40 – 0,5 µg/mL konsantrasyon aralığında bulunan farklı numunelerde analizler gerçekleştirilmiştir. 6 paralel olacak şekilde yapılan analiz sonuçları bilinen konsantrasyonlara karşı pik alanı olarak kalibrasyon grafiği çıkarılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.46'da yer almaktadır.



Şekil 4.45. Plazma ortamında imatinib mesilata ait doğrusallık grafiği



Şekil 4.46. Plazma ortamında erlotinib HCl'ye ait doğrusallık grafiği

Kesinlik

Deney içi kesinlik

Maddelerin 10 defa ard arda analizi yapılan konsantrasyonları, kalibrasyon denklemi aracılığıyla hesapla bulunan miktarları standart sapma ve bağıl standart sapma değerleriyle birlikte verilmiştir.

Çizelge 4.17. Plazma numuneleri için etkin maddelere ait deney içi kesinlik sonuçları

	Konsantrasyon (µg/mL)	Analiz Değeri İMA	Analiz Değeri ERLO
1	10	10,058	9,448
2	10	9,910	9,955
3	10	9,801	9,487
4	10	9,591	9,886
5	10	9,962	9,651
6	10	9,734	9,539
7	10	9,816	9,777
8	10	9,878	9,914
9	10	9,594	9,802
10	10	9,947	9,921
Ortalama	10	9,829	9,738
Standart Sapma	0	0,155	0,192
BSS	0	1,572	1,976

Deneyler arası kesinlik

Maddelerin birbirini takip eden 3 gün içerisindeki ölçümleri analiz edilen konsantrasyonları, kalibraskalibrasyon denklemi aracılığıyla hesapla bulunan miktarları, standart sapma ve bağıl standart sapma değerleriyle birlikte verilmiştir. Ayrıca, güvenirlik değeri yüzde olarak hesaplanmıştır. Hesaplama, bilinen değerde ölçülen sonuç alınıyorsa yüzde doğruluğu nedir, oran-orantısı ile yapılmıştır ve bulunan sonuçlar güven aralığı sınırları dahilindedir.

Çizelge 4.18. Plazma numuneleri için etkin maddelere ait deneyler arası kesinlik sonuçları

	Analiz Değeri İMA			Analiz Değeri ERLO		
Konsantrasyon (µg/mL)	20	5	1	20	5	1
1. gün	20,155	5,187	0,990	19,419	5,138	0,969
2. gün	20,103	5,094	0,992	19,839	5,152	0,945
3. gün	19,775	5,099	0,991	19,851	5,203	0,952
Ortalama	20,011	5,127	0,991	19,703	5,164	0,955
Standart Sapma	0,206	0,052	0,001	0,246	0,034	0,012
Bağıl Standart Sapma	1,029	1,023	0,143	1,249	0,645	1,344
Güvenirlik	100,1	102,5	99,1	98,5	103,2	95,5
Aynı konsantrasyona ait numunelerin deneyler arası analiz sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (p>0,05)						

Doğruluk ve geri elde

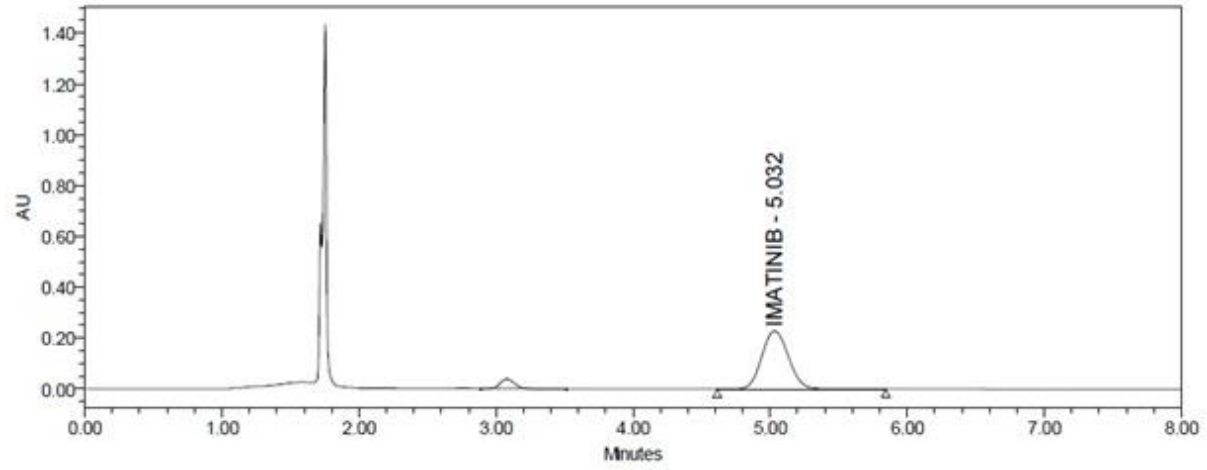
3 farklı konsantrasyonda hazırlanan numuneler analiz edilmiş ve kalibrasyon denklemi aracılığıyla geri elde değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapma değerleriyle birlikte sunulmuştur.

Çizelge 4.19. Plazma numuneleri için etkin maddelere ait deneyler arası kesinlik sonuçları

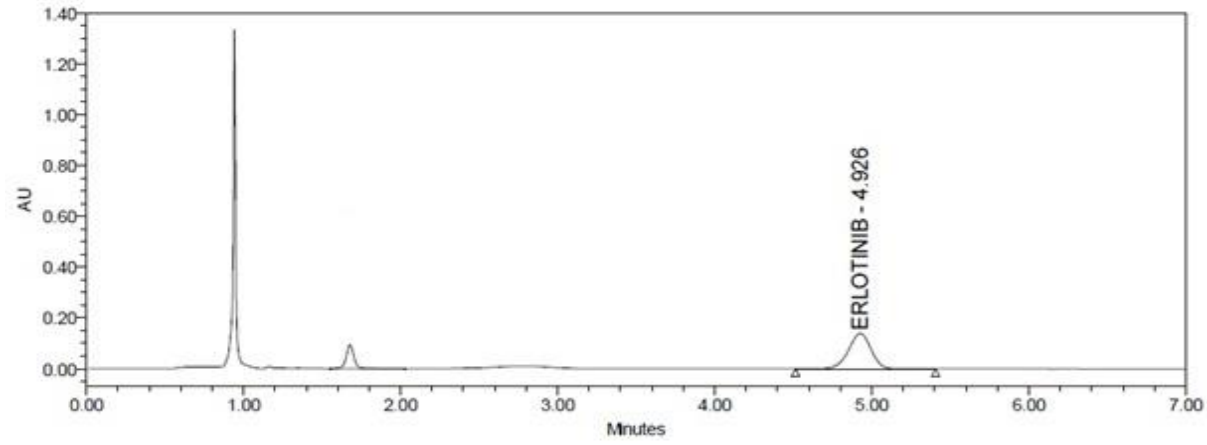
İMA Konsantrasyonu (µg/ml)	**Geri elde ± SS (µg/ml)**	**BSS**
12	11,921 ± 0,118	1,008
10	9,898 ± 0,098	0,991
8	8,121 ± 0,106	1,310
ERLO Konsantrasyonu (µg/ml)	**Geri elde ± SS (µg/ml)**	**BSS**
12	12,035 ± 0,212	1,692
10	9,903 ± 0,190	1,921
8	8,124 ± 0,142	1,745

Özgünlük ve seçicilik

Analitlerin, plazma veya solvan pikleri gibi diğer maddeler ile aynı dalga boyunda aynı yerde pik vermediğinin kontrolünü yapmak amacıyla incelenen bir validasyon parametresidir. Maddelere ait kromatogramlar aşağıda yer almaktadır.



Şekil 4.47. Plazmada yer alan imatinib mesilata ait kromatogram



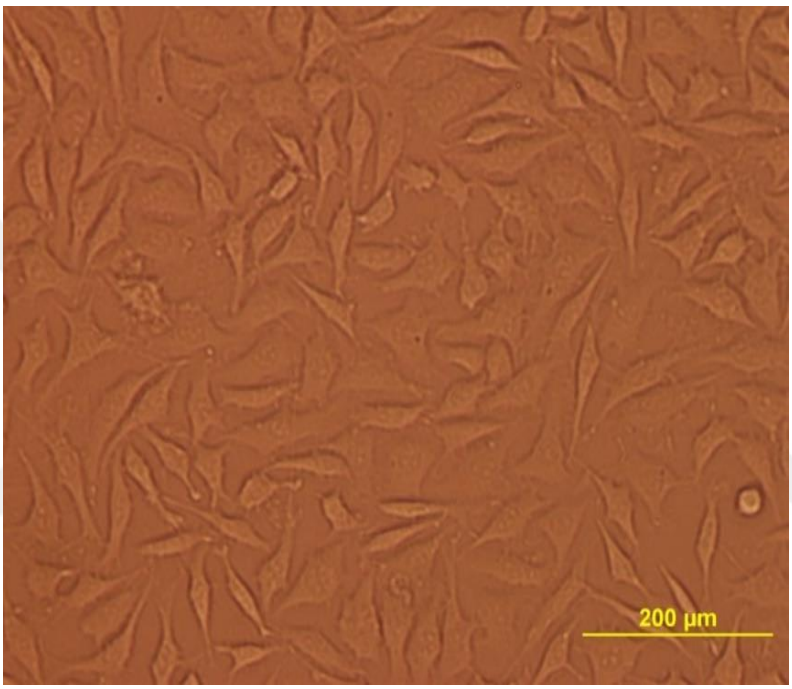
Şekil 4.48. Plazmada yer alan erlotinib HCl'e ait kromatogram

Duyarlılık ve saptama sınırı

Plazma ortamında Xterra kolonda yapılan validasyon çalışmalarına göre; duyarlılık sınırı (LOQ); imatinib mesilat için 0,289 µg/mL iken erlotinib HCl için 0,218 µg/mL olarak bulunmuştur. Saptama sınırı (LOD) ise; imatinib mesilat için 0,095 µg/mL, erlotinib HCl için 0,072 µg/mL olarak tayin edilmiştir.

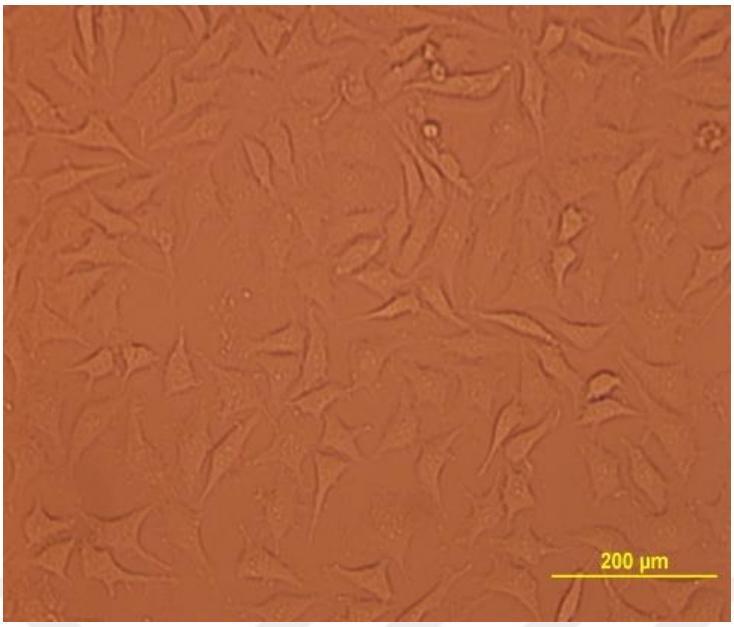
4.1.7. Formülasyonlarda yer alan maddelere ait sitotoksisite test sonuçları

Etkin maddelerin ve formülasyonların hücre canlılıkları üzerine etkisinin incelenmesi açısından L929 fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksisite çalışmaları yapılmıştır. Sitotoksisite testleri için tetrazolyum redüksiyon kullanılmış olup imatinib mesilat, erlotinib HCl, deksketoprofen tremetamol, PEG2000, folik asit, kitozan ve tripolifosfat üzerinde çalışılmıştır. L929 fibroblast hücreleri, ortası yuvarlağımsı uzun yapılardır, hücre görüntüleri aşağıda yer almaktadır.

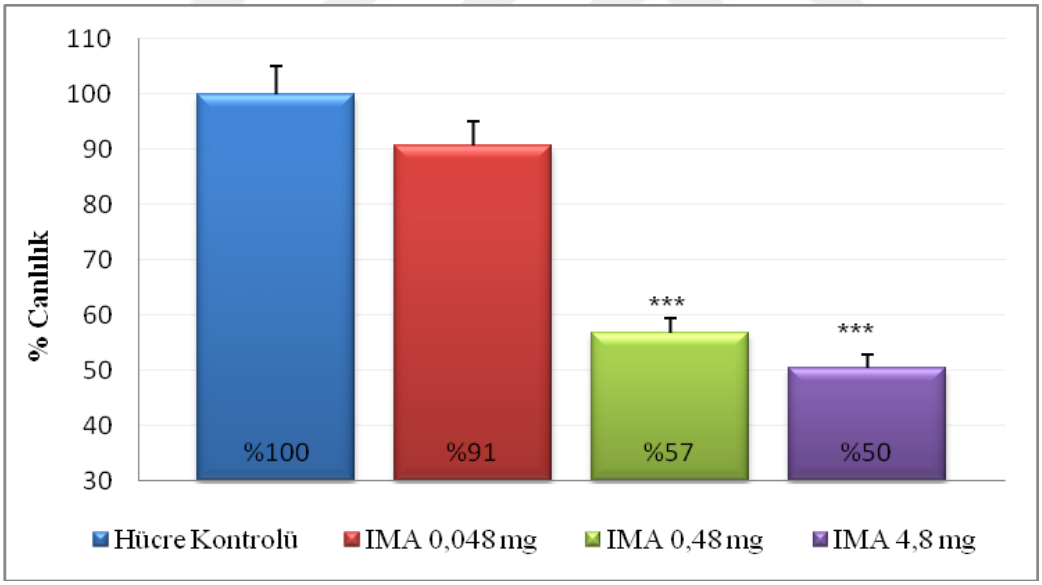


Resim 4.1. L929 fibroblast hücreleri kontrol grubuna ait görüntüler

Hücre görüntülerinde rastlanan yuvarlak yapılar canlılığını kaybetmiş hücrelerdir. Uzun, yassı görünümlü yapılar ise canlı L929 fibroblast hücreleridir.

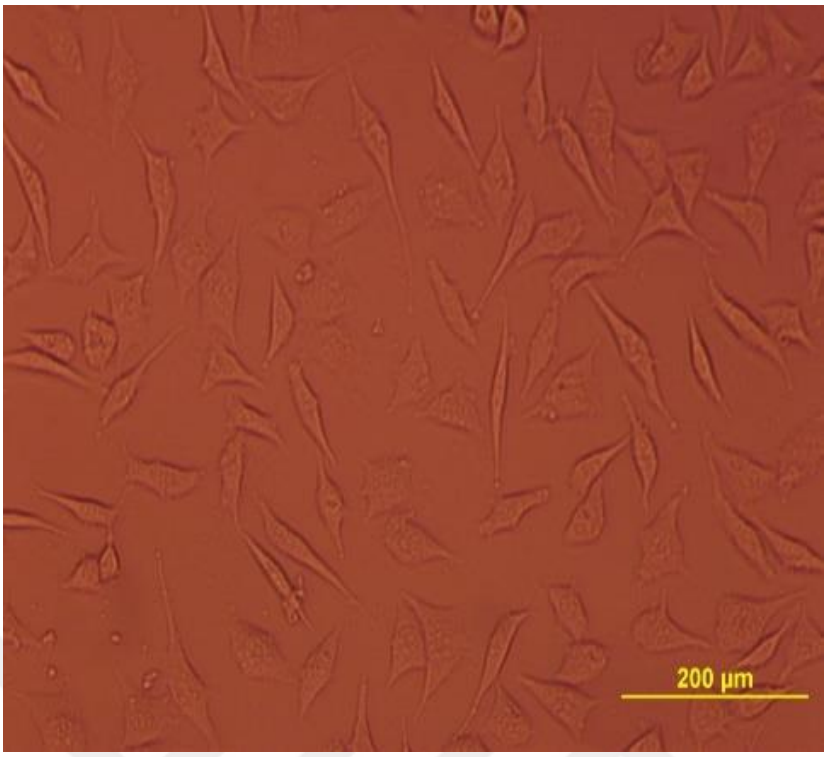


Resim 4.2. İmatinib mesilata ait hücre görüntüleri

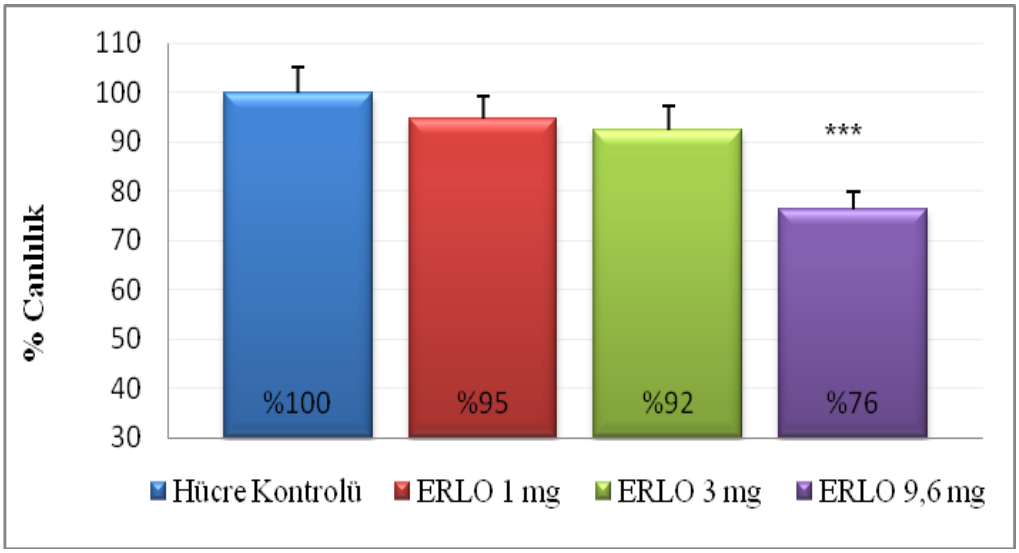


Şekil 4.49. İmatinib mesilata ait hücre canlılığı bulguları

(Hücre kontrolü ve IMA 0,048 mg grupları ile IMA 0,48 mg ve IMA 4,8 mg grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$) ancak diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$)(***))

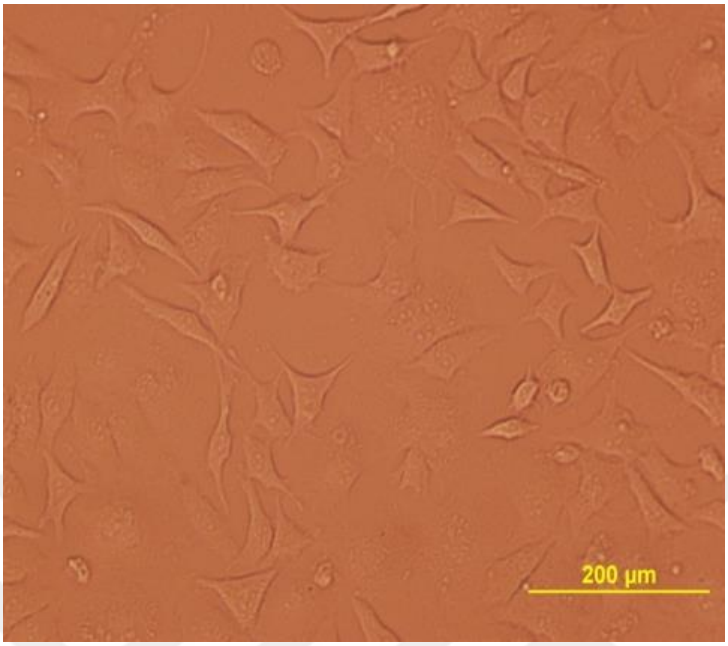


Resim 4.3. Erlotinib HCl'e ait hücre görüntüleri

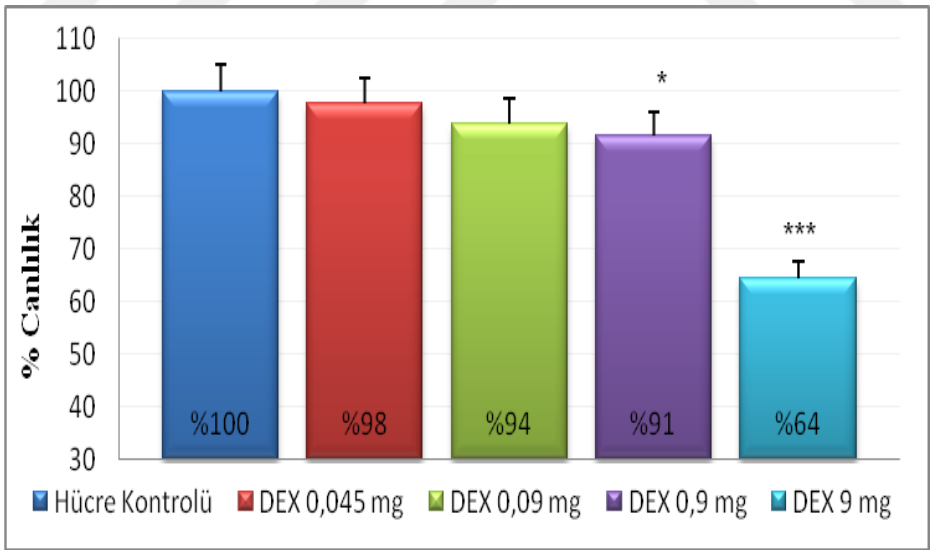


Şekil 4.50. Erlotinib HCl'e ait hücre canlılığı bulguları

(Hücre kontrolü, ERLO 1 mg ve ERLO 3 mg grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$) ancak bu gruplar ile ERLO 9,6 mg arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$)(***))

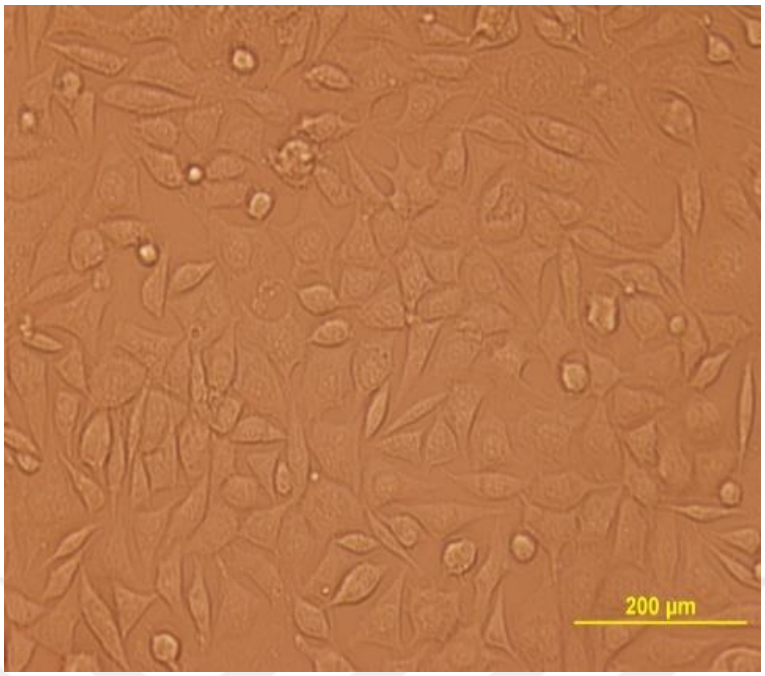


Resim 4.4. Deksketoprofen trometamole ait hücre görüntüleri

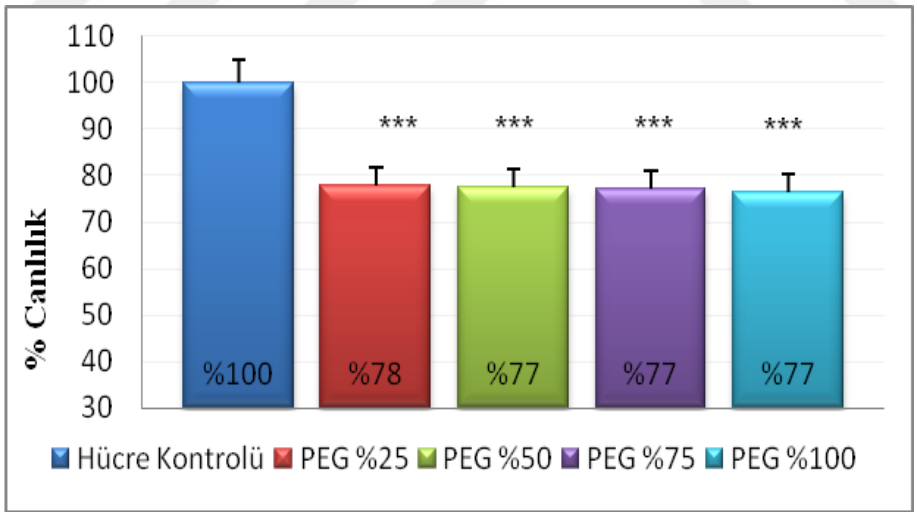


Şekil 4.51. Deksketoprofen trometamole ait hücre canlılığı bulguları

(Hücre kontrolü ile DEX 0,045 mg ve DEX 0,09 mg grupları, DEX 0,045 mg ile DEX 0,09 mg ve DEX 0,9 mg grupları ve DEX 0,09 mg ile DEX 0,9 mg grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$) ancak diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$)(***) ($p<0,05$)(*))

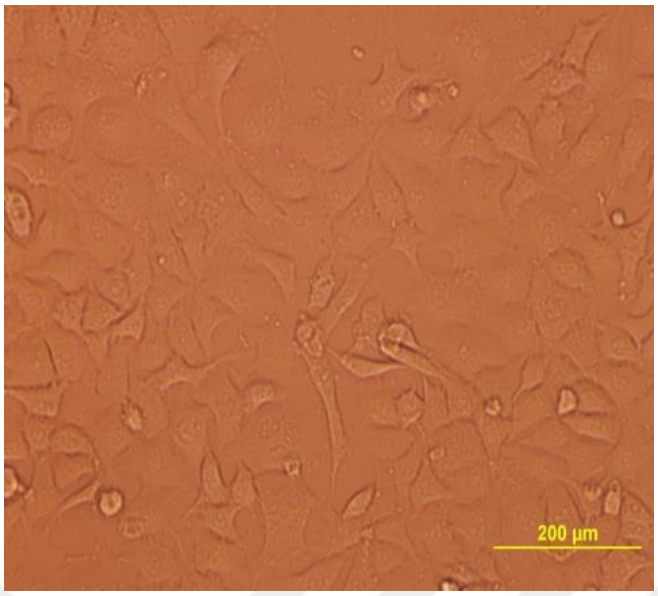


Resim 4.5. PEG2000'e ait hücre görüntüleri

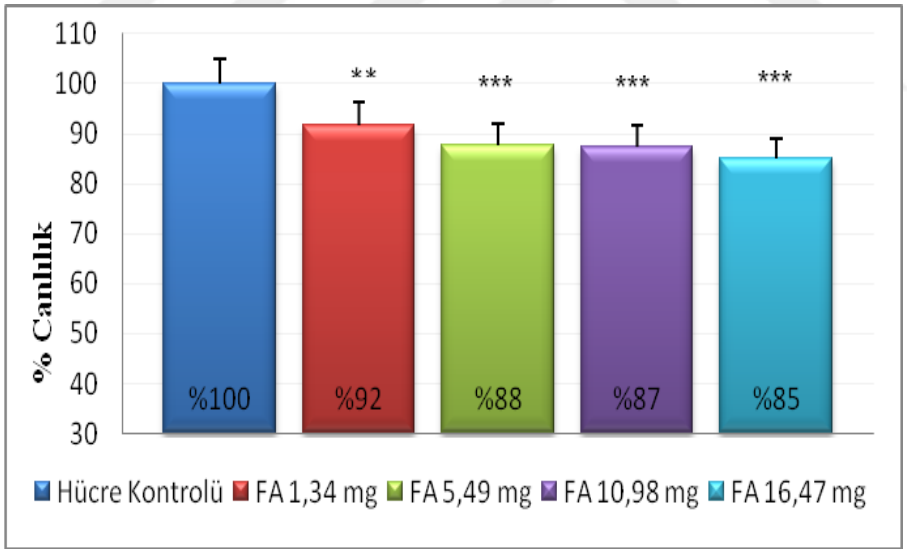


Şekil 4.52. PEG2000'e ait hücre canlılığı bulguları

(Hücre kontrolü ile PEG'ün tüm konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$)(***) ancak diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$))

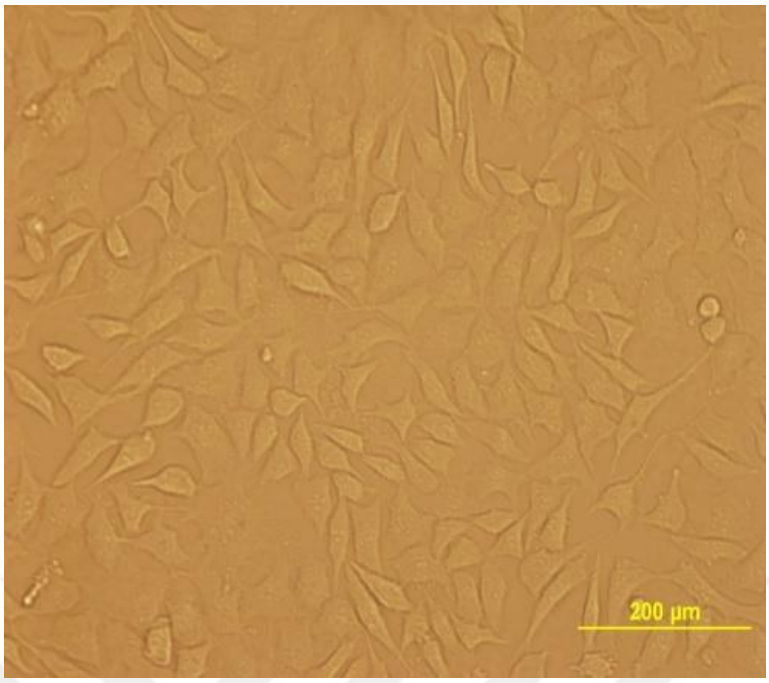


Resim 4.6. Folik asite ait hücre görüntüleri

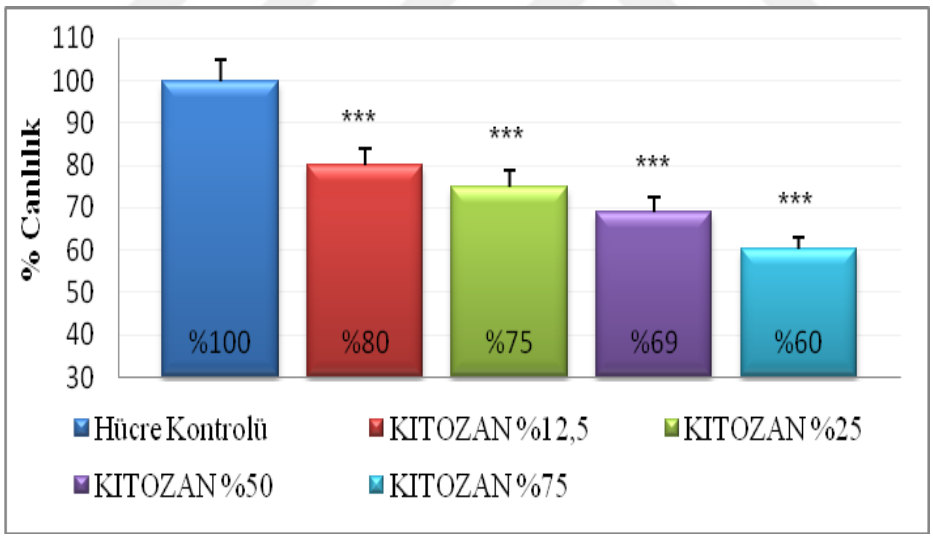


Şekil 4.53. Folik asite ait hücre canlılığı bulguları

(Hücre kontrolü ile Folik asitin tüm konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$)(***)($p<0,01$)(**)) ancak diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$))

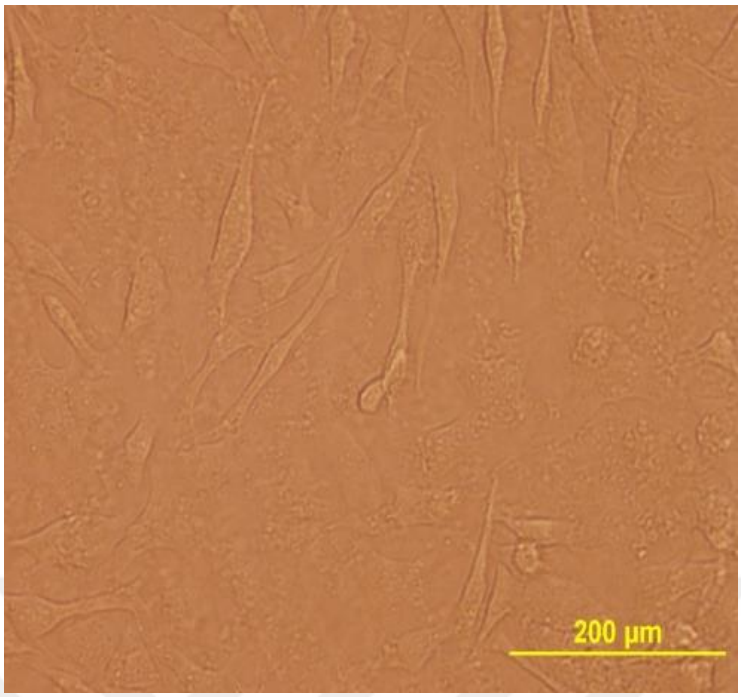


Resim 4.7. Kitozana ait hücre görüntüleri

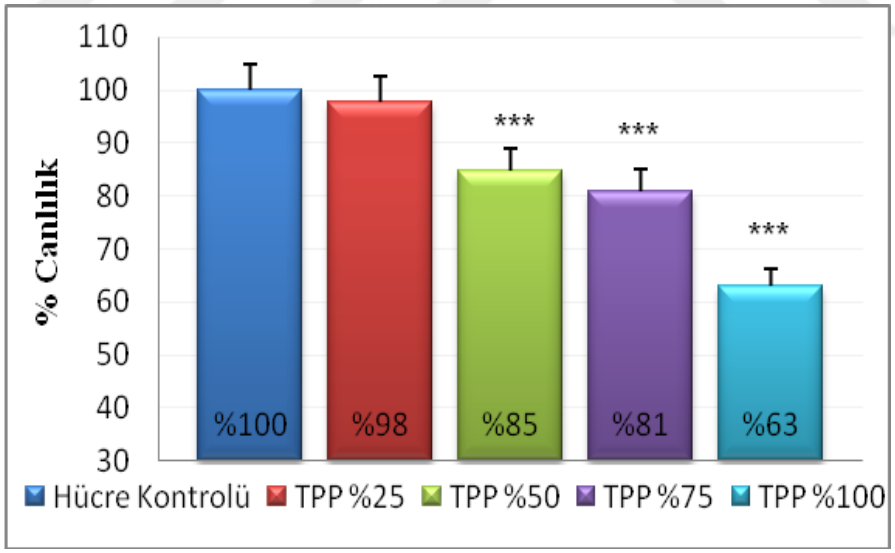


Şekil 4.54. Kitozana ait hücre canlılığı bulguları

(Hücre kontrolü ile Kitozan'ın tüm konsantrasyonları, Kitozan %25 ile Kitozan %100 grupları ve Kitozan %50 ve Kitozan %100 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$)(***)($p<0,05$)(*) ancak diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$))



Resim 4.8. Tripolifosfata ait hücre görüntüleri ve hücre canlılığı bulguları



Şekil 4.55. Tripolifosfata ait hücre görüntüleri ve hücre canlılığı bulguları

(hücre kontrolü ile TPP %50, TPP %75 ve TPP %100 grupları, TPP %25 ile TPP %50, TPP %75 ve TPP %100 grupları ve TPP %100 ile TPP %50 ve TPP %75 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$)(***)($p<0,01$)(**) ancak diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$))

4.2. Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

Hazırlanan nano-taşıyıcı sistemler üzerinde karakterizasyon çalışmaları yapılmış bunlara ait bulgular aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Hazırlanan formülasyonlarda partikül büyüklükleri, polidispersite indeksleri ve zeta potansiyelleri ölçümüş, morfolojik incelemeler yapılmış, yükleme kapasitesi tayin edilmiştir. Ayrıca formülasyonlar üzerinde *in vitro* salım çalışmaları da incelenmiştir. İn vitro salım çalışmaları ile ilgili bulgulara nano-taşıyıcı sistemlere ait karakterizasyon çalışmaları başlığı altında yer verilmeyecek olup ayrı bir başlık altında açıklanacaktır.

4.2.1. Kuantum noktacıklarına ait karakterizasyon çalışmaları

Nano taşıyıcı sistemlerden kuantum noktacıklarıyla ilgili olarak yapılan formülasyon çalışmalarına "Çizelge 3.4 Kuantum noktacıkları formülasyonları" başlığı altında yer verilmiştir. Bu çalışmalarda esas formülasyon olarak F1 formülasyonu seçilmiş ve üretim sırasındaki kritik parametrelerin belirlenmesi açısından bu formülasyon üzerinde değişikliklere gidilmiştir. İlk olarak F1 formülasyonunun daha düşük ölçeklerde çalışılması durumunda üretim işleminin değişip değişmeyeceğine bakılmış ve hem yarı yarıya (F2) hem de onda bir oranında (F6) azaltılarak üretilmeye çalışılmıştır. F1, F2 ve F6 formülasyonlarında (1) ve (2) numaralı çözeltiler magnetik karıştırıcı altında karıştırılmıştır. Elde edilen sonuç ürünlere UV lamba altında bakılmış her üç formülasyonun (F1, F2 ve F6) da 360 nm'de parlak sarı floresan renk verdiği gözlenmiştir. (1) ve (2) numaralı çözeltilerin birbirleri ile karıştırılmaları iki farklı açıdan F2 formülasyonu ile denenmiştir. İlk olarak (1) numaralı çözelti doğrudan (2) numaralı çözelti üzerine dökülmüş, diğer yöntemde ise enjektör aracılığı ile damla damla ilave edilmiştir. Her iki yöntemde de UV lamba altında parlak sarı floresans gözlenmiş ancak damla damla ilave edilen örnekte çok daha yoğun bir ışıma gözlenmiştir. Formülasyonlarda (1) numaralı çözeltinin (2) numaralı çözelti üzerine damla damla ilave edilmesine karar verilmiştir. Daha sonra, enjektör çapının etkili olup olmadığı değerlendirilmiş ve 10 mL, 5 mL ve 1 mL'lik enjektörler ile çalışılmıştır. Floresans ışımanın en yoğun olduğu örneğe 1 mL'lik enjektör kullanımı ile ulaşılabilmiştir. Ayrıca, formülasyonlar üzerinde gün ışığının etkisi de değerlendirilmiş ve formülasyonlar hem gün ışığında hem de karanlık ortamda hazırlanmıştır. Karanlık ortamda hazırlanan formülasyonlarda daha yüksek bir verim

gözlenmiştir. Bunun üzerine tüm örnekler karanlık ortamda, (1) numaralı çözeltinin 1mL'lik enjektör ile (2) numaralı çözeltiye damla damla ilave edilmesi ile hazırlanmıştır.

Üretimde karıştırıcının etkisi de göz önünde bulundurulmuş ve aynı formülasyon magnetik karıştırıcı altında, ince problu vibracell ile ve 10000 rpm hızda ultratorax ile hazırlanmıştır. Magnetik karıştırıcı altında oldukça tatmin edici sonuçlar alınmasına rağmen vibracell ile uygun sonuçlar alınamamıştır. Bu durum, enjektör ile damla damla ilave etme işleminin uzun zaman gerektirmesi ve vibracell cihazının da bu süre boyunca aralıksız olarak çalışamaması sebebine dayandırılmıştır. Ultratorax ile elde edilen ürün ile magnetik karıştırıcı karşılaştırıldığında ise aralarında sonuç ürün parlaklığı açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Daha sonraki formülasyonlar magnetik karıştırıcı altında hazırlanmıştır.

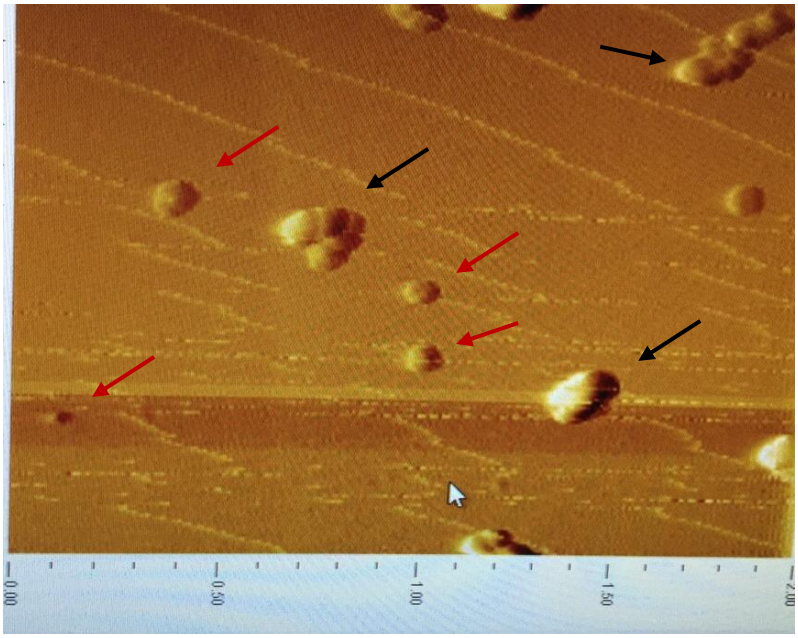
Formülasyonlarda (1) numaralı çözeltinin etüvde kurutulması basamağında ara ürün stabilitesini değerlendirmek amacı ile farklı sıcaklıklar denenmiştir. F2 formülasyonunda kullanılan 80ºC artırılarak 100ºC'ye çıkartılmış (F3) ancak F3 formülasyonundan elde edilen sonuç ürünün UV lamba altında floresan renk vermediği gözlenmiştir. Bir başka ifade ile, kuantum noktacığı elde edilememiştir. Sıcaklık 90ºC (F4) olarak ayarlanmış ve yine sonuç ürün elde edilememiştir. Sıcaklığın 40ºC'ye düşürülmesinde (F5) ise ara ürün elde edilen zaman uzamışsa da sonuç ürün elde edilebilmiştir.

Çinko oksit (ZnO) kuantum noktacıkları oluşumu; çinko oksit ve nitrik asitin reaksiyonu sonucu çinko nitrat ve çinko nitratın da sodyum hidroksit ile reaksiyonu sonucu çinko oksit oluşumuna dayanmaktadır. Bu reaksiyonların sıcaklık yanı sıra madde konsantrasyonlarının da etkilenebileceği göz önüne alınarak madde miktarlarına ilişkin çalışmalar yapılmıştır. İlk olarak (1) numaralı çözelti içerisindeki nitrik asit konsantrasyonu artırılmıştır (F7). Formülasyona UV lamba altında bakılmış ve parlak sarı floresan renk gözlenmiştir. F7 formülasyonu ile elde edilen ürün F2 formülasyonu ile kıyaslanmıştır ve F7 formülasyonunda daha yoğun bir parlaklık gözlenmiştir.

Ayrıca; partiküllerin reaksiyon safsızlıklarından arındırılması için hem F2 Formülasyonu hem de F7 formülasyonunun (1) ve (2) çözeltileri hazırlama aşamasında ayrı ayrı 0,20µm'lik membranlardan süzüldükten sonra karıştırılarak karşılaştırılmıştır. F2 formülasyonu kendi içerisinde karşılaştırıldığında; filtrelenmiş halinin daha berrak ve homojen bir çözelti halinde olduğu ancak filtrelenmemiş halinde dip kısımlarda çökelekler

oluştuğu gözlenmiştir. F7 formülasyonunda ise (1) numaralı çözelti süzülememiş membranı çok çabuk tıkamıştır. Membranda görülen tıkanıklığın, oluşan ara ürün miktarının artmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Nitrik asit konsantrasyonu yanı sıra F2 numaralı formülasyonun konsantrasyonu da değiştirilmiştir ve sodyum hidroksit miktarı %4'ten %0,5'e oldukça önemli oranda düşürülmüştür (F8). Sodyum hidroksit miktarının düşürülmesi ile elde edilen üründe UV lamba altında floresan ışıma gözlenmemiştir. Bunun üzerine;(2) numaralı çözeltinin miktarı onda bir oranına çekilmiş dolayısıyla konsantrasyon %5'e çıkarılarak denenmiştir (F9). Sonuç üründe ışıma görülmemiş dolayısıyla kuantum noktacıkları elde edilememiştir. Daha sonrasında ise sodyum hidroksit miktarı F2'ye göre yarıya indirilerek (F10) kuantum noktacığı üretilmeye çalışılmıştır. UV lamba altında floresan ışıma gözlenmiş ancak yoğunluk açısından anlamlı oranda bir düşüş meydana geldiği görülmüştür. Yapılan formülasyon çalışmaları yanı sıra; F2 formülasyonu ile elde edilen kuantum noktacıklarının AFM cihazı ile morfolojik görüntülenmesi de yapılmıştır (Resim 4.9). Resim 4.9'da yer alan görüntüde kırmızı renkli oklar ile gösterilen şekiller kuantum noktacığını siyah renkli oklar ile gösterilen şekiller ise agrege olmuş kuantum noktacıklarını göstermektedir.



Resim 4.9. Kuantum noktacıklarının AFM cihazında elde edilen görüntüsü

Çalışmalar sonucu elde edilen kuantum noktacığı metanol çözeltisi içerisinde bulunmaktadır. Taşıyıcı sistemlere etkin madde yüklemek ve deneysel çalışmalara özellikle

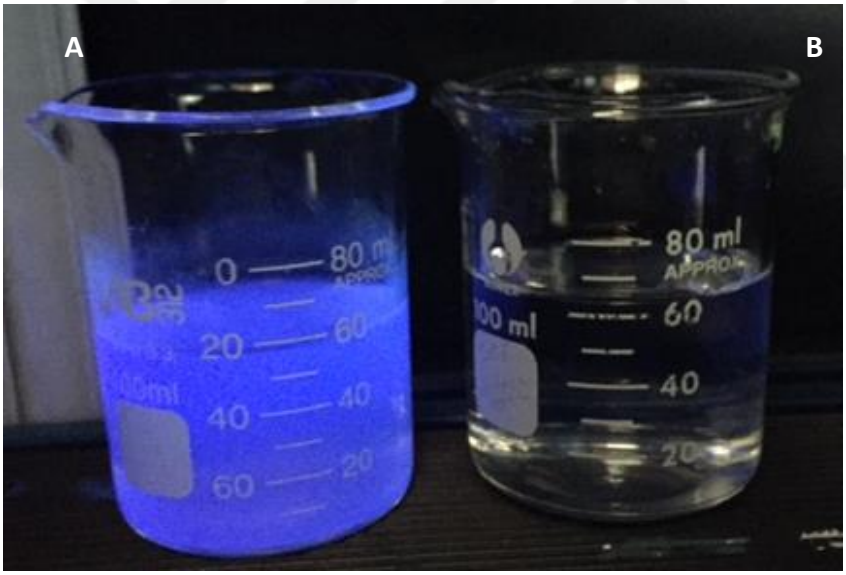
hücre ve deney hayvanları boyutunda devam edebilmek adına dış fazın organik faz yerine su fazı olması gerekmektedir. Dolayısıyla elde edilen ürün, metanolden arındırılmalıdır. Bu amaç doğrultusunda; metanol çözeltisi olarak elde edilen sonuç ürün üzerinde etüvde farklı sıcaklıklarda kurutma, metanolün kaynama noktasının biraz üzerindeki bir sıcaklıkta evaporatörde uçurma ve basitçe santrifüjleme işlemleri sürdürülmüştür. Etüvde 40, 60, 80, 90 ve 100ºC'lerde çalışılmış ve çözelti halinde ışıma gösteren ürünlerin 40ºC'nin üzerinde kurutularak elde edilen katı toz hallerinde ışımanın gözlenmediği görülmüştür. 40ºC'de evapore edildiğinde ise etüvden çok daha fazla bir zaman harcanmış ve buna rağmen tamamen katı toz hali elde edilememiştir. 5000, 10000 ve 18000 g'de santrifüj edildiğinde ise çökmenin tam olarak gerçekleşmediği gözlenmiştir. Bu durum, oldukça küçük partikül boyutuna sahip olduğu bilinen kuantum noktacıklarının santrifüj yöntemine uygun olmadığına dayandırılmıştır.

Çalışmalar formülasyonlar üzerinde yüzey etkin madde etkisini görmek adına formülasyonlarda SDS ve PEG kullanımı ile çeşitlendirilmiştir. Öncelikli olarak; PEG'ün hangi türünün kullanılacağının belirlenmesi adına; 1 mol kuantum noktacığı için 1 mol PEG içerecek şekilde miktarları hesaplanmış PEG400, PEG1000, PEG1500 ve PEG4000 ile çalışmalar sürdürülmüştür. Formülasyonların çözünürlükleri ve kuantum noktacıkları ile karışabilirlikleri açısından PEG4000 daha uygun bulundu. F1 formülasyonu üzerinden yürütülen çalışmalarda (2) numaralı çözelti içerisine; kuantum noktacığı ile eşit mol sayısında yer alacak miktarda SDS ve PEG4000 ilave edilmiş ardından 1 saat sonikatör altında bekletilmiştir. SDS içerikli çözeltide çözünürlük problemi gözlemiş ve yarım saat daha sonikatör altında bekletilmiştir. Bu şekilde çözeltileri hazırlanan maddelere karanlık ortamda magnetik karıştırıcı altında 1 mL'lik enjektör ile (1) numaralı çözeltinin tamamı damla damla ilave edilmiştir. Formülasyonlara UV lamba altında bakılmış ve floresan ışıma gözlenmiştir. Ayrıca bu formülasyonlar üzerinde partikül büyüklükleri ölçümleri yapılmış ve PEG içerikli formülasyonun çok daha küçük bir partikül boyutuna sahip olduğu tesbit edilmiştir. PEG4000 içerikli bu formülasyonun partikül büyüklüğü Malvern CGS-3 serisine ait LS cihazı ile 1nm olarak ölçülmüştür.

Kuantum noktacıklarının katı halde verdiği ışımanın PEG4000 miktarından ne derece etkilendiği ise F2 formülasyonundaki (2) numaralı çözelti içerisinde 0,08 g; 0,5 g; 2 g ve 4 g PEG4000 kullanımı ile değerlendirilmiştir. 4 g PEG4000 kullanılan formülasyon 30 dakika diğer formülasyonlar ise 20 dakika sonike edildikten sonra (1) numaralı çözeltinin

damlatılması işlemi gerçekleştirilmiştir. Tüm örneklerin metanollü çözeltilerinde UV lamba altında 366 nm'de parlak sarı floresan ışıma gözlenmiştir. 40ºC'lik etüvde kurutulduktan sonra elde edilen kuru toz hallerinde de aynı şekilde ışıma gözlenmiştir. Ayrıca, ışıma yoğunluğunun konsantrasyon arttıkça azaldığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar neticesinde; PEG'ün kuantum noktacıklarının etrafını sardığı ve miktarının artışına bağlı olarak da etrafı sarılı kuantum noktacıklarının arttığı dolayısıyla da kuantum noktacıkları ışımalarını engellediği çıkarımı yapılmıştır.

Bu yöntem ile üretilen kuantum noktacıklarının zamana bağlı agregasyon göstermesi üzerine farklı bir yöntem ile ZnO kuantum noktacıkları üretimine gidilmiştir. Yeni yöntem ile üretilen kuantum noktacıklarına UV lamba altında bakılmış ve mavi floresan ışıma gözlenmiştir. Resim 4.10'da UV lamba altında kuantum noktacıklarının ışıması gösterilmiştir.



Resim 4.10. UV lamba altında kuantum noktacıklarının görünüşleri; A (soldaki), kuantum noktacıkları; B (sağdaki), distile su

İlk yöntem ile (mangan asetat içermeyen yöntem) üretilmiş kuantum noktacıklarının 2-propanol ile temizlenmesi ve ardından santrifüjlenmesi sonrasında partikül büyüklükleri; 1,2 nm olarak bulunmuştur. Etüvde kurutma sonucu ise partikül büyüklüğü 3,5 nm olarak ölçülmüştür. 1 ay süre ile bekletilmeleri sonrasında partikül büyüklükleri 154 nm'yi bulmuştur. Zeta potansiyelleri ise; -13,6 olarak ölçülmüştür.

Negatif yüzey yüküne sahip kuantum noktacıkları elde edildikten sonra katyonik kitozan ile elektrostatik olarak etkileşecekleri düşünülmüş ve doğrudan kitozan çözeltisi ile muamele edilmiştir. Etkin maddeler ise kitozan çözeltisi içerisinde dağıtılmıştır. Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.8'de ERLO yüklü ve Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.9'da İMA yüklü formülasyonların içerikleri verilmiş olup bu formülasyonlara ait bulgular Çizelge 4.20'de ve Çizelge 4.21'de verilmiştir. DEXER7 ve DEXER8 formülasyonlarında gözle görülür büyüklükte partiküller oluştuğundan ölçüm yapılmamıştır.

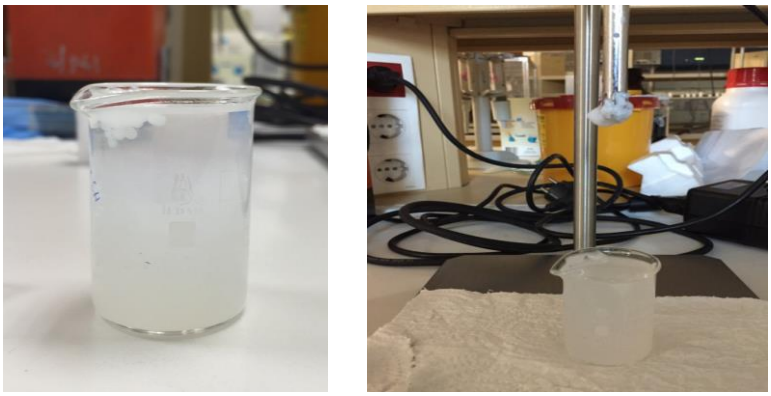
Çizelge 4.20. Farklı pH'larda hazırlanmış erlotinib yüklü kuantum noktacıklarına ait bulgular

Formülasyon	PB (nm)	PDI	ZS (mV)
DEXER1	318,4±50,9	0,478±0,230	26,7±1,1
DEXER-PEG2	249,7±11,0	0,203±0,071	40,8±0,4
DEXER-PEGFA3	352,1±35,9	0,499±0,089	36,7±0,2
DEXER4	707,4±53,6	0,835±0,157	27,2±1,35
DEXER-PEG5	655,1±26,2	0,419±0,081	40,1±0,7
DEXER-PEGFA6	294,1±63,7	0,763±0,095	33,7±1,70
DEXER9	450,5±25,8	0,486±0,080	20,3±0,5

Çizelge 4.21. Farklı pH'larda hazırlanmış imatinib yüklü kuantum noktacıklarına ait bulgular

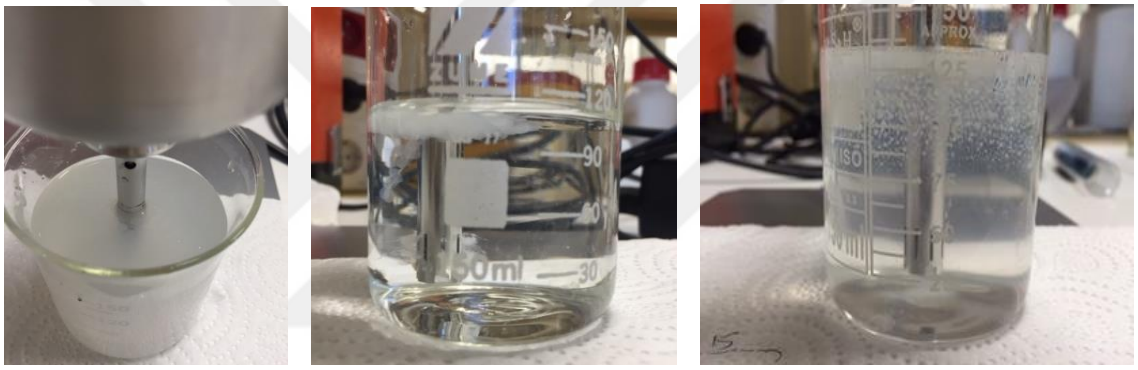
Formülasyon	PB (nm)	PDI	ZS (mV)
DEXİMA1	660,8±156,1	0,683±0,173	-12,6±0,7
DEXİMA-PEG2	569±68,3	0,414±0,119	5,4±0,9
DEXİMA-PEGFA3	724,9±84,9	0,532±0,142	1,4±0,4
DEXİMA4	785±68,6	0,545±0,143	-10,2±0,4
DEXİMA-PEG5	642±129	0,564±0,120	9,2±1,4
DEXİMA-PEGFA6	822±110	0,491±0,075	4,5±1,8

Kuantum noktacıklarının kullanımı ile kitozanın yeteri kadar güçlü çapraz bağ yapamadığı düşünülmüş, bunun üzerine çapraz bağlayıcı ajan olarak TPP maddesi kullanılmıştır. Bu şekilde elde edilen kuantum noktacıklarının içerikleri Çizelge 3.12'de yer almaktadır. Hazırlanmaları sırasında ise gözle görülür büyüklükte partiküller oluşmuştur. Hazırlanmaları sırasında çekilen görüntüler Resim 4.11 ve Resim 4.12'de yer almaktadır.



Resim 4.11. DEXER10 formülasyonuna ait hazırlama görüntüleri

Çok yoğun kitozan içeriği sebebiyle büyük yapılı (boyutları 341,8 nm ile 6 µm arasında) partiküller elde edilmiştir.



Resim 4.12. DEXER11 (soldaki ve ortadaki) ve DEXER12 (sağdaki) formülasyonlarına ait görüntüler

DEXER 11 formülasyonu ile ortalama 734,8 nm boyutunda partiküller elde edilmiştir. Polidispersitesi de oldukça yüksektir. Daha da seyreltilerek DEXER12 formülasyonu denenmiştir. DEXER12 formülasyonu PDI oldukça yüksek bulunmuştur. Partikül büyüklükleri ise 34,27 nm ile 3 µm arasında değişmektedir. Bunun üzerine çok daha düşük oranlarda kitozan kullanılması düşünülmüştür. Formülasyonlarda kullanılan kitozan içeriği 20 kat azaltılmıştır. İçeriklerine Çizelge 3.14'de yer verilen bu formülasyonlara ait bulgular Çizelge 4.22'de yer almaktadır.

Çizelge 4.22. Farklı konsantrasyonlarda kitozan yüklenmiş ERLO yüklü kuantum noktacıkları

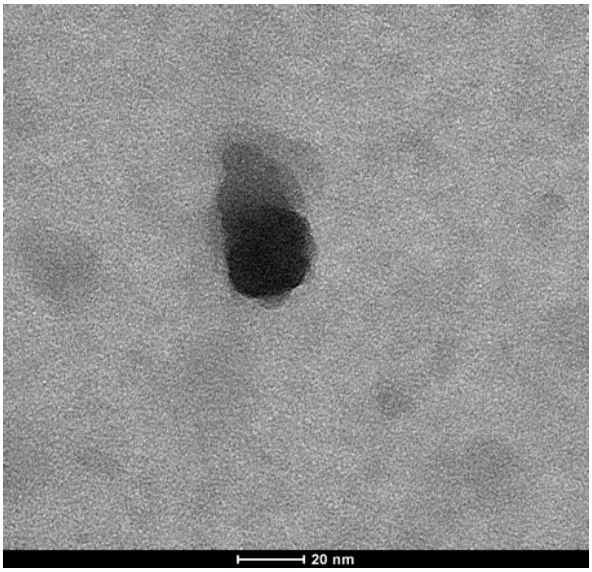
Formülasyon	PB (nm)	PDI	ZS (mV)	Yükleme Etkinliği	
				ERLO	DEX
DEXER13	243,14±15,39	0,426±0,320	17,5±0,5	X	X
DEXER14	244,5±67,0	0,696±0,042	24,6±0,4	%32	%80
DEXER15	260,0±87,6	0,823±0,062	18,2±1,19	%35	%91
DEXER-PEG16	242,04±27,9	0,413±0,024	25,2±0,7	%52	%77

İMA yüklü formülasyonlara (Çizelge 3.15) ait bulgulara ise Çizelge 4.23'de yer verilmiştir.

Çizelge 4.23. TPP ile sertleştirilmiş imatinib yüklü kuantum noktacıkları

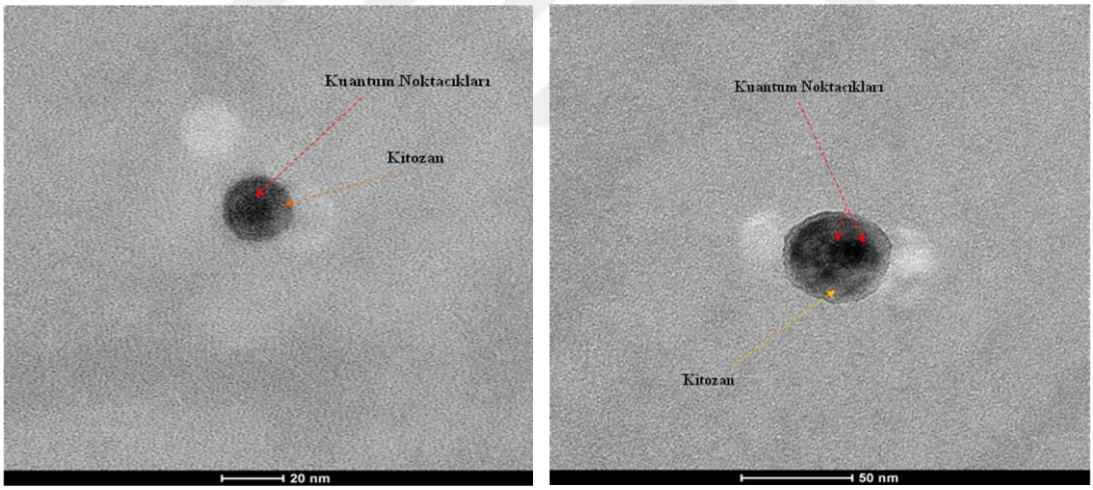
Formülasyon	PB (nm)	PDI	ZS (mV)	Yükleme Etkinliği	
				İMA	DEX
DEXİMA7	5132±332,2	1	35,2±1,23	%79	%96
DEXİMA8	407,3±34,4	0,725±0,210	8,71±1,40	%58	%97
DEXİMA-PEG9	319,0±43,28	0,512±0,199	15,0±2,30	%77	%95

Kuantum noktacıklarının agregasyonunun azaltılması ve formülasyondaki etkilerinin artırılması amacı ile kuantum noktacıklarına üretim aşamasında mangan asetat ilave edilmiştir. Bu yöntemde; çinko asetat ve mangan asetatın sudaki karışımı TEA ve oleik asit sulu çözeltisi ile karıştırılmıştır. Yarım saat süresince karıştırıldıktan sonra 80ºC'ye getirilmiş ve bu sıcaklıkta da 2saat karıştırılmıştır. Sonrasında 20 ºC'ye soğutulmuş ve santrifüjlenerek kuantum noktacıkları reaksiyona girmeyen maddelerden ayırılmıştır. İzopropanol ile yıkanarak kuantum noktacıkları saflaştırılmıştır. Mangan asetat ilavesiyle geliştirilen yöntem ile üretilmiş kuantum noktacıklarının 2-propanol ile temizlenmesi ve ardından santrifüjlenmesi sonrasında partikül büyüklükleri; 0,78 ± 0,17 nm olarak bulunmuştur. Bu şekilde elde edilen kuantum noktacıklarının etüvde kurutma sonrasında 1,4 nm olarak ölçülmüş ve uzun süre bekletilmesi sonrasında da partikül büyüklüklerini korudukları görülmüştür. Ayrıca her iki yolla elde edilen kuantum noktacıklarının da suda tekrar çözündüklerinde mavi floresan ışımalarını ve oldukça küçük partikül boyutlarını korumakta oldukları gözlenmiştir. Aşağıda bu şekilde üretilen kuantum noktacıklarına ait TEM görüntüsü yer almaktadır.

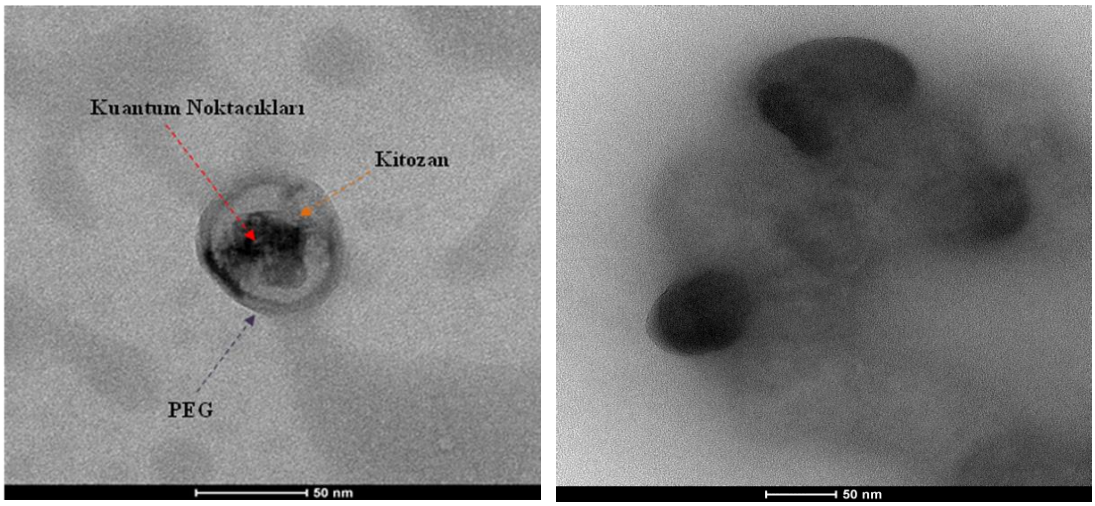


Resim 4.13. Mangan asetat ilavesiyle üretilmiş etkin madde yüklü kuantum noktacıkları

Hazırlanan KÖR1 için partikül büyüklüğü; 289 nm, KÖR2 için partikül büyüklüğü; 159 nm ve KÖR3 için partikül büyüklüğü ise 430 nm'dir. KÖR4 ve KÖR5'e ait TEM görüntüleri ise aşağıda yer almaktadır.

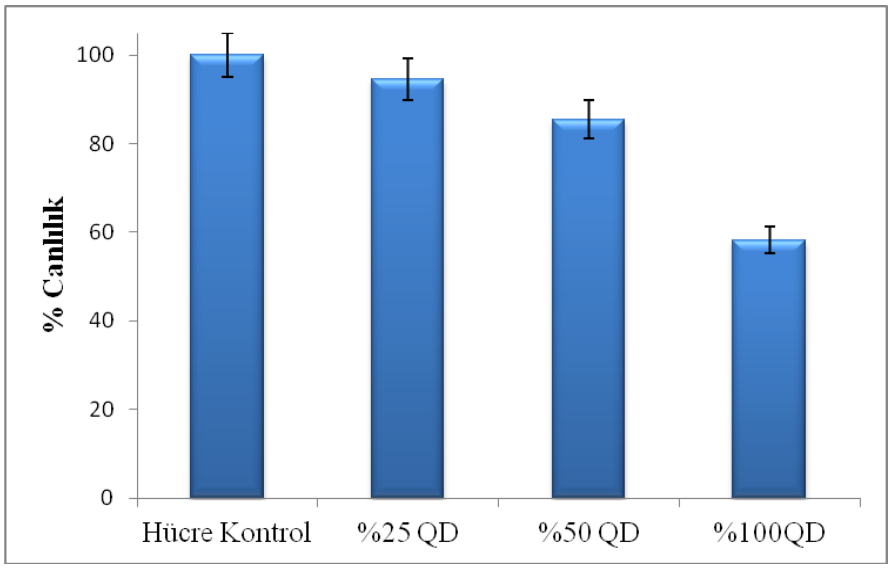


Resim 4.14. KÖR4'e (QD ve CH içerikli formülasyon) ait TEM görüntüleri (x18000)



Resim 4.15. KÖR5'e (Pegile QD ve CH içerikli formülasyon) (x18000) (sol) ve etkin madde içermeyen pegfa'lı (x120000) (sağ) kuantum noktacıklarına ait TEM görüntüsü

Mangan asetat ilavesi ile elde edilen kuantum noktacıklarının partikül büyüklükleri oldukça düşük, suda kolayca dağılabilen taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Bu taşıyıcı sistemlerin L929 fare fibroblast hücrelerine uygulanarak sitotoksisiteleri incelenmiştir. Bu amaçla; 10mg kuantum noktacığı içeren KÖR4 kodlu formülasyon daha önce belirtildiği gibi hazırlanmış, santrifüj işlemi sonrasında DMEM ortamında disperse edilmiştir. Bu haliyle %100 olarak kabul edilen formülasyon yarı yarıya ve 1:4 oranında DMEM ile seyreltilerek %50 ve %25 oranında formülasyonlar hücrelere uygulanmıştır. Sitotoksisite sonuçları Şekil 4.58'de sunulmuştur.



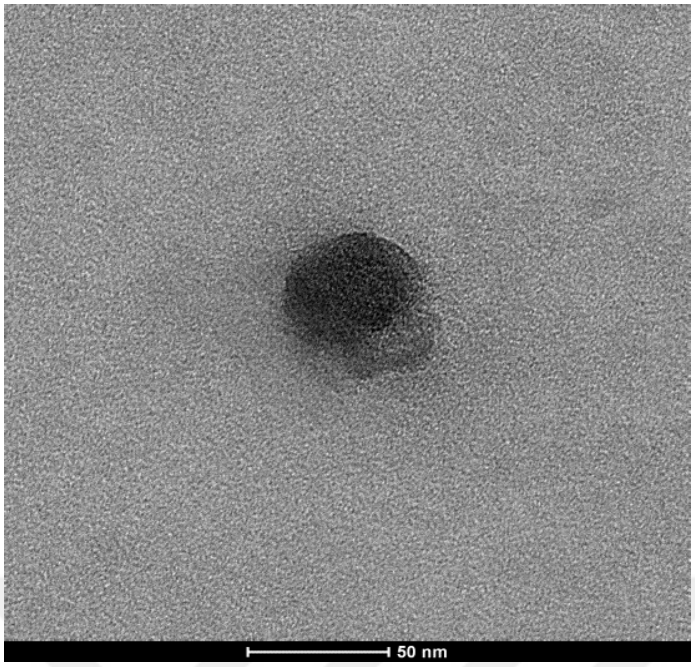
Şekil 4.56. Kuantum noktacıklarına ait sitotoksisite test sonuçları

Çizelge 3.16'da yer alan, etkin madde içeren kuantum noktacıkları ile hazırlanan taşıyıcı sistemlere ait karakterizasyon sonuçları aşağıdaki çizelgede yer almaktadır.

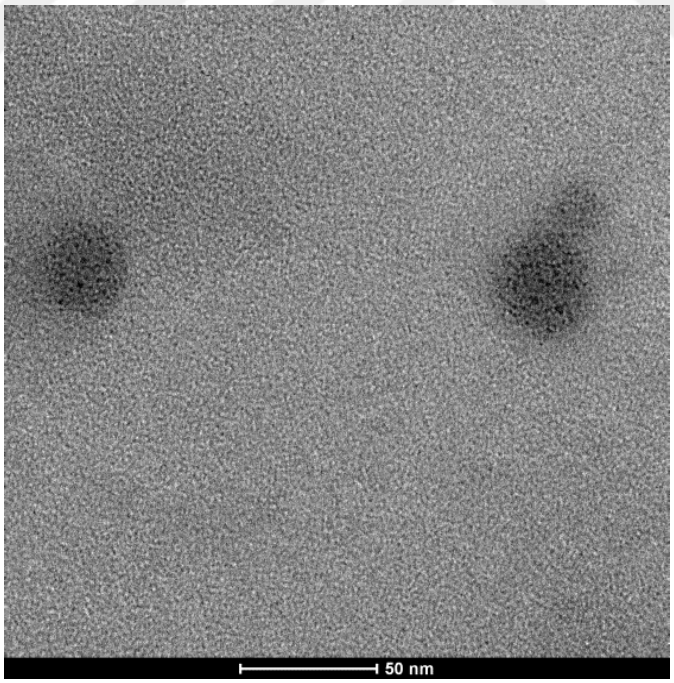
Çizelge 4.24. Kuantum noktacıklarına ait karakterizasyon çalışması sonuçları

	PB (nm)	PDI	ZS (mV)	Yükleme Kapasitesi	
				ERLO/İMA	DEX
QD-İMA	280,7±97,37	0,709±0,091	5,63±1,44	%84	%97
QD-İMA-PEG	375,1±28,67	0,554±0,294	-11,8±1,26	%80	%96
QD-İMA-PEG-FA	168,6±48,78	0,451±0,124	-35,8±0,27	%75	%96
QD-ERLO	117,9±40,986	0,910±0,064	43,1±6,38	%56	%98
QD-ERLO-PEG	222,2±45,40	0,691±0,074	-12,4±1,47	%51	%99
QD-ERLO-PEG-FA	161,6±96,866	0,883±0,083	-0,98±0,88	%48	%98

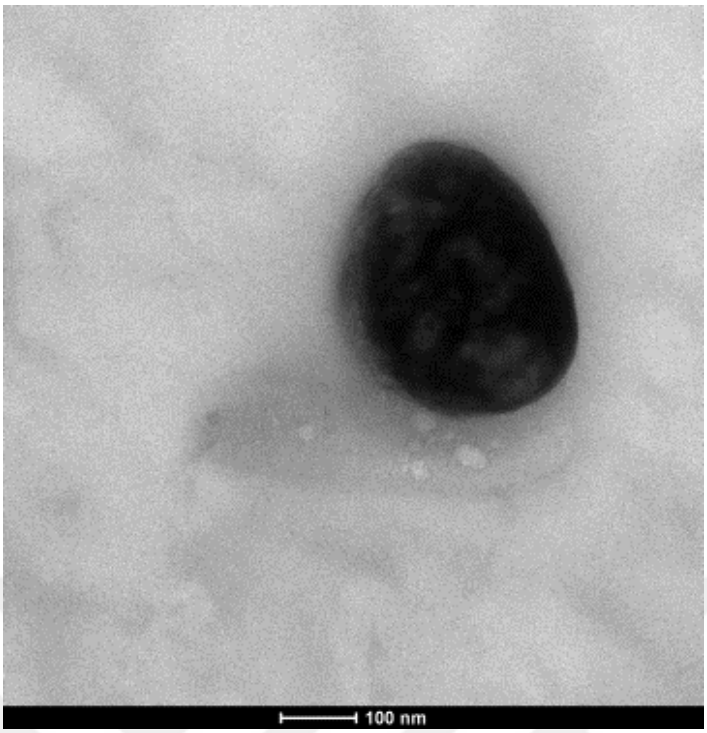
Hazırlanan bu formülasyonlara ait TEM görüntüleri alınarak morfolojik olarak da incelenmiştir. TEM görüntülerine ait sonuçlar aşağıda yer almaktadır.



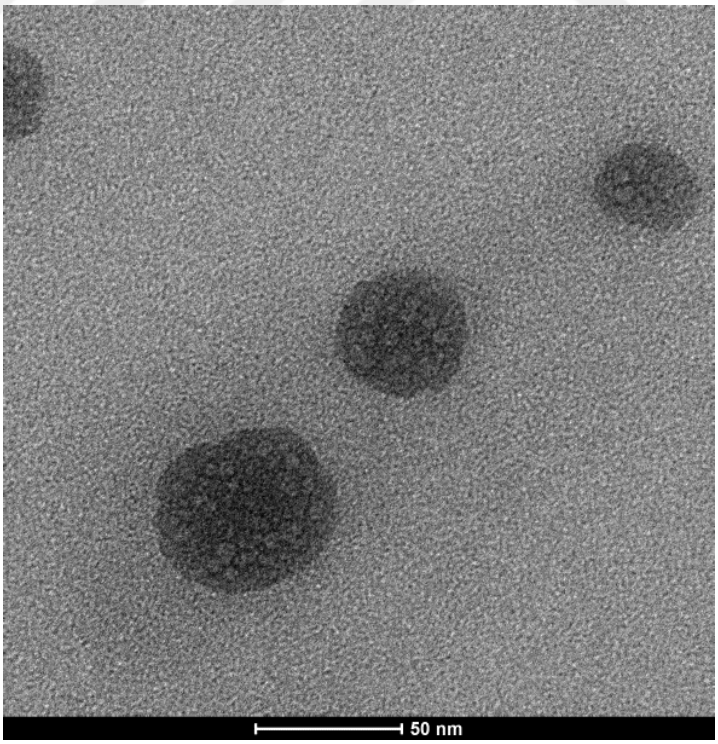
Resim 4.16. QD-İMA kodlu formülasyona ait TEM görüntüsü (x49000)



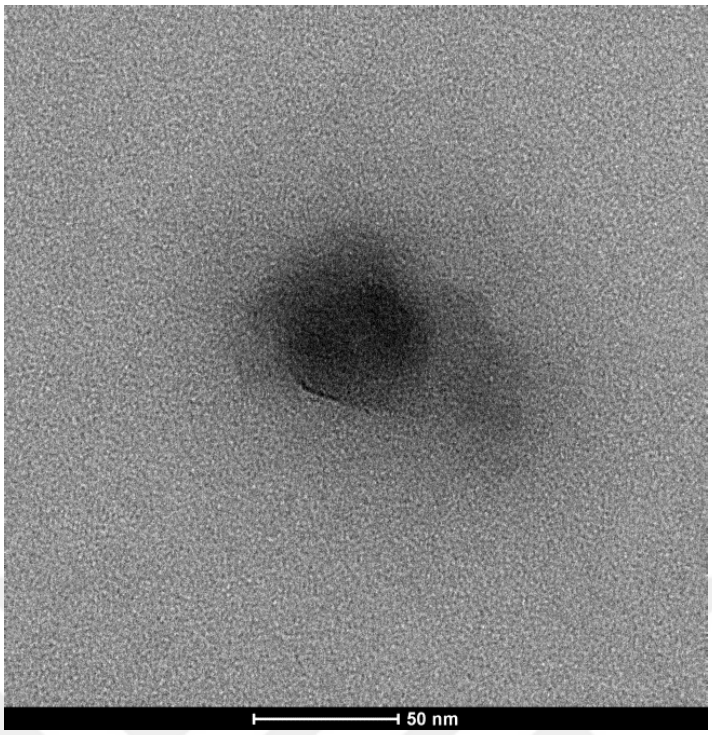
Resim 4.17. QD-İMA-PEG kodlu formülasyona ait TEM görüntüsü (x49000)



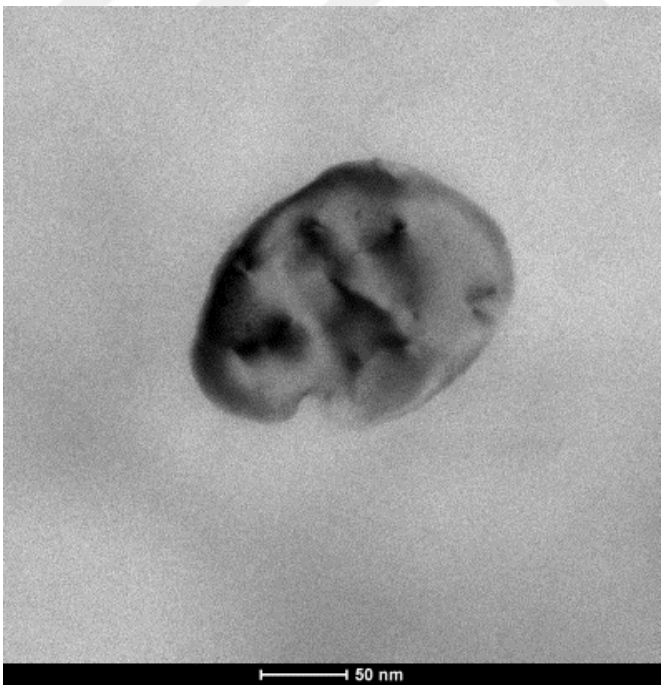
Resim 4.18. QD-İMA-PEG-FA kodlu formülasyona ait TEM görüntüsü (x49000)



Resim 4.19. QD-ERLO kodlu formülasyona ait TEM görüntüsü (x120000)



Resim 4.20. QD-ERLO-PEG kodlu formülasyona ait TEM görüntüsü (x120000)



Resim 4.21. QD-ERLO-PEG-FA kodlu formülasyonaait TEM görüntüsü (x120000)

4.2.2. Nanopartiküllere ait karakterizasyon çalışmaları

Kitozan nanopartikülleri elde etmeden önce püskürtülecek çözeltiyi hazırlamak gerekmektedir. Kitozan çözeltisi elde etmek için hazırlanan farklı glasiyal asetik asit içerikli formülasyonlar Çizelge 6'da verilmiştir. Hazırlanan bu formülasyonlardan C1 ve C2 formülasyonlarında tam bir çözünme gözlenmesine rağmen C3 ve C4 formülasyonlarında tam bir çözünme gözlenmemiş, kitozan parçacıklar halinde kalmıştır. Bu sonuçlardan hareketle, daha az glasiyal asetik asit içeriğine sahip olan C2 formülasyonu ile Nano Spray Dryer cihazında çalışılmıştır.

Cihazda sırasıyla K1, K2, K3 ve K4 numaralı formülasyonlar ile çalışılmıştır. Bu formülasyonlar; saf su, düşük yüzey gerilimine sahip olduğu bilinen etanol ve Tween80 ve PEG olmak üzere iki farklı yüzey etkin madde çözeltileridir. Çalışma sırasında düzgün ve sürekli bir püskürtme gözlenebilmesi için farklı maddeler için farklı pompa çeşitlerinin kullanılması gerekmiştir.

%10 ve %20 oranlarında kitozan içeren çözeltilerin piknometre ile yoğunlukları ölçüldükten sonra damla hacimleri ve yüzey gerilimleri incelenmiştir. Bu çalışmaya ait veriler Çizelge 4.25'de yer almaktadır.

Çizelge 4.25. Farklı konsantrasyonlardaki kitozan çözeltilerinin özellikleri

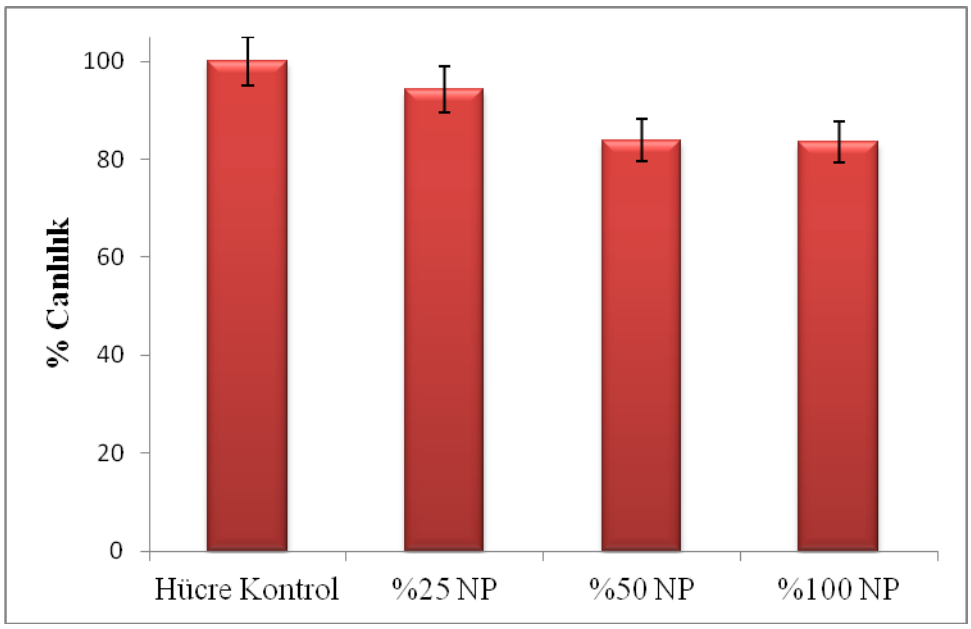
Özellik	10% Kitozan Çözeltisi	20% Kitozan Çözeltisi
Yoğunluk (g/mL)	1,012	1,070
Damla hacmi (µL) ±SE	76,06±0,16	80,39±0,32
Yüzey gerilimi (mN/m) ±SE	14,02±0,02	14,10±0,03

Kitozan nanopartiküllerinin eldesinde; partikül büyüklüğünü püskürtme başlığı çapı ve spray gücünün de doğrudan etkileyeceği düşünülmektedir. Bu amaçla cihaz üzerinde bir seri formülasyon denenerek çalışma şartları optimize edilmeye çalışılmıştır. En az iki paralel üzerinden yürütülen çalışmalara ait veriler aşağıdaki çizelgede yer almaktadır.

Çizelge 4.26. Kitozan nanopartiküllerine ait bulgular

Form. No	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta potansiyel (mV)	Örnek Hacmi (mL)	Çalışma Süresi	% verim
N1	461,9 ± 9,3	0,484 ± 0,006	+19,68 ± 0,44	50	7 saat	85
N2	206,4 ± 19,5	0,403 ± 0,103	+20,62 ± 0,36	50	7 saat	80
N3	489,3 ± 15,1	0,928 ± 0,176	+21,73 ± 1,03	20	16 saat	19
N4	281,9 ± 16,9	0,962 ± 0,050	+19,15 ± 0,25	20	19 saat	13
N5	304,4 ± 48,3	0,841 ± 0,245	+23,45 ± 0,32	20	30 saat	14
N6	403,8 ± 35,2	0,625 ± 0,202	+28,53 ± 0,25	20	18 saat	85
N7	322,1 ± 62,7	0,469 ± 0,115	+24,02 ± 0,81	40	15 saat	70
N8	381,0 ± 36,4	0,538 ± 0,109	+30,47 ± 0,54	40	8 saat	72

Nanopartikül taşıyıcı sistemleri için etkin madde içermeyen sonuç formülasyon (N2 kodlu formülasyon) L929 fare fibroblast hücrelerine uygulanarak sitotoksisiteleri incelenmiştir. Nano Spray Dryer cihazı ile püskürtme sonrası elde edilen katı madde DMEM ortamında disperse edilmiştir. Bu haliyle %100 olarak kabul edilen formülasyon yarı yarıya ve 1:4 oranında DMEM ile seyreltilerek %50 ve %25 oranında formülasyonlar hücrelere uygulanmıştır. Sitotoksisite sonuçları Şekil 4.58'de sunulmuştur.



Şekil 4.57. Nanopartiküllere ait sitotoksisite test sonuçları

Nanopartiküller üzerinde kullanılan kitozan konsantrasyonuna bağlı olarak yoğunluk, yüzey gerilimi, damla hacmi ve viskozite değişimleri incelenmiştir (Çizelge 4.27). Daha sonra formülasyon yapısına eklenecek olan PEG2000'in veya PEGFA'nın da bu parametrelere olan etkisi incelenmiştir.

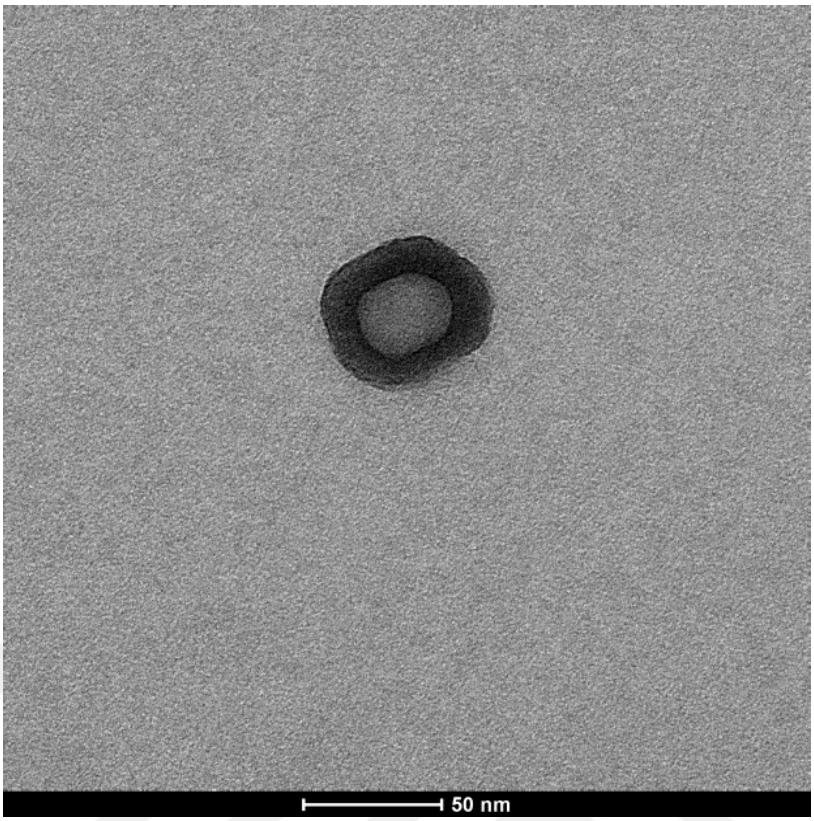
Çizelge 4.27. Fromülasyonlara ait püskürtmeyi etkileyebilecek parametrelere ait sonuçlar

Formülasyon Adı	Yoğunluk	Damla Hacmi	Yüzey Gerilimi
BOŞ-NP	0,9799	12,25±0,02	64,88±0,10
BOŞ-NP-PEG	1,0014	13,06±0,04	70,28±0,17
BOŞ-NP-PEG-FA	1,0011	13,42±0,03	70,16±0,20
NP-İMA	0,9755	14,18±0,03	72,72±0,11
NP-İMA-PEG	0,9858	12,67±0,02	69,31±0,07
NP-İMA-PEG-FA	1,0175	13,63±0,01	72,59±0,43
NP-ERLO	0,9568	12,41±0,01	66,35±0,17
NP-ERLO-PEG	0,9775	12,30±0,02	65,25±0,25
NP-ERLO-PEG-FA	0,9741	11,84±0,02	65,92±0,73

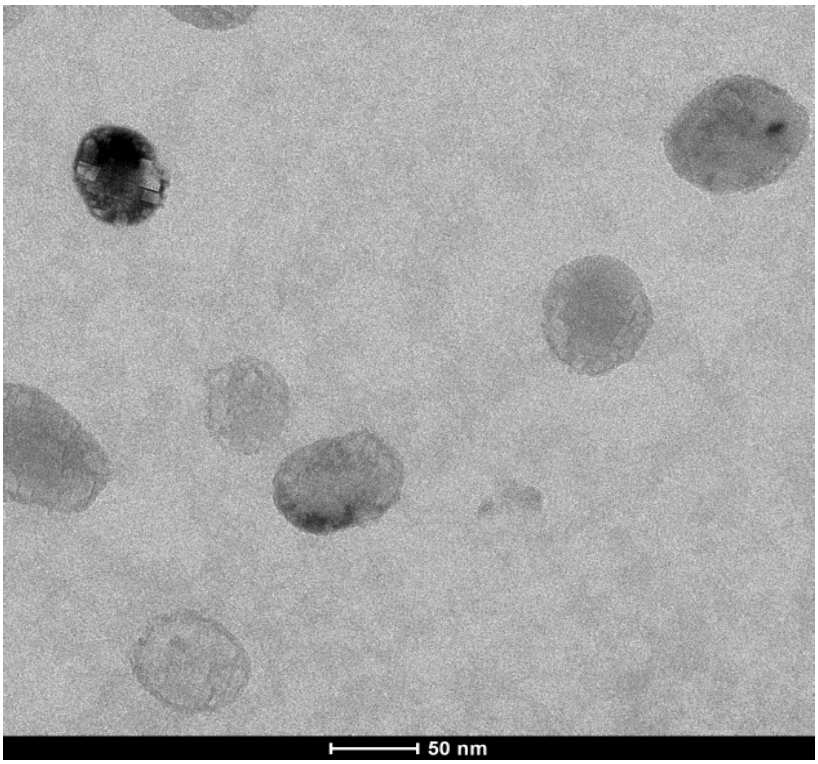
Tüm formülasyonlara ait karakterizasyon sonuçları Çizelge 4.28'de yer almaktadır.

Çizelge 4.28. Formülasyonlara ait karakterizasyon sonuçları

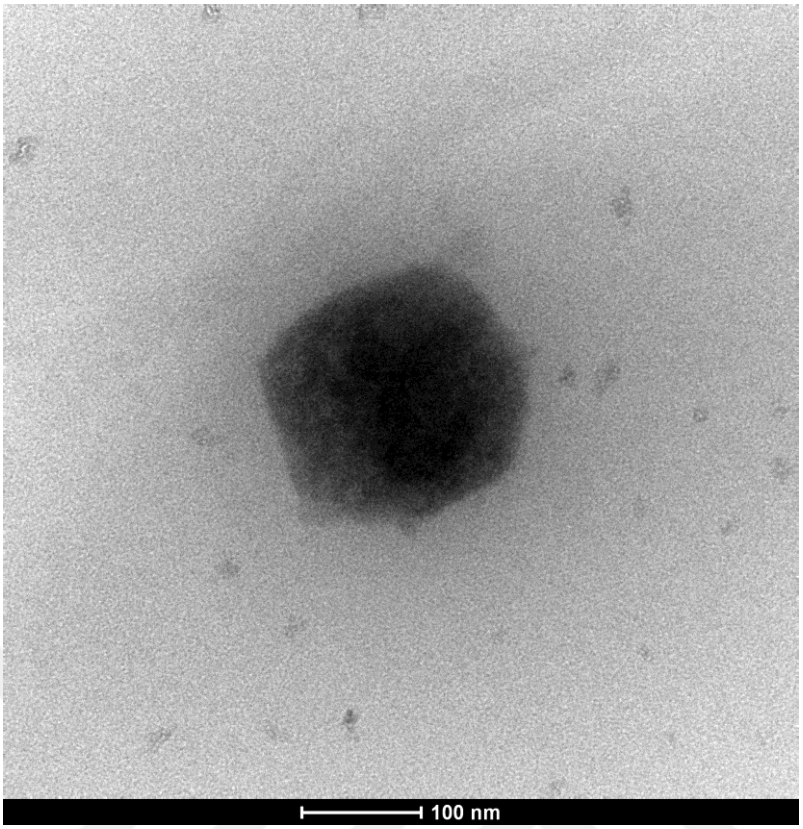
	PB	PDI	ZS	%Verim
NP-İMA	218,5±22,99	0,621±0,095	23,4±1,14	98,8
NP-İMA-PEG	265,4±27,78	0,609±0,058	21,7±0,13	99,0
NP-İMA-PEG-FA	412,4±7,76	0,314±0,099	-15,7±3,58	99,5
NP-ERLO	101,6±53,10	0,634±0,099	26,6±1,41	98,7
NP-ERLO-PEG	167,2±20,81	0,666±0,018	25,8±2,89	93,5
NP-ERLO-PEG-FA	206±56,63	0,601±0,032	27,4±1,35	98,9



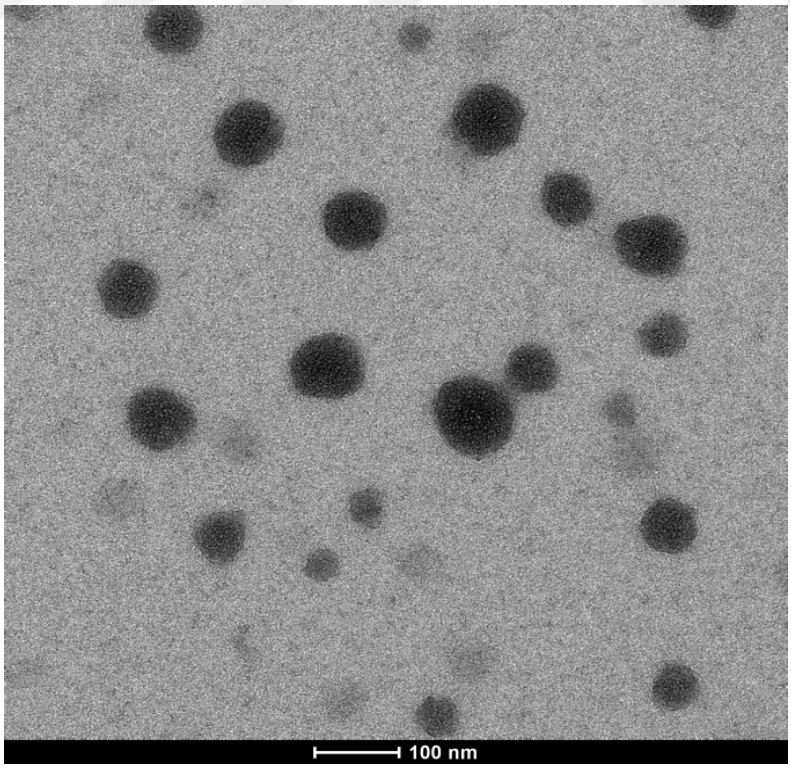
Resim 4.22. NP-İMA kodlu formülasyona ait TEM görüntüsü (x150000)



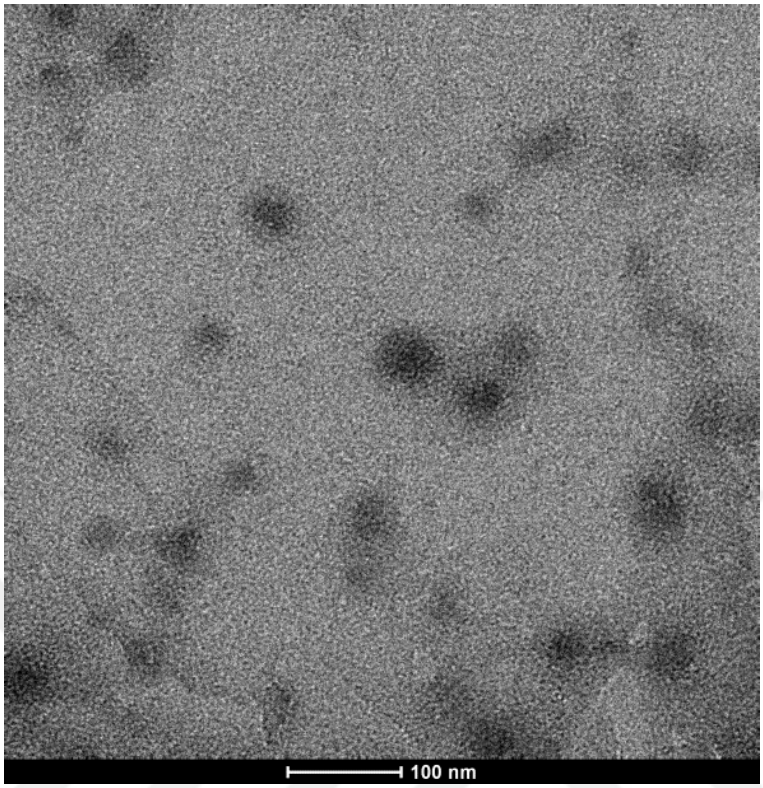
Resim 4.23. NP-İMA-PEG kodlu formülasyona ait TEM görüntüsü (x98000)



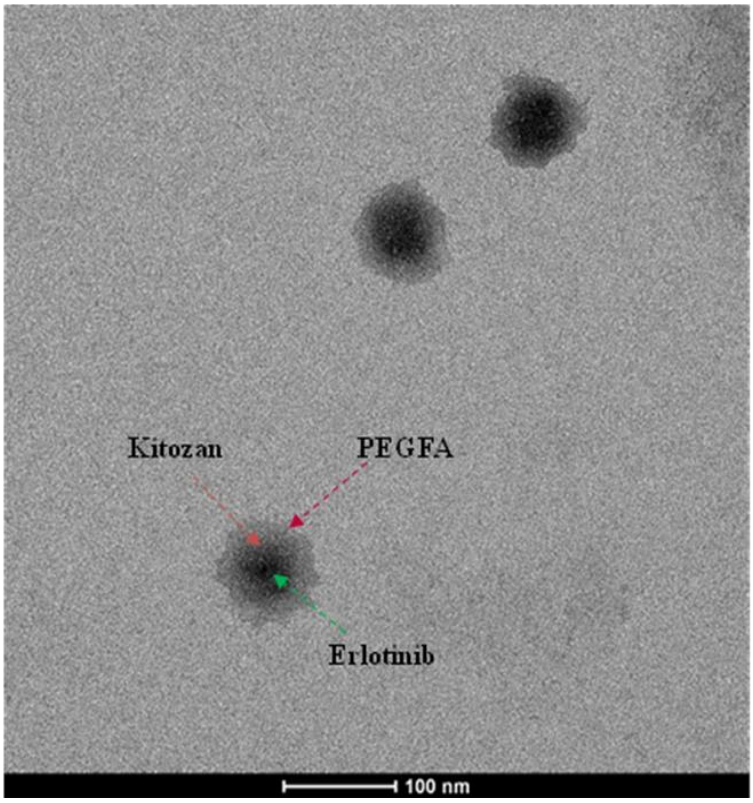
Resim 4.24. NP-İMA-PEG-FA kodlu formülasyona ait TEM görüntüsü (x68000)



Resim 4.25. NP-ERLO kodlu formülasyona ait TEM görüntüsü (x49000)



Resim 4.26. NP-ERLO-PEG kodlu formülasyonlara ait TEM görüntüleri (x68000)



Resim 4.27. NP-ERLO-PEG-FA kodlu formülasyonlara ait TEM görüntüleri (x68000)

4.2.3. Formülasyonlarda yapılan *in vitro* salım çalışmalarına ait bulgular

Formülasyonlarda yapılan Franz difüzyon hücrelerinden salım çalışmalarında erlotinib HCl'in düşük çözünürlük göstermesi dolayısı ile pH 7,4 fosfat tamponunda beklenilen salım elde edilememiştir. Bu nedenle erlotinib HCl çözeltisi üzerinde etkin madde salımını artırmaya yönelik çalışmalar sürdürülmüştür. Bu amaçla %20 etanol içeren çözelti içerisinde erlotinib HCl (farklı dozlarda) ve deksketoprofen tremetamol (tüm çalışmalarda 0,09 mg sabit dozda) çözülmüş daha sonra Franz difüzyon hücrelerinin donör kompartman kısmına konulmuştur. Franz difüzyon hücrelerinin reseptör kısmına ise farklı ortamlar ilave edilerek çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Çalışmalara ait bulgular aşağıdaki çizelgede özetlenmiştir.

Çizelge 4.29. ERLO ve DEX içeren çözelti için diyaliz membranda salım çalışmaları

Kompartman	Kullanılan ortam	ERLO DOZ	ERLO SALIM	ERLO SÜRE	DEX SALIM	DEX SÜRE
Donör	EtOH:Su (20:80)	3 mg	%38,49	192 saat	X	X
		0,375 mg	%57,33	192 saat	%37,04	24 saat
Reseptör	PBS:PG (40:60)					
Donör	EtOH:Su (20:80)	3 mg	%42,49	192 saat	X	X
		0,375 mg	%61,69	192 saat	X	X
		0,0044 mg	%43,93	72 saat	X	X
Reseptör	DMEM:PG (40:60)					
Donör	EtOH:Su (20:80)	3 mg	%4,70	192 saat	% 102,14	120 saat
		0,375 mg	%10,23	192 saat	% 96,48	120 saat
Reseptör	%1 SDS 0,1 N HCl					
Donör	EtOH:Su (20:80)	0,375 mg	X	X	% 87,37	48 saat
		0,0044 mg	X	X	% 67,32	48 saat
Reseptör	PBS					
Donör	EtOH:Su (20:80)	0,375 mg	%0,52	48 saat	% 31,16	48 saat
		0,0044 mg	%14,75	48 saat	% 12,08	48 saat
Reseptör	DMEM					
Donör	EtOH:Su (20:80)	3 mg	%33,59	72 saat	% 112,85	24 saat
		0,375 mg	%60,37	72 saat	% 136,28	24 saat
Reseptör	Distile Su					

*Çizelgede belirtilen PBS kısaltması pH 7,4 fosfat tamponunu, EtOH kısaltması etanolü, PG kısaltması ise propilen glikolü ifade etmektedir.

Franz difüzyon hücrelerinde gerçekleştirilen etkin maddenin çözeltiden salımı ile ilgili çalışmalarda; erlotinib HCl dozu 3 mg, 0,375 mg veya 0,0044 mg olmak üzere üç farklı dozda kullanılarak %20 etanol içerisinde çözüldükten sonra donör kompartmana eklenmiştir. Franz difüzyon hücrelerinin reseptör kompartmanına ise farklı türlerde çözücüler ilave edilerek geçiş çalışmaları sürdürülmüştür.

Diyaliz membran ile yapılan çalışmalardan sonra salım üzerine membran etkisi olabileceği düşünülmüş ve diyaliz membran yerine selofan membran kullanılarak çalışmalar devam ettirilmiştir. Selofan membran gerçekleştirilen çalışmalar, diyaliz membran ile aynı koşullarda sürdürülmüş ve elde edilen bulgular karşılaştırılmıştır. Ancak yalnızca membran etkisinin olup olmadığı araştırıldığından diyaliz membranda gerçekleştirilen tüm çalışmalar selofan membran ile tekrarlanmamış yalnızca üç farklı reseptör ortamı kullanılmıştır. Reseptör olarak distile su, DMEM ve DMEM:PG (40:60) ortamlarında çalışmalar iki farklı dozda yürütülmüştür. Selofan membran ile yapılan çalışmalara ait bulgular Çizelge 4.30'da yer almaktadır. Çizelgede erlotinib HCl ve deksketoprofen tremetamole ait salımlar yüzde olarak verilmiş olup başlangıç konsantrasyonundan hareketle hesaplanmıştır. Ayrıca tüm çalışmalarda deksketoprofen tremetamol dozu 0,09 mg olacak şekilde sabit tutulmuştur.

Çizelge 4.30. ERLO ve DEX içeren çözelti için selofan membranda salım çalışmaları

Kompartman	**Kullanılan ortam**	**ERLO DOZ**	**% ERLO SALIM**	**ERLO SÜRE**	**% DEX SALIM**	**DEX SÜRE**
Donör	EtOH:Su (20:80)	3 mg	36,29	72 saat	150,91	48 saat
		0,375 mg	54,45	72 saat	127,01	48 saat
Reseptör	Distile Su					
Donör	EtOH:Su (20:80)	3 mg	34,02	72 saat	X	X
		0,375 mg	43,47	72 saat	X	X
Reseptör	DMEM:PG (40:60)					
Donör	EtOH:Su (20:80)	3 mg	X	X	195,28	48 saat
		0,375 mg	X	X	162,44	48 saat
Reseptör	DMEM					

Selofan membran kullanmanın etkin madde salımını iyileştirmediği gözlenmiş bunun üzerine tekrar diyaliz membran kullanımına gidilerek reseptör kompartmana konulan çözücüler değiştirilerek farklı ortamlar denenmiştir (Çizelge 4.31 ve Çizelge 4.32).

Çizelge 4.31. ERLO ve DEX içeren çözelti için diyaliz membrandaki diğer salım çalışmaları

Kompart.	Kullanılan ortam	ERLO DOZ	ERLO SALIM	ERLO SÜRE	DEX SALIM	DEX SÜRE
Donör	PG:Su (20:80)	3 mg	%17,12	96 saat	X	X
		0,375 mg	%62,11	96 saat	X	X
Reseptör	PBS:PG (40:60)					
Donör	PG:Su (20:80)	3 mg	%27,64	96 saat	X	X
		0,375 mg	%68,99	96 saat	X	X
Reseptör	DMEM:PG (40:60)					
Donör	PG:Su (20:80)	3 mg	%3,56	96 saat	%98,18	72 saat
		0,375 mg	%27,26	96 saat	%57,22	48 saat
		0,0044 mg	%3,30	96 saat	%76,98	96 saat
Reseptör	DMEM:PG (40:60)					
Donör	PG:Su (20:80)	0,375 mg				
Reseptör	PBS:PG (70:30)		%26,71	72 saat	%74,09	72 saat
Reseptör	PBS:PG (60:40)		%43,75	72 saat	%96,72	72 saat
Donör	PG:Su (5:95)	0,375 mg				
Reseptör	PBS:PG (70:30)		%35,98	96 saat	%164,75	96 saat
Donör	PG:Su (20:80)	0,375 mg	%52,69	96 saat	%57,46	96 saat
Donör	EtOH:Su (20:80)	0,375 mg	%50,72	72 saat	%68,41	72 saat
Reseptör	pH 3 Asetat tmp.					
Donör	PG:Su (20:80)	0,375 mg	%16,09	96 saat	%94,82	72 saat
Donör	EtOH:Su (20:80)	0,375 mg	%24,39	96 saat	%274,49	96 saat
Reseptör	pH 5,2 Asetat tmp.					
Donör	PG:Su (20:80)	0,375 mg	%2,82	96 saat	%78,99	96 saat
Donör	EtOH:Su (20:80)	0,375 mg	%6,27	48 saat	%139,56	96 saat
Reseptör	PBS-Tau					
Donör	PG:Su (20:80)	0,375 mg	%41,9	144 saat	%66,77	144 saat
Donör	EtOH:Su (20:80)	0,375 mg	%7,02	144 saat	%48,90	144 saat
Reseptör	AseT3:DMEM (40:60)					

*Çizelgede belirtilen PBS kısaltması pH 7,4 fosfat tamponunu, AseT3 kısaltması pH 3 asetat tamponunu ve PBS-Tau kısaltması ise 1,875 mM sodyum taurokolat içeren pH 7,4 fosfat tamponunu ifade etmektedir.

Çizelge 4.32. ERLO ve DEX içeren çözelti için diyaliz membrandaki diğer salım çalışmaları

Kompart.	Kullanılan ortam	ERLO DOZ	ERLO SALIM	ERLO SÜRE	DEX SALIM	DEX SÜRE
Donör	PG:Su (20:80)	3 mg	%14,07	48 saat	%82,48	48 saat
		0,375 mg	%53,50	144 saat	%61,09	144 saat
		0,05 mg	%96,90	144 saat	%13,70	144 saat
Donör	EtOH:Su (20:80)	0,375 mg	%1,09	144 saat	%4,92	144 saat
		0,05 mg	%71,00	144 saat	%24,3	144 saat
Reseptör	AseT3:DMEM (60:40)					
Donör	PG:AseT3 (40:60)	3 mg	%5,79	72 saat	%31,10	72 saat
		0,375 mg	%62,35	72 saat	%85,38	72 saat
Reseptör	AseT3:PG (60:40)	0,05 mg	%74,63	72 saat	%100,10	72 saat
Donör	PG:PBS (40:60)	3 mg	%4,43	72 saat	%131,51	72 saat
		0,375 mg	%16,76	72 saat	%33,07	72 saat
Reseptör	PBS:PG (60:40)	0,05 mg	%21,80	72 saat	%59,94	72 saat
Donör	PG:Su (20:80)	0,05 mg	%88,50	24 saat	%29,87	24 saat
Reseptör	pH 3 Asetat tmp.					

*Çizelgede belirtilen PBS kısaltması pH 7,4 fosfat tamponunu ve AseT3 kısaltması pH 3 asetat tamponunu ifade etmektedir.

İmatinib mesilat ve deksketoprofen trometamol içeren çözelti formülasyonları için yapılan Franz hücresi salım çalışmalarında ise üç farklı imatinib mesilat dozu denenmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan DMEM'in pH'sının 7,36 olarak ölçülmesi dolayısı ile diyaliz membran geçişleri pH 7,4 fosfat tamponunda yapılmıştır. Franz difüzyon hücrelerinden imatinib ve deksketoprofen trometamol içeren çözeltinin diyaliz membrandan geçişine ait bulgular Çizelge 4.33'de yer almaktadır.

Çizelge 4.33. İMA ve DEX içeren çözeltiye ait Franz difüzyon hücresinden salım çalışmaları

	İmatinib mesilat			**Deksketoprofen tremetamol**		
DOZ	4,8 mg	0,48 mg	0,048 mg	0,09 mg	0,09 mg	0,09 mg
Salım yüzdesi	%8,42	%35,96	%98,54	%74,71	%75,85	%67,02
Süre	144 saat	72 saat	72 saat	144 saat	72 saat	72 saat

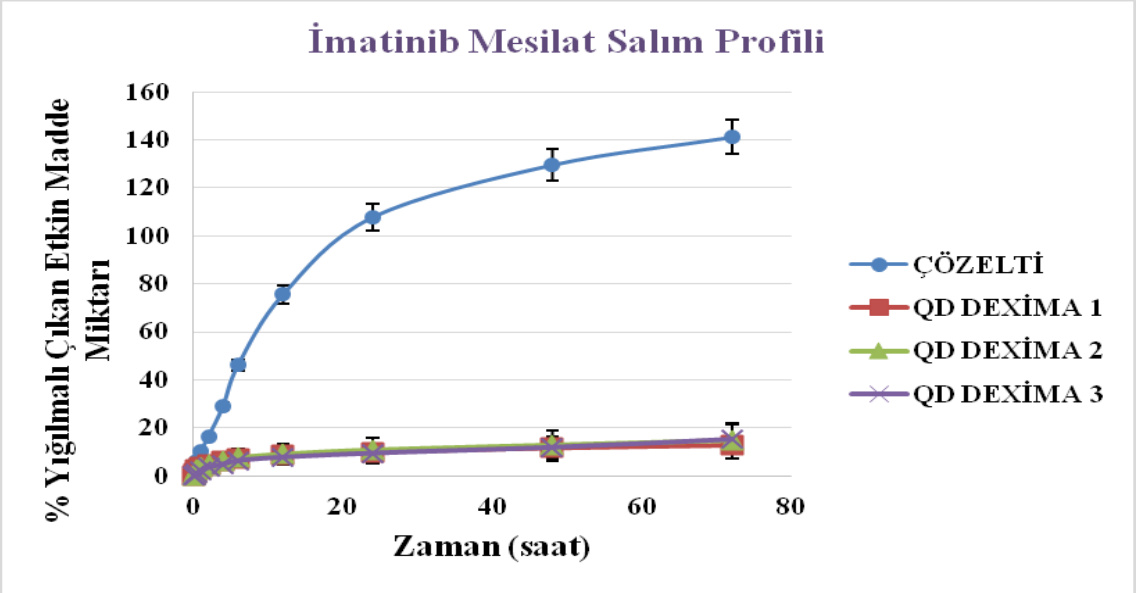
Diyaliz membran 24 saat boyunca pH 7,4 fosfat tamponunda ıslatıldıktan sonra kullanılmıştır. Diyaliz membran, Franz hücrelerinin orta kısmına yerleştirilmiş, hücrelerin alt kısmına pH 7,4 fosfat tamponu (2,5 mL), üst kısmına ise salımı incelenecek formülasyon (1,5 mL) ilave edilmiştir. Ortam sıcaklığı su banyosu ile 37ºC'de sabit tutulmuş, magnetik karıştırıcı ile deney süresince sabit hızda karıştırılmıştır. 0,25.; 0,5.; 1., 2., 4., 6., 12., 24., 48. ve 72. saatlerde (veya 24 saatte bir olacak şekilde daha uzun sürelerde) alt kısımdan (reseptör) 2,5 mL örnek alınmış ve yerine 37ºC'ye getirilmiş taze pH 7,4 fosfat tamponu ilave edilmiştir. Alınan örneklerdeki etkin madde miktarları UPLC cihazı ile tayin edilmiştir. Hücrelerden geçen % kümülatif etkin madde miktarları zamana karşı grafiğe geçirilmiş, deney süresi sonunda % kümülatif geçen miktarlar hesaplanmıştır. % kümülatif etkin madde salım değerine 0,048 mg imatinib mesilat dozu ile ulaşıldığı gözlenmiştir.

Erlotinib HCl ve imatinib mesilat için hayvanları tedavi etmede kullanılacak dozlar sırasıyla 3 mg ve 4,8 mg olup, bu dozlarda Franz hücresi ile salım çalışması yapıldığında sink koşullar sağlanamadığı için %100 salım sonuçları elde edilmemiştir. Bu nedenle diyaliz membrandan salım çalışmaları diyaliz torbası yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Diyaliz torbası ile yapılan deneyler erlotinib HCl için pH 3 asetat tamponunda ve imatinib mesilat için pH 7,4 fosfat tamponunda sürdürülmüştür. Diyaliz membranı 1 gece boyunca reseptör ortamı ile ıslatıldıktan sonra alt ucundan iple bağlanmış ve etkin madde çözeltileri ile formülasyonlar (1,5 mL) diyaliz torbasının içine koyularak üst kısmından tekrar iple bağlanmıştır. Diyaliz torbasının tamamen sıvı içerisine batmasını sağlamak amacıyla alt ucuna ağırlık verici madde bağlanmış ve 200 mL hacminde ortam içeren behere diyaliz torbaları bırakılmıştır. Su banyosu kullanılarak ortam sıcaklığı 37ºC'de sabit tutulmuş, deney süresince magnetik karıştırıcı ile sabit hızda karıştırma saplanmıştır. Belirli zaman aralıklarında beherden 2 mL örnek alınmış ve yerine 37ºC'ye getirilmiş taze ortam ilave edilmiştir. Alınan örneklerden UPLC cihazı ile etkin madde miktar tayini yapılarak diyaliz membranından ortama salınan % etkin madde miktarları zamana karşı grafiğe geçirilmiş ve süre sonunda % salınan miktarlar hesaplanmıştır.

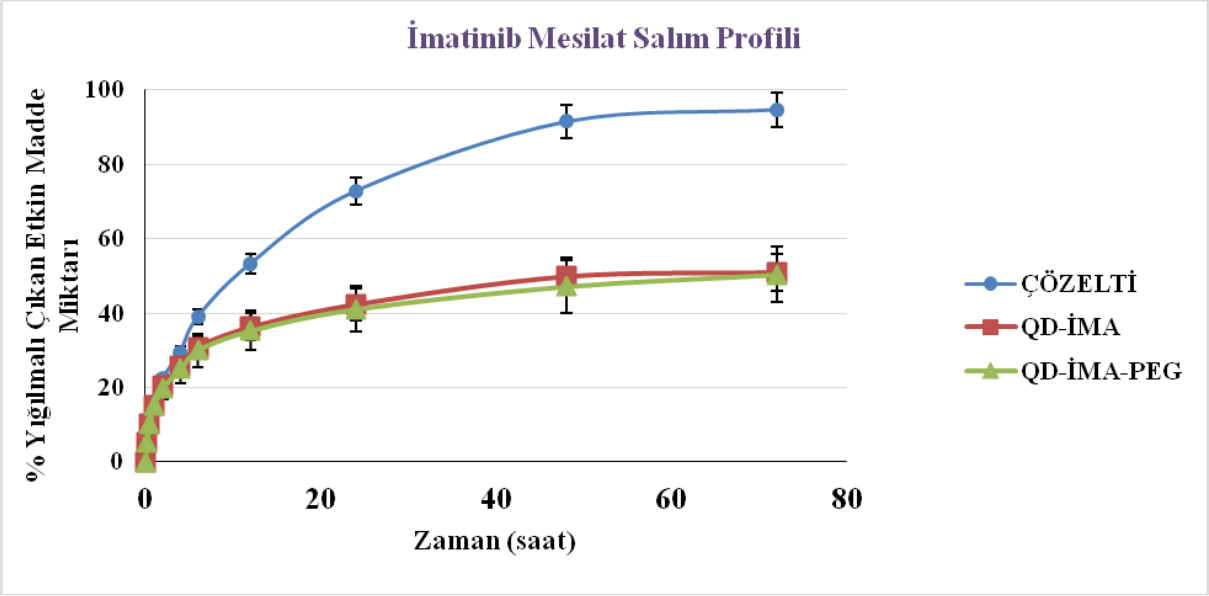
Kuantum noktacıklarında yapılan in vitro salım çalışmalarına ait bulgular

İmatinib mesilat ve deksketoprofen tremetamol içeren formülasyonlar santrifüj edildikten sonra 1,5 mL'sinde 4,8 mg İMA ve 0,09 mg DEX olacak şekilde distile su içerisinde

disperse edilip Franz hücresinin donör kısmına yerleştirilmiştir. Salım çalışmaları sırasında 15.dakika, 30. dakika ve 1., 2., 4., 6., 12., 24., 48. ve 72. saatlerde reseptör kısmın tamamı alınıp pH:7,4 fosfat tamponu ilave edilerek deney sürdürülmüştür. Alınan numuneler süzüldükten sonra UPLC ile analiz edilmiş, elde edilen sonuçlara Şekil 4.58 ve Şekil 4.59'da yer verilmiştir.



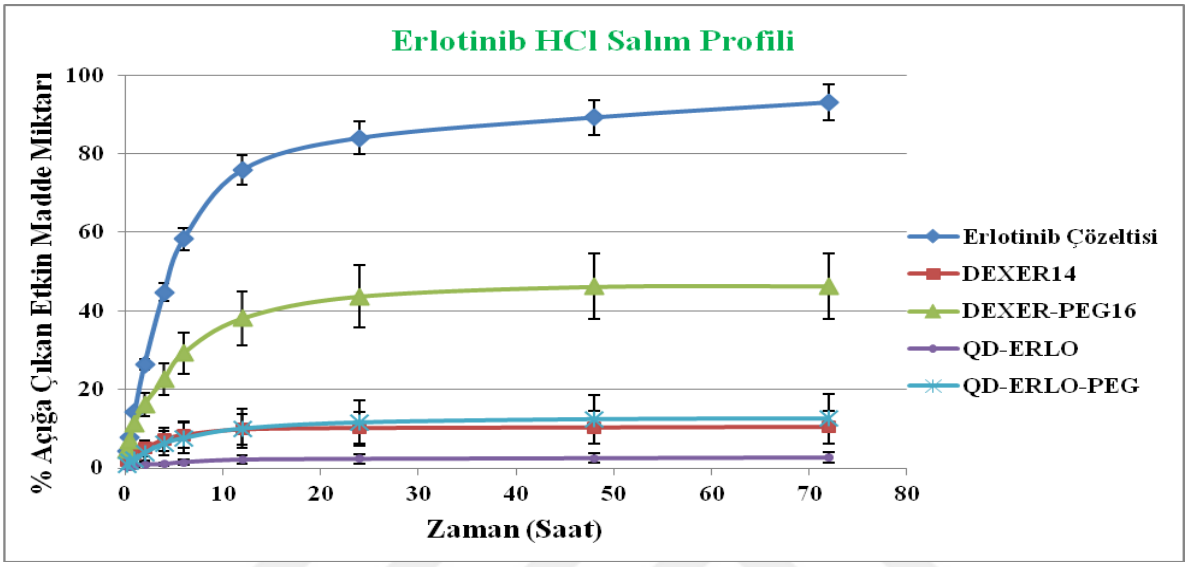
Şekil 4.58. Kuantum noktacıklarından Franz difüzyon hücresinde İMA salım profili



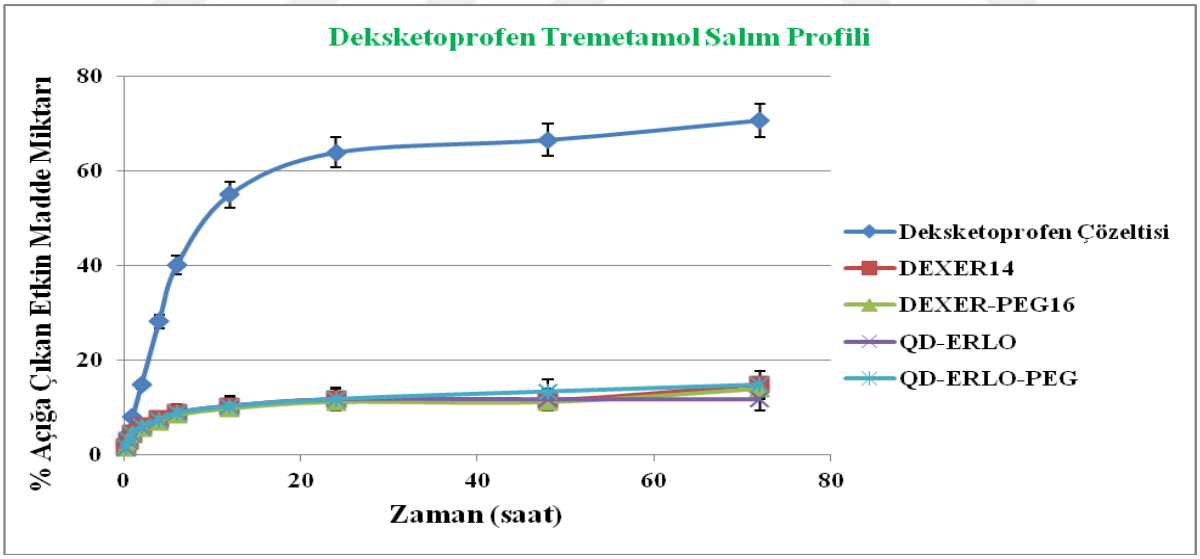
Şekil 4.59. Farklı şekilde hazırlanan kuantum noktacıklarından Franz difüzyon hücresinde imatinib mesilat salım profili

ERLO ve DEX içeren formülasyonlar, 18000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edilip süpernatant kısmı atıldıktan sonra; 1,5 mL'sinde 0,05 mg ERLO ve 0,09 mg DEX olacak

şekilde distile su ile disperse edilmiştir. Formülasyonlar Franz hücresinin donör kısmına yerleştirilmiş ve pH:3 asetat tamponu bulunan reseptör kısımdan 15.dakika, 30. dakika ve 1., 2., 4., 6., 12., 24., 48. ve 72. saatlerde numuneler alınmıştır. Alınan numuneler süzüldükten sonra UPLC ile analiz edilmiş, elde edilen sonuçlara Şekil 4.60 ve Şekil 4.61'de yer verilmiştir.



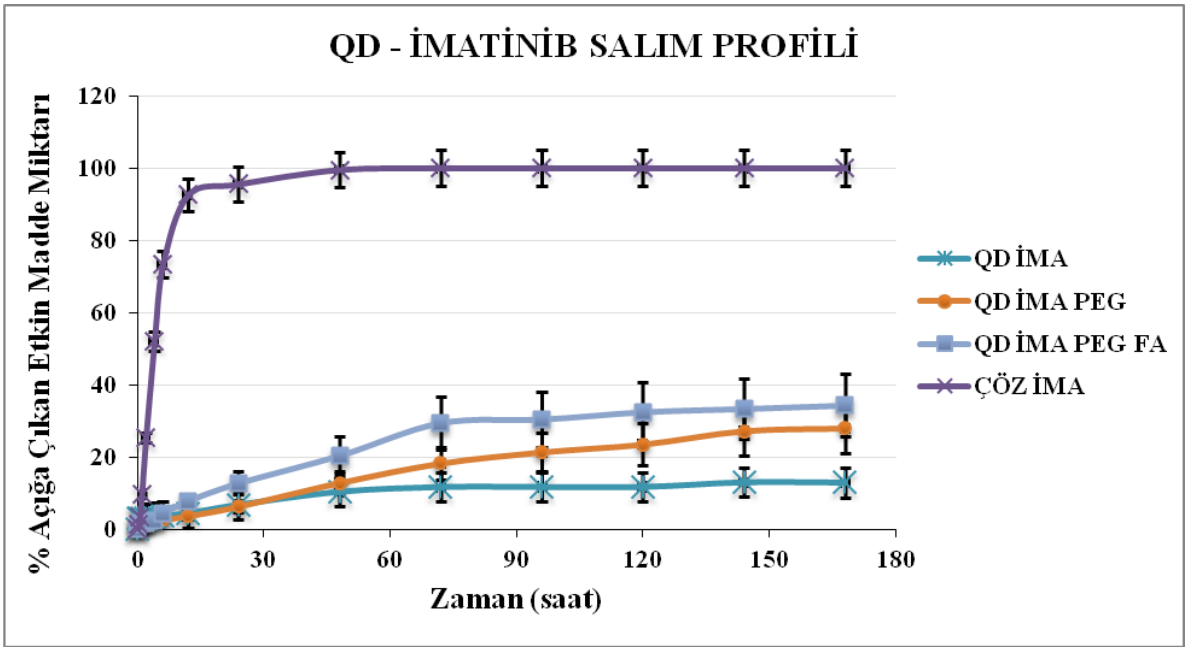
Şekil 4.60. Kuantum noktacıklarından Franz difüzyon hücresinde ERLO salım profili



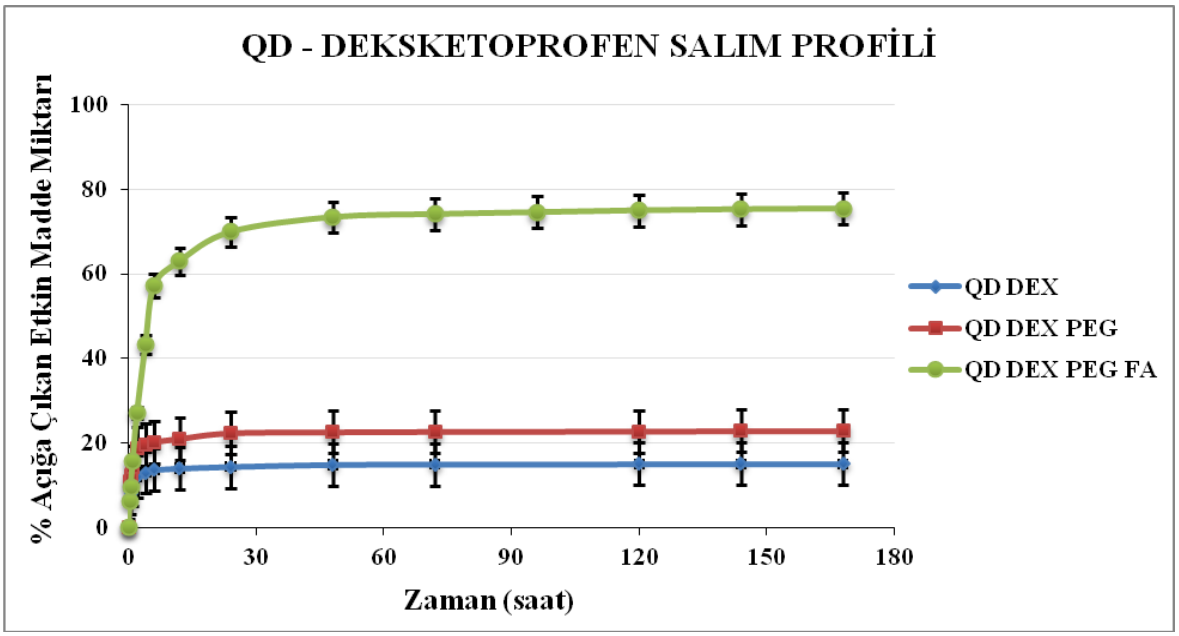
Şekil 4.61. ERLO içeren kuantum noktacıklarından Franz difüzyon hücresinde DEX salım profili

Franz difüzyon hücreleri ile yapılan çalışmalarda tekrarlanabilirliğin düşük olması, DEX için çok farklı sonuçların alınması üzerine diyaliz torba yöntemi ile salım çalışmaları sürdürülmüştür. Hazırlanan formülasyonlar 18000 rpm'de 40 dakika boyunca santrifüj edilip süpernatant kısmı atıldıktan sonra, 1,5 mL'sinde 4,8 mg İMA, 3 mg ERLO ve 0,09

mg DEX içerecek şekilde distile suda disperse edilip diyaliz torbanın iç kısmına yerleştirilmiştir. 15. ve 30. dakikalarda, 1., 2., 4., 6., 12., 24., 48. ve 72. saatlerde 2 mL örnek alınıp yerine 37ºC'ye getirilmiş ortam ilave edilmiş, sonrasında ise UPLC ile etkin madde miktar tayini yapılmıştır. Şekil 4.62 ve Şekil 4.63'de İMA ve DEX'e ait, Şekil 4.64 ve Şekil 4.65'de ERLO ve DEX'e ait grafikler yer almaktadır.

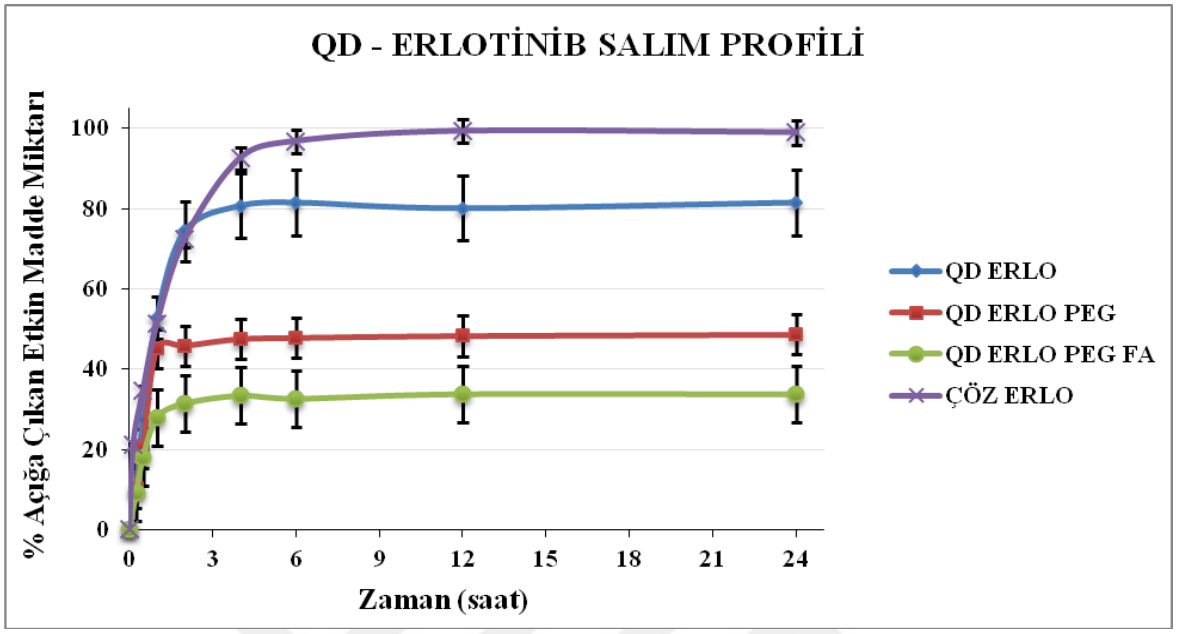


Şekil 4.62. Kuantum noktacıklarından diyaliz torbasında İMA salım profili
(Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$))

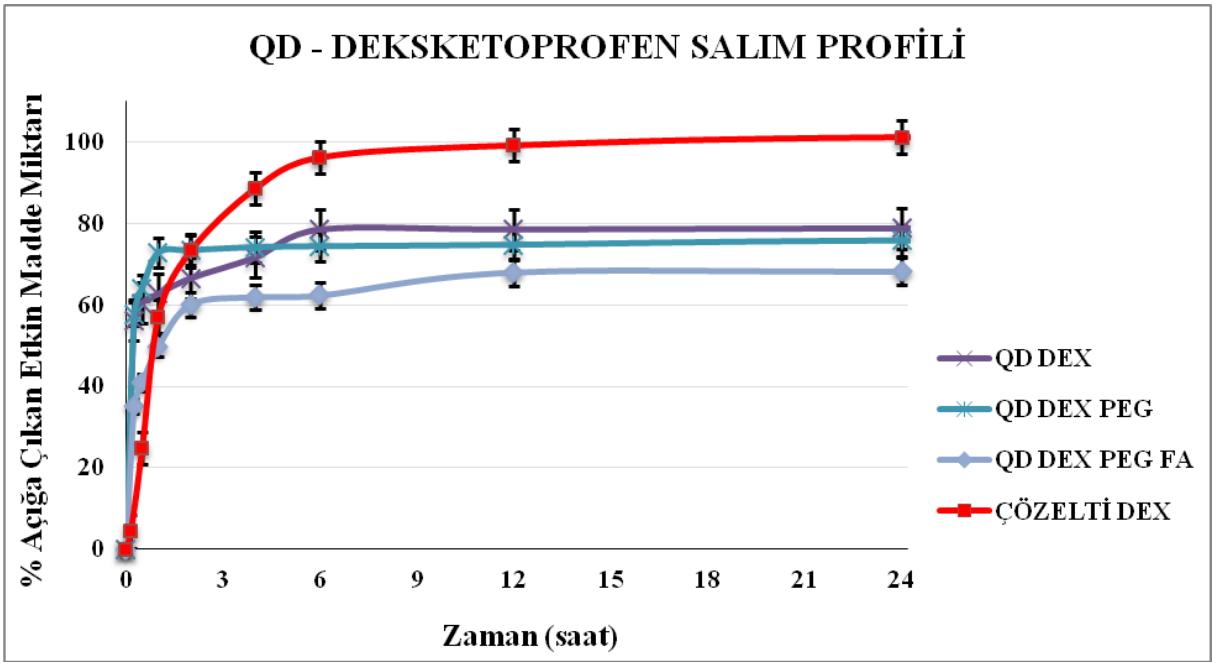


Şekil 4.63. İMA içeren kuantum noktacıklarından diyaliz torbasında DEX salım profili

(QD ile QD-PEG grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktur (p>0,05) ancak diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark vardır (p<0,001))



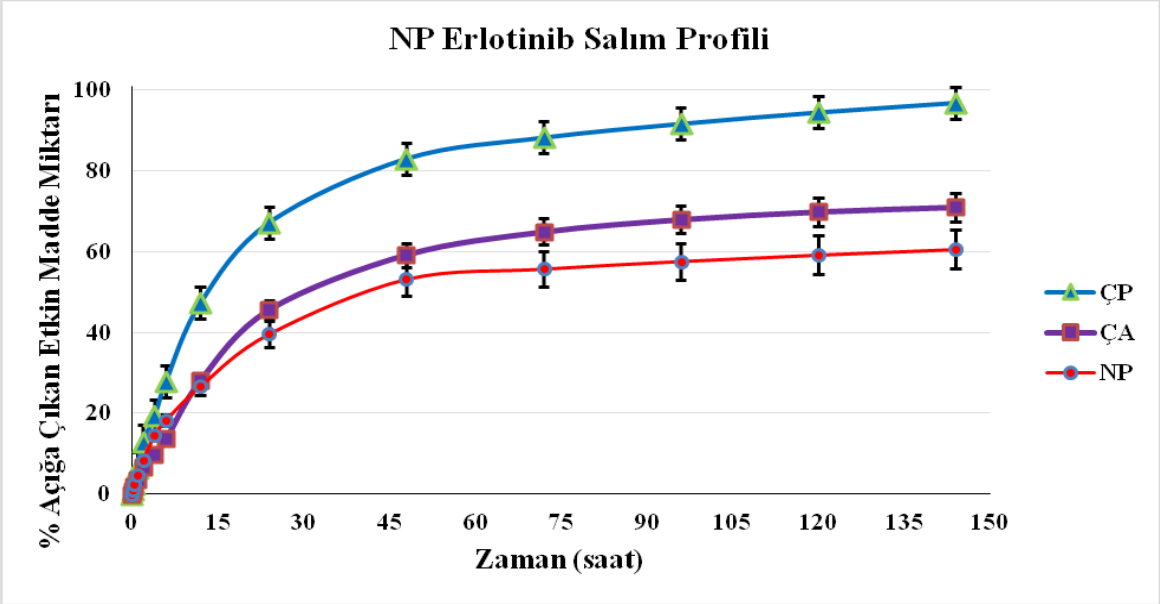
Şekil 4.64. Kuantum noktacıklarından diyaliz torbasında ERLO salım profili (Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır (p<0,001))



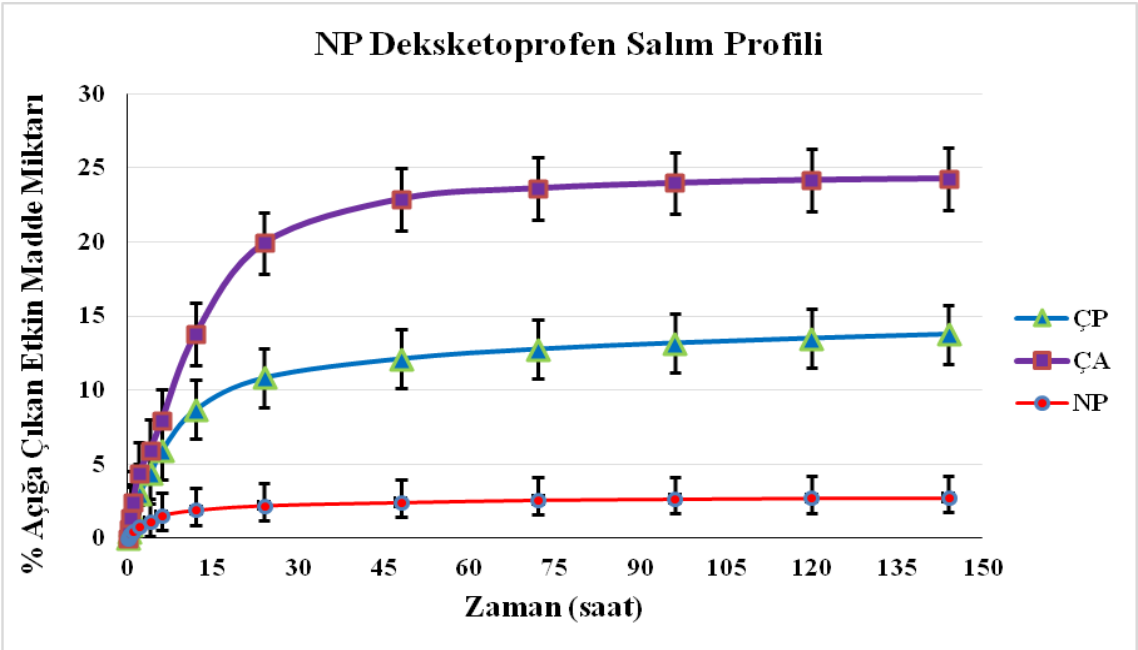
Şekil 4.65. ERLO içeren kuantum noktacıklarından diyaliz torbasında DEX salım profili (Tüm gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark vardır (p<0,001))

Nanopartiküllerden yapılan in vitro salım çalışmalarına ait bulgular

NP-ERLO-PEG-FA formülasyonu üzerinde Franz difüzyon hücrelerinden salım çalışması yapılmıştır. Formülasyonun hazırlanıp NanoSpray Dryer cihazına verilmesinden sonra elde edilen katı madde %20 alkol içerikli su ile disperse edilmiş (NP kodlu) ve karşılaştırma amacıyla hem %20 propilen glikol (PG) içerikli çözelti (ÇP kodlu) ile hem de %20 alkol içerikli çözelti (ÇA kodlu) ile kıyaslanmıştır (Şekil 4.66 ve Şekil 4.67).

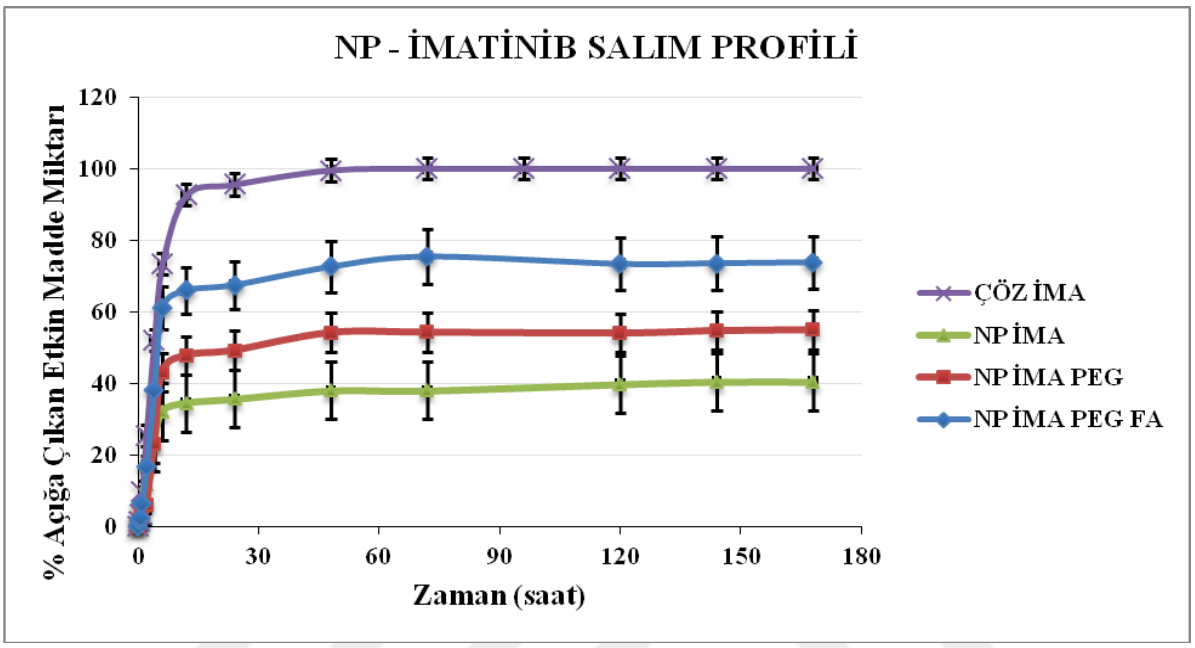


Şekil 4.66. Nanopartiküllerden Franz difüzyon hücresinde ERLO salım profili



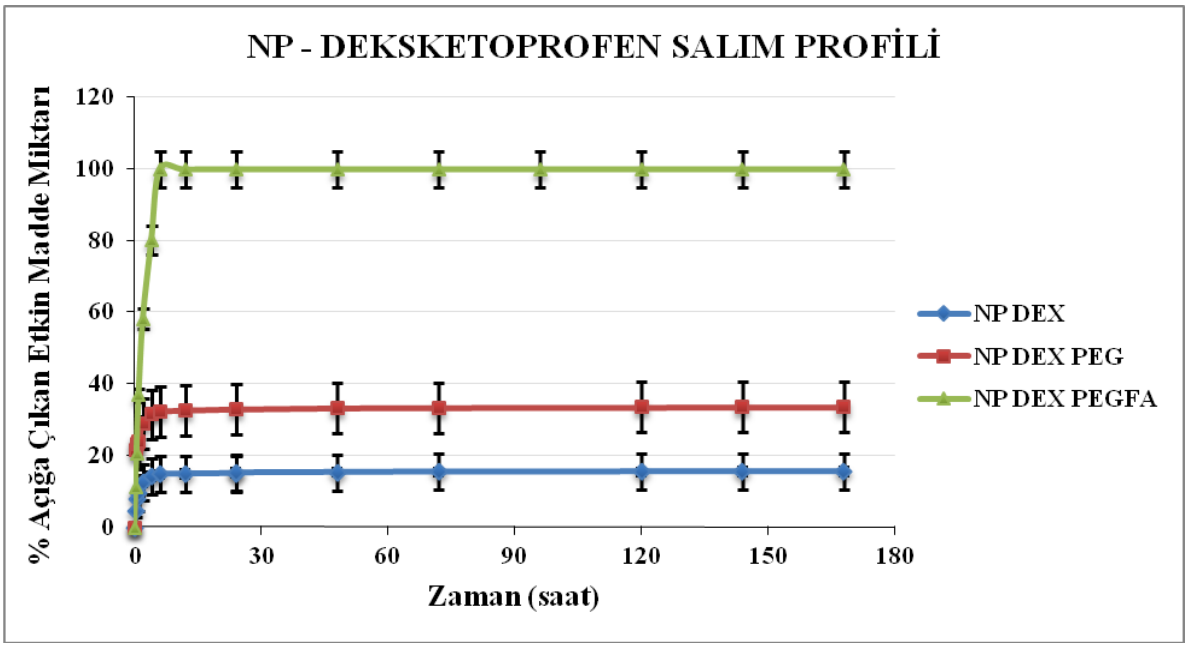
Şekil 4.67. ERLO içeren nanopartiküllerden Franz difüzyon hücresinde DEX salım profili

Hazırlanan katı haldeki formülasyonlar 1,5 mL'sinde 4,8 mg İMA, 3mg ERLO ve 0,09 mg DEX içeren miktarda distile su ile disperse edilerek diyaliz torbanın iç kısmına yerleştirilmiştir. 15. ve 30. dakikalarda, 1.,2., 4., 6., 12., 24., 48. ve 72. saatlerde 2 mL örnek alınıp yerine 37ºC'ye getirilmiş taze ortam ilave edilmiş UPLC ile miktar tayini yapılmıştır.



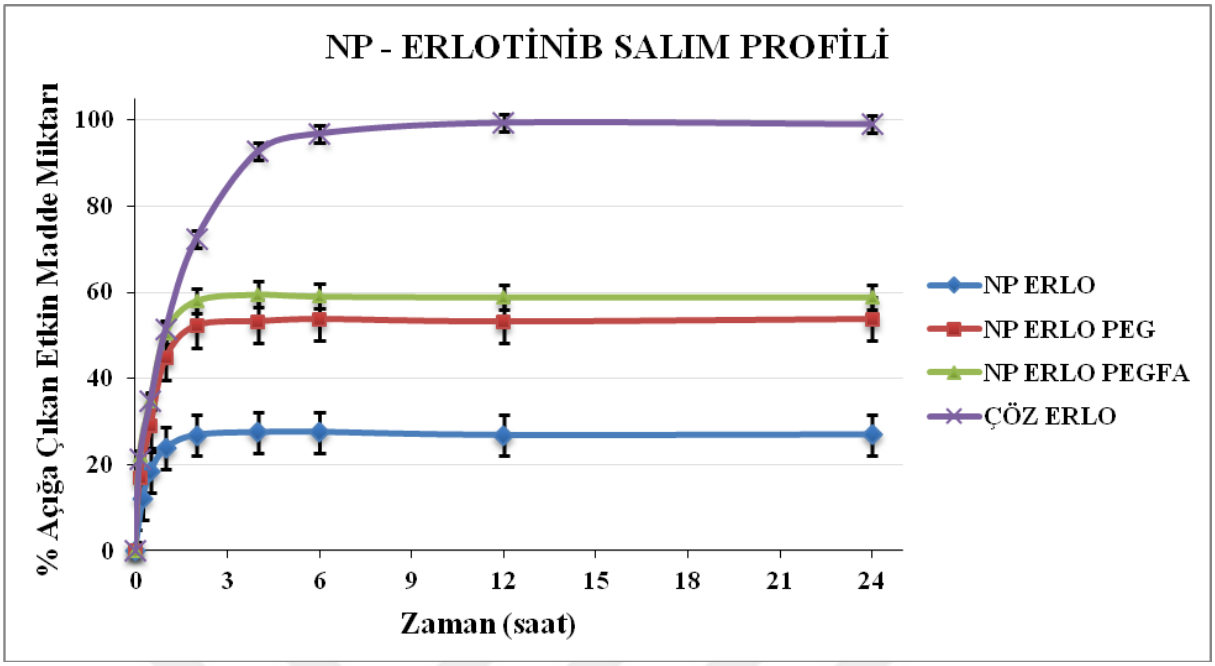
Şekil 4.68. Nanopartiküllerden diyaliz torbasında İMA salım profili

(Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$))

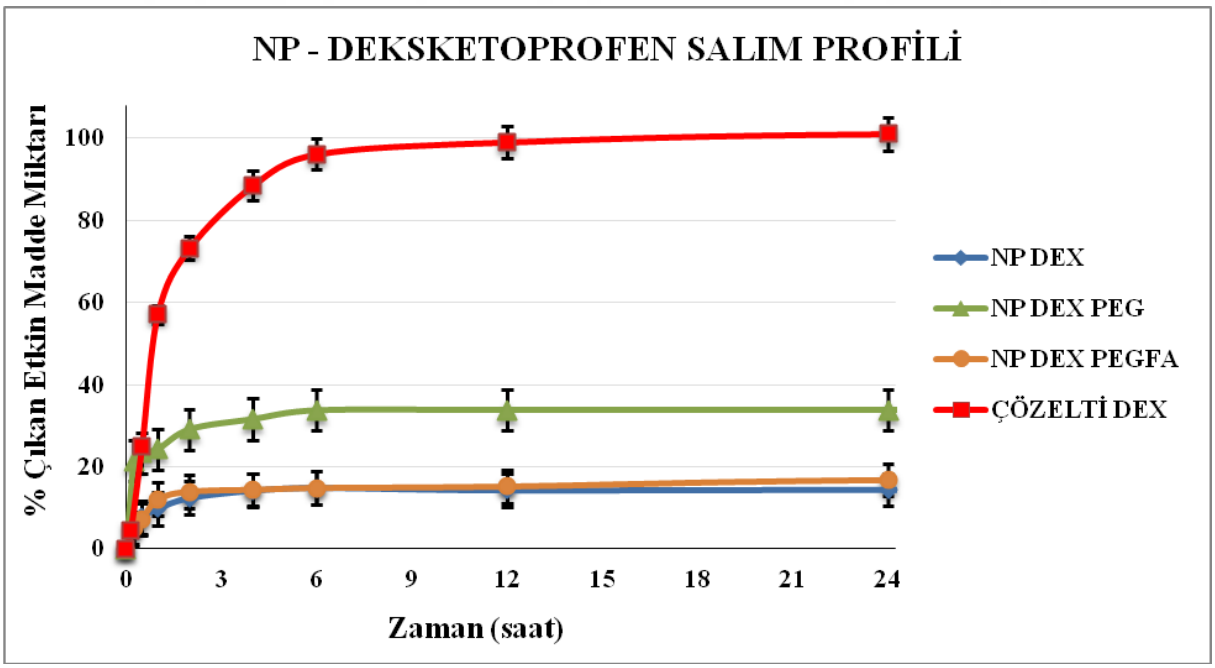


Şekil 4.69. İMA içeren nanopartiküllerden diyaliz torbasında DEX salım profili

(Çözelti ile NP-PEGFA grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$) ancak diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$))



Şekil 4.70. Nanopartiküllerden diyaliz torbasında ERLO salım profili
(Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$), ancak NP ERLO PEG ve NP ERLO PEGFA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$))



Şekil 4.71. ERLO içeren nanopartiküllerden diyaliz torbasında DEX salım profili
(Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$), ancak NP DEX ve NP DEX PEGFA grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$))

4.2.4. İn vitro salım çalışmalarına ait reaksiyon kinetikleri

İn vitro salım çalışmaları sonucunda alınan veriler değerlendirilerek formülasyonlara ait reaksiyon kinetikleri matematiksel olarak hesaplanmıştır. Reaksiyon kinetikleri; sıfırıncı derece kinetik, birinci derece kinetik, Higuchi kinetiği, Korsmayer-Peppas kinetiği ve Hixon-Crowell kinetiği açısından değerlendirilmiştir. Sıfırıncı derece kinetik için zamana karşı % açığa çıkan etkin madde miktarı; birinci derece kinetik için zamana karşı % açığa çıkan etkin madde miktarının logaritmik değeri; Higuchi kinetiği için zamanın karekköüne karşı % açığa çıkan etkin madde miktarı), Korsmayer-Peppas kinetiği için zamanın logaritmik değerine karşı % açığa çıkan etkin madde miktarının logaritmik ifadesi ve Hixon-Crowell kinetiği için zamana karşı başlangıç ilaç miktarının küpkökü değeri ile açığa çıkan etkin madde miktarı küpkök değeri farkı grafikleri çizilmiştir. Bu grafiklerden elde edilen r^2 değerleri hesaplanmış ve Çizelge 4.34'de özet şeklinde belirtilmiştir. Reaksiyon kinetiklerine ait ayrıntılı bulgular Ek-1'de yer almaktadır.

Çizelge 4.34. Formülasyonların reaksiyon kinetiklerine ait r^2 değerleri

Formülasyon Adı	Sıfırıncı Derece	Birinci Derece	Weibull	Higuchi	Korsmayer-peppas	Hixon-crowell
QD-İMA	0,830	0,788	0,903	0,947	0,904	0,814
QD-İMA-PEG	0,974	0,850	0,899	0,976	0,903	0,906
QD-İMA-PEGFA	0,902	0,738	0,963	0,977	0,948	0,807
QD-ERLO	0,945	0,766	0,764	0,944	0,952	0,833
QD-ERLO-PEG	0,800	0,689	0,646	0,895	0,902	0,708
QD-ERLO-PEGFA	0,817	0,705	0,690	0,956	0,920	0,742
NP-İMA	0,990	0,884	0,808	0,912	0,948	0,934
NP-İMA-PEG	0,961	0,961	0,849	0,815	0,940	0,989
NP-İMA-PEGFA	0,995	0,880	0,832	0,884	0,987	0,958
NP-ERLO	0,733	0,742	0,661	0,949	0,940	0,769
NP-ERLO-PEG	0,834	0,760	0,700	0,972	0,950	0,794
NP-ERLO-PEGFA	0,798	0,766	0,692	0,969	0,953	0,795

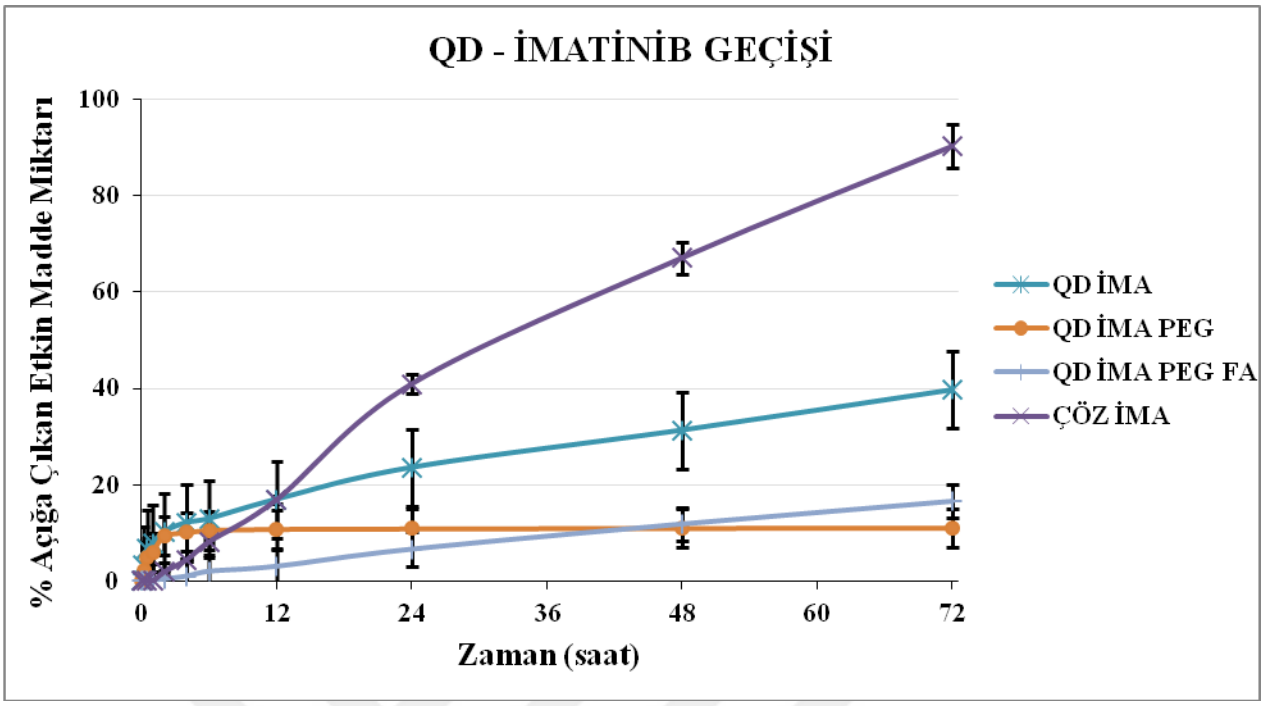
4.3. Hücre Çalışmalarına Ait Bulgular

4.3.1. Caco-2 hücrelerinden geçiş çalışmaları

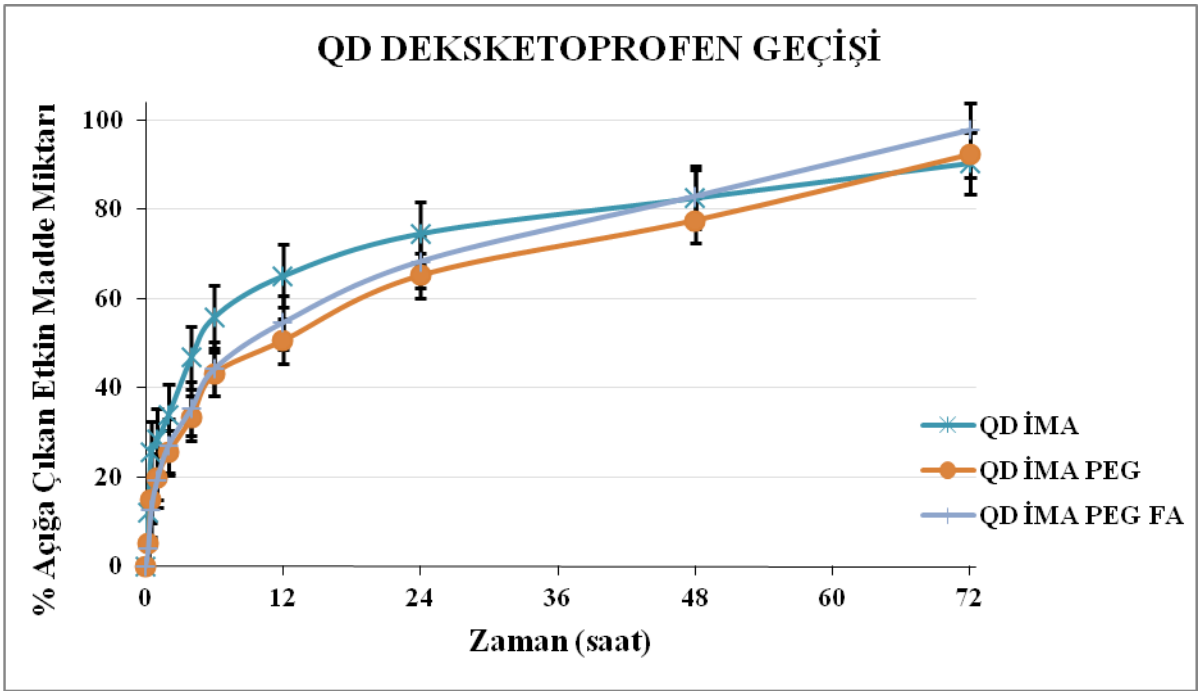
Caco-2 hücrelerinden geçiş çalışmaları; dikey difüzyon hücrelerinin apikal ve bazolateral kısımları arasına Caco-2 hücrelerinin yerleştirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Dikey difüzyon hücrelerinin apikal kısmına numune, bazolateral kısmına ise ortam ilave edilmiştir. Ortam olarak; imatinib mesilat içeren formülasyonlar için DMEM ortamı, erlotinib HCl içeren formülasyonlar için ise PG:DMEM ortamı kullanılmıştır. Belirlenen zaman aralıklarında bazolateral kısımlardan örnekler alınmış ve UPLC cihazında miktar tayini yapılarak sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar günlük yapılan kalibrasyon denkleminde yerine konularak mililitredeki miktarlar (konsantrasyon) tayin edilmiş ve bazolateral kısmın hacmi 4 mL olduğundan belirli zaman aralıklarında ortamda bulunan miktarlar bulunmuştur. Formülasyonlarda yer alan etkin maddelerin miktarları (başlangıç miktarı) belirli olduğundan (4,8 mg İMA veya 3 mg ERLO) yüzde olarak bulunmuş ve zamana karşı grafiğe geçirilmiştir. İmatinib mesilat veya erlotinib HCl içeren formülasyonlarda yardımcı etkin madde olarak deksketoprofen tremetamol bulunduğundan bu madde için elde edilen salım sonuçlarına ayrı bir grafikte yer verilmiştir.

<u>Caco-2 hücrelerinden geçiş çalışmalarında kuantum noktacıklarına ait bulgular</u>

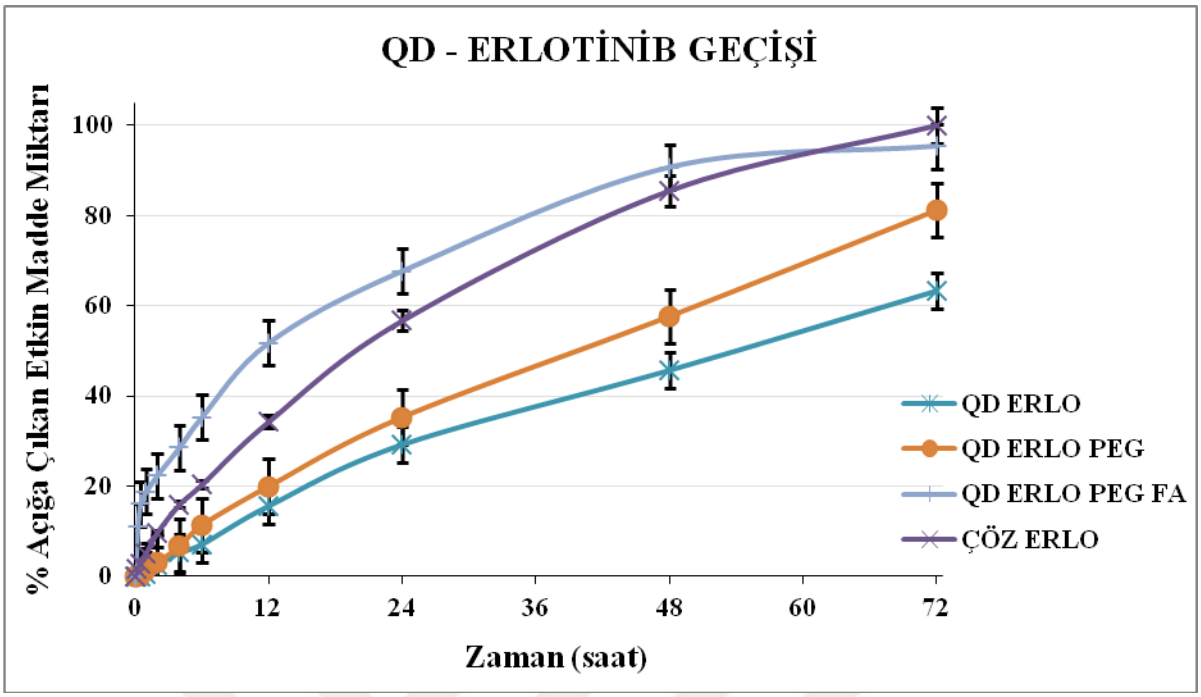
Caco-2 hücrelerinden yapılan geçiş çalışmalarına ait bulgular, ilk olarak İMA içeren formülasyonlar sonrasında ise ERLO içeren formülasyonlar olmak üzere sıralanmıştır. İMA içeren formülasyonlara da imatinib mesilat geçişi ve ardından bu formülasyonlarda yer alan deksketoprofen tremetamol geçişi olacak şekilde yer verilmiştir. Daha sonra ERLO içeren formülasyonlara yer verilmiştir. Erlotinib HCl geçişi ile ilgili grafik, ve hemen ardından bu formülasyonlarda yer alan deksketoprofen tremetamol geçişi ile ilgili grafik yer almaktadır.



Şekil 4.72. Caco-2 hücrelerinde kuantum noktacıklarından İMA geçiş profili (Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$))

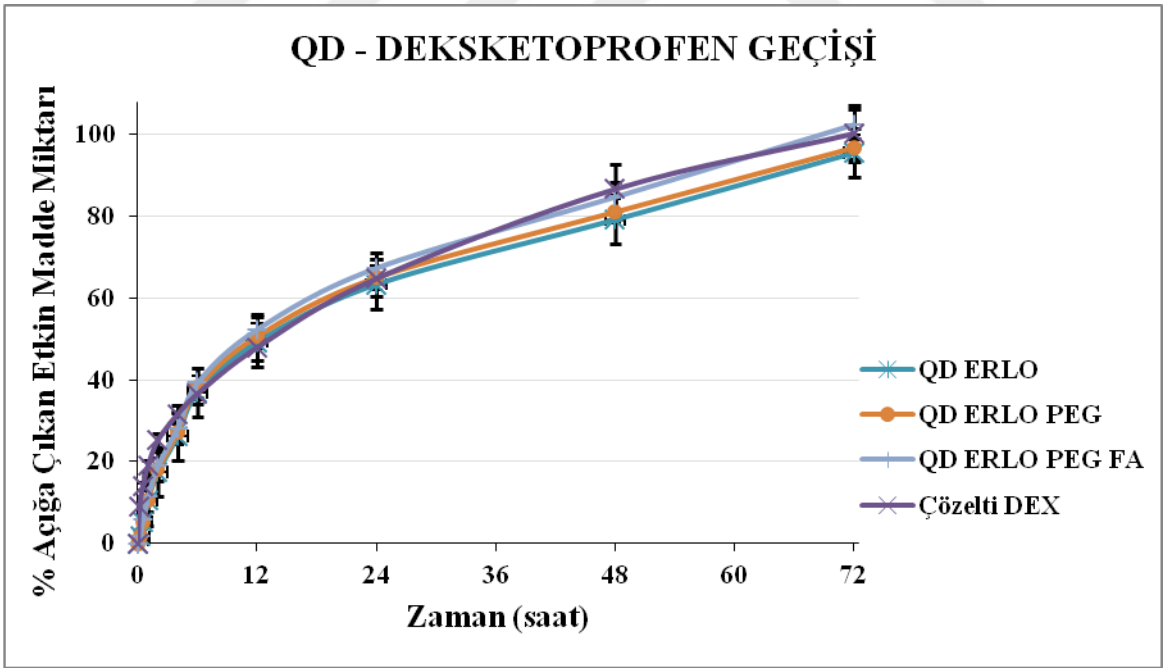


Şekil 4.73. İMA içeren Caco-2 hücrelerinde kuantum noktacıklarından DEX geçiş profili (Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$))



Şekil 4.74. Caco-2 hücrelerinde kuantum noktacıklarından ERLO geçiş profili

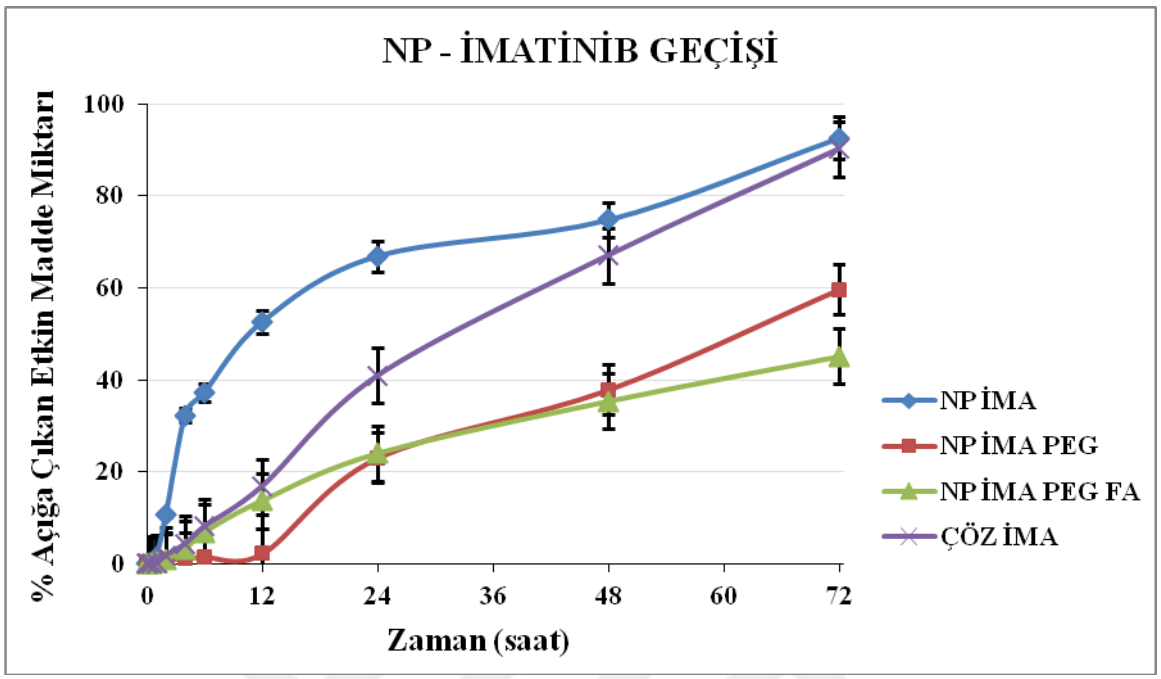
(Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$) ancak ÇÖZ ERLO ile QD ERLO PEG FA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$))



Şekil 4.75. ERLO içeren Caco-2 hücrelerinde kuantum noktacıklarından DEX geçiş profili

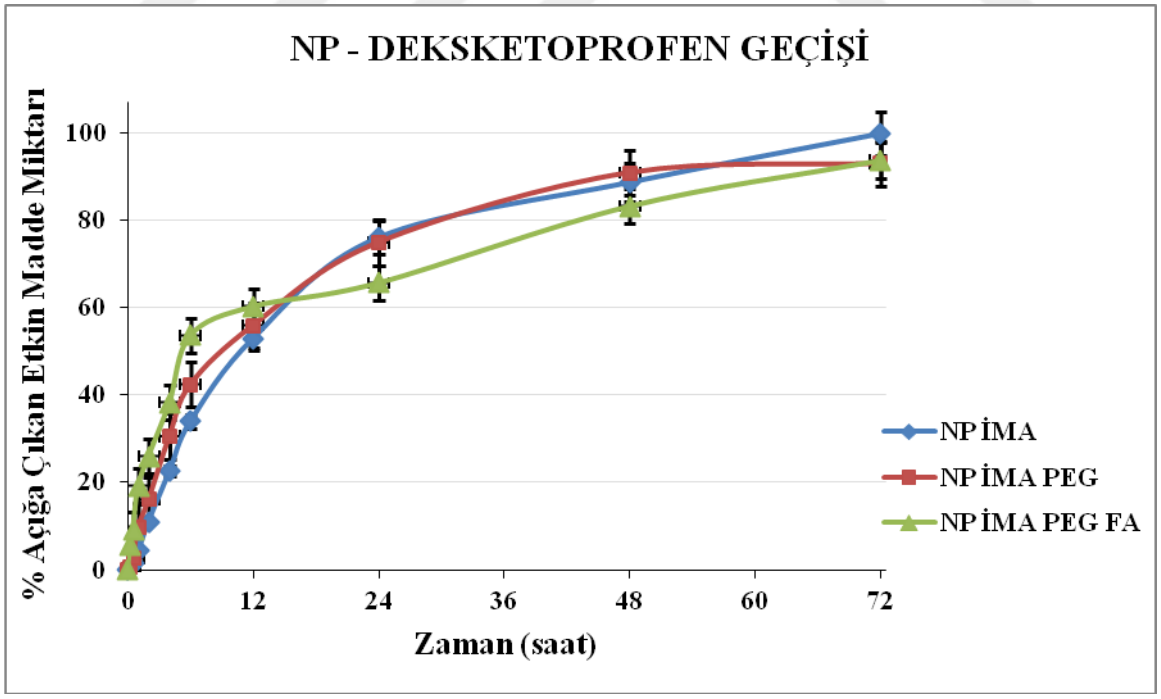
(Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$), ancak ÇÖZELTİ DEX ve QD ERLO PEGFA ile QD ERLO ve QD ERLO PEG arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$))

Caco-2 hücrelerinden geçiş çalışmalarında nanopartiküllere ait bulgular



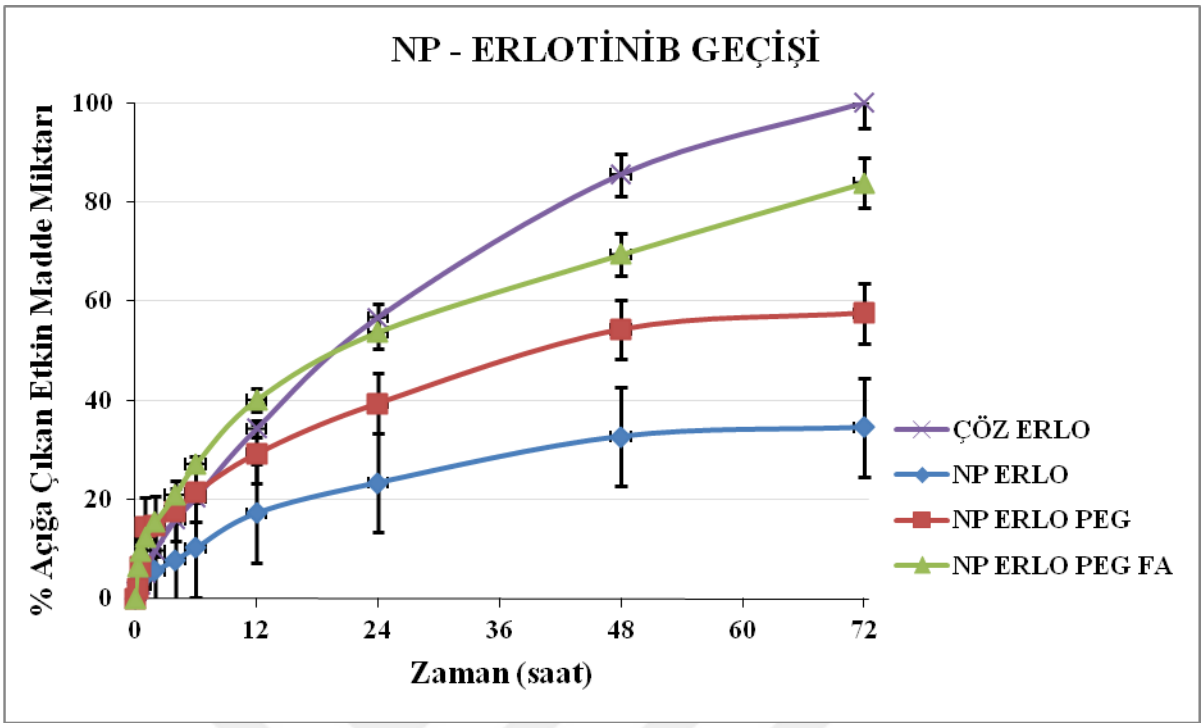
Şekil 4.76. Caco-2 hücrelerinde nanopartiküllerden İMA geçiş profili

(Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$) ancak ÇÖZ İMA ile NP İMA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$))



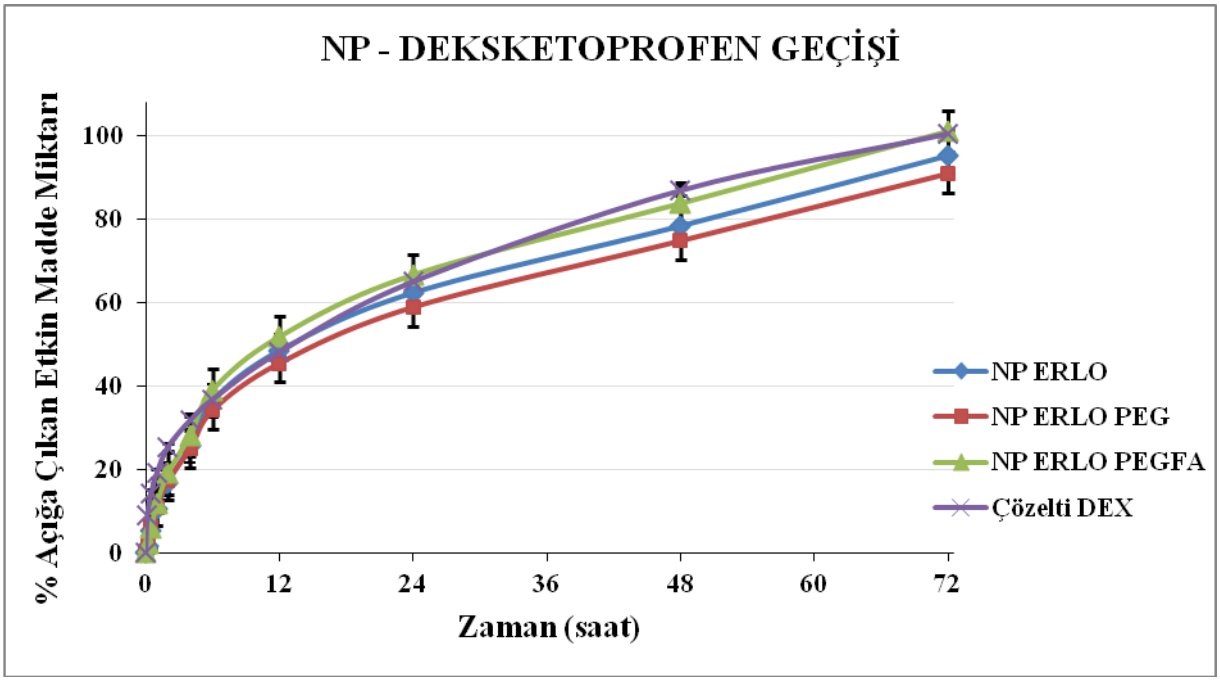
Şekil 4.77. İMA içeren Caco-2 hücrelerinde nanopartiküllerden DEX geçiş profili

(Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$) ancak NP İMA ve NP İMA PEG FA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,05$))



Şekil 4.78. Caco-2 hücrelerinde nanopartiküllerden ERLO geçiş profili

(Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$))



Şekil 4.79. ERLO içeren Caco-2 hücrelerinde nanopartiküllerden DEX geçiş profili

(Gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$), ancak ÇÖZELTİ DEX ve NPERLOPEGFA arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$))

4.3.2. Maddelerin salım ve geçiş çalışmalarına göre hesaplanan permeabilite katsayılarına ait bulgular

Permeabilite katsayısı formülasyon içerisindeki maddenin ortama geçişinin bir göstergesidir. Doz yanı sıra formülasyonların salım grafiklerinden hesaplanan eğim ve kullanılan membranın çapı permeabilite katsayısını ifade etmektedir. Daha önce belirtilen formüle göre hesaplar yapılmış, sonuçlar cm/saat olarak Çizelge 4.35'de yer verilmiştir.

Çizelge 4.35. Formülasyonlara Ait Permeabilite Katsayıları

	Formülasyon Adı	DİYALİZ MEMBRANI	Caco-2 HÜCRE MEMBRANI
İMATİNİB MESİLAT İÇİN PERMEABİLİTE KATSAYISI	Çözelti ima	0,169	0,483
	QD ima	3,427	160,322
	QD ima peg	3,424	130,664
	QD ima peg fa	1,447	3,139
	NP ima	6,158	34,115
	NP ima peg	5,645	15,543
	NP ima peg fa	9,882	5,291
ERLOTİNİB HCl İÇİN PERMEABİLİTE KATSAYISI	Çözelti erlo	0,185	0,160
	QD erlo	8,664	30,129
	QD erlo peg	7,261	30,966
	QD erlo peg fa	4,427	33,352
	NP erlo	5,880	2,363
	NP erlo peg	8,629	28,108
	NP erlo peg fa	6,535	36,563
DEKSKETOPROFEN İÇİN PERMEABİLİTE KATSAYISI	Çözelti ima	0,561	0,480
	QD ima	10,996	113,464
	QD ima peg	11,295	87,472
	QD ima peg fa	8,470	98,408
	NP ima	10,718	68,165
	NP ima peg	31,157	91,055
	NP ima peg fa	22,647	106,814
	Çözelti erlo	0,670	3,758
	QD erlo	8,083	126,273
	QD erlo peg	8,577	129,036
	QD erlo peg fa	1,452	137,349
	NP erlo	10,242	10,210
	NP erlo peg	31,311	15,513
	NP erlo peg fa	7,689	136,096

4.3.3. Hücre bütünlüklerinin değerlendirilmesine yönelik bulgular

Caco-2 hücreleri ile yapılan deneylerde, bir hücre grubu ile hiç çalışılmamış olup kontrol grubu olarak bırakılmıştır. Bu hücreler, hücrelerin yalnızca ortam koşullarından etkilenmelerinin değerlendirilmesi amacı ile deney süresince deney koşullarında bekletilmişlerdir. Diğer hücreler ile geçiş çalışmaları sürdürülmüştür. Caco-2 hücreleri ile yapılan geçiş çalışmaları bitiminde, formülasyon uygulanan hücreler dikey difüzyon hücrelerinden dikkatlice çıkarılmıştır. Alınan Caco-2 hücreleri; içeriğinde yer alan etkin maddeye göre DMEM veya DMEM:PG ortamı içerisine 6 kuyucuklu hücre tablası içerisine yerleştirilmiştir. İMA içerikli formülasyonlar, deney koşulları DMEM ortamında sürdürüldüğü için DMEM ortamına ve ERLO içerikli formülasyonlar da, deney koşulları DMEM:PG ortamında sürdürüldüğü için DMEM:PG ortamına alınmıştır. Bu hücreler yanı sıra kontrol grubunun da hücre bütünlüğü ölçülmüştür. Sonuçlar ohm cinsinden yer olmakta olup hücrelerin deney süresince canlı kalıp kalmadığını yansıtmaktadır.

Çizelge 4.36. Caco-2 Hücre Bütünlüklerinin Değerlendirilmesinde TEER Ölçüm Sonuçları

Numune Adı	**Hücre Bütünlüğü Ölçüm Sonucu (ohm)**	**p değeri**	**Numune Adı**	**Hücre Bütünlüğü Ölçüm Sonucu (ohm)**	**p değeri**
Caco-2 Hücresi	43	-	Caco-2 Hücresi	307	-
İmatinib Çözelti	69	>0,05	Erlotinib Çözelti	320	>0,05
QD ima	40	>0,05	QD erlo	350	>0,05
QD ima peg	36	>0,05	QD erlo peg	400	>0,05
QD ima pegfa	80	>0,05	QD erlo pegfa	383	>0,05
NP ima	93	>0,05	NP erlo	221	>0,05
NP ima peg	63	>0,05	NP erlo peg	333	>0,05
NP ima pegfa	86	>0,05	NP erlo pegfa	415	>0,05

Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (p>0,05)

4.3.4. Hücreler üzerinde antitümöral aktivitenin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

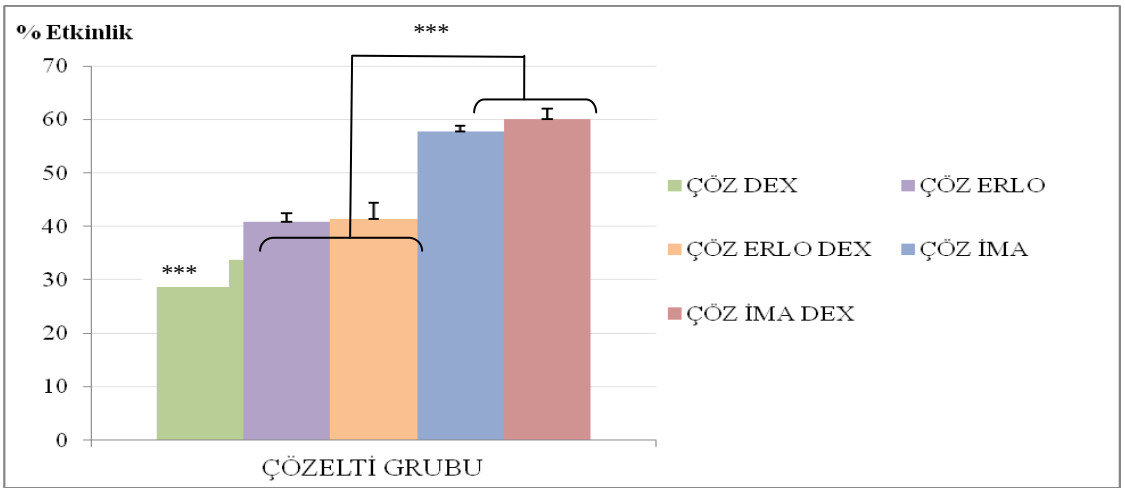
Antitümöral aktivite tayini MTT yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan hücre hattı ise WEHI adlı fibrosarkoma hücreleridir. Çalışmada hücrelerin antikanserojen ajanlara verdikleri cevap değerlendirilmiştir. Fibrosarkoma hücreleri üzerine formülasyonlar eklenmiş, 3 gün inkübe edildikten sonra 540 nm'de okuma yapılmıştır. Sonuçlar hücre kontrol grubunun canlılığı %100 kabul edilerek, yüzde üzerinden hücrelerin canlılığı hesaplanmıştır. Bu şekilde bulunan değerler ise 100 değerinden çıkarılarak formülasyonların % etkinliği bulunmuş ve % etkinlik cinsinden formülasyon bazında çizelge ve grafik halinde verilmiştir.

İMA, ERLO ve DEX'e ait çözeltilerin yanı sıra İMA ile DEX ve ERLO ile DEX'in karışım halindeki çözeltileri de fibrosarkoma hücreleri üzerine uygulanmıştır. Bu çözelti ve çözelti karışımlarına ait yüzde antitümöral etkinlik değerleri Çizelge 4.37'de verilmiştir.

Çizelge 4.37. Fibrosarkomalı hücreler üzerine çözeltilerin antitümöral etkinlik yüzdeleri

ÇÖZELTİ GRUBU				
ÇÖZ-ERLO	**ÇÖZ-DEXERLO**	**ÇÖZ-DEX**	**ÇÖZ-İMA**	**ÇÖZ-DEXİMA**
40,917	41,399	32,348	57,811	59,994

Çözelti grubuna ait grafik Şekil 4.80'de yer almaktadır.

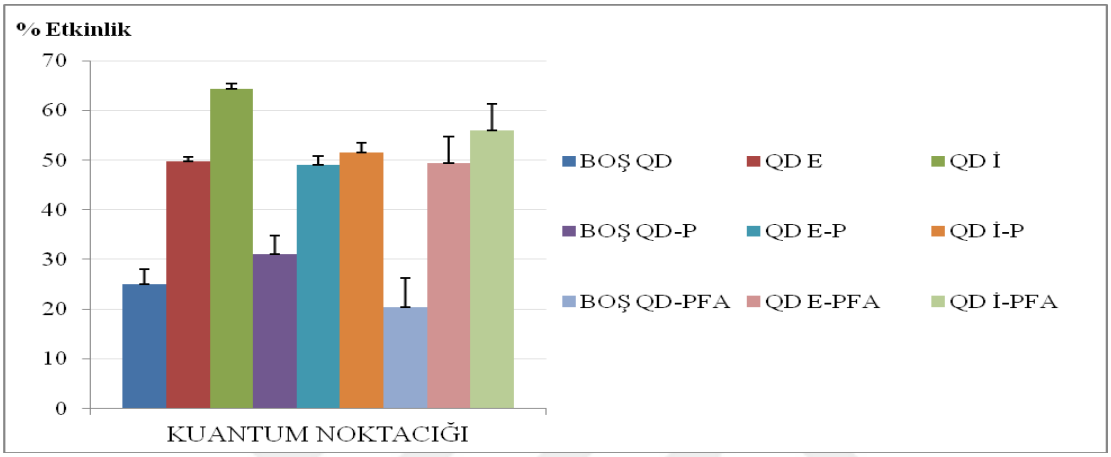


Şekil 4.80. Fibrosarkomalı hücreler üzerine çözeltilerin etkisi

(Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$)(***) ancak ÇÖZ ERLO ve ÇÖZ ERLO DEX ile ÇÖZ İMA ve ÇÖZ İMA DEX arasında anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$))

Çizelge 4.38. Fibrosarkomalı hücreler üzerine kuantum noktacıklarının antitümöral etkinlik yüzdeleri

QD-ERLO	QD-ERLO-PEG	QD-ERLO-PEGFA
51,403	49,066	54,096
QD-İMA	**QD-İMA-PEG**	**QD-İMA-PEGFA**
64,382	51,509	53,968
BOŞ-QD	**BOŞ-QD-PEG**	**BOŞ-QD-PEGFA**
24,941	31,026	20,274

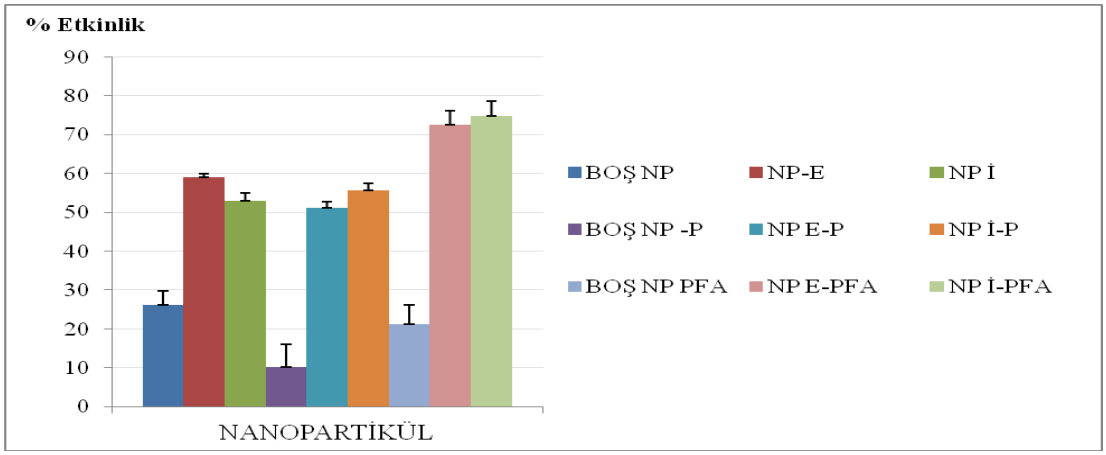


Şekil 4.81. Fibrosarkomalı hücreler üzerine kuantum noktacıklarının etkisi

(BOŞ gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$), diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$))

Çizelge 4.39. Fibrosarkomalı hücreler üzerine nanopartiküllerin antitümöral etkinlik yüzdeleri

NP-ERLO	NP-ERLO-PEG	NP-ERLO-PEGFA
58,928	51,112	72,550
NP-İMA	**NP-İMA-PEG**	**NP-İMA-PEGFA**
52,945	55,585	74,745
BOŞ-NP	**BOŞ-NP-PEG**	**BOŞ-NP-PEGFA**
26,157	10,241	21,242



Şekil 4.82. Fibrosarkomalı hücreler üzerine nanopartiküllerin etkisi

(BOŞ NP ve BOŞ NP-PFA ve BOŞ NP-P ve BOŞ NP-PFA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$), diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$))

4.4. Deney Hayvanı Çalışmalarına Ait Bulgular

Bu başlık altında ilk olarak sağlıklı Balb-C tipi deney hayvanları üzerinde, farmakokinetik parametrelerin hesaplanmasına yönelik olarak gerçekleştirilen çalışmalara ait bulgulara yer verilmiştir. Sonrasında ise; hazırlanan formülasyonların fibrosarkoma oluşturulmuş deney hayvanları üzerindeki antitümöral etkinliklerinin değerlendirilmesi için yapılan çalışma sonuçları yer almaktadır. Antitümöral etkinlik ise;

- deney hayvanlarında oluşturulmuş fibrosarkomanın ölçülmesi,
- hayvanların sakrifiye edilmesi sonrasında çıkarılmış tümör bölgesinin histopatolojik olarak incelenmesi
- tümör bölgesi üzerinde gerçekleşen enzimsel aktivitelerin enzim kitleri kullanılarak incelenmesi

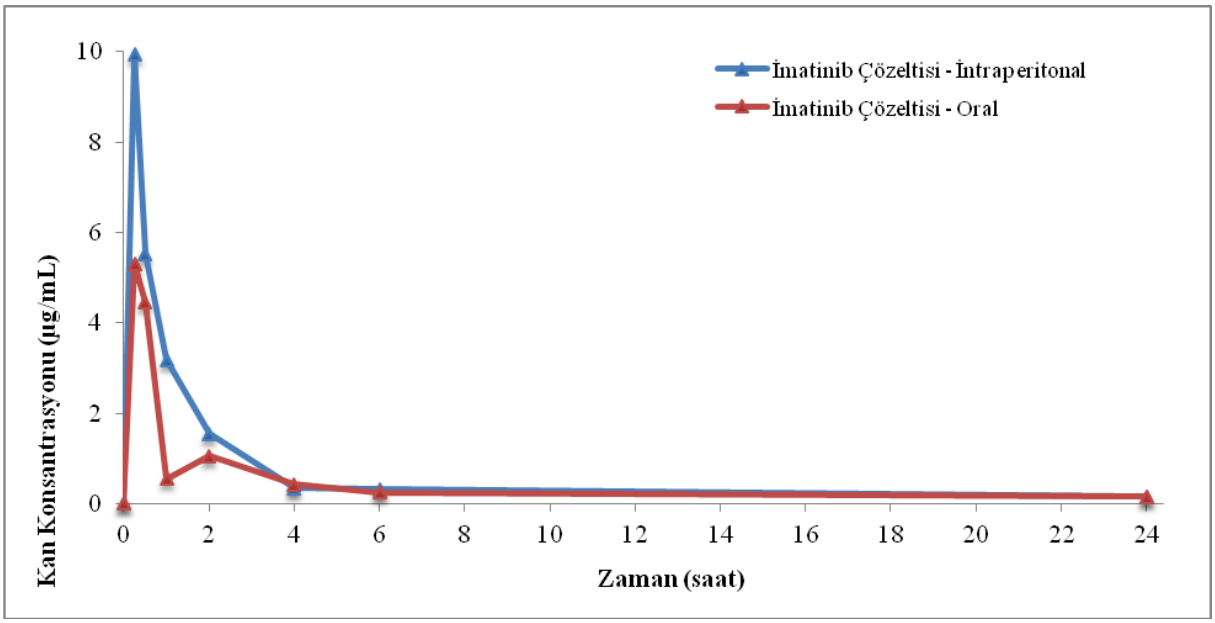
olmak üzere üç farklı açıdan değerlendirilmektedir. Ayrıca, verilen ilaçların vücutta dağılımının incelenmesi ve dokularda tutulumunun aydınlatılması amacı ile hayvanlar sakrifiye edildikten sonra dalak, akciğer, karaciğer ve tümör dokuları çıkarılmış ve bunlarda etkin madde tayinleri yapılarak değelendirilmiştir.

4.4.1. İlaçların farmakokinetik parametlerinin hesaplanması

Deksketoprofen tremetamol içeren imatinib mesilat ve erlotinib hidrokorür etkin maddelerini içeren çözeltiler hem intraperitonal hem de oral yolla uygulanmıştır. Formülasyonlar ise yalnızca oral yol ile deney hayvanlarına uygulanmıştır. Belirli zaman aralıklarında hayvanlardan kan alınmış ve alınan kanlar UPLC ile analiz edilmiştir. Elde edilen konsantrasyon değerleri Kinetica 5.0 programına girilmiş, zamana karşı kan konsantrasyonu grafikleri çizilmiştir. Bu grafiklerden yararlanılarak bazı farmakokinetik parametreler hesaplanmıştır. Kan konsantrasyonu-zaman grafiğinde en yüksek kan konsantrasyonu değeri C_{max}, C_{max}'a ulaşılan süre t_{max} olarak kısaltılmış ve tablolarda bu şekilde yer verilmiştir. Kan konsantrasyonu-zaman grafiği altında kalan alan (AUC) değeri yanı sıra verilen ilacın yarılanma ömrü ve vücutta kaldığı süre (ortalama yaşam ömrü) değerleri de hesaplanmıştır.

İmatinib mesilat yüklü ilaçların farmakokinetik parametlerinin hesaplanması

Her bir grupta 5 hayvan olacak şekilde, sağlıklı Balb-C tipi deney hayvanları gruplara ayrılmıştır. İMA ve DEX içeren etkin madde çözeltileri hem intraperitonal yol ile hem de oral yol ile uygulanmış ilaç uygulaması sonrasında belirli zaman aralıklarında hayvanlardan kan alınmıştır. Alınan kanlarda İMA tayini yapılmıştır. Elde edilen veriler ile kan konsantrasyonları-zaman grafikleri çizilmiştir. İMA ve DEX içeren çözeltilerin intraperitonal ve oral yol ile uygulamalarına ait grafikler Şekil 4.83'de yer almaktadır.



Şekil 4.83. İmatinib mesilat ve deksketoprofen maddelerinin çözelti halinde intraperitonal uygulama ile verildikten sonraki kan konsantrasyonu-zaman grafiği

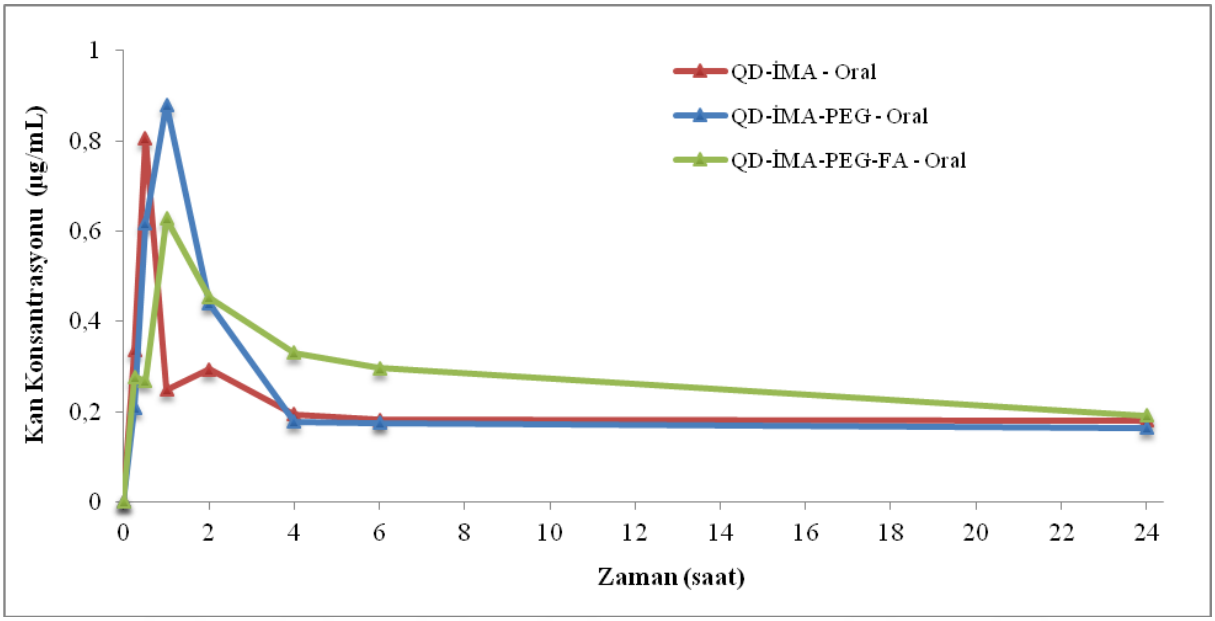
Hesaplanan farmakokinetik parametreler Çizelge 4.40'da yer almaktadır.

Çizelge 4.40. İMA ve DEX maddelerinin çözelti hallerine ait farmakokinetik parametreler

Farmakokinetik Parametre	İP	Oral
C_{max}	9,944	5,314
t_{max}	0,25	0,25
AUC_{last}	13,955	9,524
Yarılanma ömrü	17,28	10,81
Ortalama yaşam süresi	14,75	12,83

Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$))

Kuantum noktacıkları ile hazırlanan İMA ve DEX içeren üç farklı formülasyon çözelti halinde oral yol ile deney hayvanlarına uygulanmıştır. Uygulama sonrasında belirli zaman aralıklarında deney hayvanlarından kan alınarak QD-İMA, QD-İMA-PEG ve QD-İMA-PEG-FA kodlu formülasyonlar için kan konsantrasyonu-zaman grafikleri çizilmiştir. Bu grafikler Şekil 4.84'de yer almaktadır.



Şekil 4.84. İMA ve DEX içeren kuantum noktacıklarına ait kan konsantrasyonu-zaman grafiği

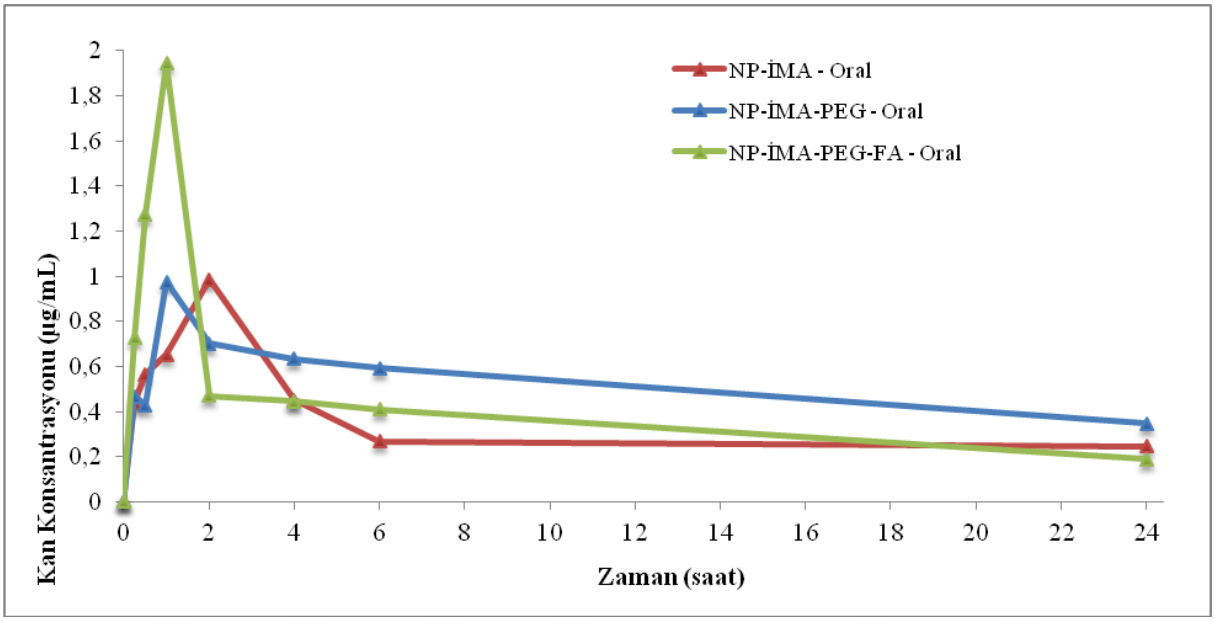
Grafikten yararlanılarak hesaplanan parametreler Çizelge 4.41'de yer almaktadır.

Çizelge 4.41. İMA ve DEX içeren kuantum noktacıklarına ait farmakokinetik parametreler

Farmakokinetik Parametre	QD-İMA	QD-İMA-PEG	QD-İMA-PEGFA
C_{max}	0,806	0,880	0,628
t_{max}	0,5	1	1
AUC_{last}	4,802	5,12	6,586
Yarılanma ömrü	49,77	172,5	26,39
Ortalama yaşam süresi	71,94	243,47	37,48

(Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$))

İMA ve DEX içeren NP-İMA, NP-İMA-PEG ve NP-İMA-PEG-FA kodlu nanopartikül formülasyonları çözelti halinde oral yol ile deney hayvanlarına uygulanmıştır. Uygulama sonrasında belirli zaman aralıklarında deney hayvanlarından alınan kanlarda İMA miktar tayini yapılmış ve kan konsantrasyonu-zaman grafikleri çizilmiştir. Bu grafikler Şekil 4.85'de yer almaktadır.



Şekil 4.85. İMA ve DEX içeren nanopartiküllere ait kan konsantrasyonu-zaman grafiği

Grafikten yararlanılarak hesaplanan parametreler Çizelge 4.42'de yer almaktadır.

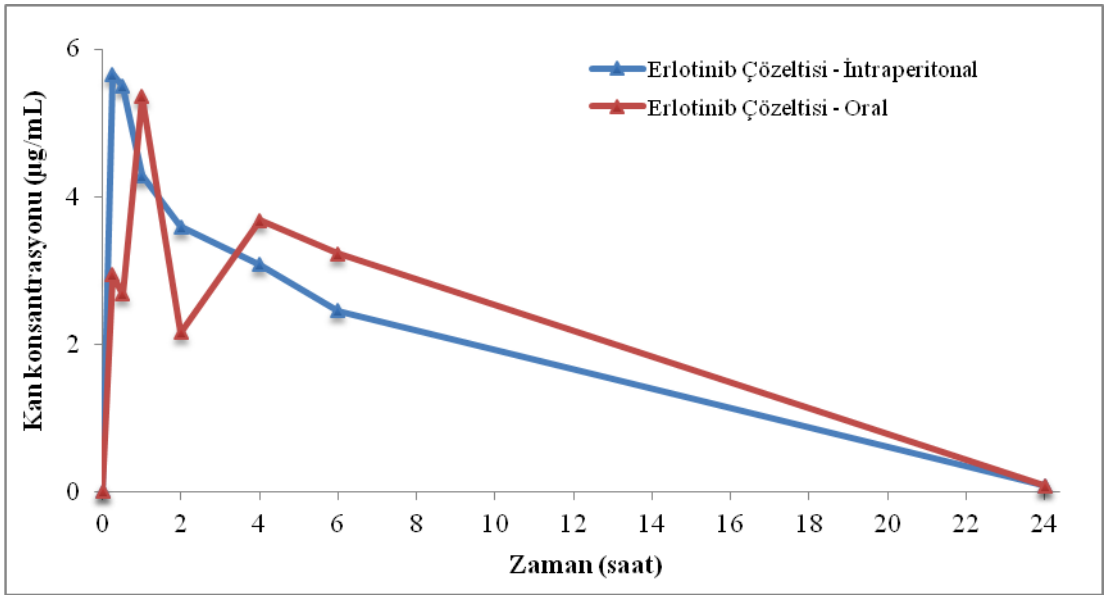
Çizelge 4.42. İMA ve DEX içeren nanopartiküllere ait farmakokinetik parametreler

Farmakokinetik Parametre	NP-İMA	NP-İMA-PEG	NP-İMA-PEGFA
C_{max}	0,986	0,974	1,944
t_{max}	2	1	1
AUC_{last}	8,017	12,167	9,078
Yarılanma ömrü	16,52	23,08	16,18
Ortalama yaşam süresi	24,84	33,33	21,43

Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$)

Erlotinib HCl yüklü ilaçların farmakokinetik parametlerinin hesaplanması

Sağlıklı Balb-C tipi deney hayvanları, her bir grupta 5 hayvan olacak şekilde gruplara ayrılmıştır. ERLO ve DEX içeren etkin madde çözeltileri hem intraperitonal yol ile hem de oral yol ile uygulanmıştır. İlaç uygulaması sonrasında belirli zaman aralıklarında alınan kanlarda erlotinib HCl tayini yapılmıştır. Elde edilen veriler ile kan konsantrasyonları-zaman grafikleri çizilmiştir. ERLO ve DEX içeren çözeltilerin intraperitonal ve oral yol ile uygulamalarına ait grafikler Şekil 4.86'da yer almaktadır.



Şekil 4.86. ERLO ve DEX maddelerinin çözelti halinde intraperitonal uygulama veya oral yol ile verildikten sonraki kan konsantrasyonu-zaman grafiği

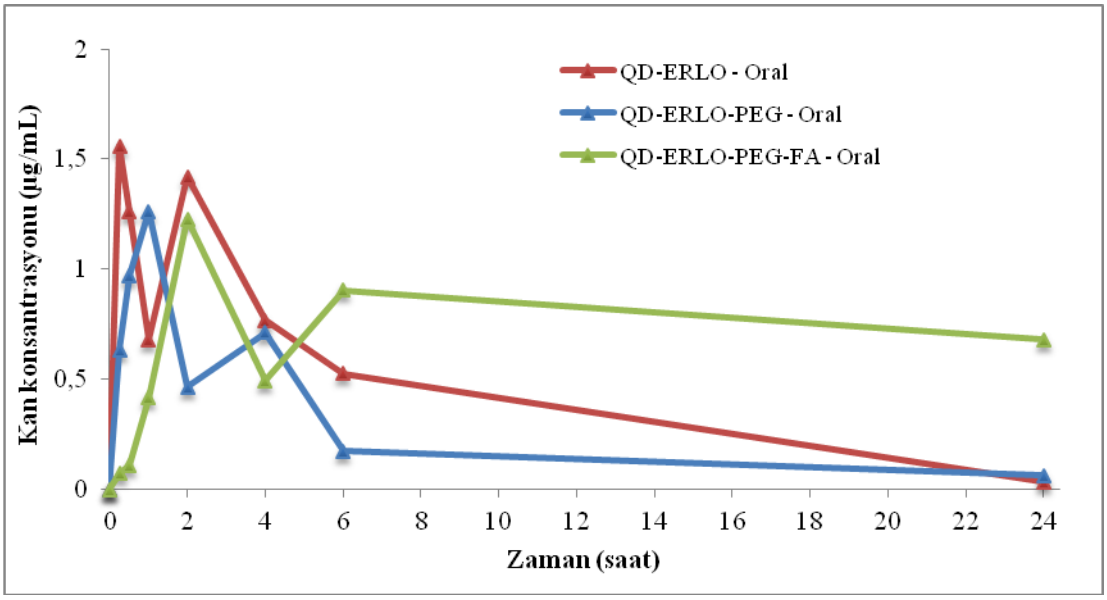
Bu grafiklerden yararlanılarak belirli farmakokinetik parametreler hesaplanmıştır. Çizelge 4.43'de intraperitonal (ip) ve oral yol ile uygulama sonrası hesaplanan farmakokinetik parametreler yer almaktadır.

Çizelge 4.43. ERLO ve DEX maddelerinin çözelti hallerine ait farmakokinetik parametreler

Farmakokinetik Parametre	İP	Oral
C_{max}	5,653	5,353
t_{max}	0,25	1,00
AUC_{last}	35,557	34,315
Yarılanma ömrü	3,46	3,45
Ortalama yaşam süresi	5,71	6,53

(Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$))

Kuantum noktacıkları ile hazırlanan ERLO ve DEX içeren üç farklı formülasyon çözelti halinde oral yol ile deney hayvanlarına uygulanmıştır. Uygulama sonrasında belirli zaman aralıklarında deney hayvanlarından kan alınmış, alınan kanlarda erlotinib HCl tayini yapılmıştır. Elde edilen veriler ile kan konsantrasyonları-zaman grafikleri çizilmiştir. QD-ERLO, QD-ERLO-PEG ve QD-ERLO-PEG-FA kodlu formülasyonlara ait kan konsantrasyonları-zaman grafikleri Şekil 4.87'de yer almaktadır.



Şekil 4.87. ERLO ve DEX içeren kuantum noktacıklarına ait kan konsantrasyonu-zaman grafiği

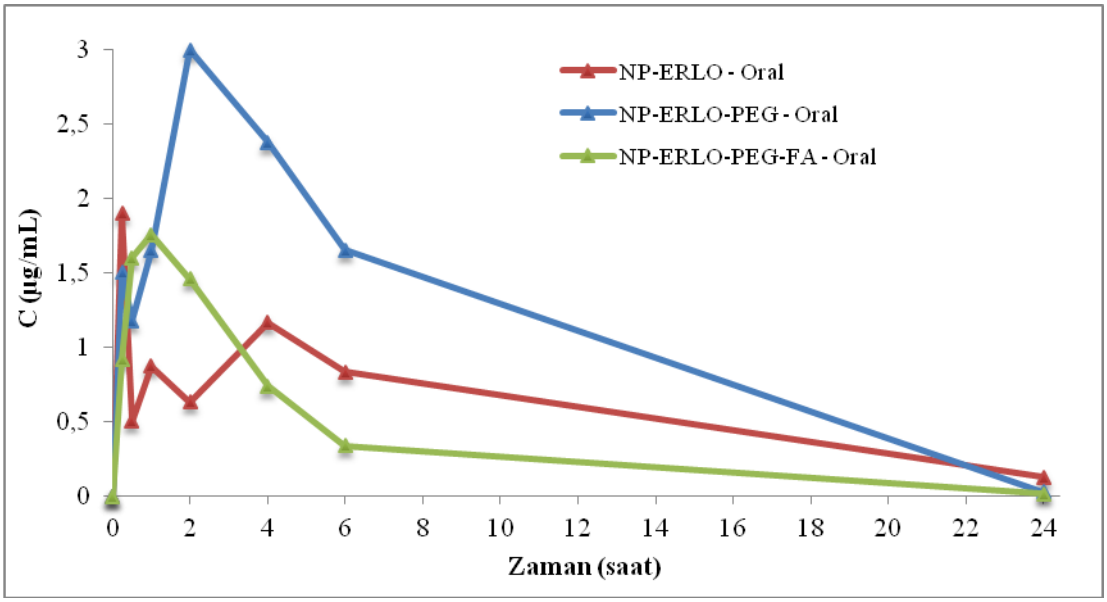
Bu grafiklerden yararlanılarak hesaplanan farmakokinetik parametrelere Çizelge 4.44'de yer verilmiştir.

Çizelge 4.44. ERLO ve DEX içeren kuantum noktacıklarına ait farmakokinetik parametreler

Farmakokinetik Parametre	QD-ERLO	QD-ERLO-PEG	QD-ERLO-PEG-FA
C_{max}	1,560	1,262	1,228
t_{max}	0,25	1,00	2,00
AUC_{last}	8,725	5,533	18,163
Yarılanma ömrü	4,55	6,24	62,62
Ortalama yaşam süresi	6,57	8,54	80,54

(QD ile QD-PEG grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$) ancak diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$)(***))

Nanopartikül taşıyıcı sistemleri içerisinde ERLO ve DEX yüklü olacak şekilde hazırlanmış NP-ERLO, NP-ERLO-PEG ve NP-ERLO-PEG-FA kodlu üç farklı formülasyon çözelti halinde oral yol ile deney hayvanlarına uygulanmıştır. Uygulama sonrasında belirli zaman aralıklarında deney hayvanlarından kan alınarak erlotinib HCl tayini yapılmıştır. Elde edilen veriler aracılığı ile çizilen kan konsantrasyonları-zaman grafiklerine Şekil 4.88'de yer verilmiştir.



Şekil 4.88. ERLO ve DEX içeren nanopartiküllere ait kan konsantrasyonu-zaman grafiği

Hesaplanan farmakokinetik parametreler Çizelge 4.45'de yer almaktadır.

Çizelge 4.45. ERLO ve DEX içeren nanopartiküllere ait farmakokinetik parametreler

Farmakokinetik Parametre	NP-ERLO	NP-ERLO-PEG	NP-ERLO-PEG-FA
C_{max}	1,898	2,994	1,757
t_{max}	0,25	2,00	1,00
AUC_{last}	12,153	20,16	8,029
Yarılanma ömrü	6,40	3,14	3,98
Ortalama yaşam süresi	10,49	5,80	4,91

(NP ile NP-PEGFA grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$) ancak diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$))

4.4.2. Antikanser etkinliğin incelenmesine yönelik bulgular

Antitümöral etkinlik başlığı altında; deney hayvanlarında oluşturulmuş tümörün kumpas yardımı ile ölçülmesi, hayvanların sakrifiye edilmesi sonrasında çıkarılmış tümör bölgesinin histopatolojik olarak incelenmesi, tümör bölgesi üzerinde gerçekleşen enzimsel aktivitelerin enzim kitleri kullanılarak incelenmesi ve deney hayvanlarında doku dağılımlarının incelenmesine ait bulgulara yer verilmiştir.

Deney hayvanlarında tümör geliştirildikten sonra tartılarak tümörlü hayvanların ağırlıkları bulunmuş ve kumpas yardımı ile tümör çapları ölçülmüştür. Tedaviye başlanan hayvanlar tedavi ortasında yani 7. gününde tekrar ağırlıkları bulunmuş ve tümör boyutları ölçülmüştür. 2 haftalık tedavi sonrasında hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Sakrifiye edilmeden hemen önce ölçümler tekrarlanmıştır. Sakrifiye edilen hayvanların tümörlerinin bir kısmı histopatolojik olarak incelenmiş, bir kısmında enzimsel aktiviteler değerlendirilmiş, bir kısmı ise doku dağılımlarının hesaplanması amacıyla ayrılmıştır.

Resim 4.28. Fibrosarkoma oluşturulmuş deney hayvanları

Deney hayvanlarında tümör büyüklükleri ölçüm sonuçları

Tümör ölçümleri en ve boy olarak ölçülmüş olan tümörlerde ortalama değerler alınarak tümör çapları üzerinden değerlendirilmiştir. Tüm tedavi gruplarında bulunan her deney hayvanı için ayrı ayrı yapılmış daha sonra deney hayvanlarının tümör çaplarının grup içi ortalaması alınarak formülasyonlara ait ölçümler hesaplanmıştır. İlk yapılan ölçüm %100 kabul edilerek ikinci (1. hafta) ve üçüncü (2. hafta) tümör çapları yüzde değerleri üzerinden elde edilmiştir.

Çizelge 4.46. Deney hayvanlarında kumpas ile tümör ölçüm sonuçları

FORMÜLASYON ADI	ORTALAMA TÜMÖR ÇAPI			
	0. HAFTA	1. HAFTA	2. HAFTA	p
KONTROL	100	145,670	194,460	>0,05
ÇÖZ DEX	100	108,920	166,145	>0,05
ÇÖZ ERLO	100	111,766	141,832	>0,05
ÇÖZ ERLO DEX	100	85,702	113,378	>0,05
ÇÖZ İMA	100	113,084	116,261	>0,05
ÇÖZ İMA DEX	100	116,602	120,673	>0,05
BOŞ QD	100	88,061	119,596	>0,05
BOŞ QD PEG	100	115,243	X*	<0,001
BOŞ QD PEG-FA	100	102,431	133,244	>0,05
QD İMA	100	106,104	98,589	<0,05
QD İMA PEG	100	110,145	123,539	>0,05
QD İMA PEG-FA	100	82,893	76,493	<0,05
QD ERLO	100	106,361	96,846	<0,05
QD ERLO PEG	100	92,583	90,563	<0,01
QD ERLO PEG-FA	100	91,487	110,069	>0,05
BOŞ NP	100	129,026	129,666	>0,05
BOŞ NP PEG	100	117,221	124,943	>0,05
BOŞ NP PEG-FA	100	131,673	141,176	>0,05
NP İMA	100	47,764	37,990	<0,001
NP İMA PEG	100	119,210	110,914	>0,05
NP İMA PEG-FA	100	88,851	101,910	>0,05
NP ERLO	100	65,382	95,342	>0,05
NP ERLO PEG	100	98,060	126,322	>0,05
NP ERLO PEG-FA	100	104,393	130,011	>0,05

X*: grupta canlı hayvan kalmaması nedeniyle ölçüm yapılamamıştır.

Sonuçlar göz önüne alındığında, ilaç uygulaması olmayan kontrol grubunda bir hafta içerisinde yaklaşık % 50 oranında bir artış olduğu görülmektedir. Etkin madde içeren tüm formülasyonlarda, ilaç uygulaması ile tümör büyümesi kontrol altına alınmıştır ancak bazı formülasyonlarda iyileşmenin çok yüksek olmadığı görülmektedir. Etkin madde içermeyen formülasyonlar karşılaştırıldığında kuantum noktacıklarının tümör küçülmesi üzerine etkisi olduğu görülmektedir. Etkin madde içeren tüm formülasyonlar değerlendirildiğinde; en yüksek tümör küçültücü etkinin, QD İMA, QD İMA PEG FA, QD ERLO, QD ERLO PEG ve NP İMA kullanılarak elde edildiği görülmektedir.

Deney hayvanlarında tümörlerin histopatolojik olarak inceleme sonuçları

Histopatolojik inceleme sonucunda tüm formülasyonlar malignant fibrosarkom ya da rhabdomyosarkomlara yani hücresel farklılaşmalara göre değerlendirilmiştir. Hücresel farklılaşma oranları yani sarkom final skorları bulunmuş, kontrol grubu %100 kabul edilerek diğer formülasyonlar % tümörleri açısından değerlendirilmiştir. Sonrasında ise bu değerler 100'den çıkarılarak yüzde iyileşme cinsinden hesaplanmıştır.

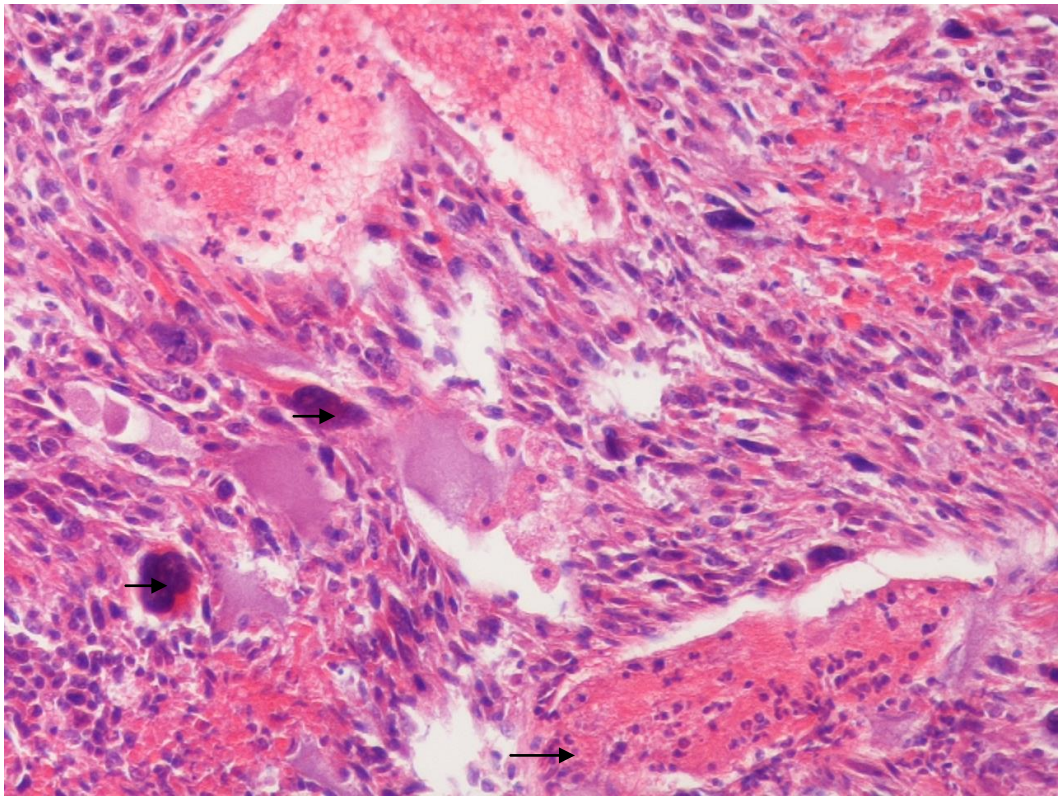
Çizelge 4.47. Histopatolojik inceleme verileri

Formülasyon Adı	Tümör Başlangıç Yüzdesi	İyileşme Yüzdesi
KONTROL	100,00	0,00
ÇÖZ-DEX	100,00	10,00
ÇÖZ-İMA	100,00	2,86
ÇÖZ-İMA-DEX	100,00	11,43
ÇÖZ-ERLO	100,00	0,00
ÇÖZ-ERLO-DEX	100,00	14,29
BOŞ-QD	100,00	14,29
BOŞ-QD-PEG	100,00	10,00
BOŞ-QD-PEG-FA	100,00	7,14
QD-İMA	100,00	32,86
QD-İMA-PEG	100,00	14,29
QD-İMA-PEG-FA	100,00	35,71
QD-ERLO	100,00	34,29
QD-ERLO-PEG	100,00	35,71
QD-ERLO-PEG-FA	100,00	0,00
BOŞ-NP	100,00	14,29
BOŞ-NP-PEG	100,00	14,29
BOŞ-NP-PEG-FA	100,00	14,29
NP-İMA	100,00	22,86
NP-İMA-PEG	100,00	7,14
NP-İMA-PEG-FA	100,00	14,29
NP-ERLO	100,00	14,29
NP-ERLO-PEG	100,00	5,71
NP-ERLO-PEG-FA	100,00	7,14

Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0.001$). Ancak; ÇÖZ ERLO ve QD-ERLO-DEX-PEGFA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$).

Histopatolojik incelemeler sonucunda en yüksek tümör iyileşme bulgusu; QD-İMA, QD-İMA-PEG-FA, QD-ERLO ve QD-ERLO-PEG ile elde edilmiştir. Tümör ölçüm sonuçları ve hücreler üzerinde gerçekleştirilen antitümöral aktivite sonuçları da göz önüne alınarak en iyi formülasyonun QD-İMA-PEG-FA olduğuna karar verilmiştir. Tümör iyileşme yüzdesi en yüksek olan QD-İMA-DEX-PEG-FA (%35,71) liyofilize edilerek toz haline getirilmiş ve kapsül içerisine konarak hayvanlara oral yolla kapsül verilmiştir. 2 hafta gün aşırı kapsül verilerek tedavi uygulaması sonrasında aynı şekilde değerlendirilen bu formülasyon ile %14,27 oranında tümörde iyileşme yakalanabilmiş, tümör yüzdesi %85,73 olarak kalmıştır.

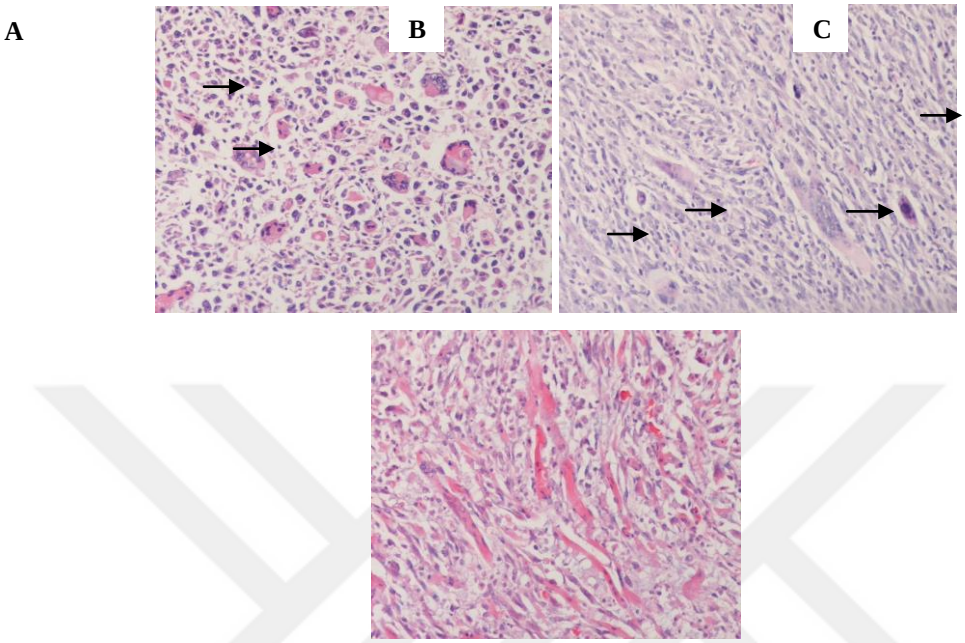
Sarkom final skoru değerlendirmesi yanı sıra bu formülasyonlara ve kontrol grubuna ait mikroskop görüntüleri de incelenmiştir. Resim 4.29'da kontrol grubuna ait görüntü yer almaktadır.



Resim 4.29. Kontrol grubuna ait mikroskobik görüntü (HEx20)

Resim 4.29'da yer alan kısa oklar bol ve eozinofilik sitoplazmalı çok çekirdekli tümör dev hücrelerini, uzun oklar ise nekrotik bölgeyi göstermektedir.

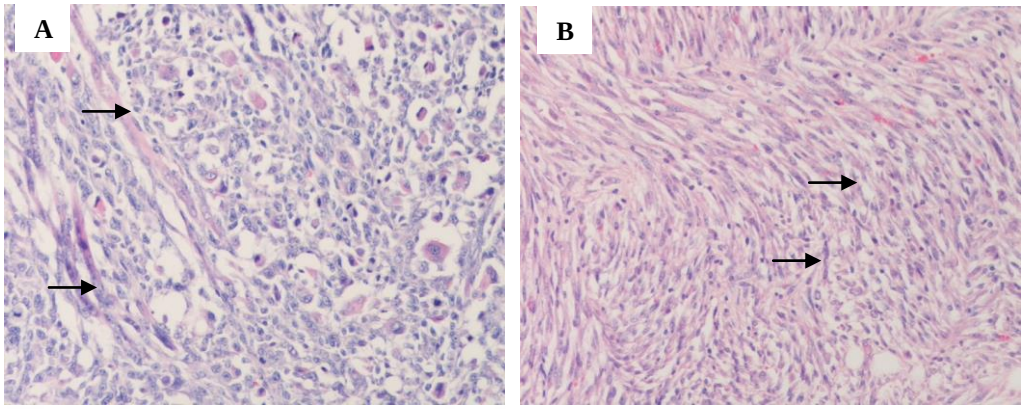
Deney hayvanlarının İMA, ERLO ve DEX etkin maddelerinin çözelti halinde ayrı ayrı oral yolla tedavileri sonrası, tümör bölgelerinin histopatolojik olarak mikroskop altında incelenmesine ait görüntülere Resim 4.30'da yer verilmiştir.



Resim 4.30. İMA (A), ERLO (B) ve DEX (C) maddelerinin çözelti halinde oral uygulanmaları sonrasında hücre görüntüleri

Resim 4.30'deki A görüntüsünde bulunan oklar tümör stromasında eozinofilik sitoplazmalı, taç benzeri yapılar oluşturan çok çekirdekli tümör dev hücrelerini; B görüntüsünde bulunan oklar ise çok çekirdekli tümör dev hücrelerini belirtmektedir. C görüntüsünde yer alan oklar tümör stromasında eozinofilik sitoplazmalı, strap (kayış) benzeri, rejenere olan çizgili kas hücrelerine benzeyen çok çekirdekli dev hücreleri belirtmektedir.

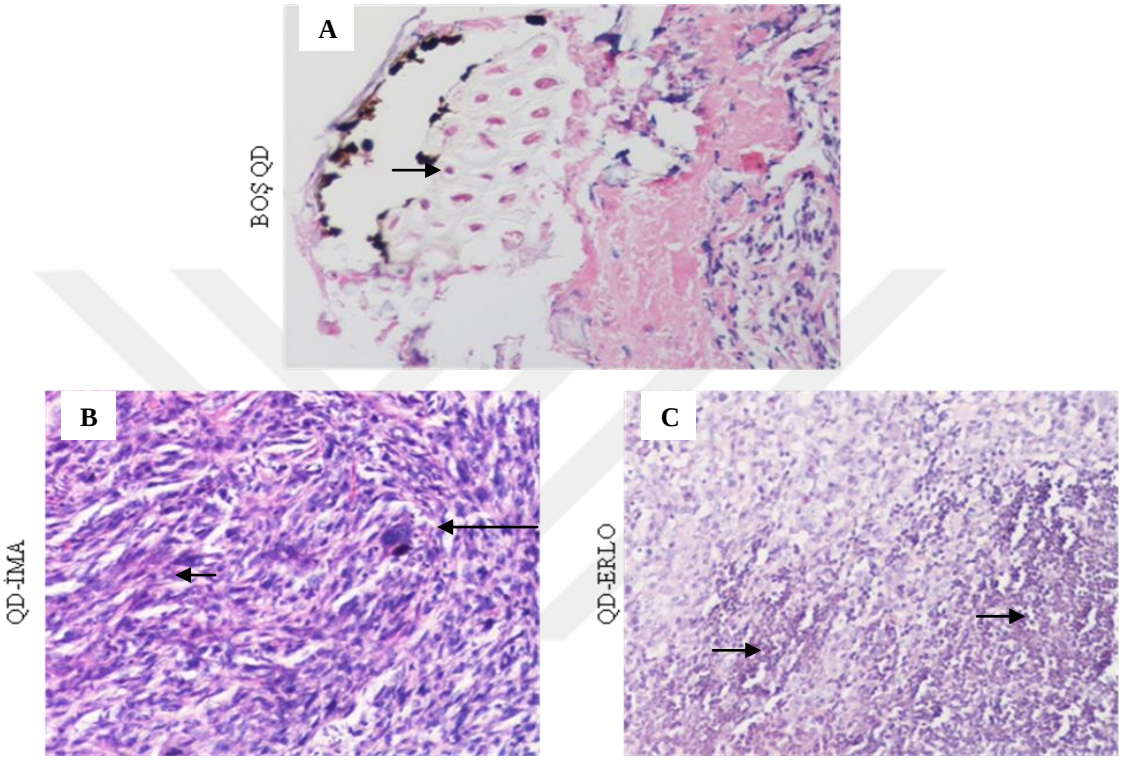
Resim 4.31’de etkin maddelerin DEX ile kombine halde kullanımları ile tedavileri sonrası tümör bölgesinin inceleme görüntüleri yer almaktadır.



Resim 4.31. İMA-DEX (A) ve ERLO-DEX (B) maddelerinin çözelti halinde oral uygulanmaları sonrasında hücre görüntüleri

Resim 4.31’deki A görüntüsünde bulunan oklar, tümör stromasında eozinofilik sitoplazmalı, strap (kayış) benzeri, rejenere olan çizgili kas hücrelerine benzeyen çok çekirdekli dev hücreleri; B görüntüsünde bulunan oklar ise, farklı yönlerde seyreden demetler oluşturan mekik şekilli tümör hücreleri belirtmektedir.

Resim 4.32’de etkin madde içermeyen kuantum noktacığı formülasyonu (BOŞ QD), ve DEX ile kombine halde etkin maddeleri içeren kuantum noktacığı formülasyonları (QD-İMA ve QD-ERLO) ile tedavi edilmiş hayvanların tümör dokularına ait mikroskop görüntüleri yer almaktadır.



Resim 4.32. Kuantum noktacıkları ile hazırlanmış yalnızca etkin madde içeren formülasyonlara ait hücre görüntüleri

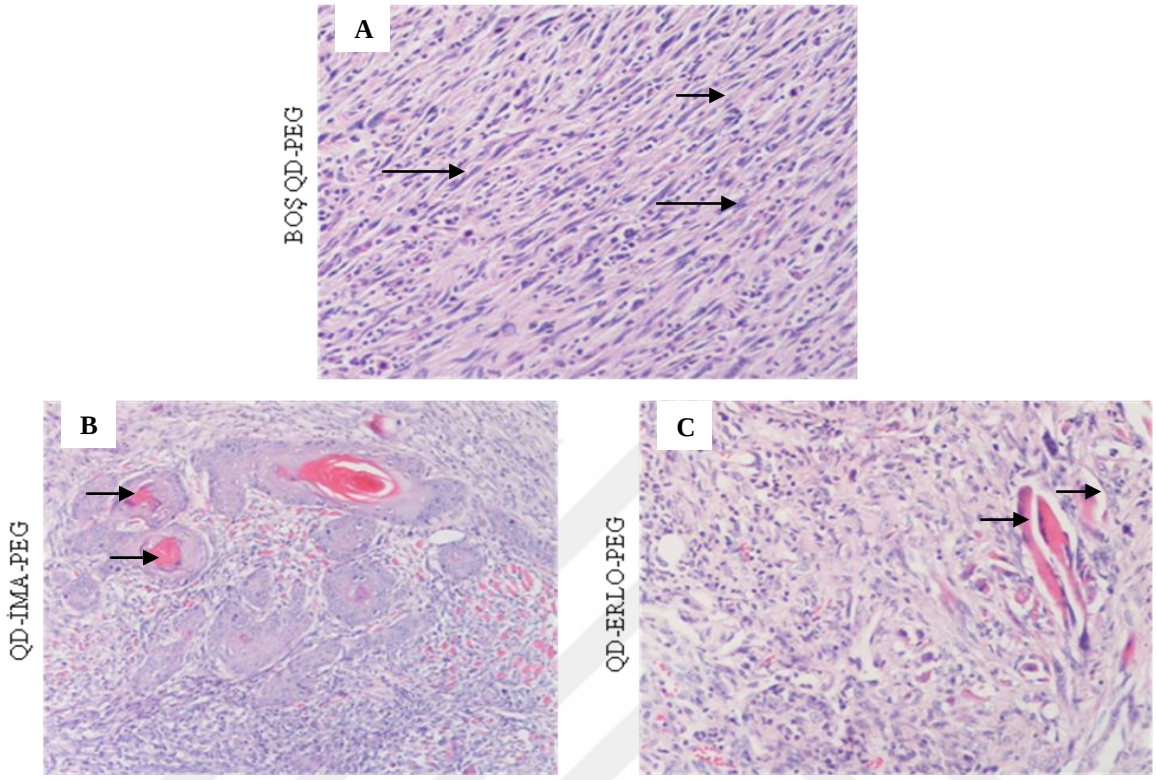
Resim 4.32’de yer alan A görüntüsü BOŞ-QD ile, B görüntüsü QD-İMA ile ve C görüntüsü ise QD-ERLO ile tedavi edilmiş hayvanların, tedavi sonrası çıkarılmış tümör dokularının histopatolojik olarak incelenmelerine ait görüntülerdir.

A görüntüsünde bulunan ok, tümör stromasında düzensiz dağılım gösteren yaygın nekrotik alanlar arasında bulunan bal peteği benzeri yapıyı belirtmektedir. Bu yapıların içleri eozinofilik yabancı cisim olarak tanımlanmaktadır.

B görüntüsünde bulunan oklardan kısa olanı; farklı yönlerde seyreden mekik (iğ) şekilli mezenkimal yapıda olan neoplastik hücreleri, uzun ok ise çok çekirdekli tümör dev hücresini belirtmektedir.

C görüntüsünde bulunan oklar; tümör parankim dokusuna infiltre olan küçük, olgun, yuvarlak, koyu bazofilik yapıda olan lenfositleri tanımlamaktadır.

PEG ile işlevselleştirilmiş kuantum noktacıklarına ait histopatolojik inceleme sonuçlarına Resim 4.33'de yer verilmiştir.



Resim 4.33. Kuantum noktacıklarına ait etkin madde ve PEG içeren formülasyonlara ait hücre görüntüleri

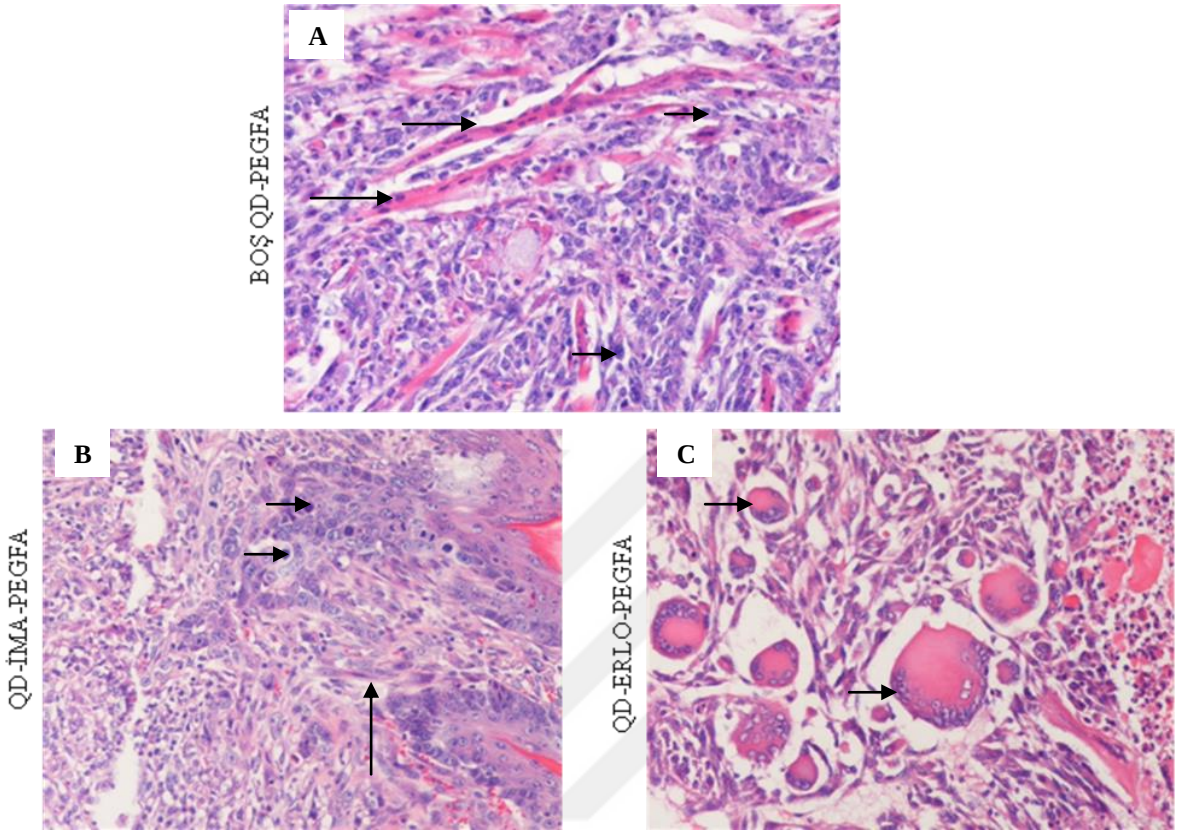
Resim 4.33'de yer alan A görüntüsü BOŞ-QD-PEG ile, B görüntüsü QD-İMA-PEG ile ve C görüntüsü ise QD-ERLO-PEG ile tedavi edilmiş hayvanların, tedavi sonrası çıkarılmış tümör dokularının histopatolojik olarak incelenmelerine ait görüntülerdir.

A görüntüsünde bulunan uzun oklar, iyi differensiye, fibroblastik yapıları; kısa oklar ise, tümör hücreleri arasına infiltre olan lenfositik yangı hücrelerini belirtmektedir.

B görüntüsünde bulunan oklar; dermiste, merkezlerinde amorfoz tabakalı keratin incileri (glob korne) bulunan iyi differensiye SCC hücrelerinden oluşan neoplastik adacıkları ifade etmektedir. Ayrıca B görüntüsünde merkezinde keratin incileri bulunmayan neoplastik adacıklara da rastlanmaktadır.

C görüntüsünde bulunan oklar; tümör parankim dokusunda çok çekirdekli dev hücrelerini göstermektedir.

Etkin madde yüklü PEG-FA ile işlevselleştirilmiş kuantum noktacıklarına ait histopatolojik inceleme sonuçları Resim 4.34'de yer almaktadır.



Resim 4.34. Kuantum noktacıklarına ait etkin madde ve PEGFA içeren formülasyonlara ait hücre görüntüleri

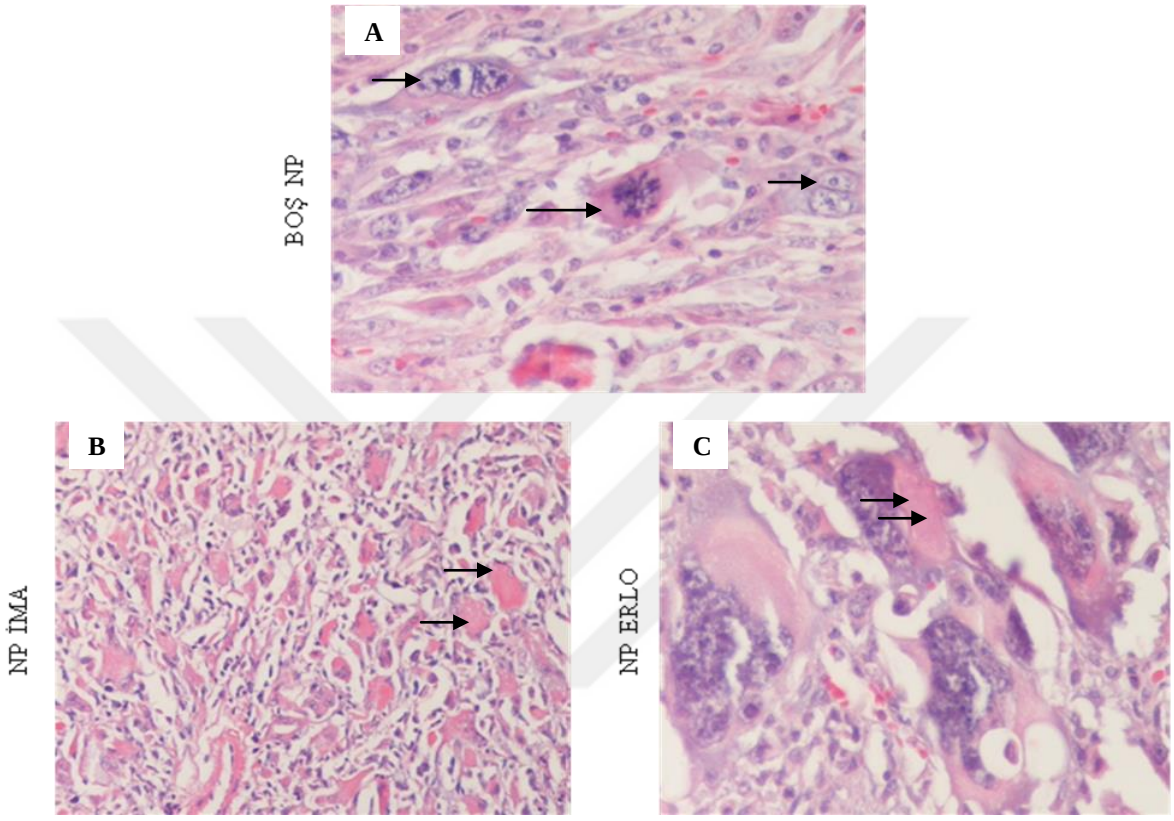
Resim 4.34'de yer alan A görüntüsü BOŞ-QD-PEG-FA ile, B görüntüsü QD-İMA-PEG-FA ile ve C görüntüsü ise QD-ERLO-PEG-FA ile tedavi edilmiş hayvanların, tedavi sonrası çıkarılmış tümör dokularının histopatolojik olarak incelenmelerine ait görüntülerdir.

A görüntüsünde bulunan uzun oklar, tümör stromasında eozinofilik sitoplazmalı, strap (kayış) benzeri, rejenere olan çizgili kas hücrelerine benzeyen çok çekirdekli dev hücreleri belirtmektedir. Kısa oklar ise, neoplastik hücreleri göstermektedir.

B görüntüsünde bulunan kısa oklar, mitotik hücreleri ve uzun ok ise, bazal hücre yastıkları arasından dermis tabakasına infiltre olarak "*epitelyal-mezenkimal dönüşüm*" sergileyen neoplastik hücreleri tanımlamaktadır.

C görüntüsünde bulunan oklar; taç benzeri yapılar oluşturan, bol ve eozinofilik sitoplazmalı, çok çekirdekli tümör hücrelerini ifade etmektedir.

Nanopartiküller ile tedavi edilmiş hayvanlara ait histopatolojik inceleme sonuçları aşağıda yer almaktadır. Resim 4.35'de etkin madde içermeyen nanopartikül formülasyonu (BOŞ NP), ve DEX ile kombine halde etkin maddeleri içeren NP-İMA ve NP-ERLO ile tedavi edilmiş hayvanların tümör dokularına ait mikroskop görüntüleri yer almaktadır.



Resim 4.35. Nanopartiküllere ait yalnızca etkin madde içeren formülasyonlara ait hücre görüntüleri

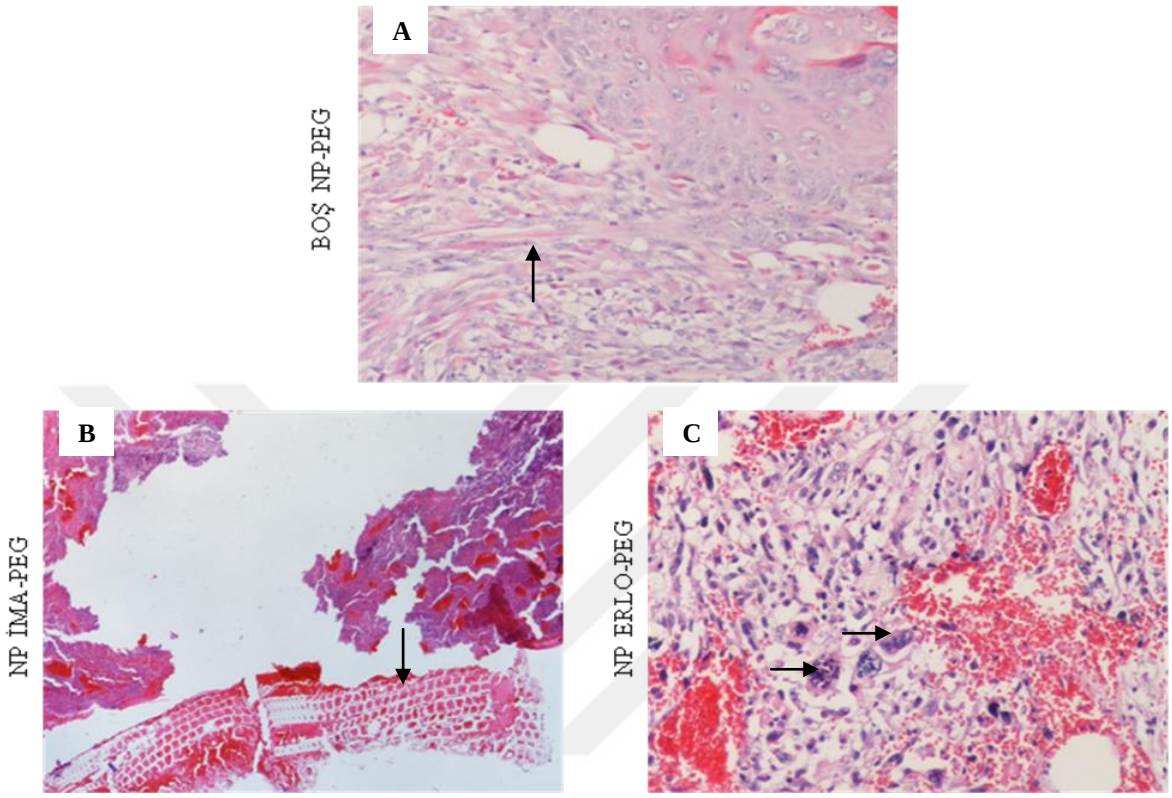
Resim 4.35'de BOŞ-NP ile (A görüntüsü), NP-İMA ile (B görüntüsü) ve NP-ERLO ile (C görüntüsü) tedavi edildikten sonra tümör dokuları çıkarılmış hayvanlara ait histopatolojik incelenme görüntüleri yer almaktadır.

A görüntüsünde bulunan kısa oklar, çok belirgin anizositozis ve anizokaryozis sergileyen, anaplastik yapıda tümör dev hücrelerini; uzun ok ise, bir tümör dev hücresinde görülen anormal mitozisi belirtmektedir.

B görüntüsünde bulunan oklar, tümör stromasında eozinofilik sitoplazmalı, çok çekirdekli dev hücrelerini tanımlamaktadır.

C görüntüsünde oldukça belirgin anizositozis ve anizokaryozis sergileyen, anaplastik yapıda olan polimorfik, tek çekirdekli tümör dev hücreleri yer almaktadır. Oklar ise; anaplastik özelliklere rağmen hala görülebilen enine çizgilenmeleri (striasyonlar) belirtmektedir.

Fonksiyonel grup olarak PEG taşıyan BOŞ-NP-PEG (A görüntüsü), NP-İMA-PEG (B görüntüsü) ve NP-ERLO-PEG (C görüntüsü) kodlu nanopartikül formülasyonlarına ait histopatolojik görüntüleme sonuçları Resim 4.36'da yer almaktadır.



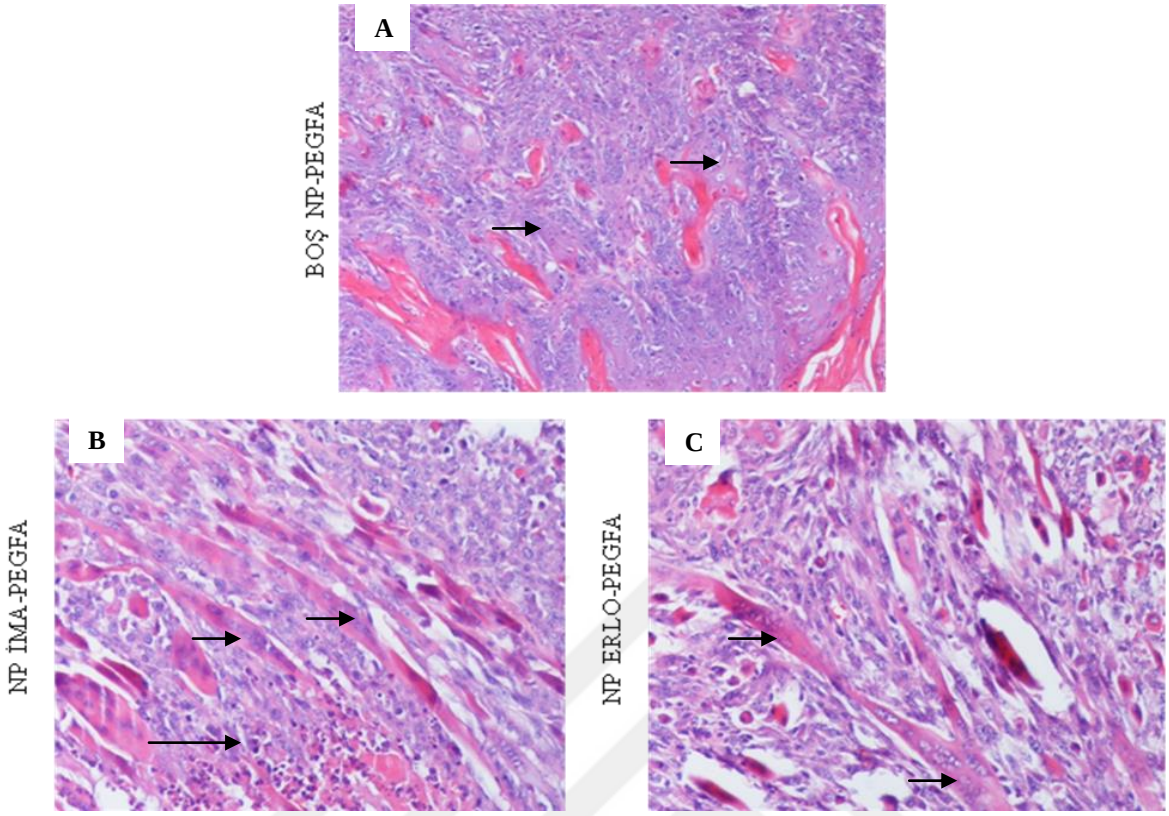
Resim 4.36. Nanopartiküllere ait etkin madde ve PEG içeren formülasyonlara ait hücre görüntüleri

Resim 4.36'da yer alan A görüntüsündeki ok ile bazal hücre yastıkları arasından dermis tabakasına infiltre olarak "*epitelyal-mezenkimal dönüşüm*" sergileyen neoplastik hücreler gösterilmektedir.

B görüntüsünde yer alan ok ile tümör stromasında düzensiz dağılım gösteren yaygın nekrotik alanlar arasında bulunan bal peteği benzeri, içleri eozinofilik yabancı cisimler belirtilmektedir.

C görüntüsünde; tümör stromasında yaygın hemoraji görülmekte olup görüntüde yer alan oklar ile tümör dev hücreleri ifade edilmektedir.

Fonksiyonel grup olarak PEG-FA taşıyan BOŞ-NP-PEG-FA (A görüntüsü), NP-İMA-PEG-FA (B görüntüsü) ve NP-ERLO-PEG-FA (C görüntüsü) kodlu nanopartikül formülasyonlarına ait histopatolojik görüntüleme sonuçları Resim 4.37'de yer almaktadır.



Resim 4.37. Nanopartiküllere ait etkin madde ve PEGFA içeren formülasyonlara ait hücre görüntüleri

Resim 4.37'deki A görüntüsünde yassı hücreli kanser yapıları bulunmaktadır, görüntüde yer alan ok ise orta derecede farklılaşma sergileyen, belirgin anizositozis ve anizokaryozisli ve epidermisten dermise invaze olan tümör hücrelerini göstermektedir.

B görüntüsünde yer alan kısa oklar; bol ve eozinofilik sitoplazmalı çok çekirdekli tümör dev hücrelerini ve uzun ok ise; nekrotik bölgeyi göstermektedir.

C görüntüsündeki oklar bol ve eozinofilik sitoplazmalı çok çekirdekli tümör dev hücrelerini belirtmektedir.

<u>İlaçların tümör bölgesindeki enzimsel aktivitelerinin değerlendirilmesine yönelik bulgular</u>

Tirozin kinaz reseptör aktivitesinin inhibisyonuna ait bulgular

Tirozin kinaz aktivasyonu çalışmalarında kit içerisinde yer alan referans çözeltisi farklı konsantrasyonlarda kullanılarak bir kalibrasyon denklemi çıkarılmıştır. Tüm formülasyonların hücrelere ayrı ayrı uygulanmış spektrofotometrik ölçüm yapılmış ve ölçüm sonrasında elde edilen absorbans değerleri bu kalibrasyon denkleminde kullanılması

neticesinde konsantrasyon değerleri elde edilmiştir. Tirozin kinaz reseptör inhibitörü olan imatinib ve erlotinib etkin maddelerini içermeyen formülasyon değerlerinden etkin madde içeren formülasyon değerleri çıkarılmıştır. Bu şekilde elde edilen değer; inhibe olan tirozin kinaz reseptörlerini vermektedir. Etkin madde içermeyen yani boş formülasyonlar ve kontrol gruplarına karşı inhibisyon etkinliği yüzde olarak hesaplanmıştır. Boş formülasyonlar ve kontrol gruplarının inhibisyon etkisi olmadığından %0 kabul edilmiştir. Bu şekilde elde edilen veriler Çizelge 4.48'de yer almaktadır.

Çizelge 4.48. Tirozin Kinaz Reseptör İnhibisyonu Etkinliği

FORMÜLASYON ADI	% İNHİBİSYON ETKİSİ
KONTROL	0,000
ÇÖZ-DEX	15,688
ÇÖZ-İMA	36,403
ÇÖZ-İMA-DEX	68,414
ÇÖZ-ERLO	16,249
ÇÖZ-ERLO-DEX	51,547
BOŞ-QD	0,000
QD-İMA	17,549
QD-ERLO	15,209
BOŞ-QD-PEG	0,000
QD-İMA-PEG	33,773
QD-ERLO-PEG	11,258
BOŞ-QD-PEG-FA	0,000
QD-İMA-PEG-FA	71,664
QD-ERLO-PEG-FA	36,126
BOŞ-NP	0,000
NP-İMA	38,874
NP-ERLO	5,785
BOŞ-NP-PEG	0,000
NP-İMA-PEG	28,201
NP-ERLO-PEG	36,165
BOŞ-NP-PEG-FA	0,000
NP-İMA-PEG-FA	15,566
NP-ERLO-PEG-FA	21,441

Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır $p<0,001$

COX enzim aktivitesinin inhibisyonuna ait bulgular

COX reseptör inhibisyonu değerlendirmesinde kite ait kullanım kitapcığında yer aldığı gibi her formülasyon için formülasyona özgü birer kör numuneleri hazırlanmıştır. Formülasyonlara ait absorbans değerlerinden kör numunelerine ait absorbans değerleri çıkarılmıştır. Absorbans değerlerinden yola çıkılarak kitapcıkta yer alan matematiksel bir işlem uygulanmış ve miktarlara geçilmiştir. COX inhibitörü olan deksketoprofen maddesini içermeyen formülasyonlar yani boş formülasyonlar %100 COX aktivitesi gösteriyor kabul edilerek diğer formülasyonlardaki COX aktivitesi yüzde cinsinden bulunmuş, daha sonra ise bu değer 100 değerinden çıkartılarak % inhibisyon etkinliği değerleri elde edilmiştir. Her bir formülasyona ait ayrı ayrı körler hazırlandığından 96 kuyucuklu kitte bazı formülasyonlar değerlendirmeye alınamamıştır.

Çizelge 4.49. Siklooksijenaz enzimi reseptör inhibisyon etkinliği

Formülasyon Adı	% İNHİBİSYON ETKİSİ
BOŞ-QD	0,000
QD-İMA	99,248
QD-ERLO	97,466
BOŞ-QD-PEG	0,000
QD-İMA-PEG	27,059
QD-ERLO-PEG	93,500
BOŞ-QD-PEG-FA	0,000
QD-İMA-PEG-FA	26,010
QD-ERLO-PEG-FA	90,388
BOŞ-NP	0,000
NP-İMA	98,350
NP-ERLO	95,866
BOŞ-NP-PEG	0,000
NP-İMA-PEG	99,854
NP-ERLO-PEG	89,202
BOŞ-NP-PEG-FA	0,000
NP-İMA-PEG-FA	93,920
NP-ERLO-PEG-FA	78,064

Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır $p<0,001$

Folat reseptör aktivitesinin inhibisyonuna ait bulgular

Standart çözeltilerden hareketle konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizilmiş ve kalibrasyon doğrusu çizilerek kalibrasyon doğru denklemi elde edilmiştir. Spektrofotometrik analiz sonrasında elde edilen absorbans değerleri doğru denkleminde yerine konularak maddelere ait konsantrasyonlar elde edilmiştir. Kontrol grubunda herhangi bir inhibisyon etkisi beklenmediğinden kontrol grubundaki folat reseptör miktarı %100 kabul edilerek değerler önce yüzde cinsinden folat miktarı olarak hesaplanmış daha sonra bu değerler 100'den çıkarılarak % inhibisyon etkinliği bulunmuştur.

Çizelge 4.50. Folat reseptör inhibisyon etkinliği

Formülasyon Adı	% İNHİBİSYON ETKİSİ
KONTROL	0,000
ÇÖZ-DEX	19,294
ÇÖZ-İMA	86,090
ÇÖZ-İMA-DEX	75,542
ÇÖZ-ERLO	41,247
ÇÖZ-ERLO-DEX	52,123
BOŞ-QD	46,529
BOŞ-QD-PEG	81,208
BOŞ-QD-PEG-FA	89,012
QD-İMA-DEX	64,031
QD-İMA-DEX-PEG	50,232
QD-İMA-DEX-PEG-FA	83,840
QD-ERLO-DEX	92,429
QD-ERLO-DEX-PEG	86,584
QD-ERLO-DEX-PEG-FA	95,542
BOŞ-NP	70,911
BOŞ-NP-PEG	75,351
BOŞ-NP-PEG-FA	83,510
NP-İMA-DEX	95,186
NP-İMA-DEX-PEG	92,073
NP-İMA-DEX-PEG-FA	94,117
NP-ERLO-DEX	74,889
NP-ERLO-DEX-PEG	67,356
NP-ERLO-DEX-PEG-FA	91,162

Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır $p<0,001$

Deney hayvanlarında ilaca ait doku dağılımları inceleme sonuçları

Deney hayvanları çalışmaları kapsamında çalışma bitiminde hayvanların sakrifiye edilmeleri sonrasında hayvanlardan alınan dalak, akciğer, karaciğer ve tümör dokularında imatinib ve erlotinib için etkin madde miktar tayini çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar nanogram cinsinden bulunmuş olup Çizelge 4.51'de yer almaktadır.

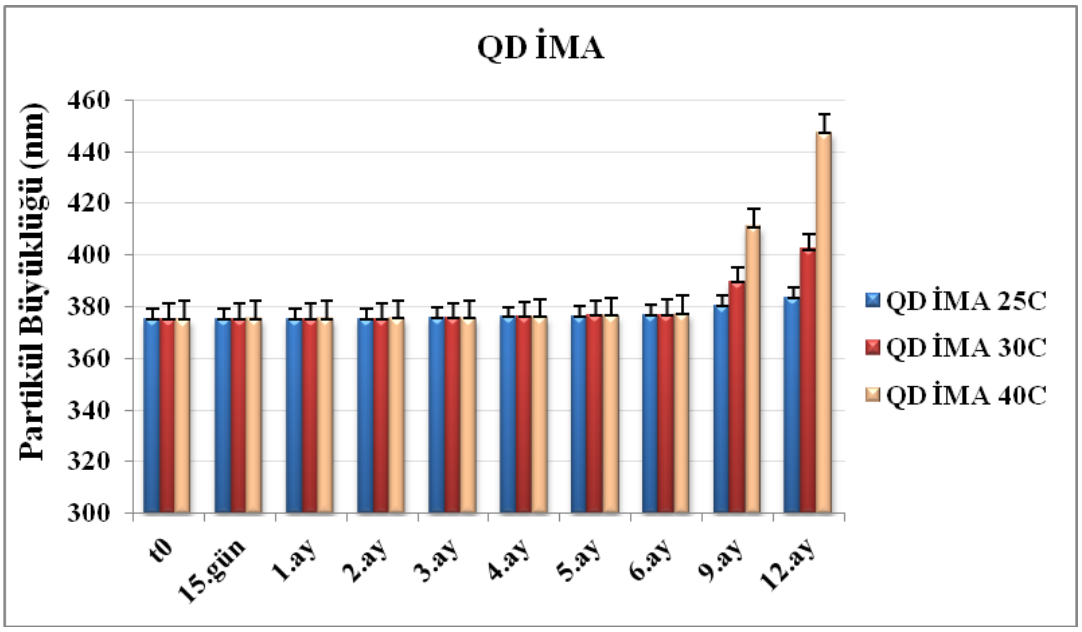
Çizelge 4.51. Deney hayvanlarında etkin maddelerin doku dağılım sonuçları

FORMÜLASYON ADI	DALAK	AKCİĞER	KARACİĞER	TÜMÖR
	ERLO/İMA	ERLO/İMA	ERLO/İMA	ERLO/İMA
ÇÖZ İMA	0,461	0,229	6,536	0,271
ÇÖZ İMA DEX	1,323	0,340	4,225	1,393
ÇÖZ ERLO	1,854	0,611	12,532	0,600
ÇÖZ ERLO DEX	1,581	0,590	10,062	2,331
QD İMA	0,666	0,490	3,593	1,228
QD İMA PEG	0,523	0,426	3,271	1,159
QD İMA PEGFA	1,136	0,280	4,427	0,411
QD ERLO	1,073	0,420	5,673	0,229
QD ERLO PEG	1,104	0,489	4,669	0,062
QD ERLO PEGFA	2,365	0,865	8,435	0,888
NP İMA PEG	0,929	0,274	4,377	0,182
NP İMA PEGFA	1,958	0,170	6,922	0,428
NP ERLO	0,839	0,592	6,535	1,629
NP ERLO PEG	3,314	0,812	9,120	3,533
NP ERLO PEGFA	2,055	0,417	5,848	2,572

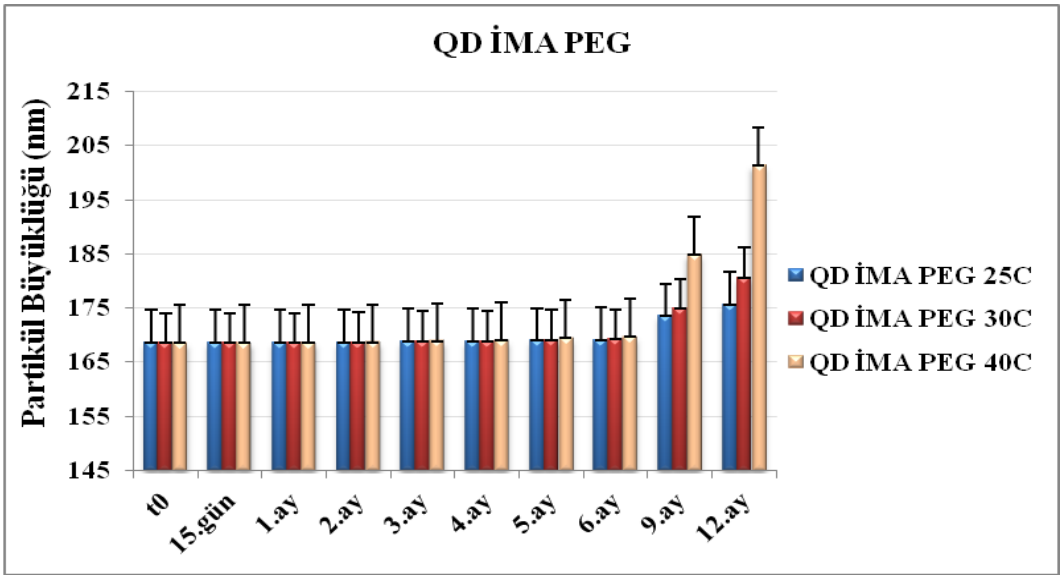
4.5. Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular

4.5.1. Kuantum noktacıklarında yapılan stabilite testlerine ait bulgular

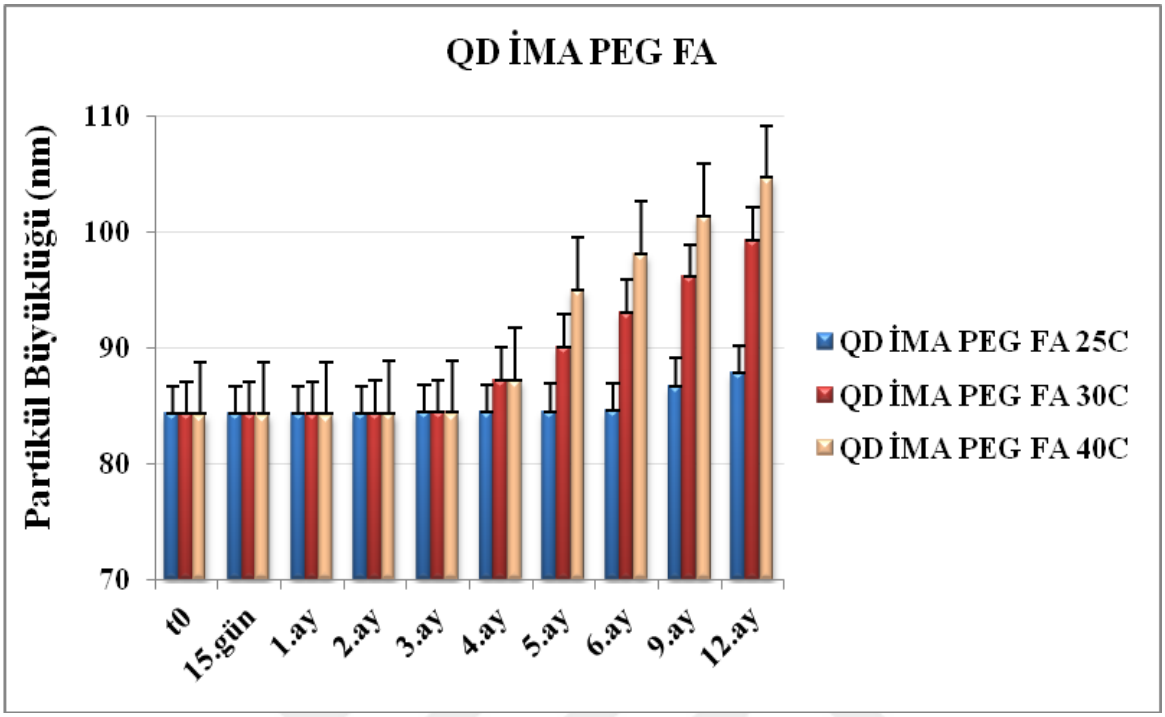
İMA ve DEX içeren QD-İMA, QD-İMA-PEG, QD-İMA-PEG-FA ve ERLO ve DEX içeren QD-ERLO, QD-ERLO-PEG ve QD-ERLO-PEG-FA formulasyonları için 25, 30 ve 40ºC'lerde stabilite çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda partikül büyüklükleri, polidispersite indeksleri, zeta potansiyelleri ve etkin madde içerikleri değerlendirilmiş, sonuçlar grafikler halinde verilmiştir.



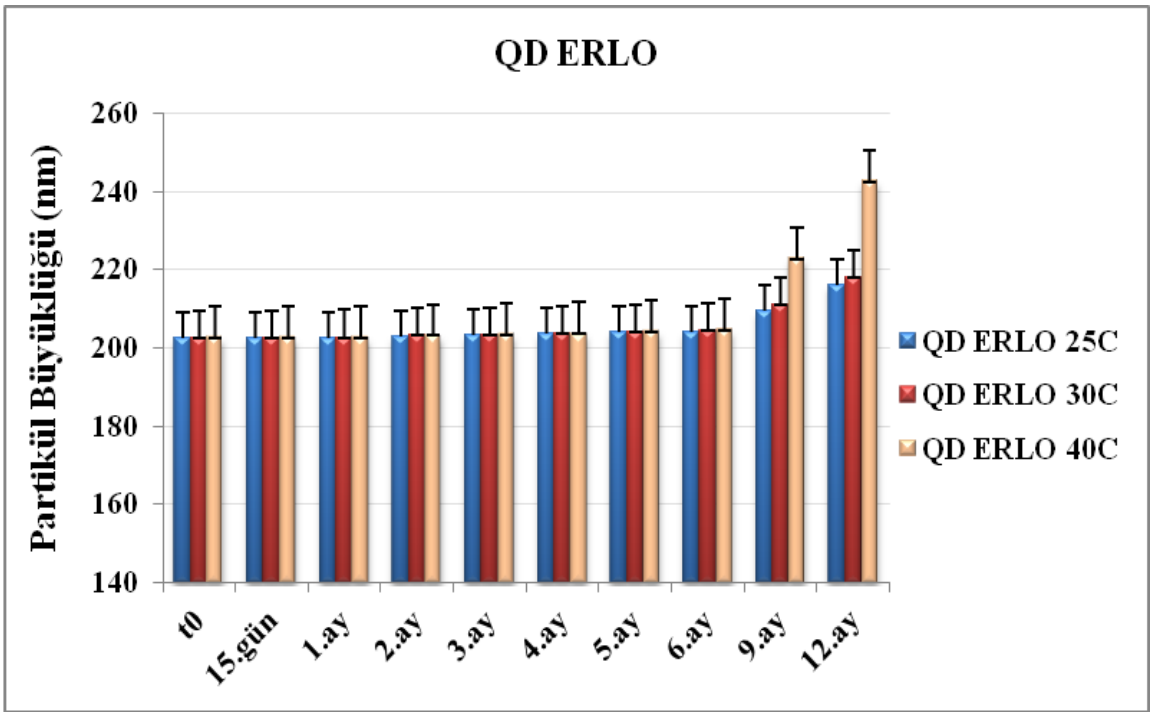
Şekil 4.89. QD-İMA formülasyonuna ait partikül büyüklüğü değişimi



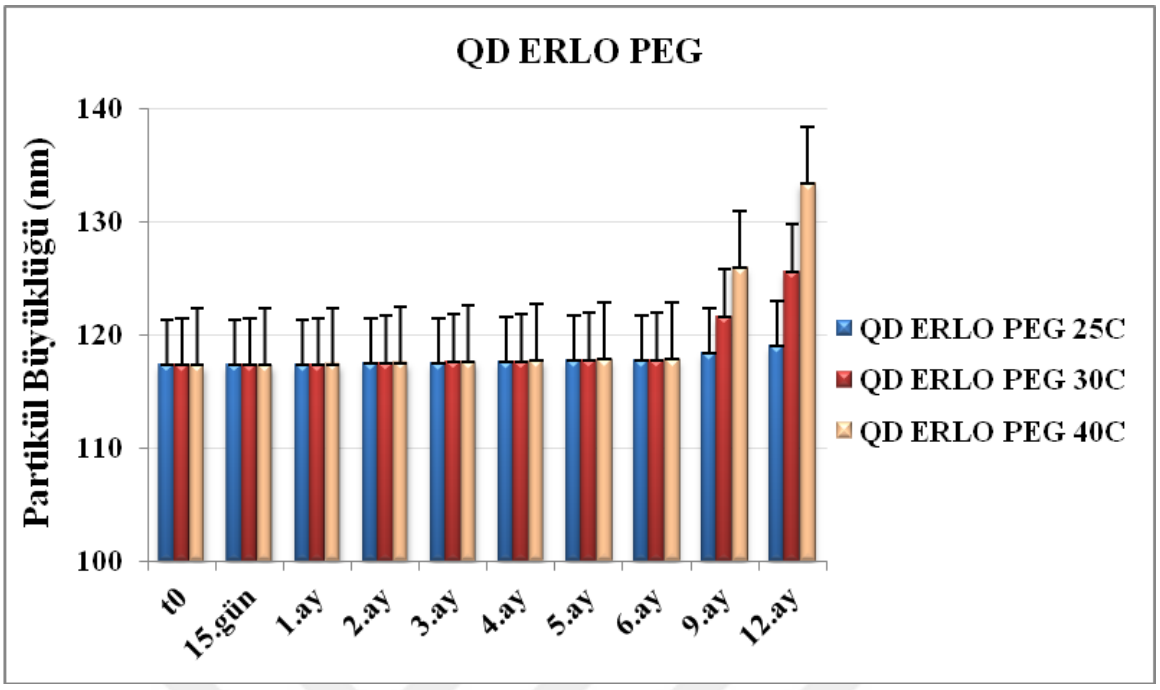
Şekil 4.90. QD-İMA-PEG formülasyonuna ait partikül büyüklüğü değişimi



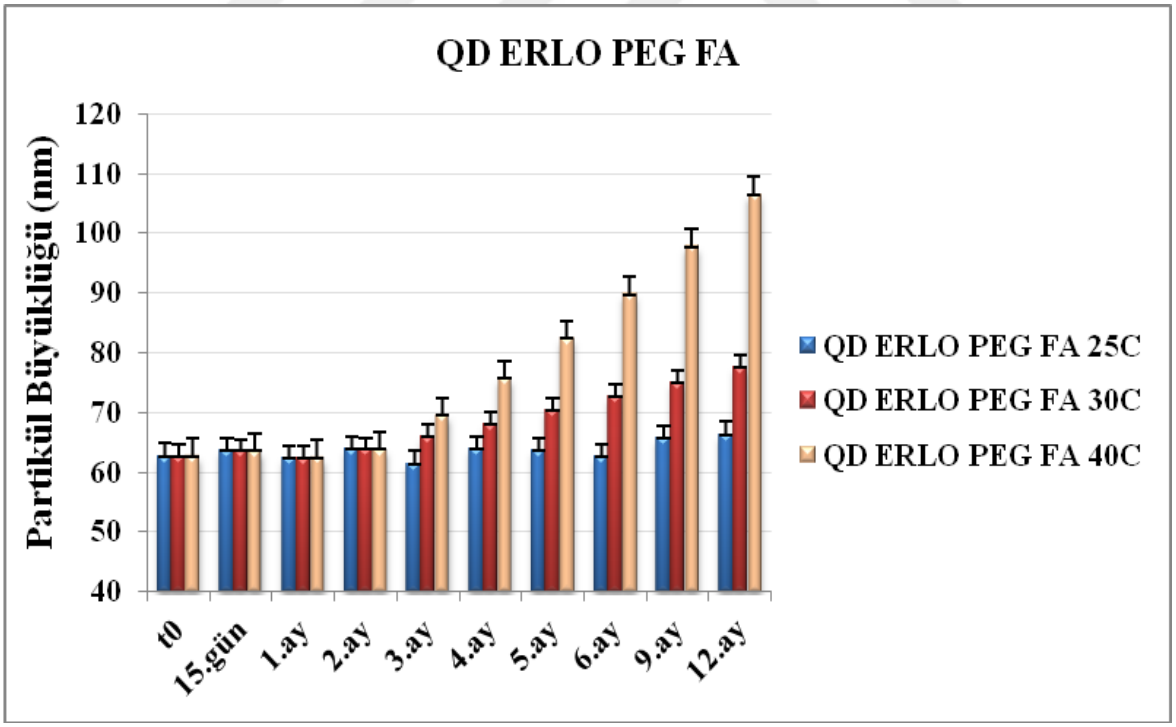
Şekil 4.91. QD-İMA-PEG-FA formülasyonuna ait partikül büyüklüğü değişimi



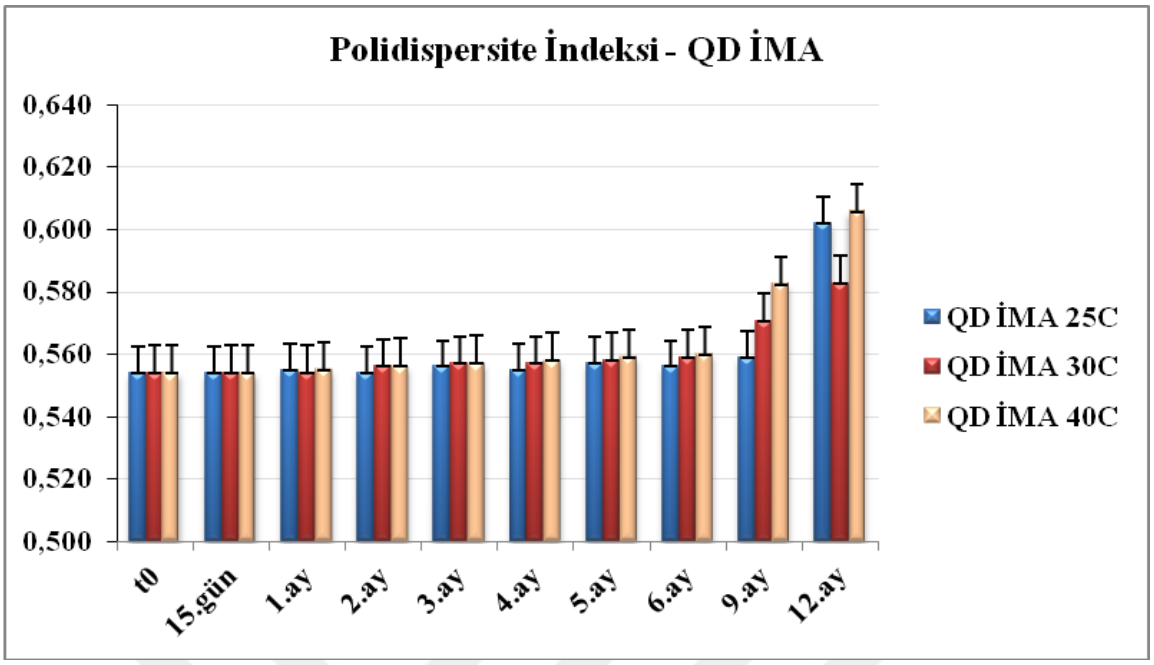
Şekil 4.92. QD-ERLO formülasyonuna ait partikül büyüklüğü değişimi



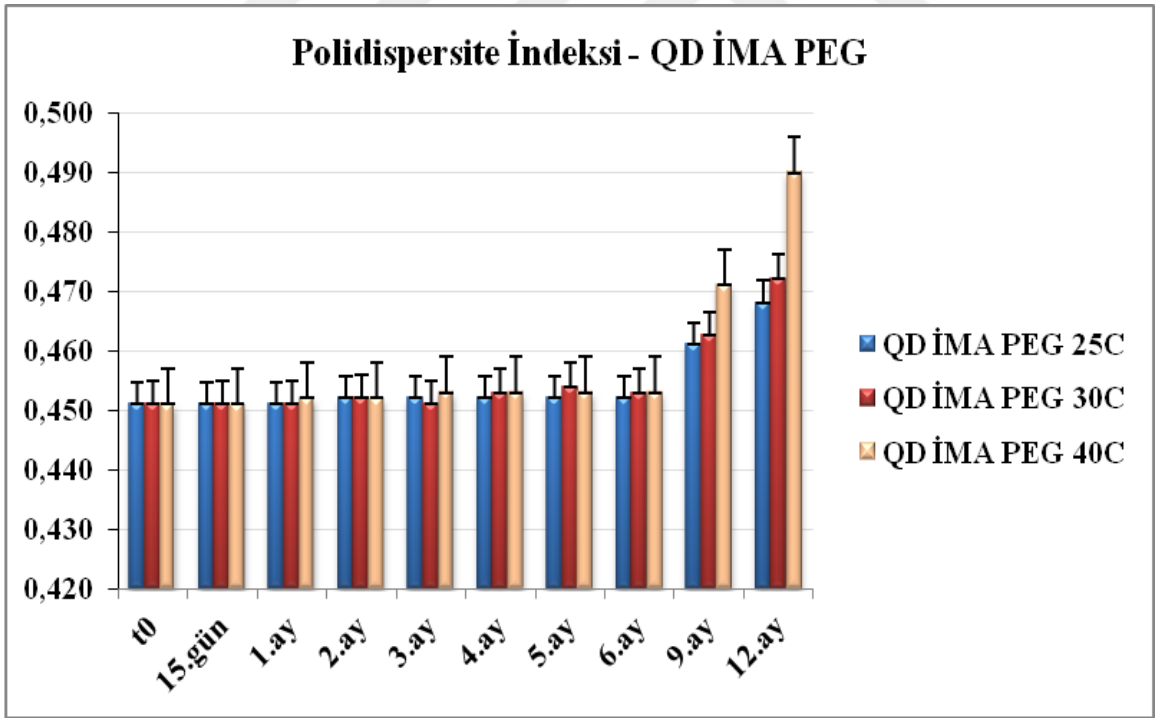
Şekil 4.93. QD-ERLO-PEG formülasyonuna ait partikül büyüklüğü değişimi



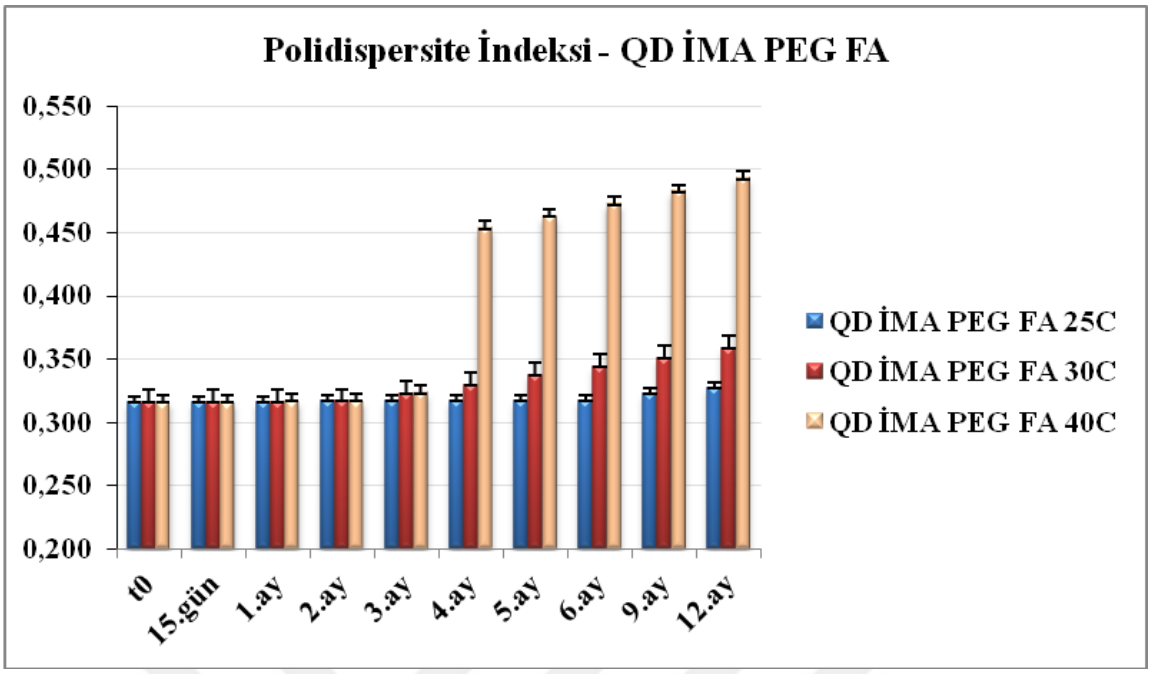
Şekil 4.94. QD-ERLO-PEG-FA formülasyonuna ait partikül büyüklüğü değişimi



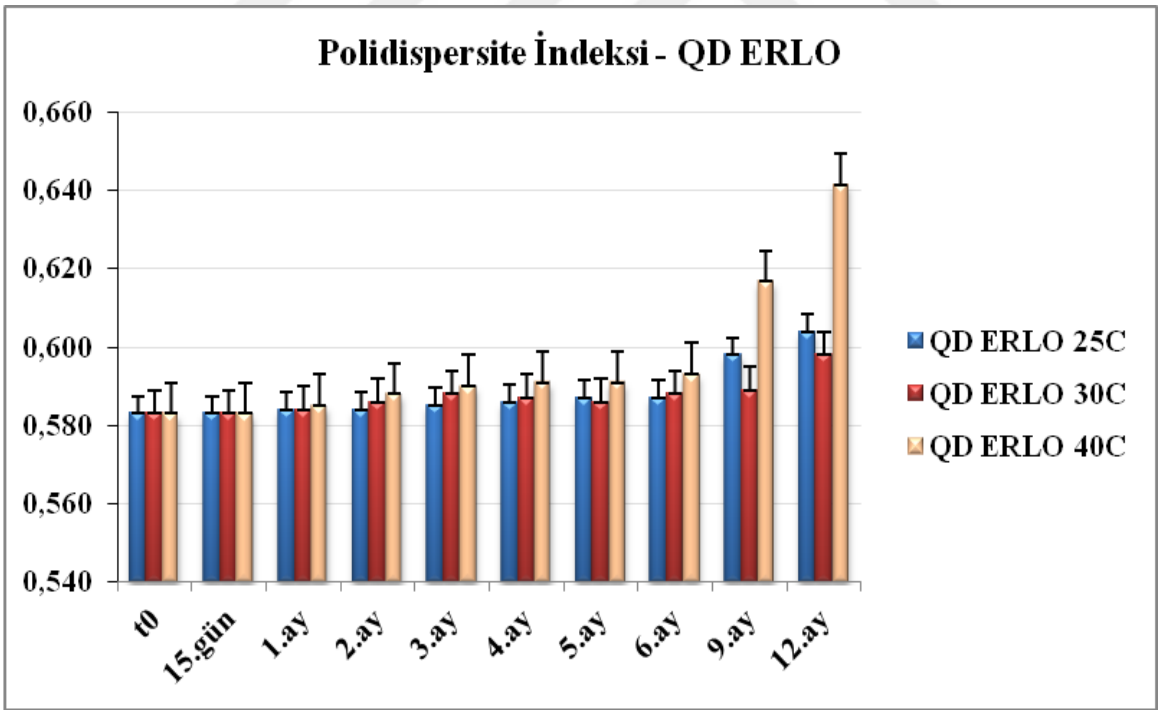
Şekil 4.95. QD-İMA formülasyonuna ait polidispersite indeksi değişimi



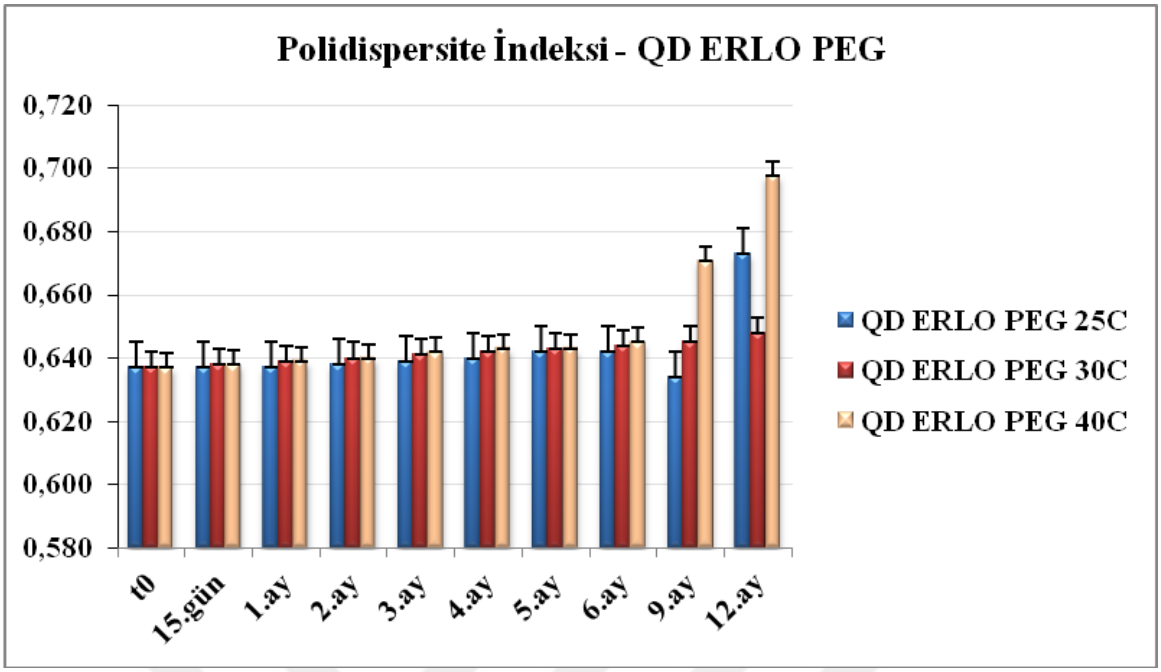
Şekil 4.96. QD-İMA-PEG formülasyonuna ait polidispersite indeksi değişimi



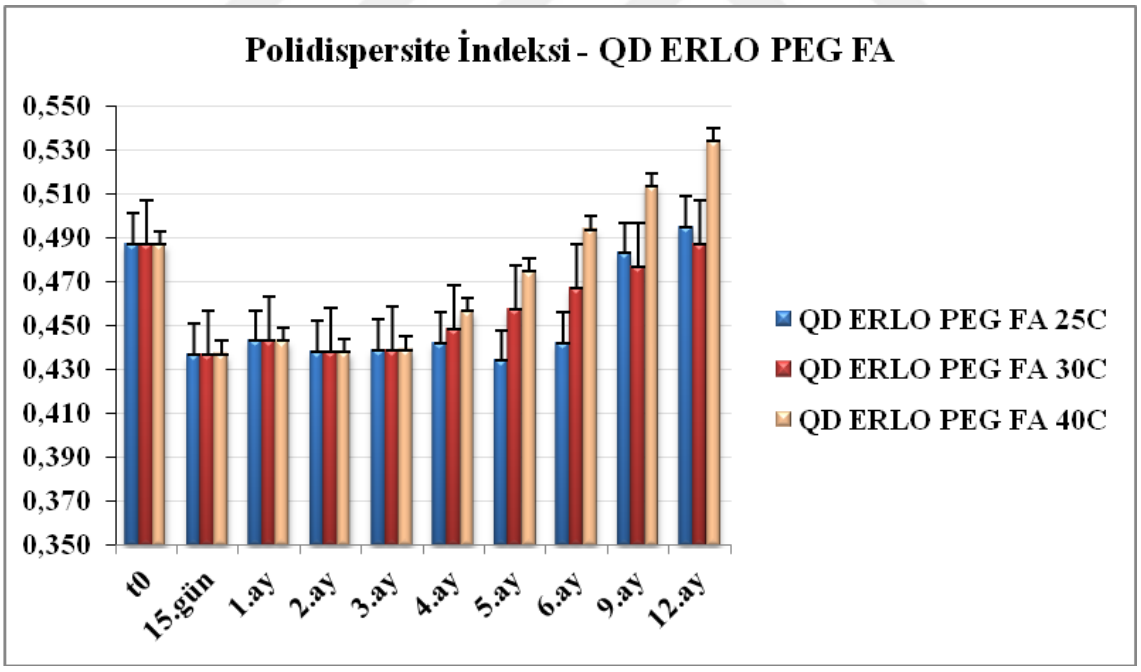
Şekil 4.97. QD-İMA-PEG-FA formülasyonuna ait polidispersite indeksi değişimi



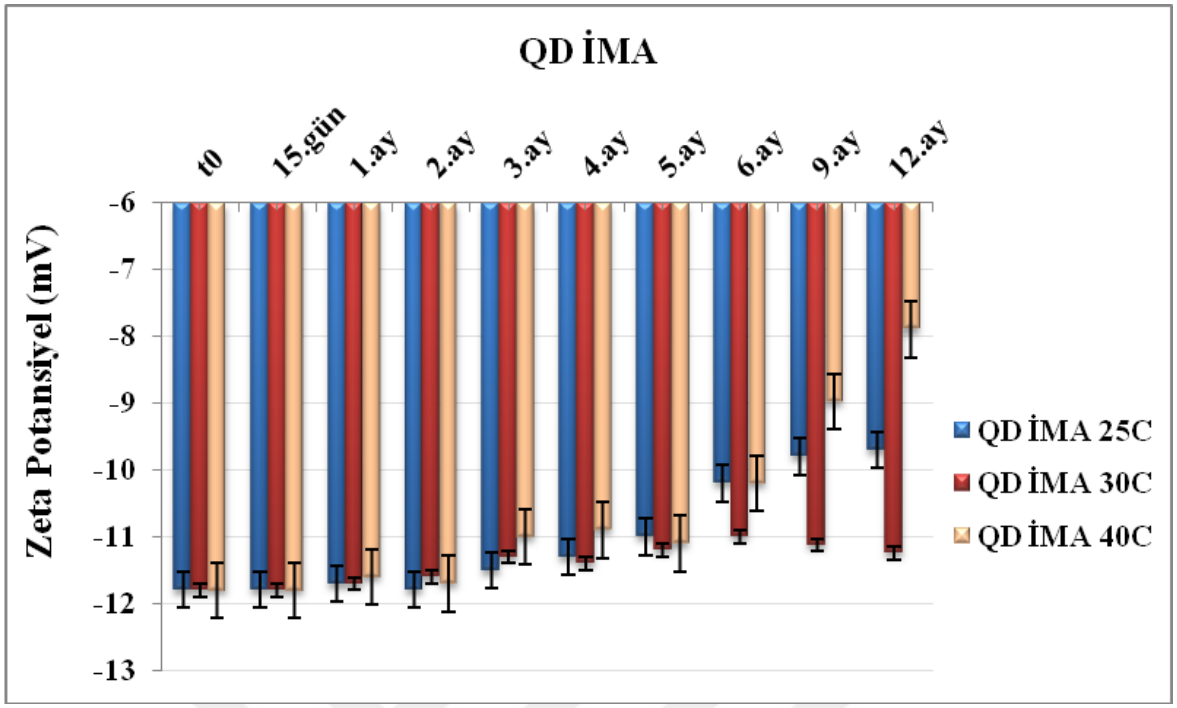
Şekil 4.98. QD-ERLO formülasyonuna ait polidispersite indeksi değişimi



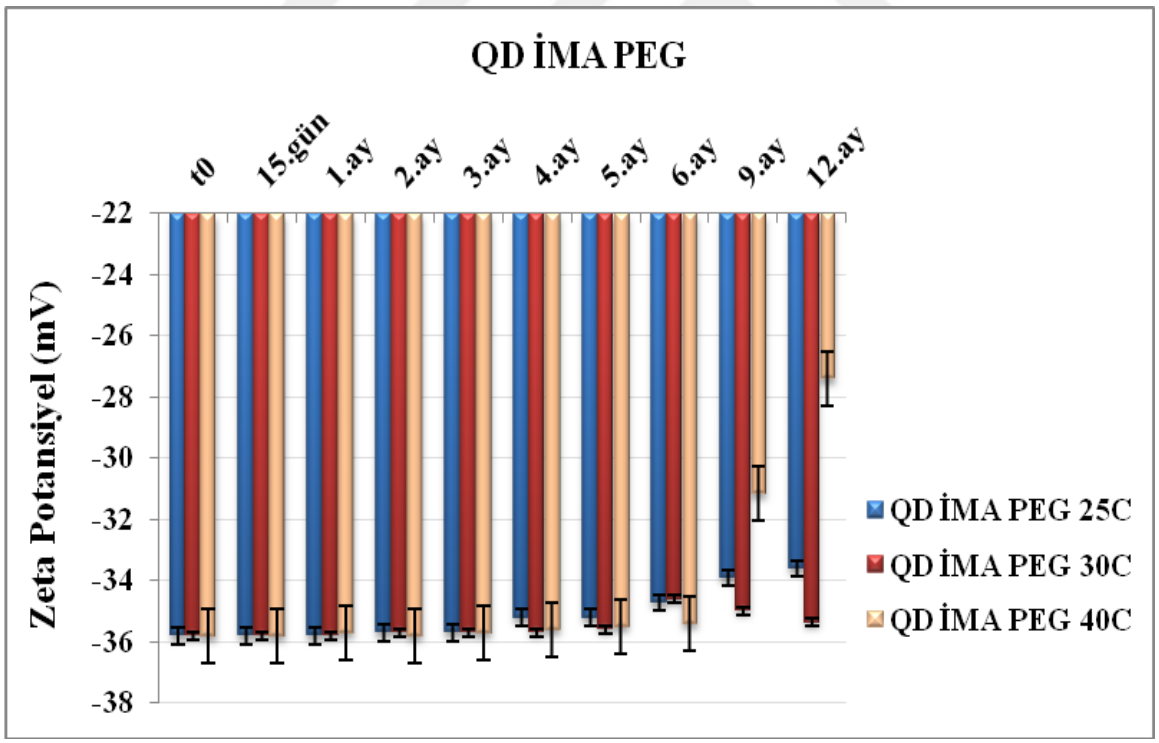
Şekil 4.99. QD-ERLO-PEG formülasyonuna ait polidispersite indeksi değişimi



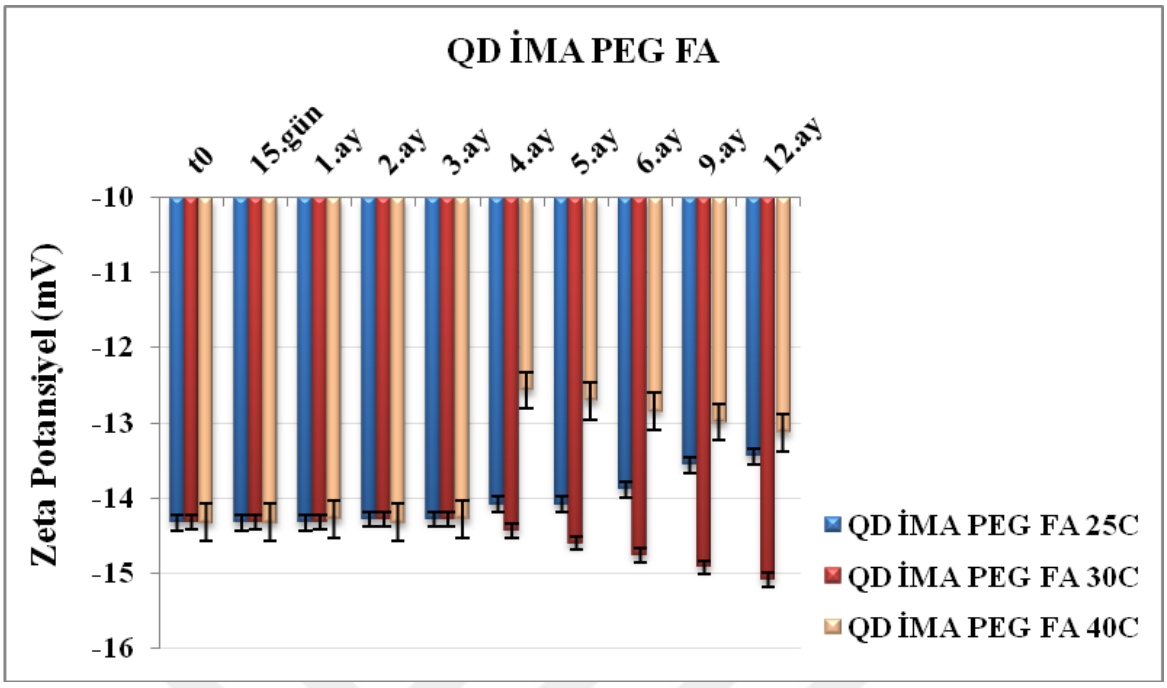
Şekil 4.100. QD-ERLO-PEG-FA formülasyonuna ait polidispersite indeksi değişimi



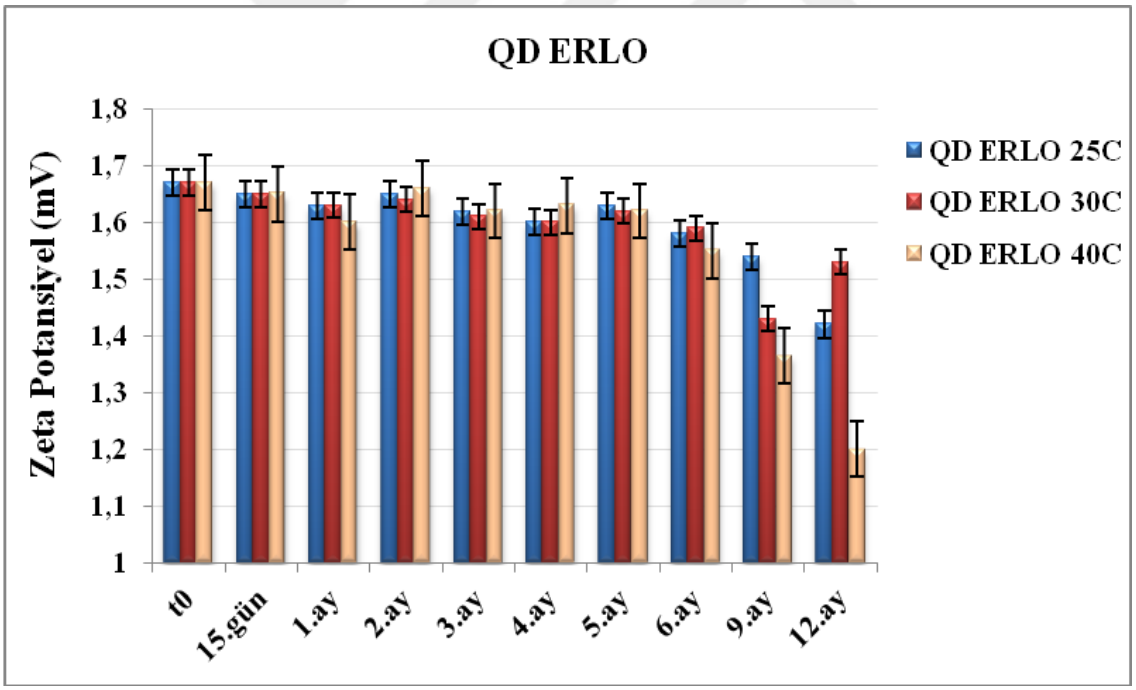
Şekil 4.101. QD-İMA formülasyonuna ait zeta potansiyeli değişimi



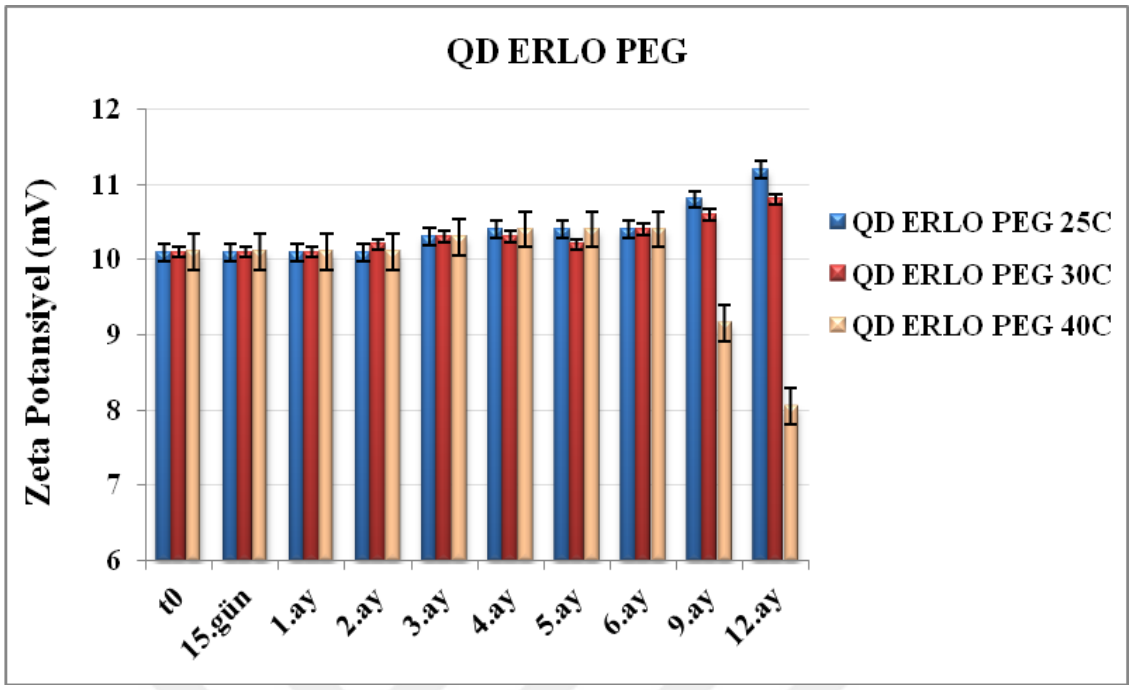
Şekil 4.102. QD-İMA-PEG formülasyonuna ait zeta potansiyeli değişimi



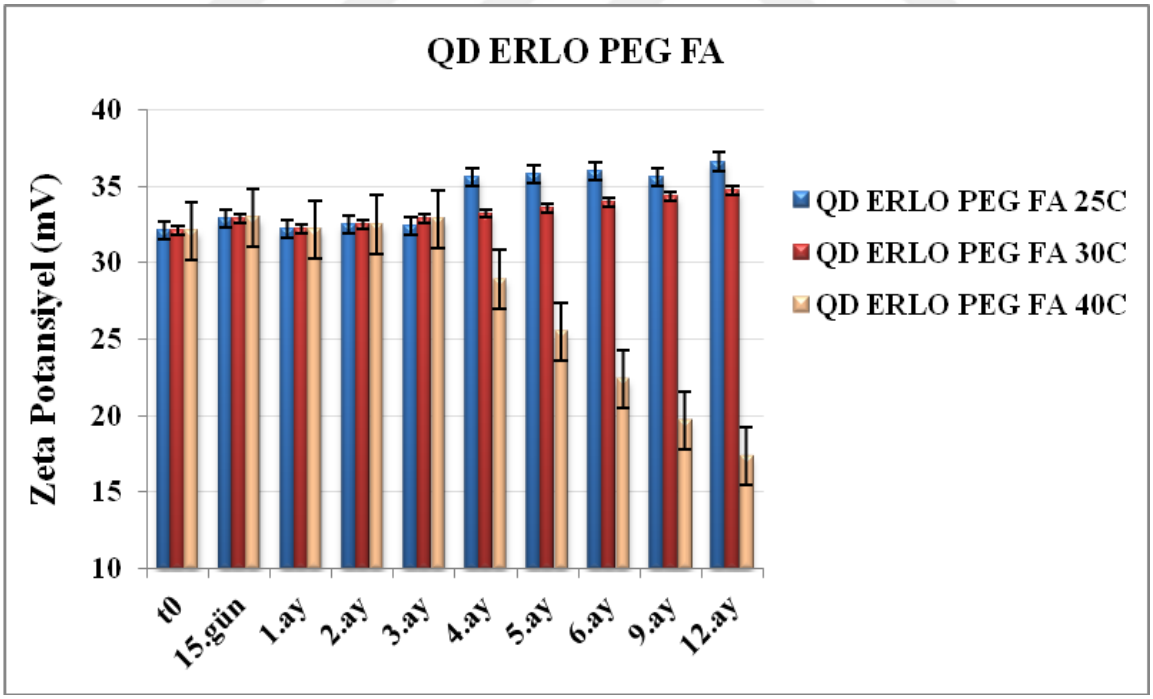
Şekil 4.103. QD-İMA-PEG-FA formülasyonuna ait zeta potansiyeli değişimi



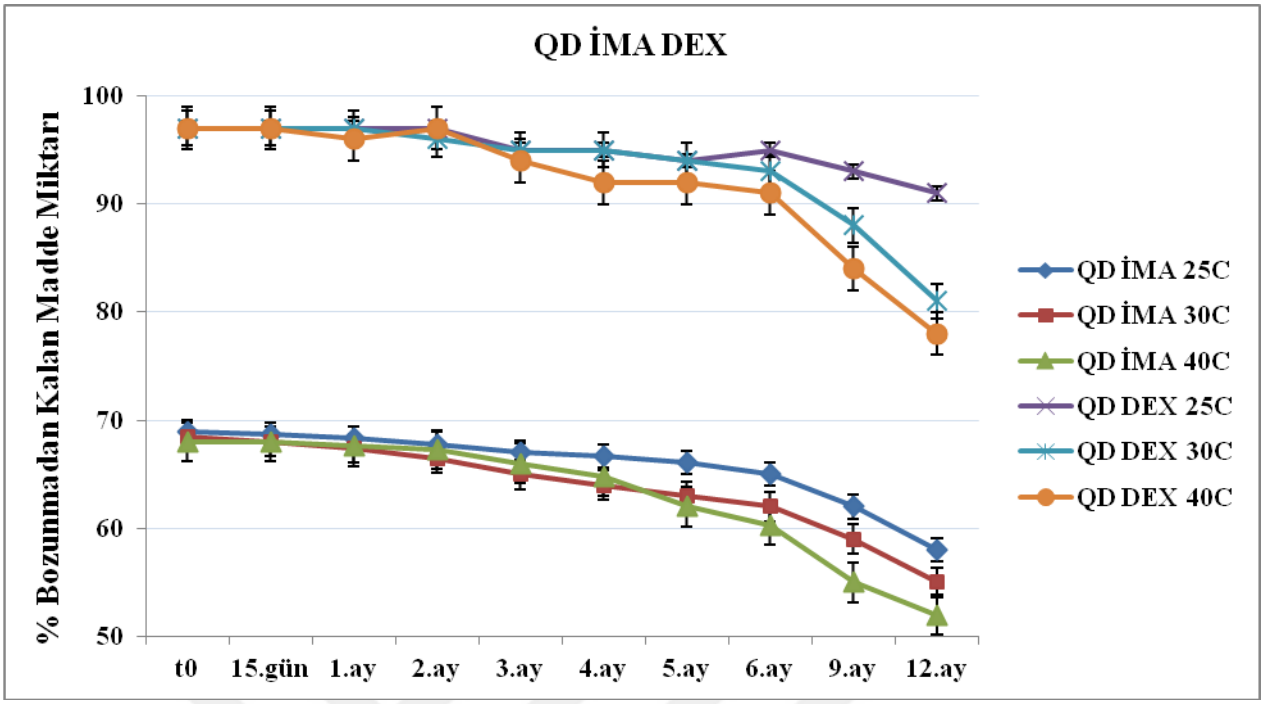
Şekil 4.104. QD-ERLO formülasyonuna ait zeta potansiyeli değişimi



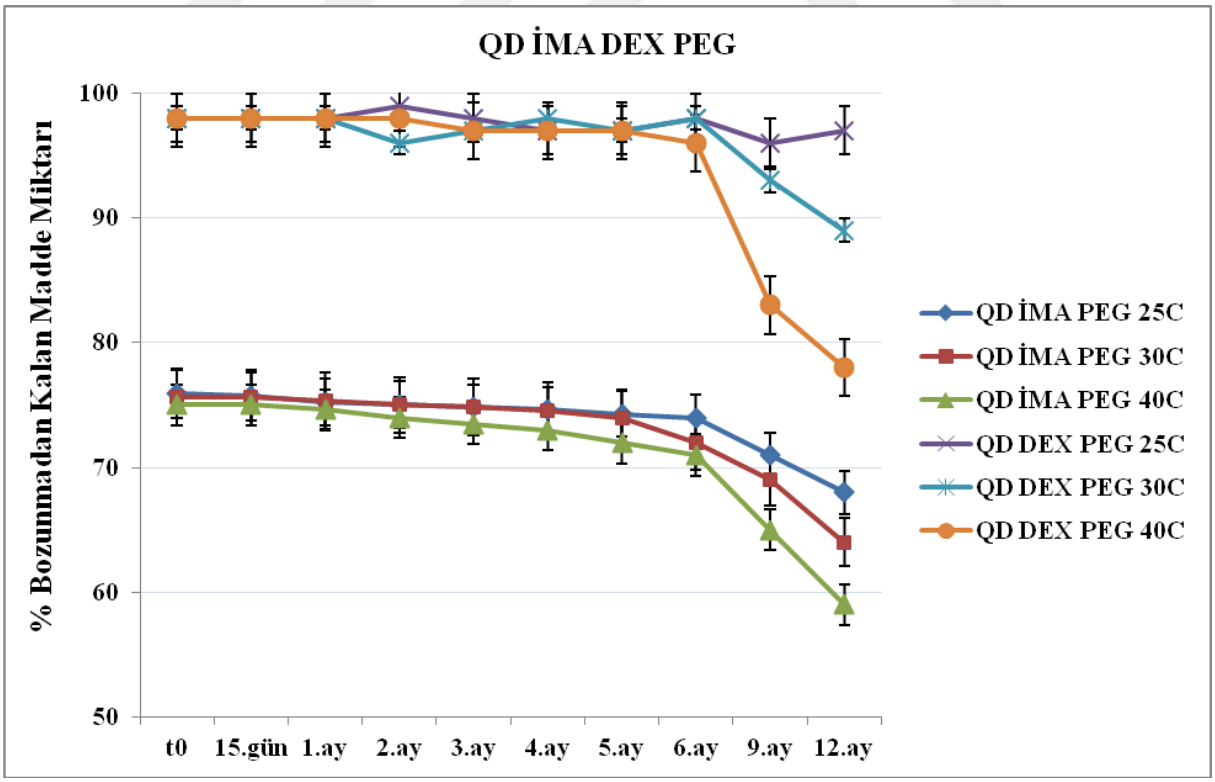
Şekil 4.105. QD-ERLO-PEG formülasyonuna ait zeta potansiyeli değişimi



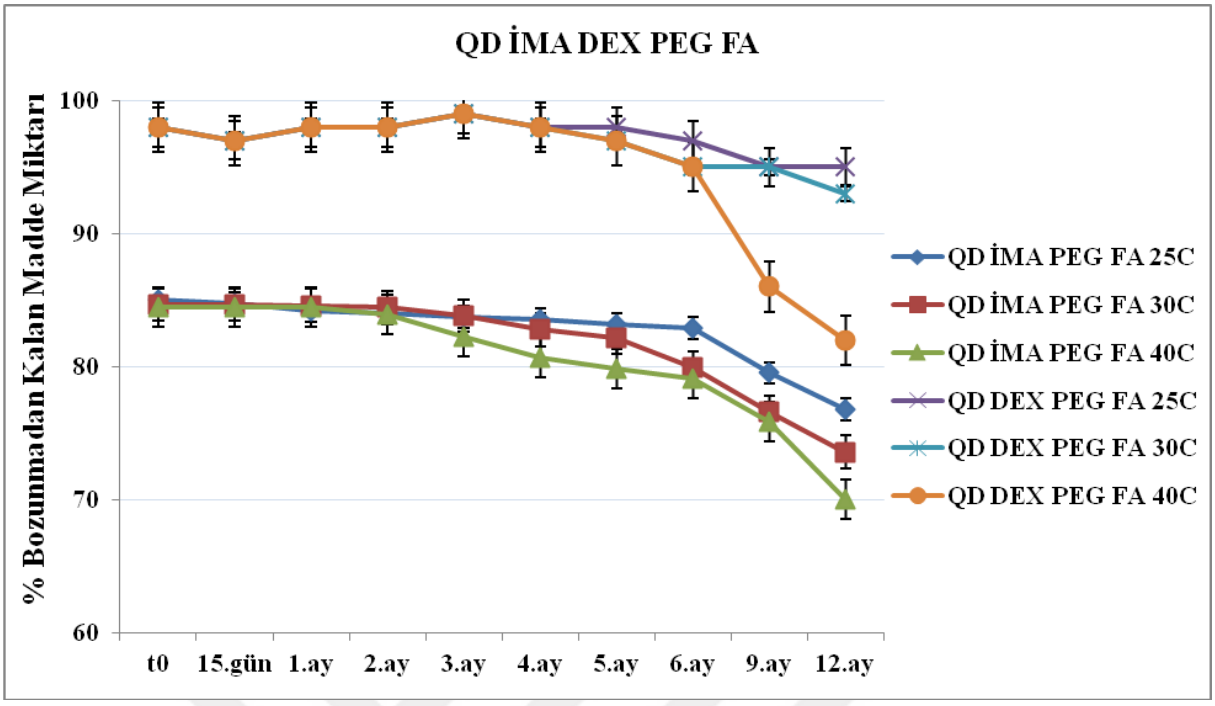
Şekil 4.106. QD-ERLO-PEG-FA formülasyonuna ait zeta potansiyeli değişimi



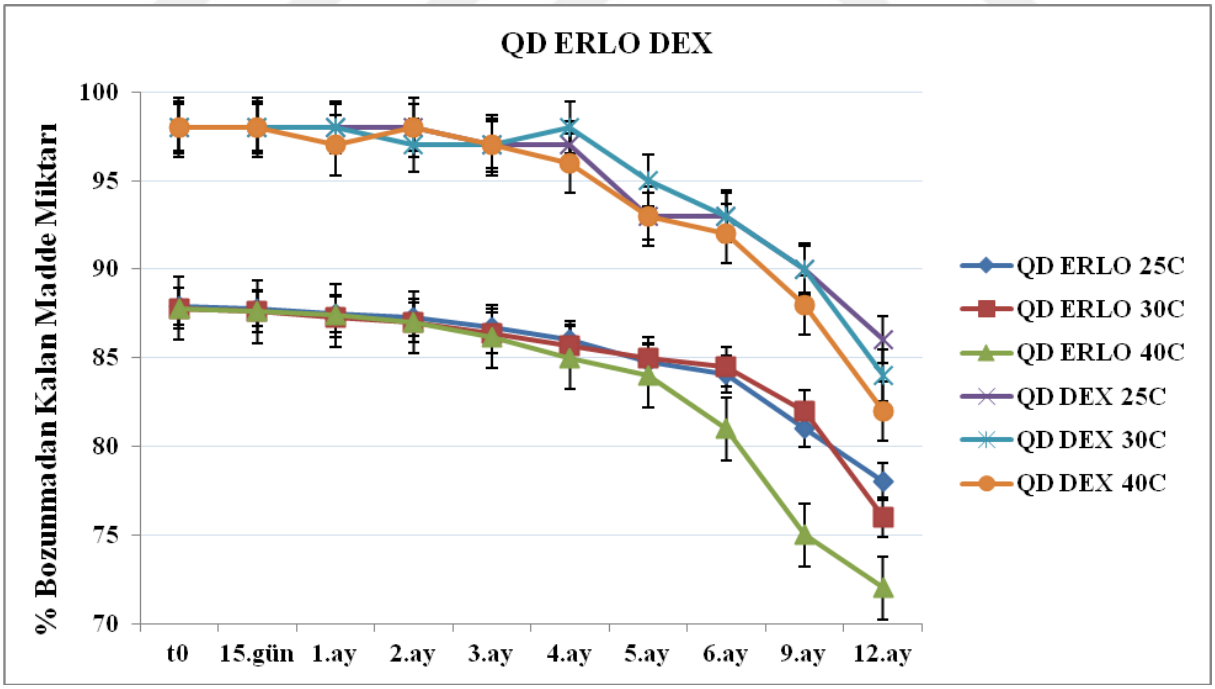
Şekil 4.107. QD-İMA formülasyonunda bozunmadan kalan etkin madde miktarının zamana göre değişimi



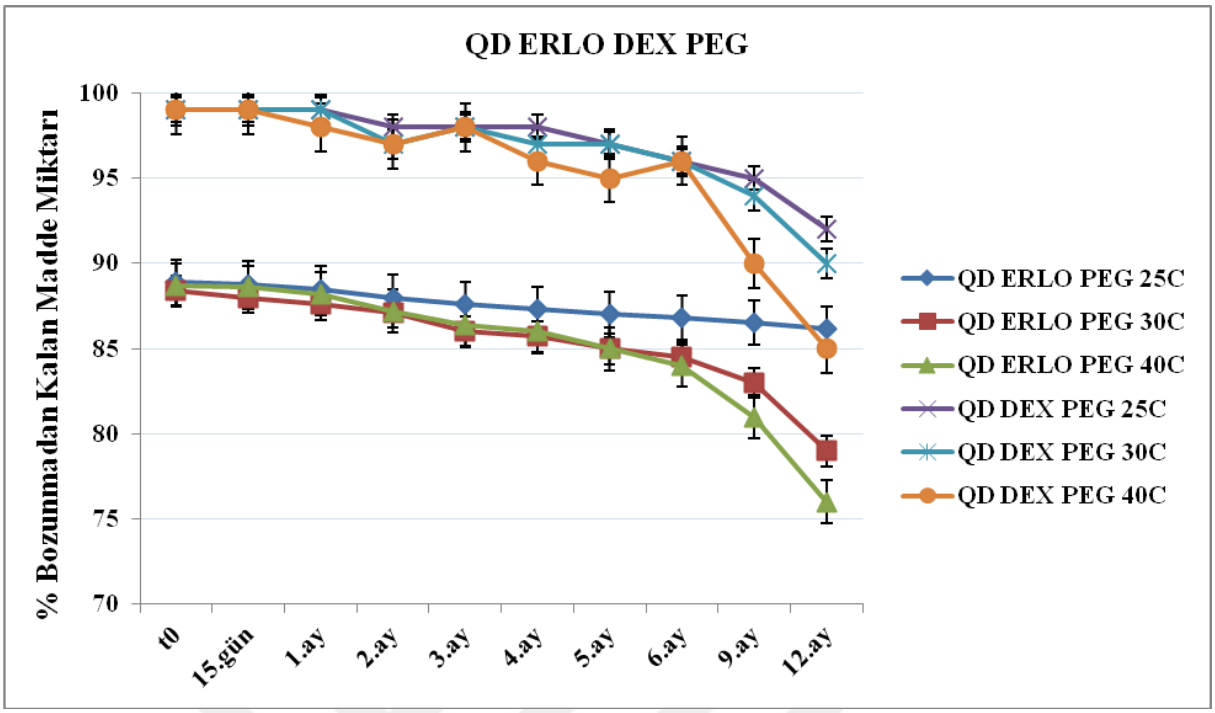
Şekil 4.108. QD-İMA-PEG formülasyonunda bozunmadan kalan etkin madde miktarının zamana göre değişimi



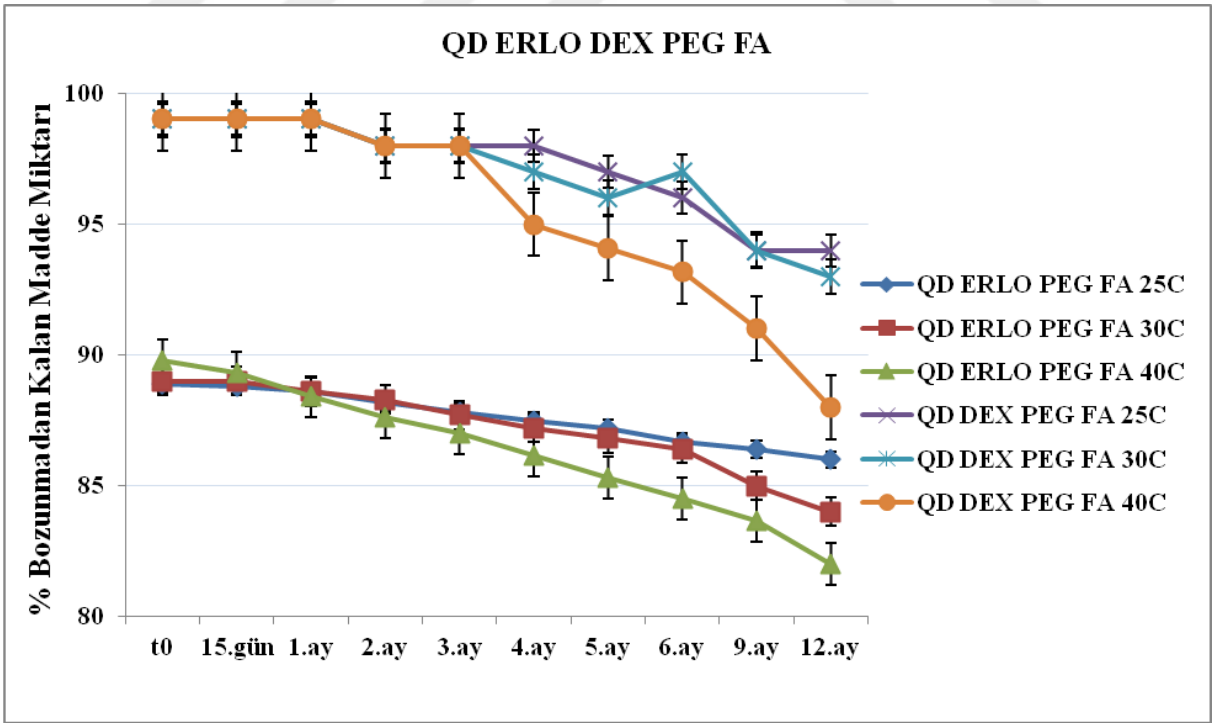
Şekil 4.109. QD-İMA-PEG-FA formülasyonunda bozunmadan kalan etkin madde miktarının zamana göre değişimi



Şekil 4.110. QD-ERLO formülasyonunda bozunmadan kalan etkin madde miktarının zamana göre değişimi

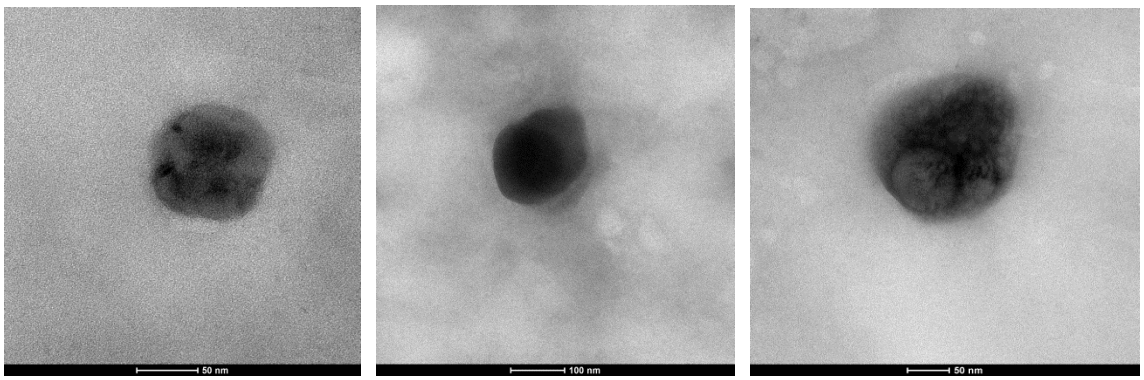


Şekil 4.111. QD-ERLO-PEG formülasyonunda bozunmadan kalan etkin madde miktarının zamana göre değişimi

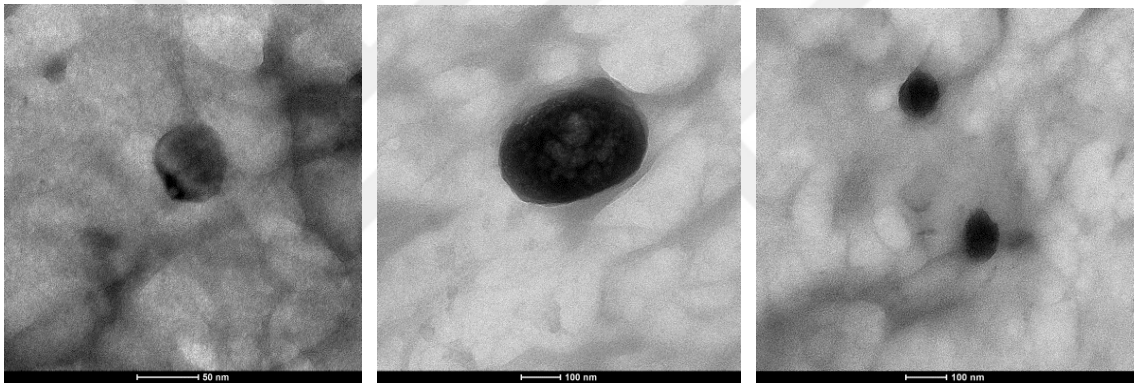


Şekil 4.112. QD-ERLO-PEG-FA formülasyonunda bozunmadan kalan etkin madde miktarının zamana göre değişimi

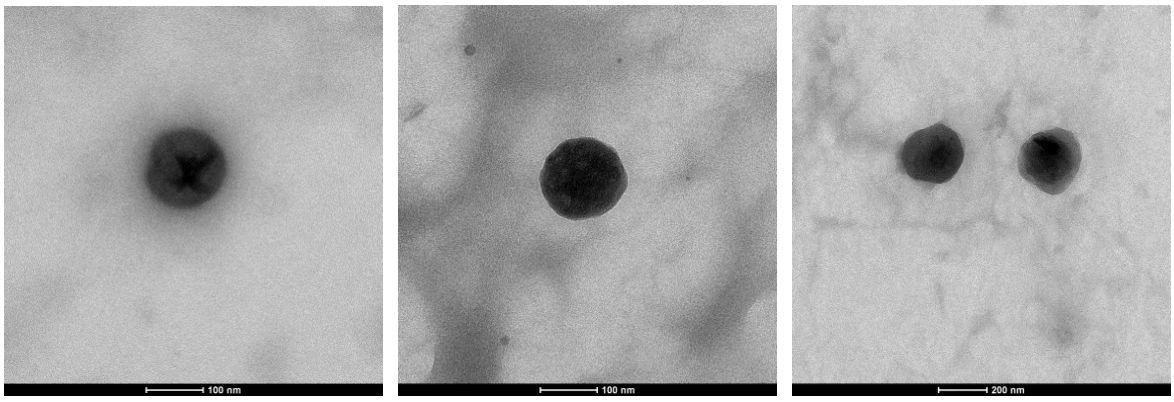
Formülasyonların onikinci ay sonunda alınan TEM görüntüleri aşağıda yer almaktadır.



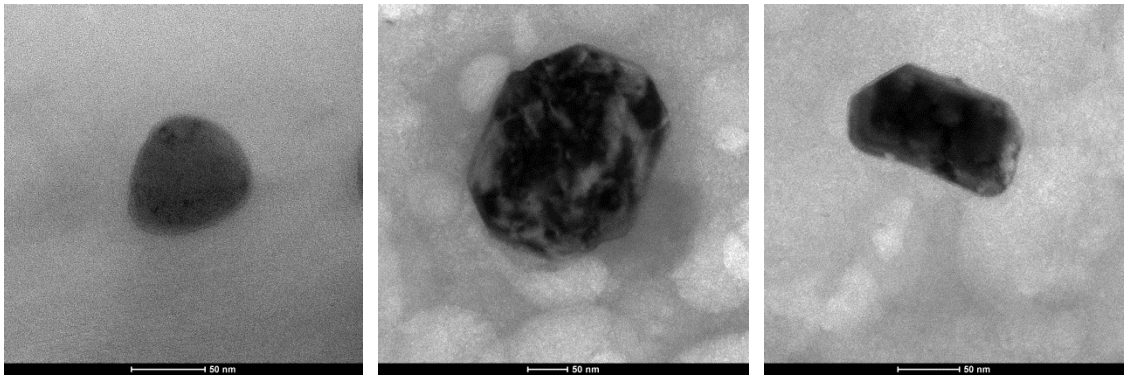
Resim 4.38. QD-İMA formülasyonuna ait farklı sıcaklıklardaki TEM görüntüleri (sol: 25ºC (x150000), orta: 30ºC (x68000), sağ: 40ºC (x98000))



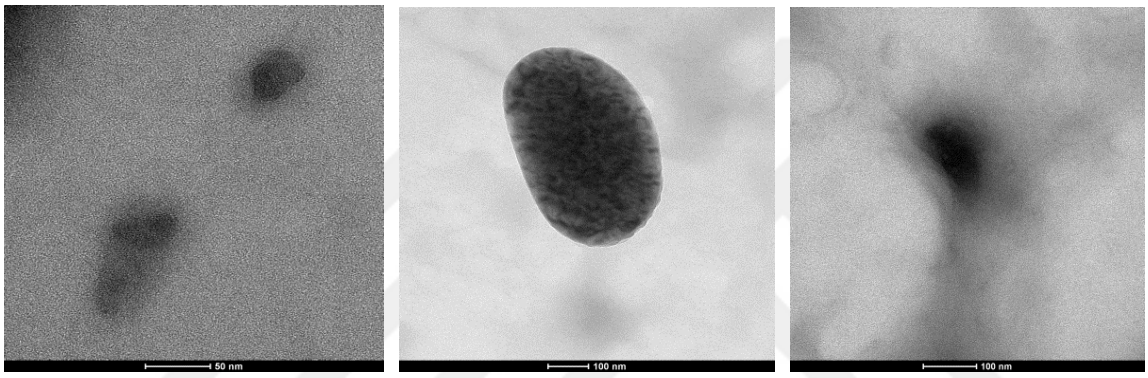
Resim 4.39. QD-İMA-PEG formülasyonuna ait farklı sıcaklıklardaki TEM görüntüleri (sol: 25ºC (x150000), orta: 30ºC (x49000), sağ: 40ºC (x49000))



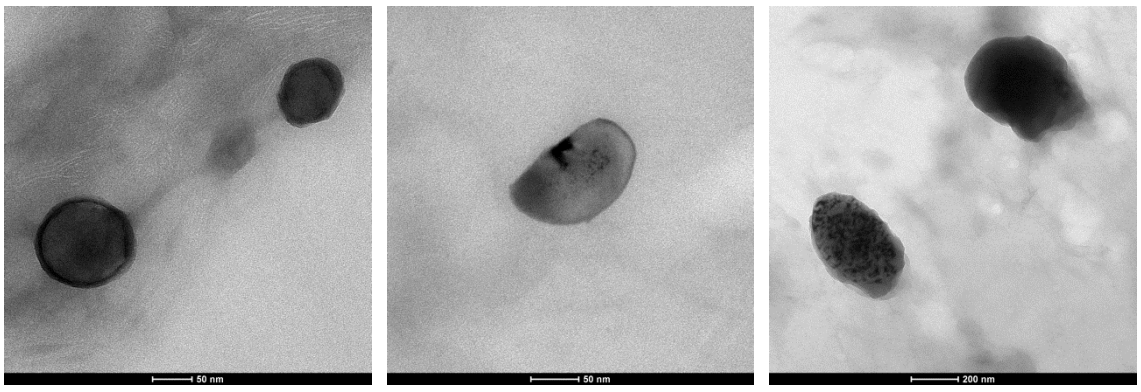
Resim 4.40. QD-İMA-PEG-FA formülasyonuna ait farklı sıcaklıklardaki TEM görüntüleri (sol: 25ºC (x68000), orta: 30ºC (x68000), sağ: 40ºC (x30000))



Resim 4.41. QD-ERLO formülasyonuna ait farklı sıcaklıklardaki TEM görüntüleri (sol: 25ºC (x180000), orta: 30ºC (x98000), sağ: 40ºC (x150000))



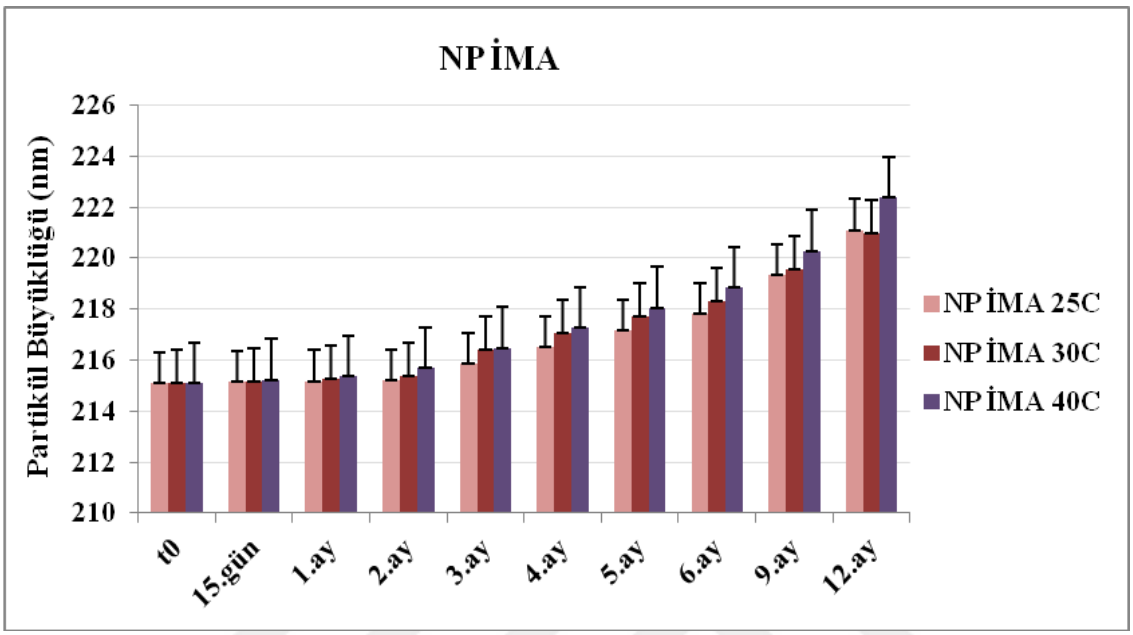
Resim 4.42. QD-ERLO-PEG formülasyonuna ait farklı sıcaklıklardaki TEM görüntüleri (sol: 25ºC (x150000), orta: 30ºC (x49000), sağ: 40ºC (x68000))



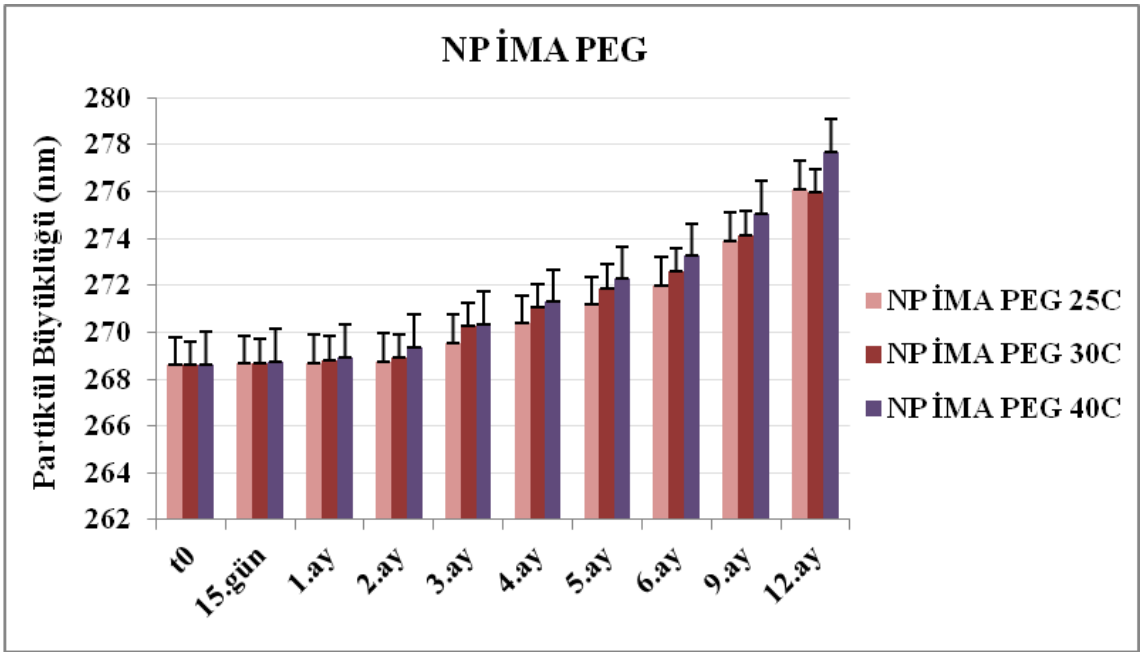
Resim 4.43. QD-ERLO-PEG-FA formülasyonuna ait farklı sıcaklıklardaki TEM görüntüleri (sol: 25ºC (x98000), orta: 30ºC (x120000), sağ: 40ºC (x30000))

4.5.2. Nanopartiküllerde yapılan stabilite testlerine ait bulgular

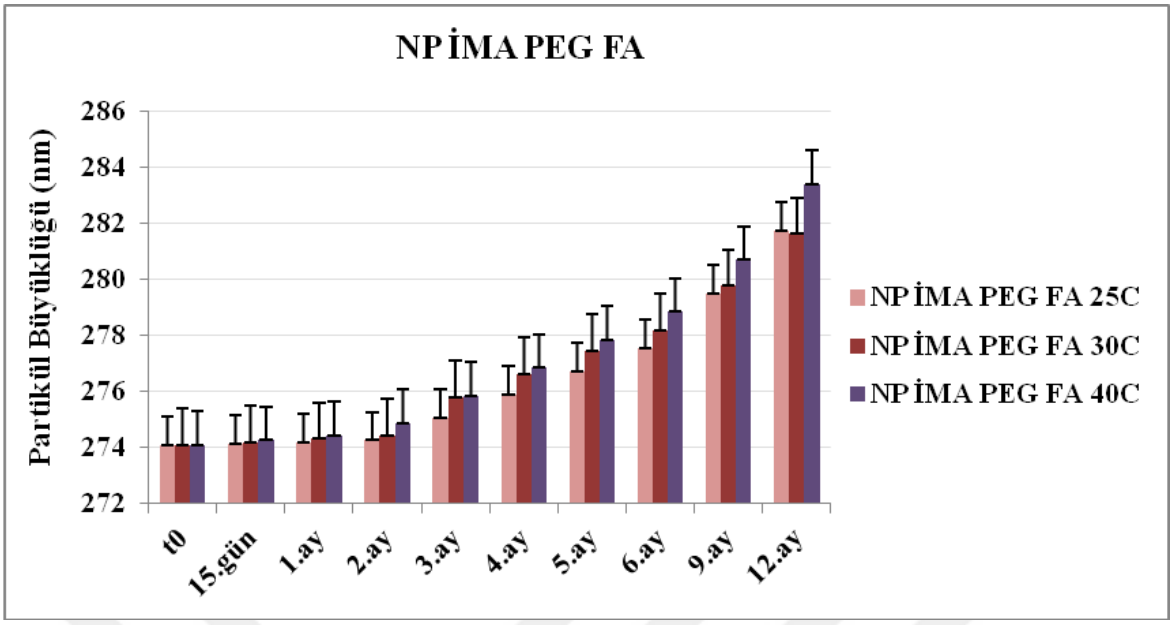
NP-İMA, NP-İMA-PEG, NP-İMA-PEG-FA, NP-ERLO, NP-ERLO-PEG ve NP-ERLO-PEG-FA formülasyonlarında 25,30 ve 40ºC sıcaklıklarda stabilite çalışmaları sürdürülmüştür.



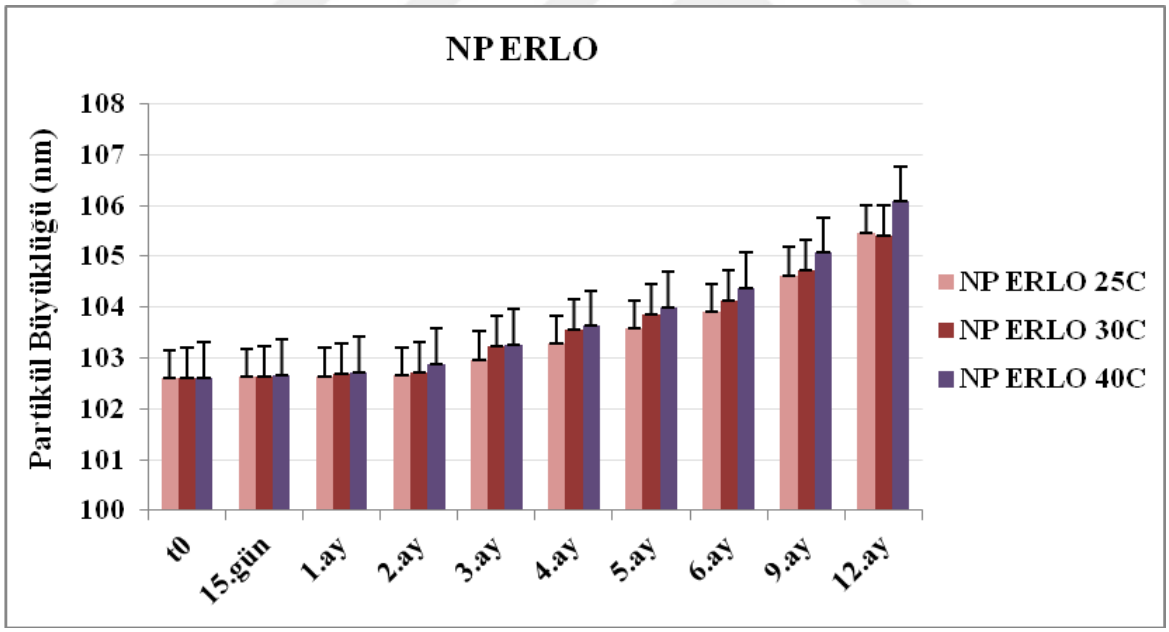
Şekil 4.113. İmatinib mesilat – Deksketoprofen trometamol içeren PEG'siz nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü değişimi



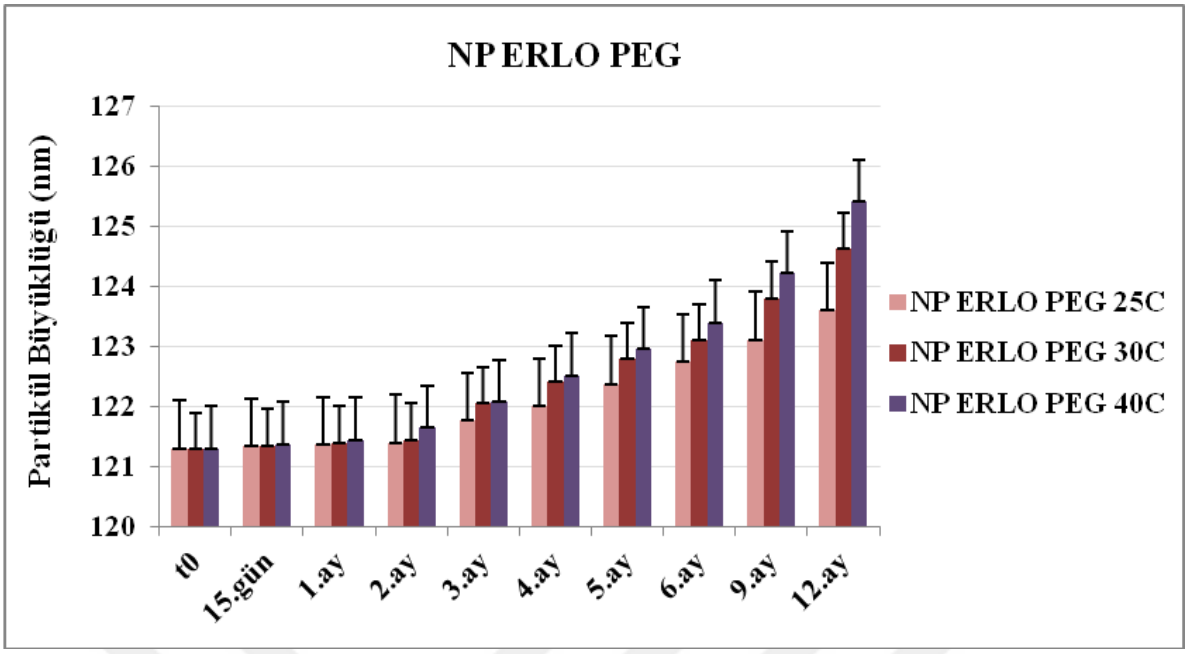
Şekil 4.114. İmatinib mesilat – Deksketoprofen trometamol içeren PEG'ile nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü değişimi



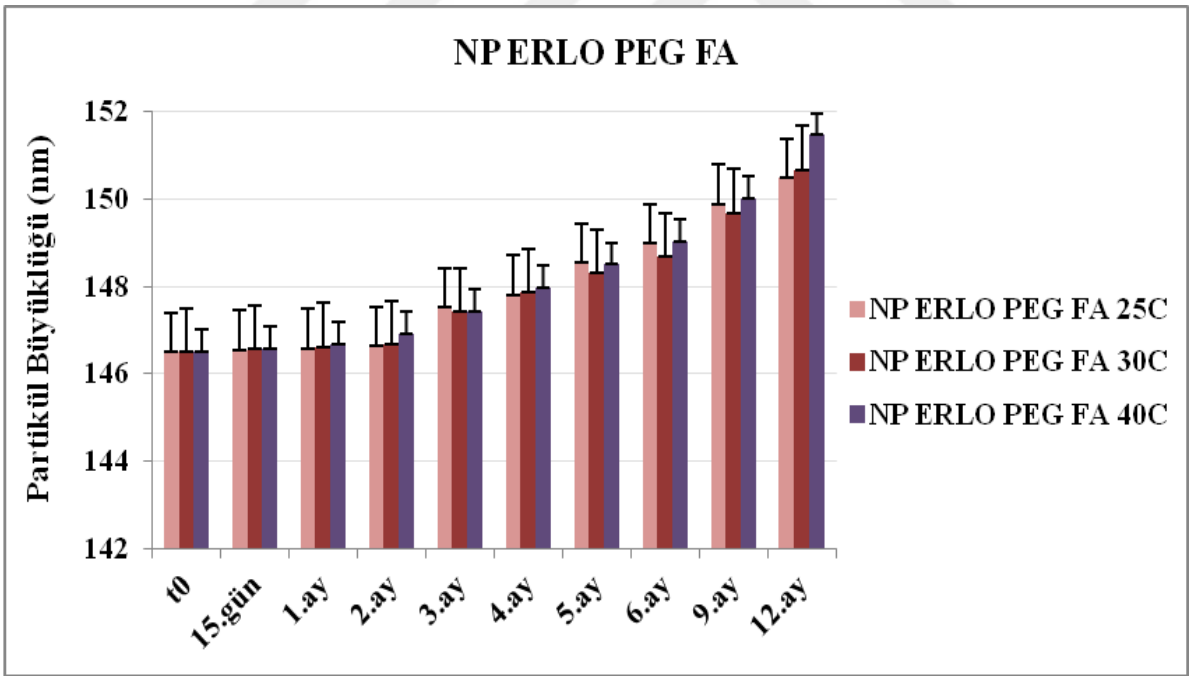
Şekil 4.115. İmatinib mesilat – Deksketoprofen trometamol içeren PEG-FA'lı nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü değişimi



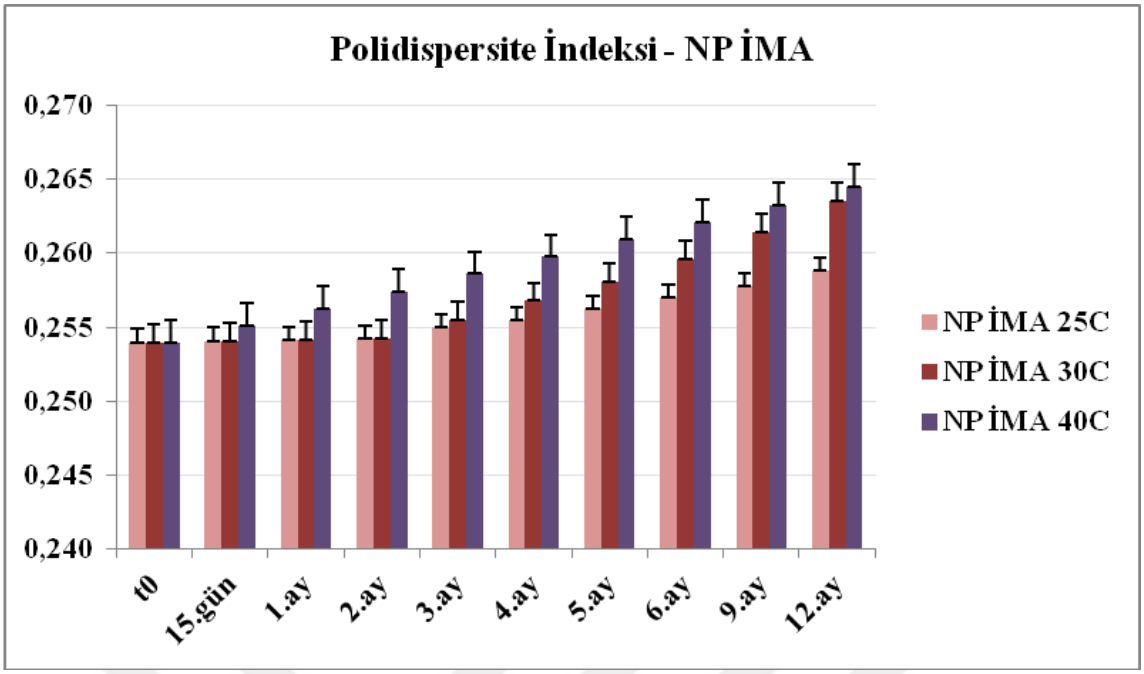
Şekil 4.116. Erlotinib HCl-Deksketoprofen trometamol içeren PEG'siz nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü değişimi



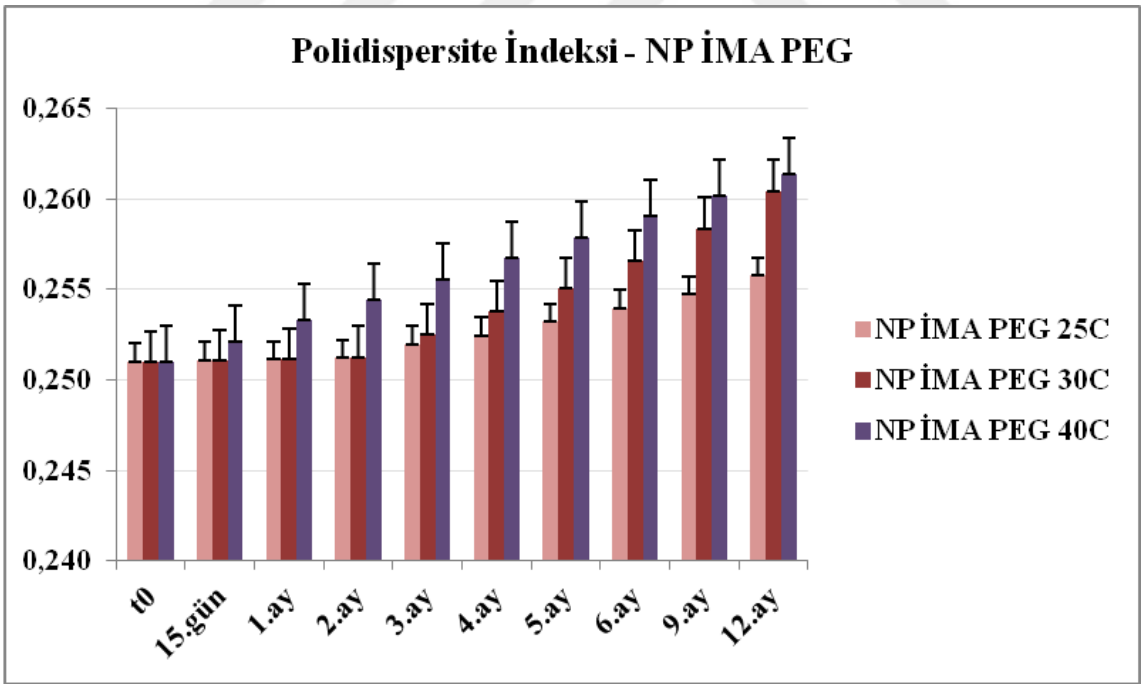
Şekil 4.117. Erlotinib HCl-Deksketoprofen trometamol içeren PEG'ile nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü değişimi



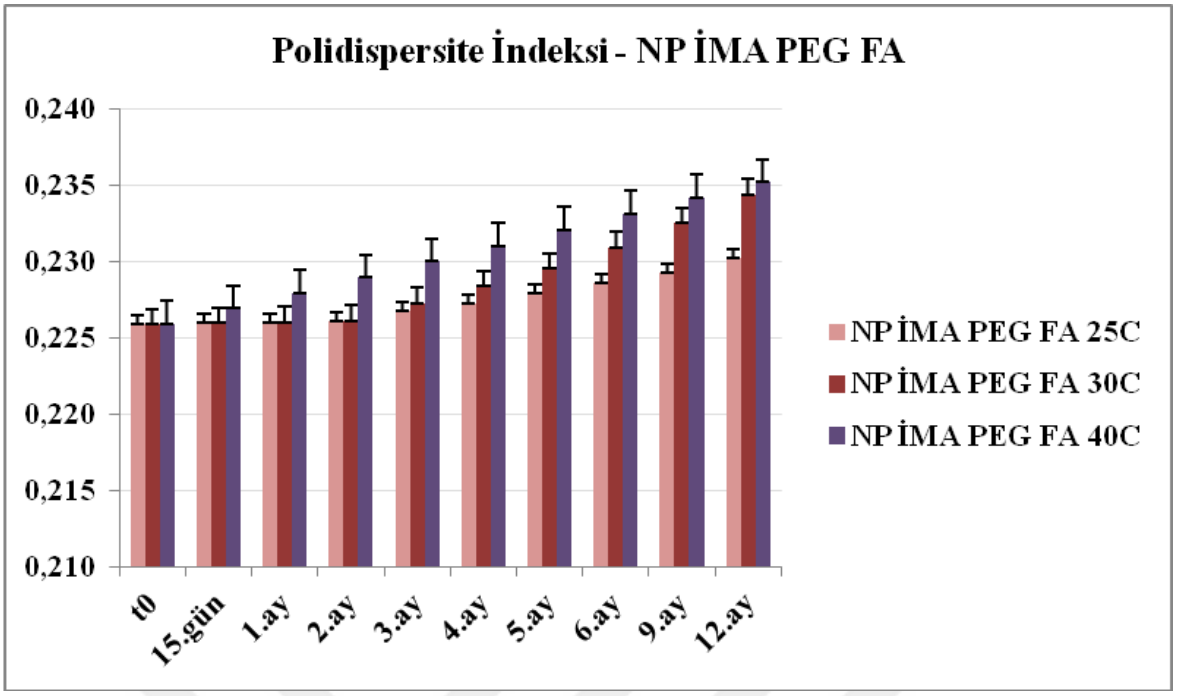
Şekil 4.118. Erlotinib HCl-Deksketoprofen trometamol içeren PEGFA'lı nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü değişimi



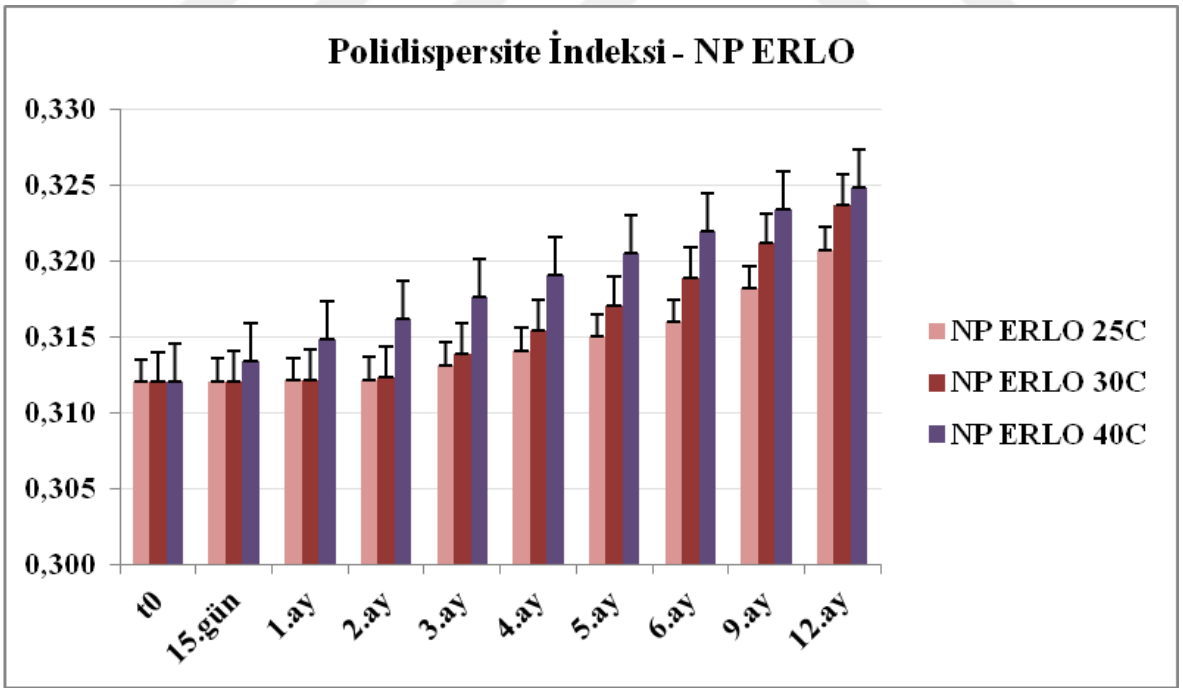
Şekil 4.119. İmatinib mesilat – Deksketoprofen trometamol içeren PEG'siz nanopartiküllere ait polidispersite indeksi değişimi



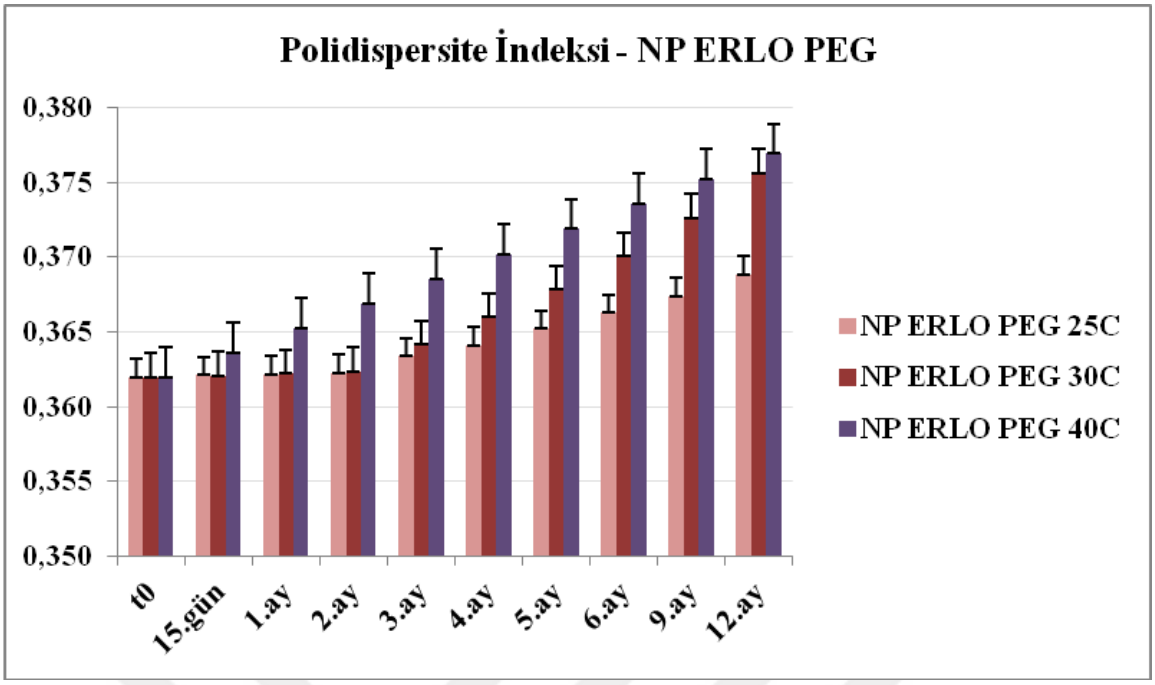
Şekil 4.120. İmatinib mesilat – Deksketoprofen trometamol içeren PEG'ile nanopartiküllere ait polidispersite indeksi değişimi



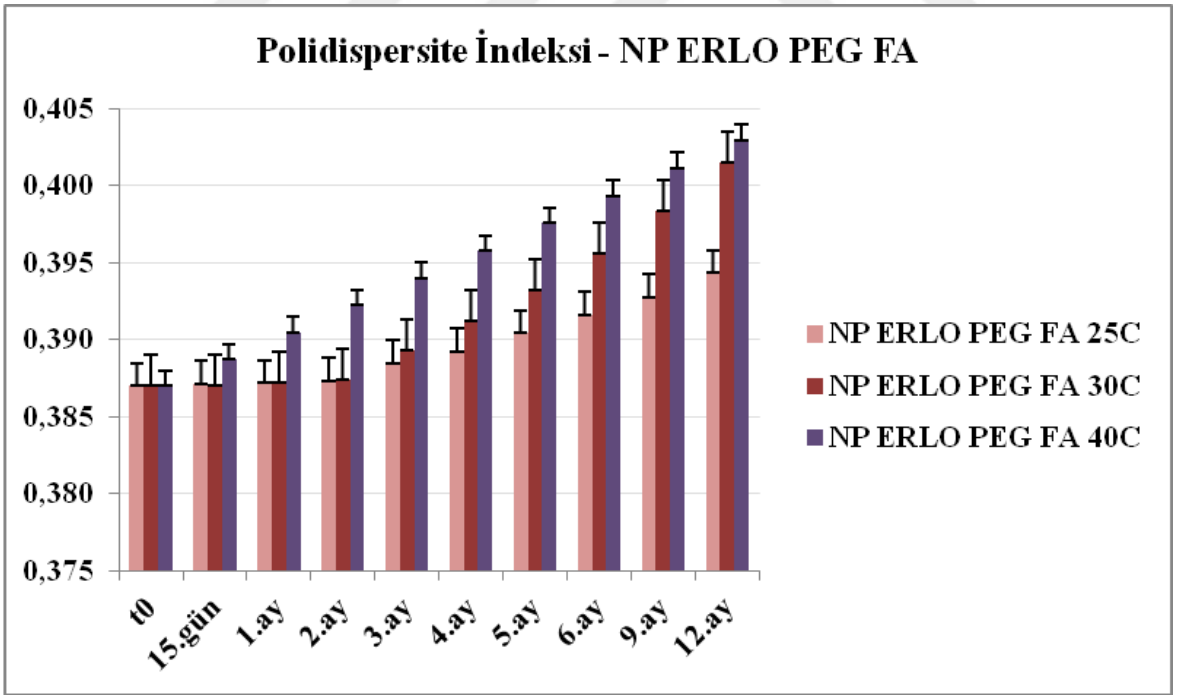
Şekil 4.121. İmatinib mesilat – Deksketoprofen trometamol içeren PEG-FA'lı nanopartiküllere ait polidispersite indeksi değişimi



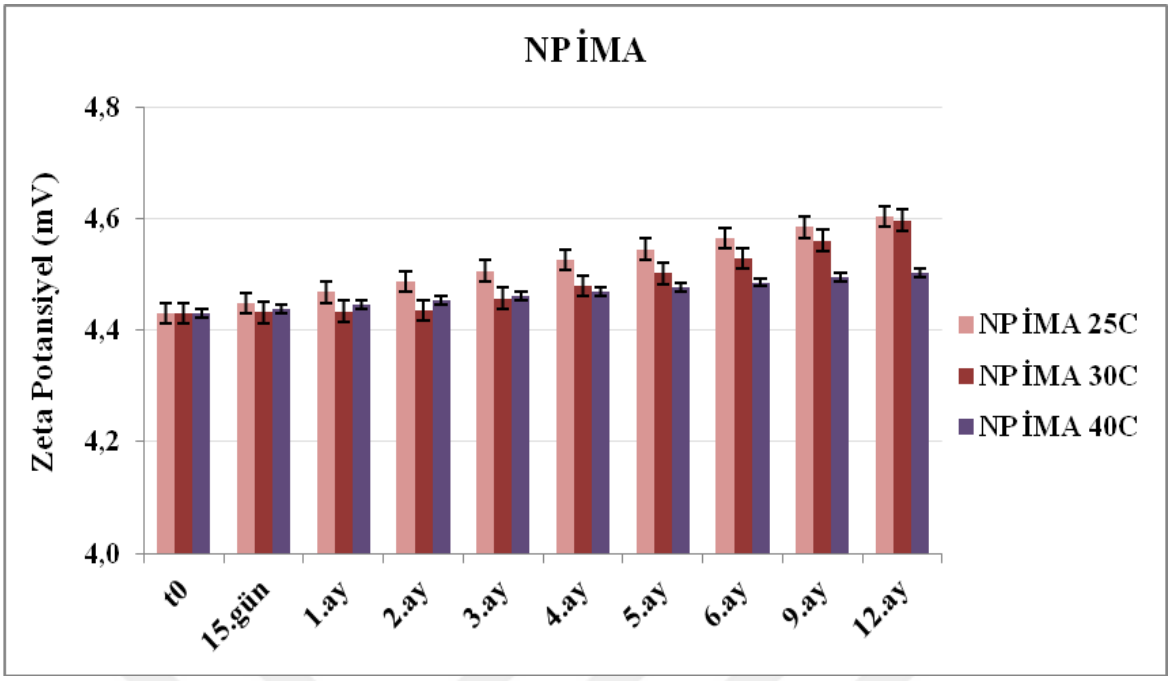
Şekil 4.122. Erlotinib HCl – Deksketoprofen trometamol içeren PEG'siz nanopartiküllere ait polidispersite indeksi değişimi



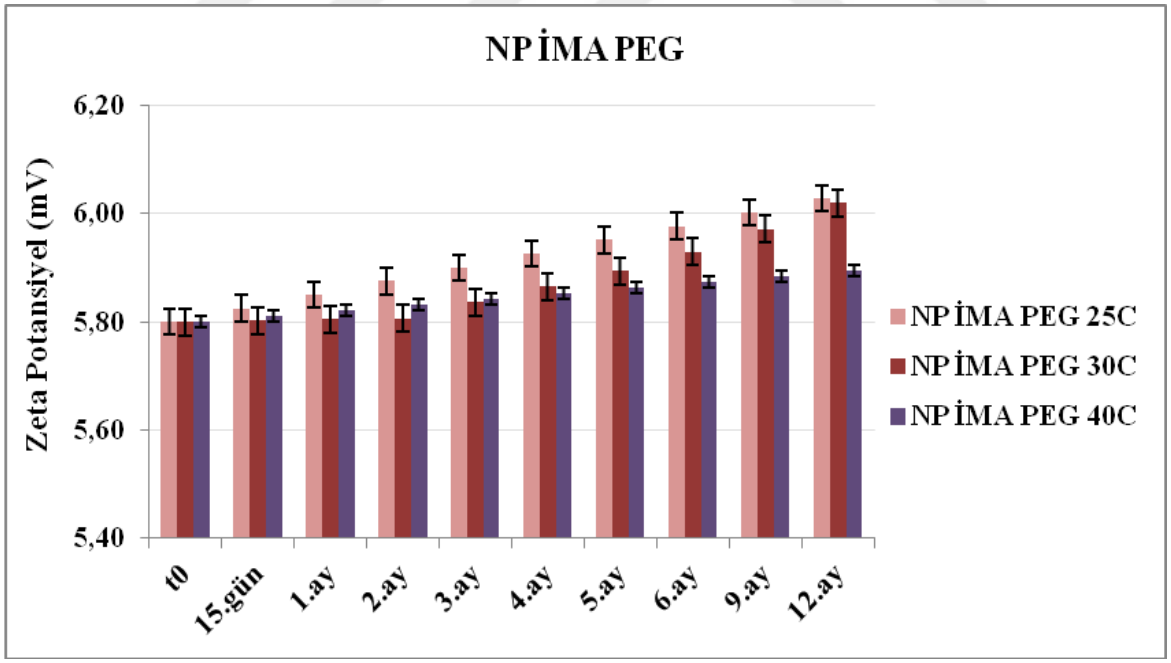
Şekil 4.123. Erlotinib HCl – Deksketoprofen trometamol içeren PEG'ile nanopartiküllere ait polidispersite indeksi değişimi



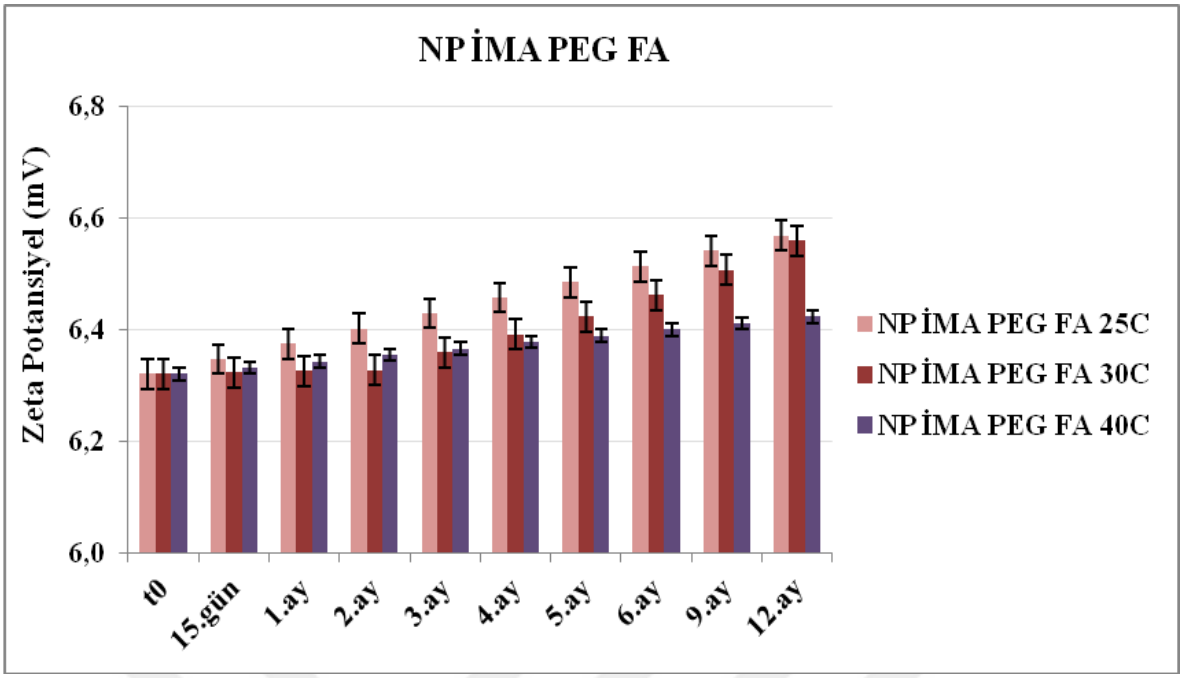
Şekil 4.124. Erlotinib HCl – Deksketoprofen trometamol içeren PEGFA'lı nanopartiküllere ait polidispersite indeksi değişimi



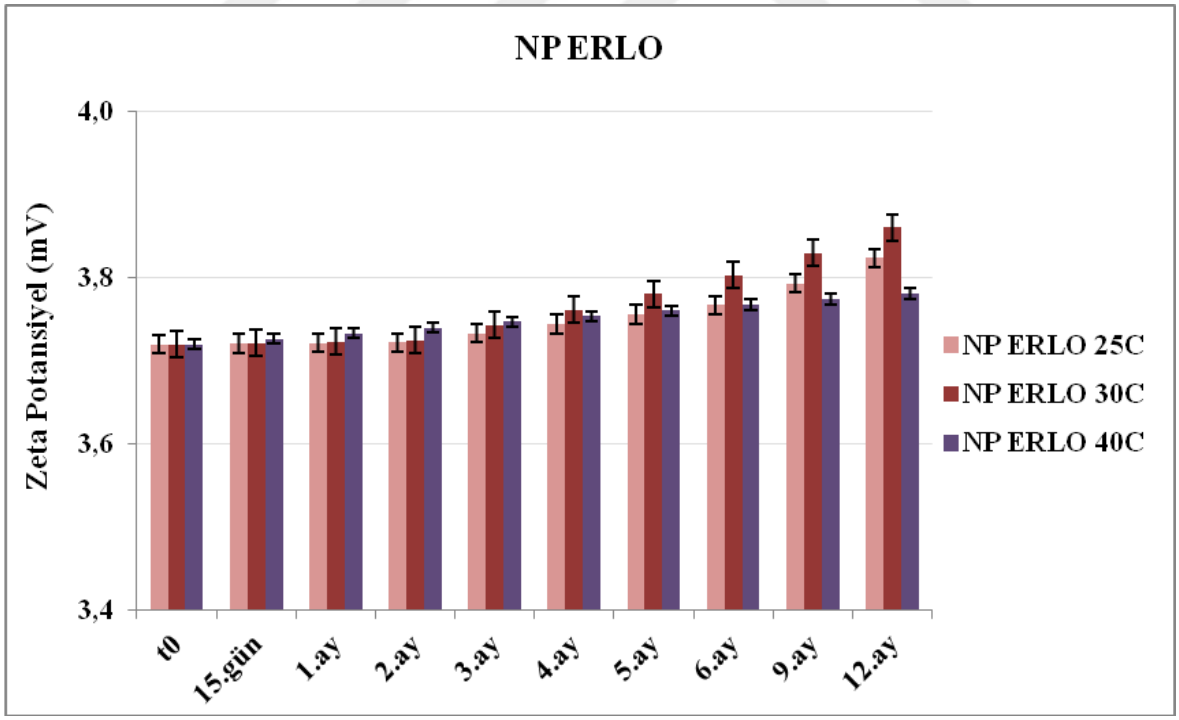
Şekil 4.125. İmatinib mesilat – Deksketoprofen trometamol içeren PEG'siz nanopartiküllere ait zeta potansiyeli değişimi



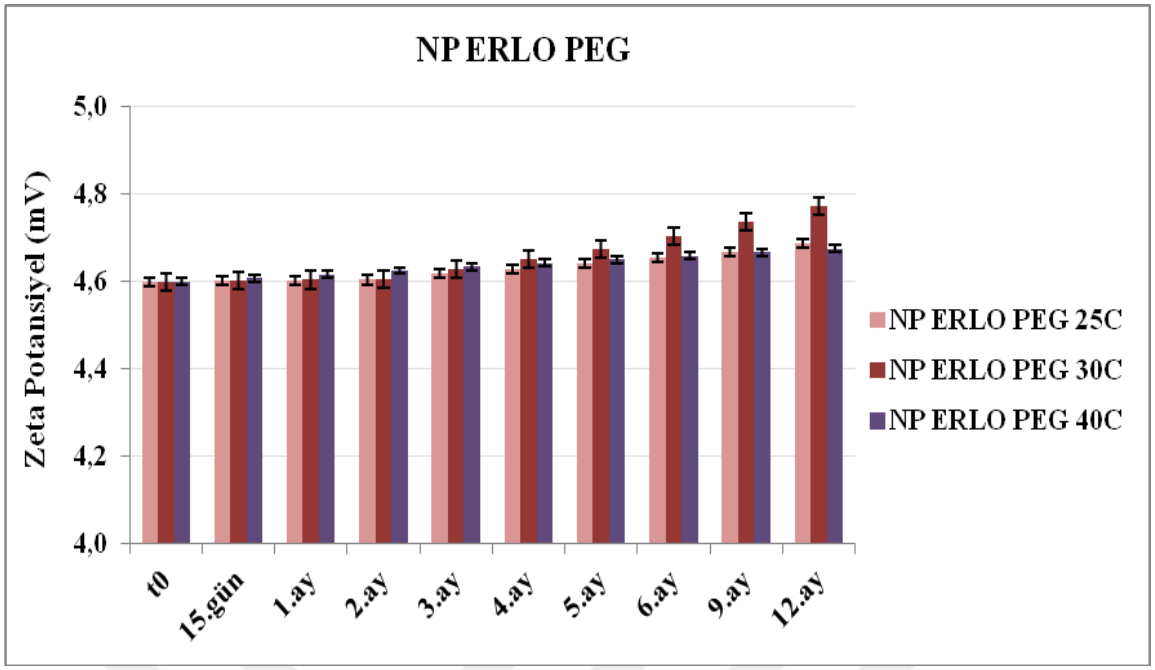
Şekil 4.126. İmatinib mesilat – Deksketoprofen trometamol içeren PEG'ile nanopartiküllere ait zeta potansiyeli değişimi



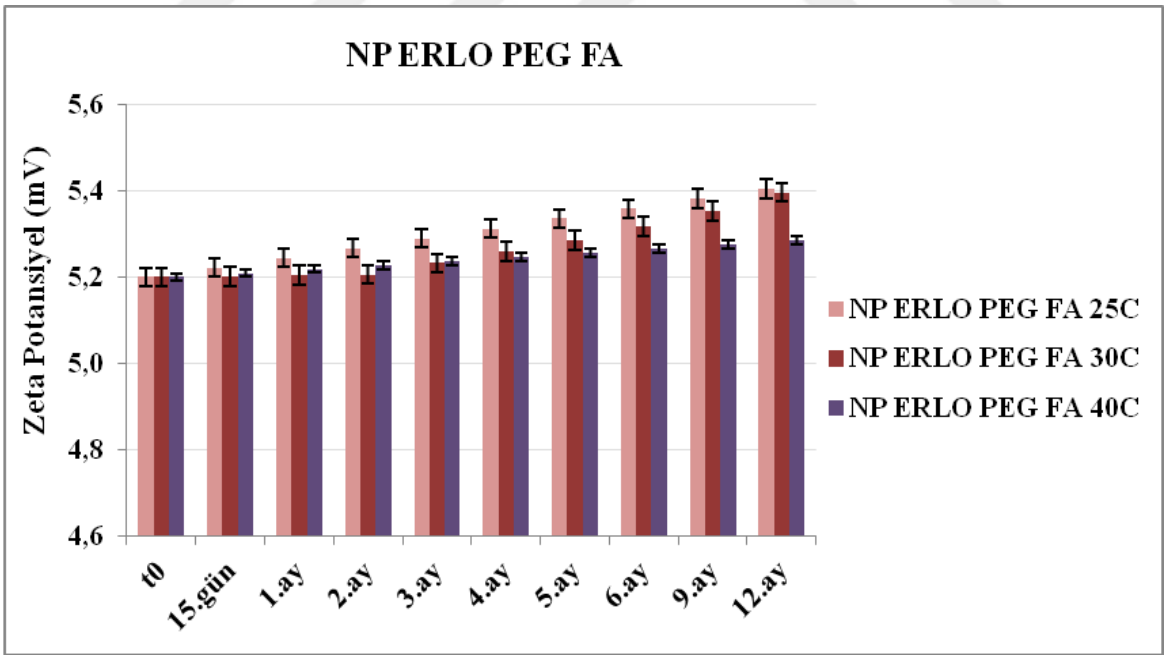
Şekil 4.127. İmatinib mesilat – Deksketoprofen trometamol içeren PEGFA'lı nanopartiküllere ait zeta potansiyeli değişimi



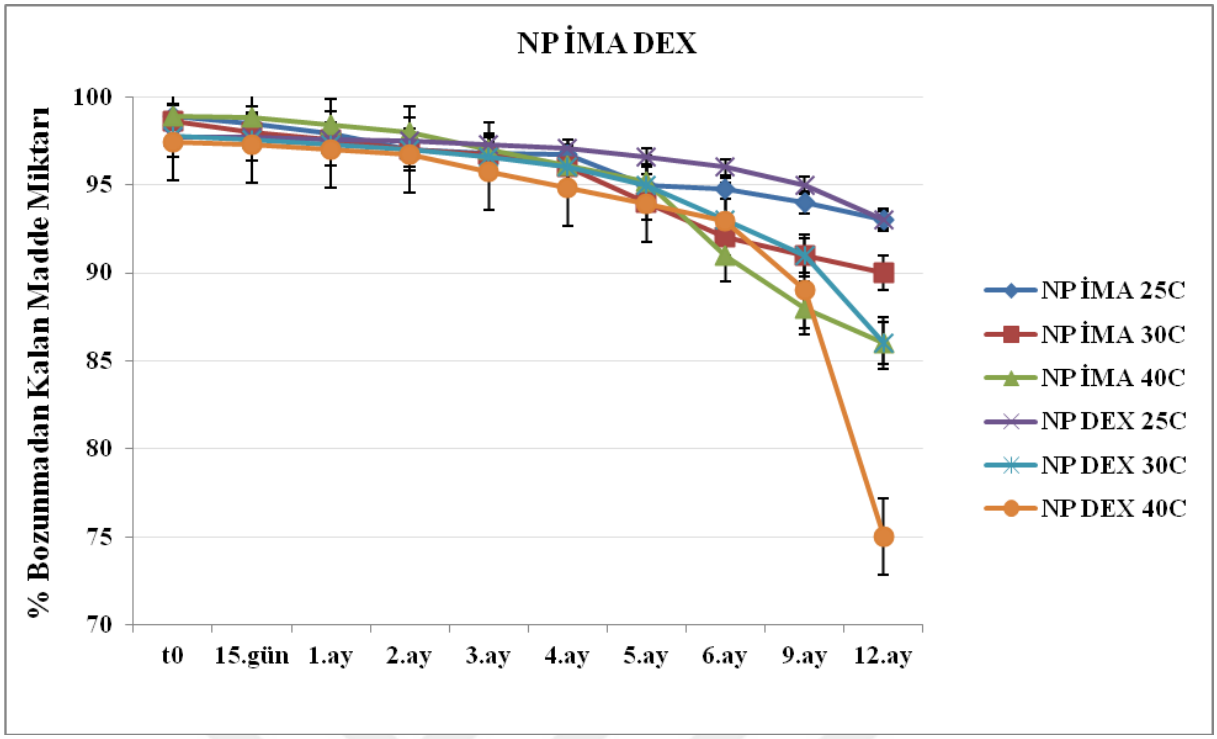
Şekil 4.128. Erlotinib HCl – Deksketoprofen trometamol içeren PEG'siz nanopartiküllere ait zeta potansiyeli değişimi



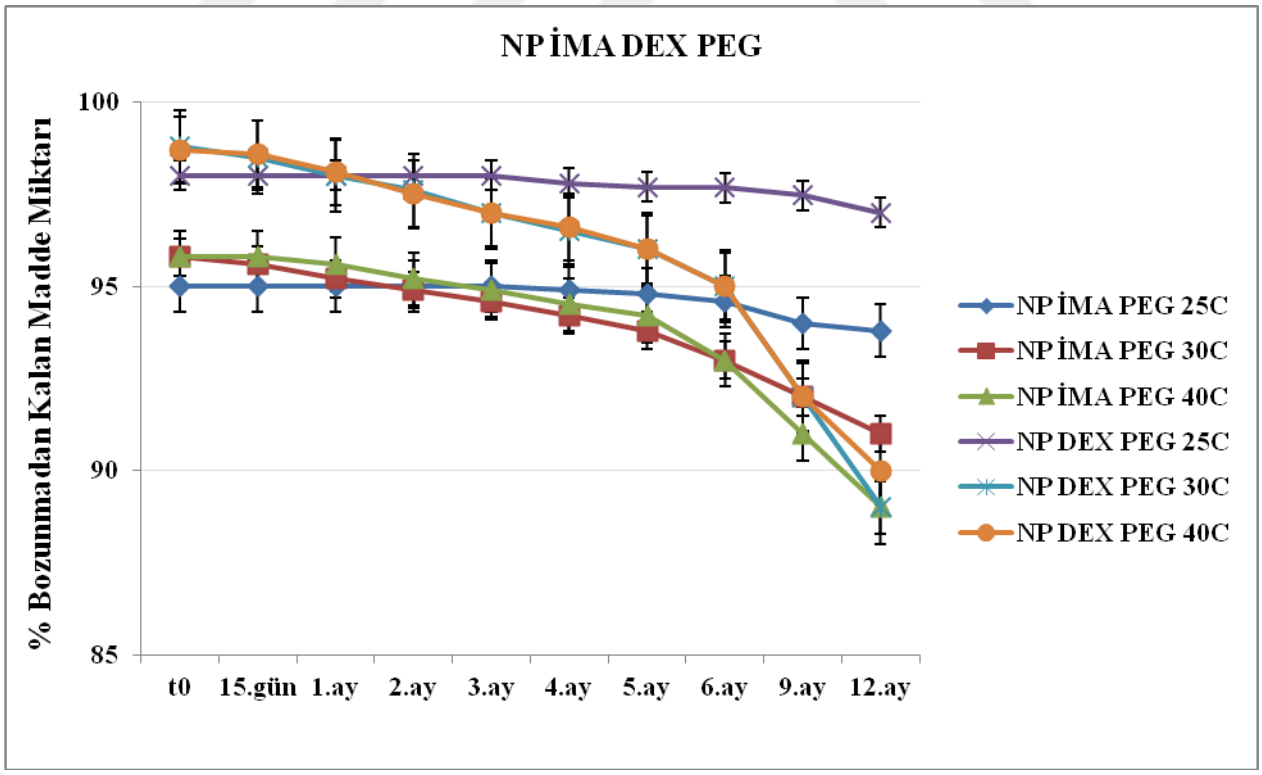
Şekil 4.129. Erlotinib HCl – Deksketoprofen trometamol içeren PEGile nanopartiküllere ait zeta potansiyeli değişimi



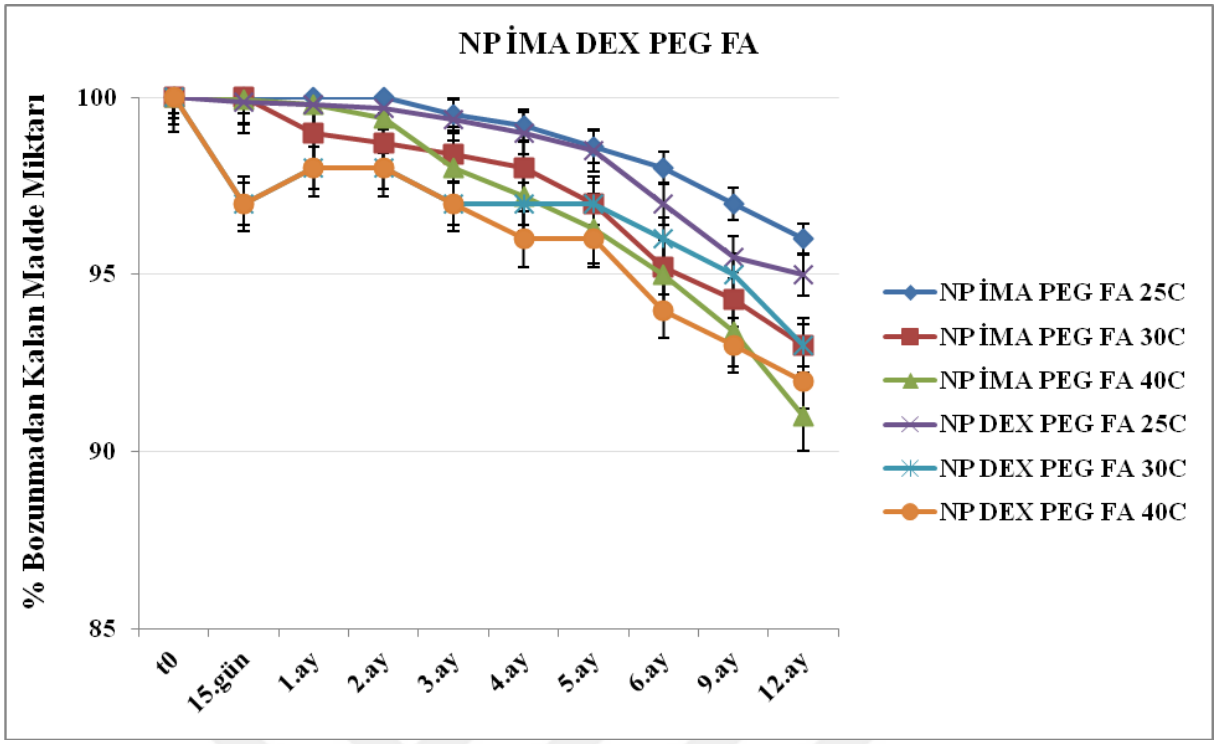
Şekil 4.130. Erlotinib HCl – Deksketoprofen trometamol içeren PEG-FA'lı nanopartiküllere ait zeta potansiyeli değişimi



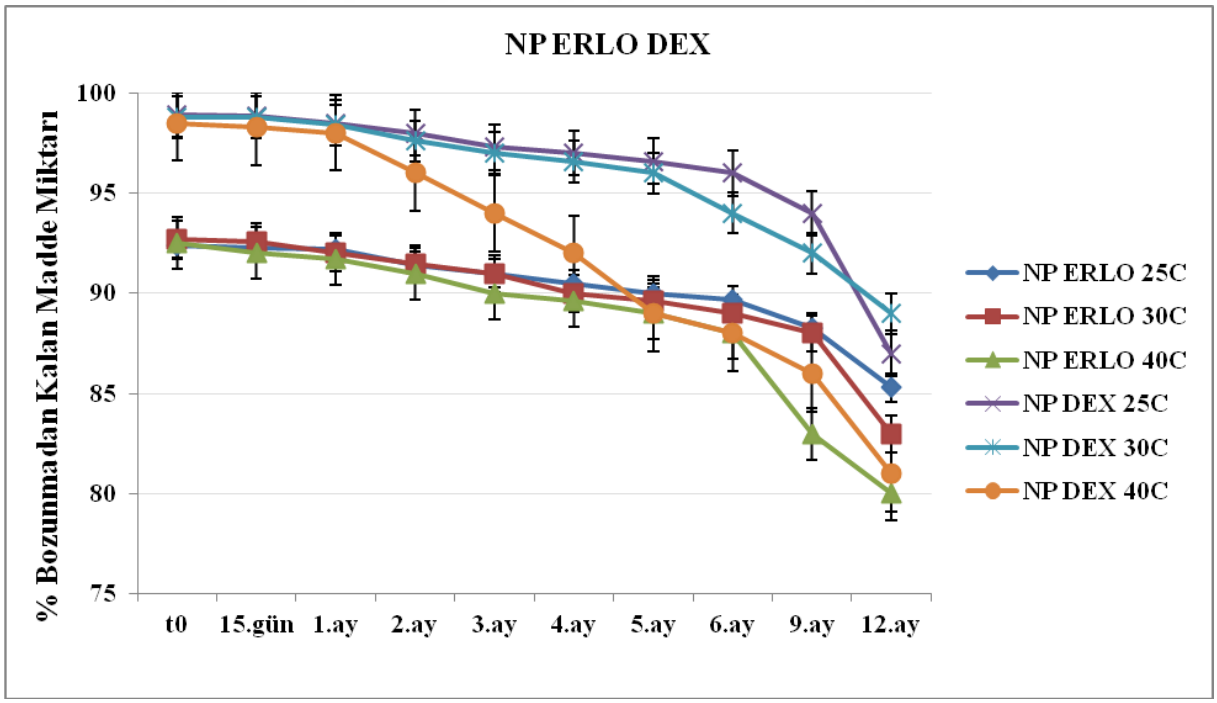
Şekil 4.131. İmatinib mesilat – Deksketoprofen trometamol içeren PEG'siz nanopartiküllerin içinde bozunmadan kalan etkin madde miktarının zamana göre değişimi



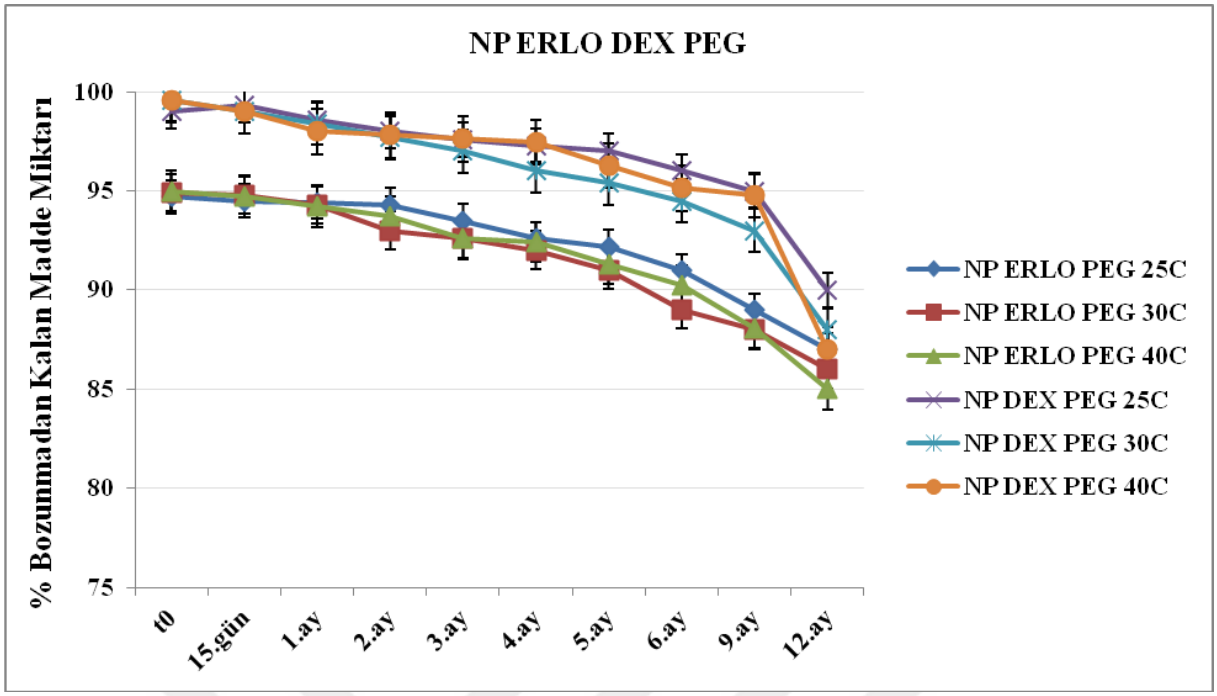
Şekil 4.132. İmatinib mesilat – Deksketoprofen trometamol içeren PEG'ile nanopartiküllerin içinde bozunmadan kalan etkin madde miktarının zamana göre değişimi



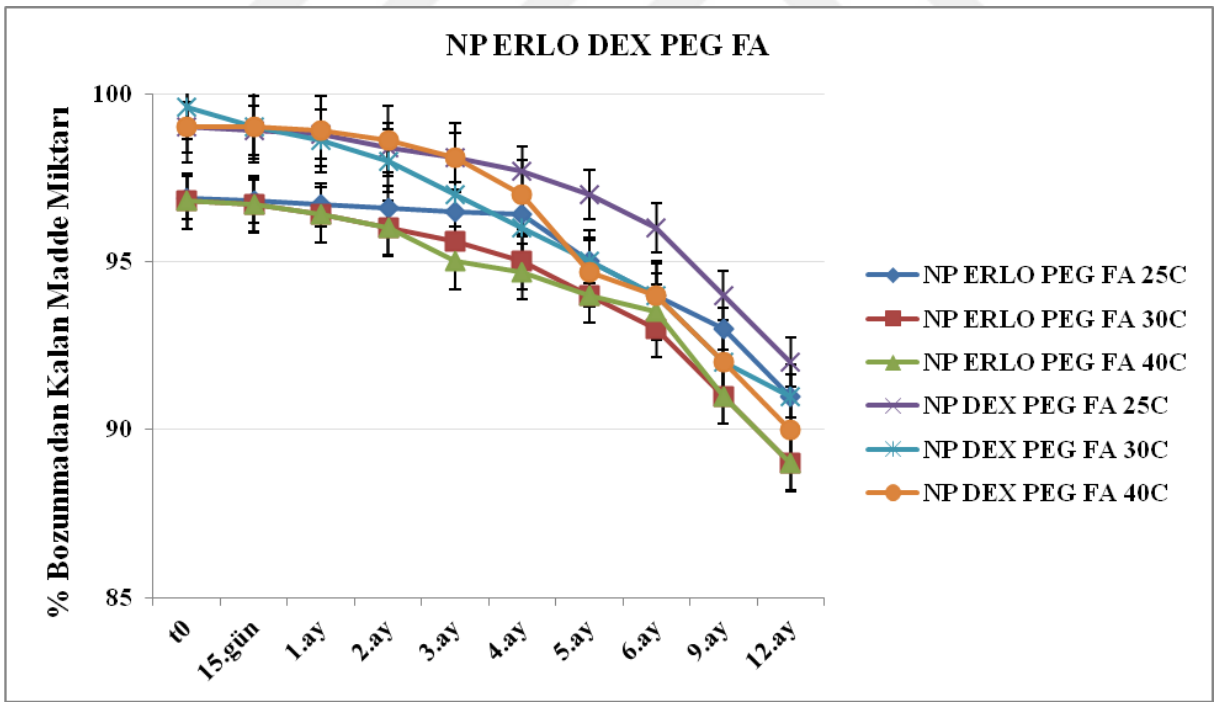
Şekil 4.133. İmatinib mesilat – Deksketoprofen trometamol içeren PEGFA'lı nanopartiküllerin içinde bozunmadan kalan etkin madde miktarının zamana göre değişimi



Şekil 4.134. Erlotinib HCl – Deksketoprofen trometamol içeren PEG'siz nanopartiküllerin içinde bozunmadan kalan etkin madde miktarının zamana göre değişimi

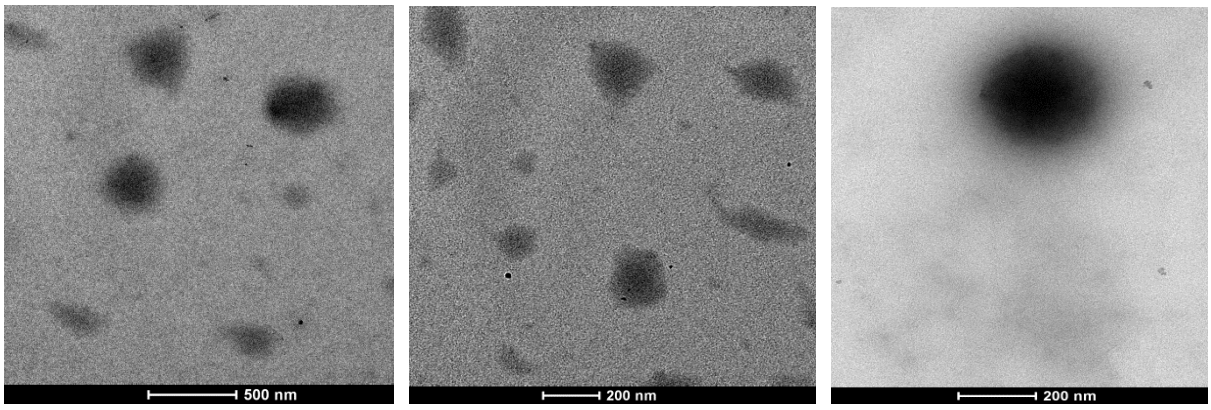


Şekil 4.135. Erlotinib HCl – Deksketoprofen trometamol içeren PEG'ile nanopartiküllerin içinde bozunmadan kalan etkin madde miktarının zamana göre değişimi

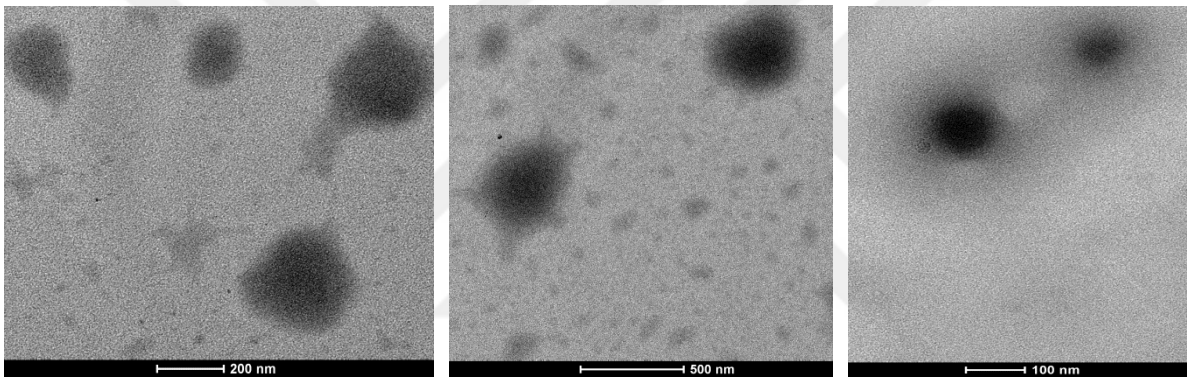


Şekil 4.136. Erlotinib HCl – Deksketoprofen trometamol içeren PEGFA'lı nanopartiküllerin içinde bozunmadan kalan etkin madde miktarının zamana göre değişimi

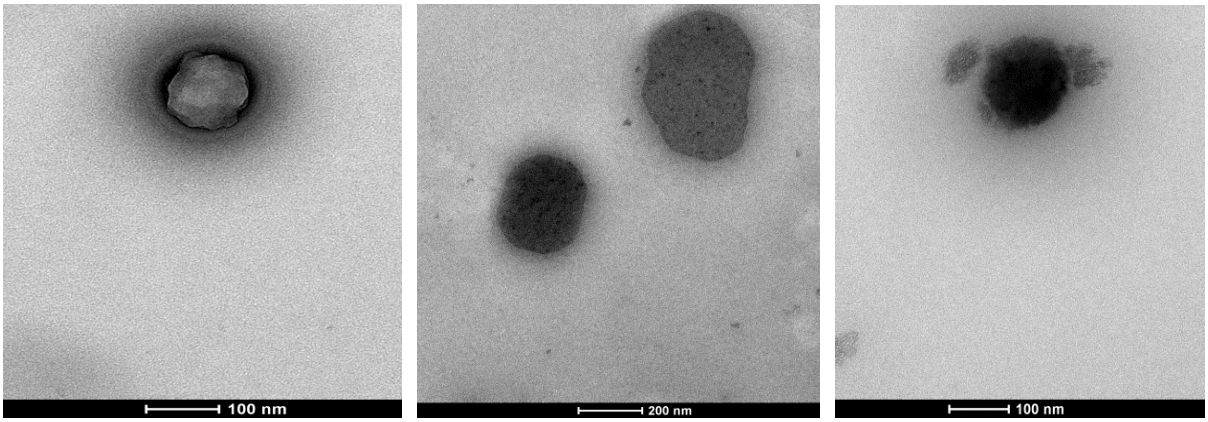
Formülasyonların on ikinci ay sonunda alınan TEM görüntüleri aşağıda yer almaktadır.



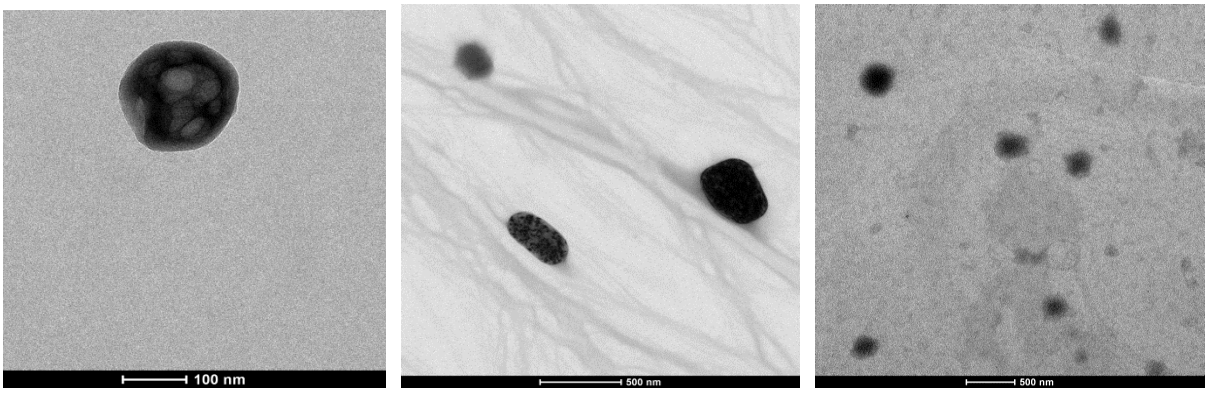
Resim 4.44. NP-İMA formülasyonuna ait farklı sıcaklıklardaki TEM görüntüleri (sol: 25ºC (x13000), orta: 30ºC (x23000), sağ: 40ºC (x30000))



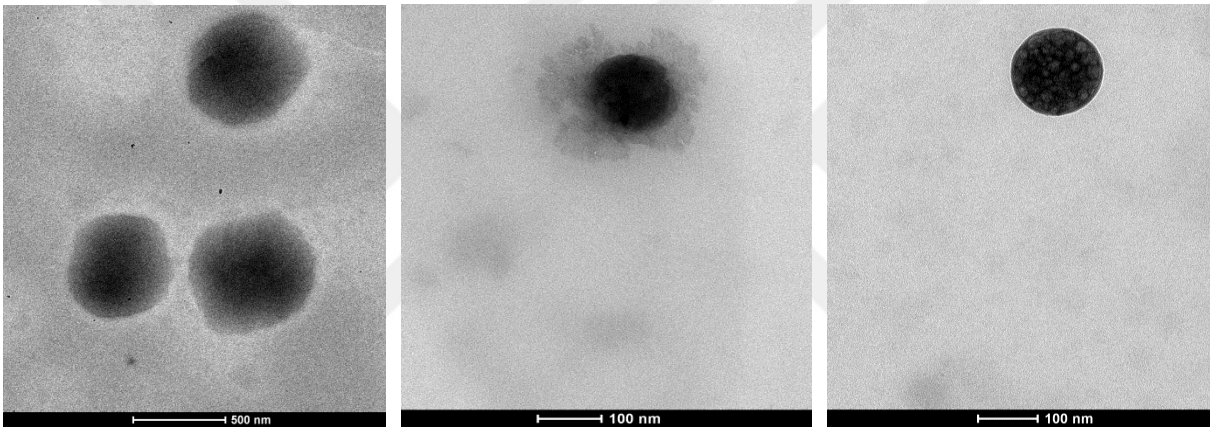
Resim 4.45. NP-İMA-PEG formülasyonuna ait farklı sıcaklıklardaki TEM görüntüleri (sol: 25ºC (x30000), orta: 30ºC (x18500), sağ: 40ºC (x49000))



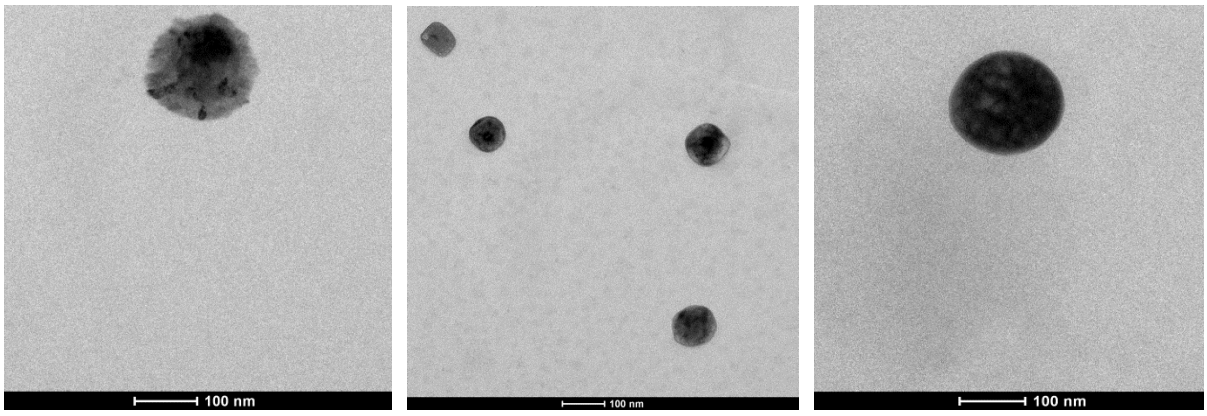
Resim 4.46. NP-İMA-PEG-FA formülasyonuna ait farklı sıcaklıklardaki TEM görüntüleri (sol: 25ºC (x49000), orta: 30ºC (x30000), sağ: 40ºC (x49000))



Resim 4.47. NP-ERLO formülasyonuna ait farklı sıcaklıklardaki TEM görüntüleri (sol: 25ºC (x11000), orta: 30ºC (x49000), sağ: 40ºC (x18500))



Resim 4.48. NP-ERLO-PEG formülasyonuna ait farklı sıcaklıklardaki TEM görüntüleri (sol: 25ºC (x18500), orta: 30ºC (x49000), sağ: 40ºC (x49000))



Resim 4.49. NP-ERLO-PEG-FA formülasyonuna ait farklı sıcaklıklardaki TEM görüntüleri (sol: 25ºC (x49000), orta: 30ºC (x49000), sağ: 40ºC (x49000)).

4.5.3. Nanotaşıyıcı sistemlerin raf ömürlerinin hesaplanmasına yönelik bulgular

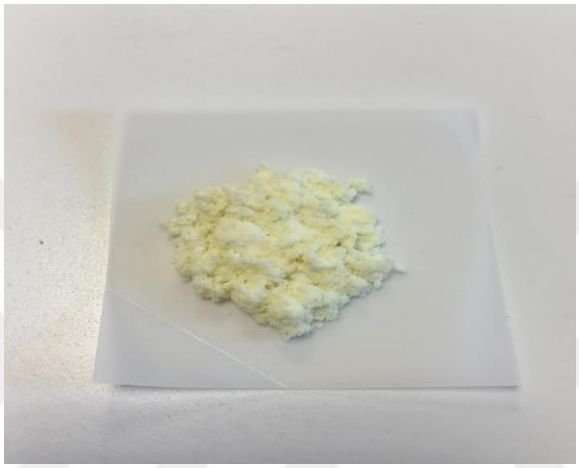
25ºC, 30ºC ve 40ºC sıcaklıklarda etkin maddelerin yüzde bozunmaları bulunmuştur. Bozunmalar üzerinden, her bir sıcaklık değeri için k, bozunma sabitleri hesaplanmıştır. Bozunma sabitleri aracılığı ile de bu sıcaklıklardaki raf ömrü hesaplanmıştır. Formülasyonlar için elde edilen raf ömürleri aşağıdaki çizelge ile özetlenmiştir. Ayrıca bu sıcaklıklarda yapılan stabilite çalışmalarına ait verilerden yararlanılarak Arrhenius denklemi aracılığı ile formülasyonlara ait 4ºC'deki raf ömürleri hesaplanmıştır.

Çizelge 4.52. Nanotaşıyıcı sistemler için raf ömrü değerleri

Formülasyon Adı	25ºC	30ºC	4ºC
QD-İMA	7,72 ay	5,91 ay	19,91 ay
QD-İMA-PEG	12,53 ay	8,02 ay	40,40 ay
QD-İMA-PEGFA	13,27 ay	8,60 ay	31,91 ay
QD-ERLO	10,50 ay	9,78 ay	27,82 ay
QD-ERLO-PEG	18,50 ay	12,35 ay	55,84 ay
QD-ERLO-PEGFA	24,23 ay	20,98 ay	58,33 ay
NP-İMA	28,46 ay	12,74 ay	76,55 ay
NP-İMA-PEG	48,66 ay	24,18 ay	82,16 ay
NP-İMA-PEGFA	28,65 ay	16,56 ay	83,87 ay
NP-ERLO	16,94 ay	12,86 ay	46,38 ay
NP-ERLO-PEG	14,40 ay	12,35 ay	19,05 ay
NP-ERLO-PEGFA	19,69 ay	14,57 ay	32,83 ay

4.6. Kapsüllerde Yapılan Çalışmalar ve Bunlara Ait Bulgular

Farklı etkin madde ve farklı taşıyıcı sistemler ile toplam on iki farklı formülasyon değerlendirilmiştir. Yapılan tüm bu çalışmalar sonucunda, bu on iki formülasyon içerisinden en iyi formülasyon bulunmaya çalışılmıştır. Özellikle tümör etkinliğine yönelik bulgular göz önüne alınarak en iyi formülasyonun QD-İMA-PEG-FA olduğu düşünülmüştür. İmatinib mesilat – deksketoprofen trometamol içeren PEGFA'lı kuantum noktacığı formülasyonu liyofilize edilmiştir. Liyofilize toza ait görüntü Resim 4.50'de yer almaktadır.



Resim 4.50. QD-İD-PEGFA liyofilize toz görüntüsü

Liyofilize tozlar farelere uygulanmak üzere Torpac firmasından temin edilen M boyutundaki kapsüllere, kapsül doldurma aparatı ile doldurulmuşur. Kapsüller üzerinde bir takım karakterizasyon çalışmaları yapılmış sonrasında ise aynı tedavi protokolü dikkate alınarak deney hayvanlarına uygulanmıştır.

4.6.1. Liyofilize toz ile kapsülde yapılan çözünme hızı çalışmaları

Bitmiş ürünün kapsül olması dolayısı ile kapsüllerde dağılma süresi belirlenmiş, etkin madde miktar tayini yapılmış ve nem miktarı tayin edilmiştir. Dağılma süresi dağılma aparatı kullanılarak hesaplanmıştır. Ortam hacmi olarak 250 mL ve ortam olarak 37±0,2°C sıcaklığındaki distile su kullanılmıştır. Liyofilize edilmiş kuantum noktacıkları için dağılma süresi 1 dakikanın altında bulunmuştur.

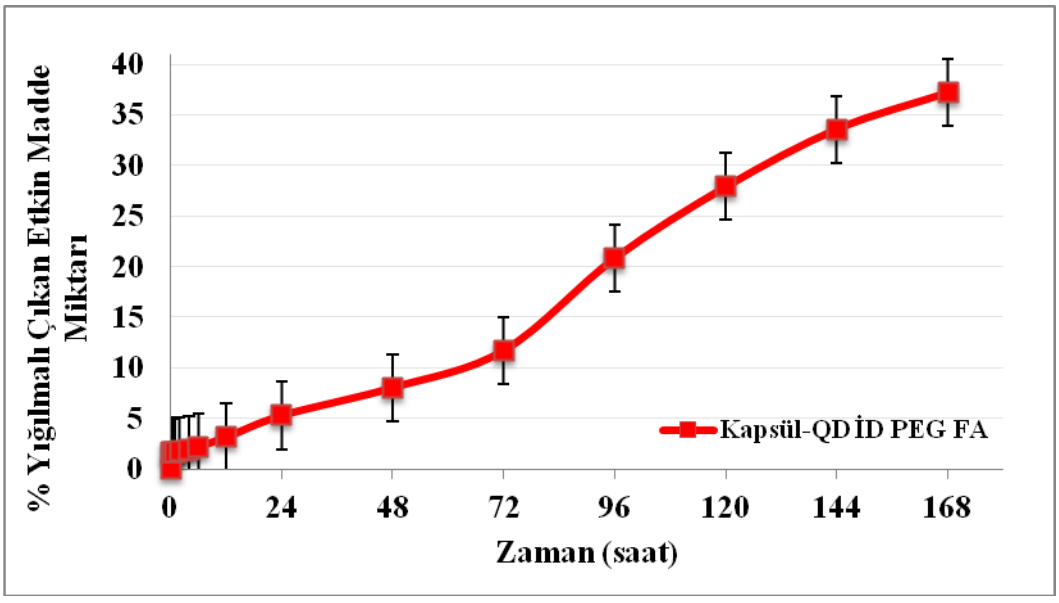
Miktar tayinleri kapsül içerisindeki tozun boşaltılıp suda disperse edilmesi sonrasında yapılmıştır. UPLC cihazı ölçülen etkin madde miktar tayini sonuçları; imatinib mesilat için

%80,41; deksketoprofen tremetamol için %60,47 olarak bulunmuştur. Kapsül içindeki toz boşaltılarak %nem tayini yapılmış ve %2,58 nem içeriği tesbit edilmiştir.

USP 2 - Palet Yöntemi kullanılarak pH 7,4 fosfat tamponunda 50 rpm ve 37 ± 0,2°C sıcaklıkta salım çalışmaları sürdürülmüştür. Kapsüllerin suda batmasını sağlamak amacı ile metal sinker'lar kullanılmıştır.

Resim 4.51. Kapsüllerin metal sinker'lar içerisindeki görüntüsü

Diyaliz membranından geçiş çalışmaları ile karşılaştırılabilmesi açısından ortam hacmi 250 mL olacak şekilde düşük tutulmuştur. 0,25.; 0,5., 1., 2., 4., 6., 12., 24., 48., 72., 96., 120., 144. ve 168. saatlerde 2 mL hacminde numuneler toplanmış; 0,22 µm'lik membran filtrelerden süzüldükten sonra UPLC'de analiz edilmiştir.



Şekil 4.137. Kapsüllerden imatinib salım profili

Liyofilize toz edildikten sonra kapsüllere doldurulan QD-İMA-PEG-FA formülasyonu için salım kinetiği değerlendirilmiştir. Salım kinetiklerine ait bulgular Çizelge 4.53'de yer almaktadır.

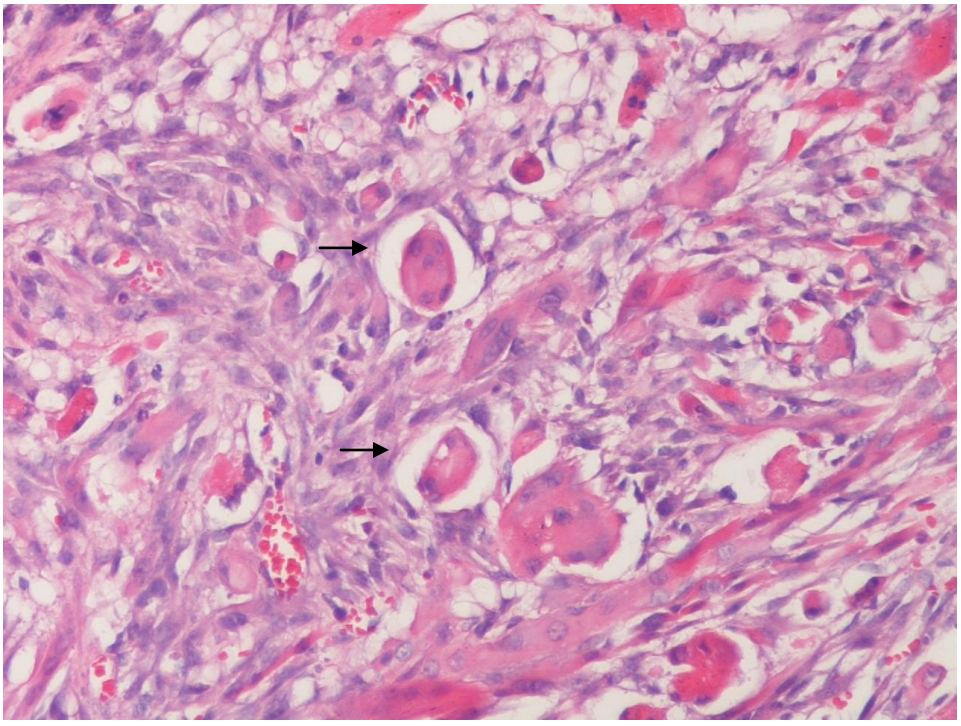
Çizelge 4.53. Kapsül formunun reaksiyon kinetiklerine ait değerleri

	m	n	r^2
Sıfırıncı Derece	0,152	0,353	0,984
Birinci Derece	0,009	0,166	0,943
Weibull	0,531	-1,957	0,851
Higuchi	1,845	-2,139	0,894
Hixon-Crowell	-0,012	3,532	0,982
Korsmayer-Peppas	0,513	0,044	0,857

4.6.2. Liyofilize tozda yapılan antitümöral etkinlik değerlendirme çalışmaları

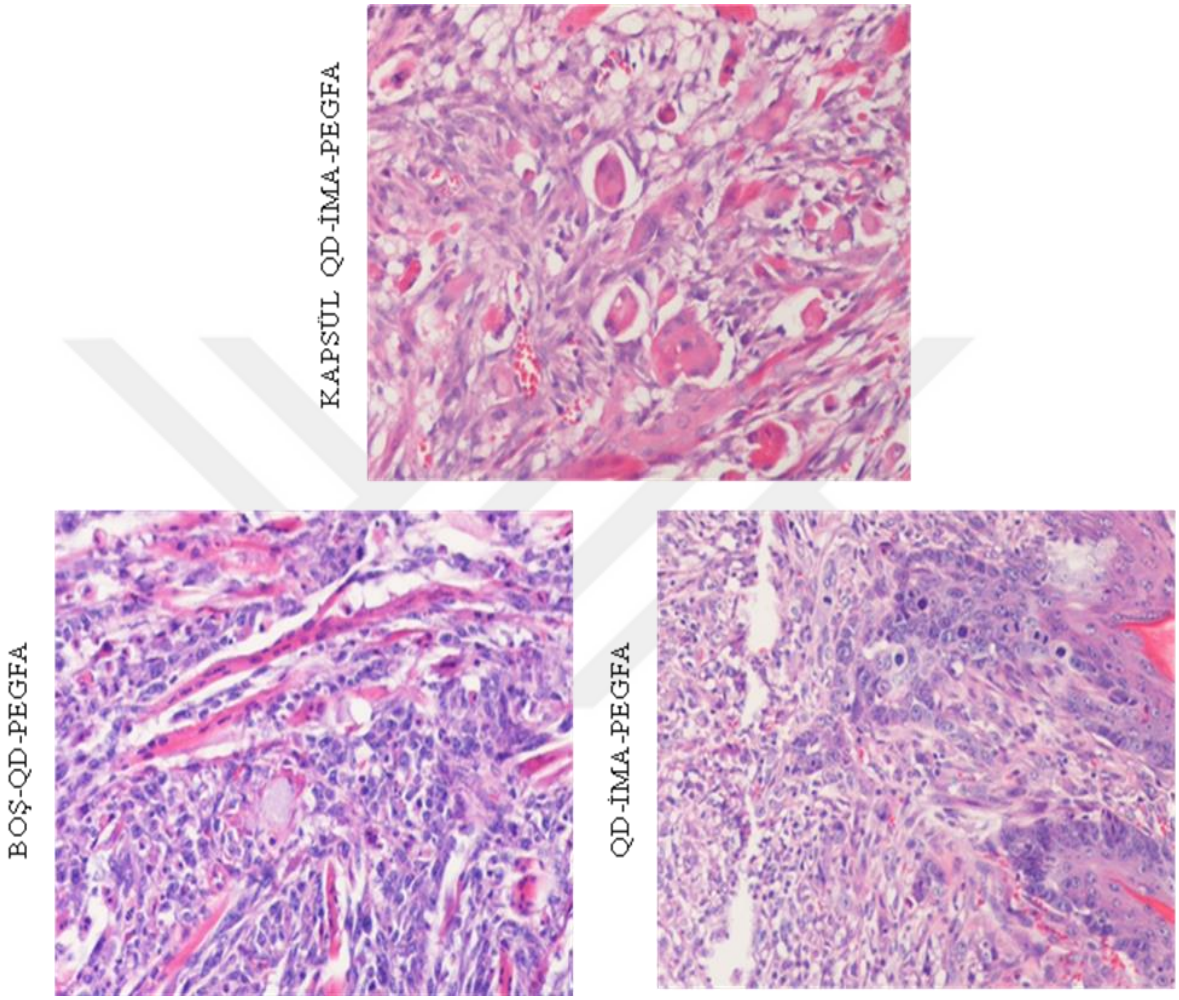
Antitümöral etkinlik; kumpas ile tümör boyutunun ölçülmesi, sarkom final skoru üzerinden antitümöral etkinliğin iyileşme yüzdesi olarak değerlendirilmesi, histopatolojik açıdan mikroskobik inceleme ve enzimsel aktivite açısından değerlendirilmiştir. Ayrıca sağlıklı dokulara etkisinin görülmesi amacı ile doku dağılımlarına da bakılmıştır.

Liyofilize edilerek kapsüle doldurulmuş QD-İMA-PEG-FA kodlu formülasyon histopatolojik olarak mikroskop altında incelenmiştir. Alınan görüntüye Resim 4.52'de yer verilmiştir.



Resim 4.52. Kapsül formunda uygulanmış formülasyona ait histopatoloji görüntüsü (HEx20)

Resim 4.52’de yer alan oklar bol ve eozinofilik sitoplazmalı çok çekirdekli tümör dev hücrelerini belirtmektedir. Kapsül formunda verilen QD-İMA-PEG-FA formülasyonunun bu görüntüsü karşılaştırma yapılabilmesi amacı ile aynı formülasyonun QD-İMA-PEG-FA kodlu çözelti hali (liyofilize edilmeden önceki hali) ve etkin madde içermeyen BOŞ-QD- PEG-FA kodlu formülasyonun mikroskobik görüntüleri Resim 4.53’de yer almaktadır.



Resim 4.53. Kapsül formülasyonu ile çözelti formülasyonunun karşılaştırılması

Antitümöral etkinlik; kumpas ile tümör boyutunun ölçülmesi, sarkom final skoru üzerinden antitümöral etkinliğin iyileşme yüzdesi olarak değerlendirilmesi, histopatolojik açıdan mikroskobik inceleme ve enzimsel aktivite açısından değerlendirilmiştir. Ayrıca sağlıklı dokulara etkisinin görülmesi amacı ile doku dağılımlarına da bakılmıştır. Çizelge 4.54’de bu çalışmalara ait bulgular yer almaktadır.

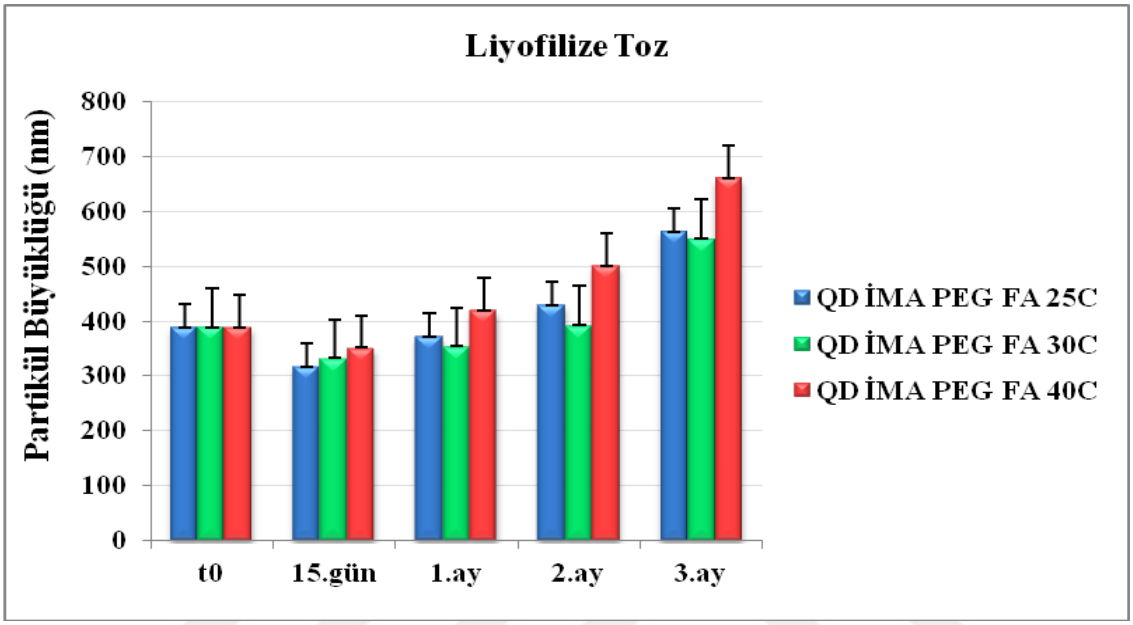
Çizelge 4.54. Kapsül formunun antitümöral aktivite açısından değerlendirilmesi

Yapılan Deney	**Ortalama Tümör Çapı Ölçümü**			
	0. Hafta	**1. Hafta**	**2. Hafta**	***p* değeri**
Kontrol	100	116,930	149,132	-
Kapsül (QD-İMA-PEG-FA)	100	104,733	88,687	<0,05
Yapılan Deney	**Sarkom final skoruna göre histopatolojik inceleme**			
	Tümör Başlangıç Yüzdesi		**İyileşme Yüzdesi**	
Kontrol	100,00		0,00	
Kapsül (QD-İMA-PEG-FA)	100,00		14,27	
Yapılan Deney	**Tirozin Kinaz Reseptör İnhibisyon Etkinliği**			
	% İnhibisyon Etkisi			
Kontrol	0,000			
Kapsül (QD-İMA-PEG-FA)	43,143			
Yapılan Deney	**COX Enzim Aktivitesi İnhibisyon Etkinliği**			
	% İnhibisyon Etkisi			
Kontrol	0,000			
Kapsül (QD-İMA-PEG-FA)	32,503			
Yapılan Deney	**Folat Reseptör İnhibisyon Etkinliği**			
	% İnhibisyon Etkisi			
Kontrol	0,000			
Kapsül (QD-İMA-PEG-FA)	80,237			
Yapılan Deney	**Doku Dağılımının İncelenmesi**			
	Dalak	**Akciğer**	**Karaciğer**	**Tümör**
Kapsül (QD-İMA-PEG-FA)	1,273	0,366	0,396	0,405

4.6.3. Liyofilize tozda yapılan stabilite çalışmaları

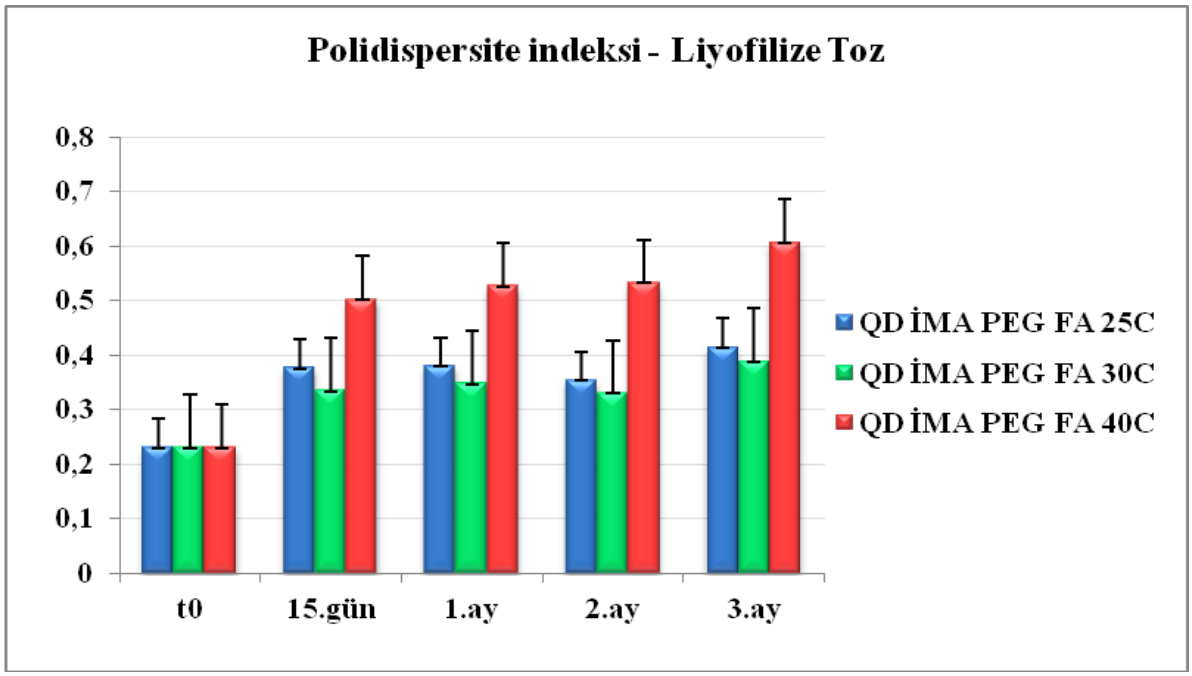
İmatinib mesilat ve deksketoprofen tremetamol içeren polietilen glikol ve folik asit yüklü QD-İMA-PEG-FA formülasyonu liyofilize edilmiş ve elde edilen katı toz üzerinden stabilite çalışmaları sürdürülmüştür. Elde edilen katı toz için başlangıçtaki etkin madde miktarı hesaplandıktan sonra, her bir örnekte aynı miktarda katı toz olacak şekilde tartılarak

ependorflar içerisinde stabilite kabinlerine yerleştirilmiştir. 25ºC, 30 ºC ve 40ºC sıcaklıklardaki stabilite kabinlerine yerleştirildikten sonra 15.gün, 1.ay, 2.ay ve 3.ay sürelerinde partikül büyüklükleri, polidispersite indeksleri, zeta potansiyelleri ve etkin madde yükleme kapasiteleri değerlendirilmiştir. Ölçümlere ait sonuçlara aşağıda verilmiştir. Partikül büyüklüklerine ait bulgular Şekil 4.138'de verilmiştir.



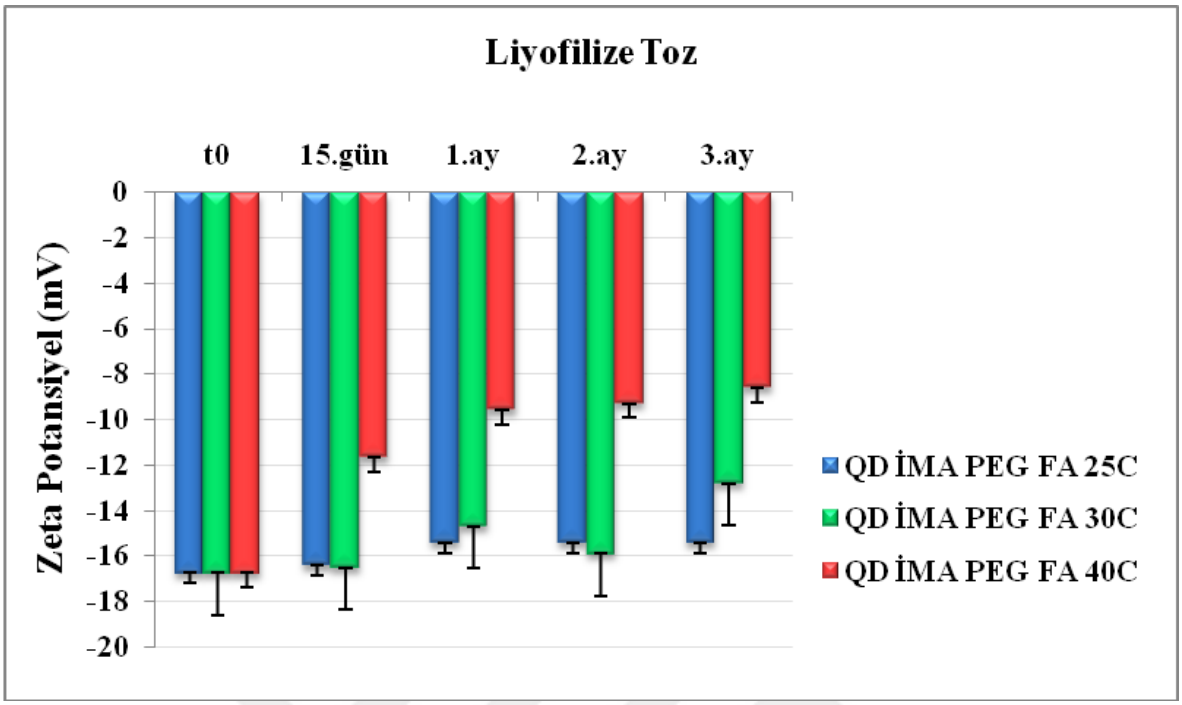
Şekil 4.138. Liyofilize toza ait zamana karşı partikül büyüklüğü değişimi

Polidispersite indeksi ölçümlerine ait bulgular Şekil 4.139'da verilmiştir.



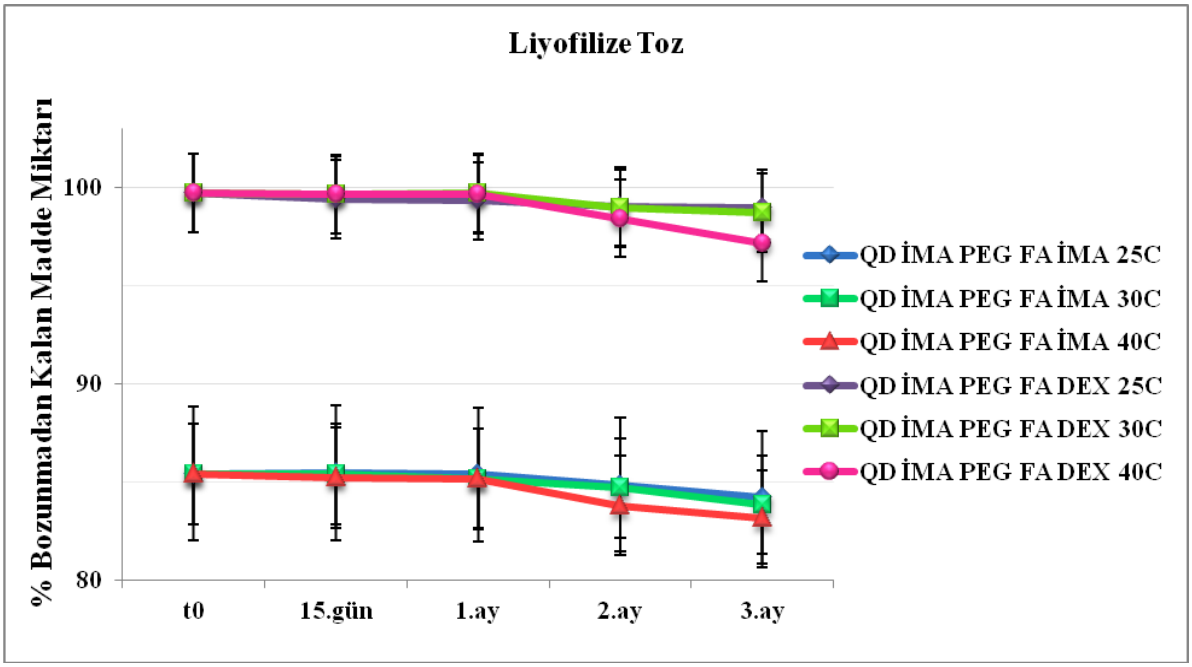
Şekil 4.139. Liyofilize toza ait zamana karşı polidispersite indeksi değişimi

Zeta potansiyel ölçümlerine ait bulgular Şekil 4.140'da verilmiştir.



Şekil 4.140. Liyofilize toza ait zamana karşı zeta potansiyeli değişimi

Belirli zaman aralıklarında İMA ve DEX için etkin madde miktar tayini yapılmıştır. Bu şekilde bozunmadan kalan madde miktarı hesaplanmıştır. Buna ait bulgular Şekil 4.141'de verilmiştir.



Şekil 4.141. Liyofilize toza ait zamana karşı yükleme kapasitesindeki değişim

Yapılan stabilite testleri sonucunda, test edilen sıcaklıklarda etkin maddelerin yüzde bozunmaları üzerinden her bir sıcaklık değeri için k bozunma sabiti hesaplanmıştır. Bozunma sabiti yardımı ile bu sıcaklıklardaki raf ömürleri hesaplanmıştır. Liyofilize toz için elde edilen raf ömürleri Çizelge 4.54'de yer almaktadır. 25ºC, 30ºC ve 40ºC sıcaklıklar için bulunan bozunma sabitlerinden yararlanılarak ekstrapolasyon yapılmış ve 4ºC sıcaklıktaki raf ömrü hesaplanmıştır. 4ºC sıcaklıktaki raf ömrü deneysel olarak bulunmamış olup hesapla bulunmuştur. 25ºC, 30ºC ve 4ºC sıcaklıklardaki raf ömürlerine ait bulgular Çizelge 4.55'de yer almaktadır.

Çizelge 4.55. Liyofilize toza ait farklı sıcaklıklardaki raf ömrü değerleri

	25ºC	**30ºC**	**4ºC**
Liyofilize toz	20,21 ay	16,73 ay	63,05 ay

5. TARTIŞMA

5.1. Önformülasyon Çalışmaları

Önformülasyon çalışmaları kapsamında ilk olarak kullanılacak olan etkin ve yardımcı maddelerin partikül büyüklüğü ve dağılımları yanı sıra zeta potansiyelleri ölçülmüştür. Tüm katı maddeler mikrometre boyutlarında bulunmuştur. Polidispersite indeksi 0-1 arasında değer almaktadır ve bu değerin sıfıra yakın olması, partiküllerin eş büyüklükte olduğunu göstermektedir. Etkin maddelerin polidispersite indeksleri yüksek çıkmıştır. Tozlar görsel olarak incelendiğinde de özellikle erlotinib hidroklorürün topakcıklar halinde bulunduğu görülmektedir. Etkin ve yardımcı maddelerin zeta potansiyelleri yüzey yükleri hakkında bilgi vermektedir. İmatinib mesilat, deksketoprofen trometamol, folik asit, PEG2000 ve DSPE-PEGFA için zeta potansiyel değerleri negatif iken, erlotinib HCl için pozitif bulunmuştur. Etkin maddeler hidrofilik/hidrofobik özelliklerine bağlı olarak taşıyıcı sistemlere afinite göstererek yüklenebilmektedirler ayrıca bunun dışında elektrostatik etki ile de yüklenebilmektedirler. Bu durum göz önünde bulundurularak yüzey yükleri ölçülmüştür.

Maddelerin ve madde karışımlarının erime noktaları tayin edilmiş ve maddeler arası olası geçimsizlik durumu değerlendirilmiştir. Erime noktaları, sıcaklığa karşı ısı değerleri kullanılarak oluşturulmuş DSC termogramlarında yer alan piklerin analiz edilmesi ile bulunmuştur. Termogramlar incelendiğinde madde karışımlarına ait termogramlarda her bir maddenin piki ayrı ayrı analiz edilebilmiştir. Bu durum maddeler arasında herhangi bir etkileşim olmadığını göstermektedir.

Maddelere ait yapı-analiz çalışmaları ise FT-IR cihazı ile yapılmış olup sonuçlar bulgular kısmında yer almaktadır. Buna göre; etkin maddelerin FT-IR ölçüm grafiklerindeki bantlara bakılarak yapıları aydınlatılabilmiştir.

Etkin madde miktar tayini çalışmalarına geçilmeden önce, miktar tayini yapılacak dalga boyunu tayin etmek amacıyla imatinib mesilat, erlotinib HCl ve deksketoprofen trometamolün UV spektrofotometre cihazı ile dalga boyu taramaları yapılmıştır. Maddelere ait dalga boyu taramaları maddelerin ileriki deneylerde kullanılması planlanan tüm ortamlarda yapılmıştır. Bu bağlamda her üç madde için de distile su, pH 7,4 fosfat

tamponu ve DMEM ortamlarında spektrum taramaları yapılmış olup erlotinib HCl için ayrıca pH 3 asetat tamponunda da spektrum taraması yapılmıştır. Maddelerin maksimum absorbans verdiği dalga boyları belirlenmiştir. Ayrı ayrı her madde için farklı ortamlarda aynı veya yakın dalga boylarında maksimum absorbans alındığı gözlenmiştir. Miktar tayini yöntemi için UV spektrumda çalışılmış ancak etkin maddeler ile deksketoprofenin verdiği absorbans değerlerinin birbirine yakın dalga boylarında olması dolayısı ile miktar tayini yöntemi UPLC cihazı ile geliştirilmiştir.

İmatinib mesilat ve deksketoprofen trometamol içeren formülasyonlar düşünülerek bu maddelerin BEH kolonda validasyon çalışmaları distile su, pH:7,4 fosfat tamponu ve DMEM ortamlarında yapılmıştır. Erlotinib HCl ve deksketoprofen trometamol içeren formülasyonlar için ise; distile su, pH:7,4 fosfat tamponu ve DMEM ortamları yanı sıra pH 3 asetat tamponunda validasyon çalışmaları yapılmıştır. Validasyon çalışmaları yürütülmeden önce imatinib mesilat ve erlotinib HCl içeren çözeltiler için UPLC cihazında da dalga boyu taramaları yapılmış ve UV spektrofotometre ile benzer sonuçlar alınmıştır. Bu nedenle imatinib mesilat için 258 nm'de erlotinib HCl için ise 246 nm'de çalışılmıştır. Ancak, DMEM ortamı için, dalga boyu taramaları birbirine yakın sonuçlar verse de bu dalga boylarında DMEM içeriğindeki maddelere ait piklerin oldukça yüksek olması ve kromatogramda etkin madde piklerinin yüksekliğini baskılayarak, belirginliğini gölgelemesi nedeniyle imatinib mesilat için 326 nm'de, erlotinib HCl için ise 300 nm'de çalışılmıştır.

İMA için validasyon çalışmalarında BEH kolon, ERLO için ise CORTEX C18 kolonu kullanılmıştır. İMA için akış 0,3 mL/dakika iken ERLO için akış 0,2 mL/dakika'dır. Akıştaki bu farklılığın sebebi, kolon farklılığına bağlı olarak ortaya çıkan basınç farkından ileri gelemektedir. CORTEX C18 kolonda; 0,3 mL/dakika akış hızında yüksek bir basınç değeri elde edilmiştir. Yüksek basıncın kolonun kullanım ömrünü azaltacağı göz önüne alınarak düşük basınçta çalışılmıştır. Yardımcı etkin madde olarak tüm formülasyonlarda yer alan DEX için her iki kolonda da validasyon çalışmaları yapılmıştır.

Kolon yanı sıra kullanılan en yüksek etkin madde konsantrasyonları da farklılık göstermektedir. İMA için 20 µg/mL konsantrasyonu en yüksek konsantrasyon iken; ERLO için bu değer 10 µg/mL'dir. ERLO için de ilk olarak 20 µg/mL konsantrasyonda çalışılmıştır. Ancak bu konsantrasyonda, kromatogramda masa şeklinde pik alınması

sebebi ile çok doğru bir etkin madde miktar tayini yapılamayacağı düşünülmüştür. Pik şeklinin dar, simetrik ve ters V şeklinde olmaması dolayısı ile konsantrasyon yarı yarıya azaltılmıştır. Bu şekilde masa piki eldesi engellenerek dar ve simetrik olan uygun bir pik elde edilebilmiştir.

Validasyon çalışmaları; doğrusallık, kesinlik (deney içi ve deneyler arası), doğruluk ve geri elde, özgünlük ve seçicilik, duyarlılık ve saptama sınırı parametrelerine göre değerlendirilmiştir. Bu maddeler için kullanılan her ortamda tüm doğrusallık değerleri r^2:0,999 veya üzerinde bulunmuştur. Diğer parametreler için düşük standart sapma değerleri elde edilmiş ve hesaplanan tüm değerler için bağıl standart sağma %2'den düşük olarak bulunmuştur. Yöntemlerin etkin maddelere özgün olduğu tesbit edilmiştir.

İn vivo ortamlarda yürütülecek olan deneyler göz önüne alınarak validasyon çalışmaları plazma için de yürütülmüştür. Bu amaçla, ilk olarak deney hayvanı olarak kullanılacak olan farelerden kan alınmış ve alınan kanların plazmaları ayrılmıştır. Maddelerin düşük miktardaki çözelti halleri plazmada dağıtıldıktan sonra UPLC cihazında spektrum taraması yapıldıktan sonra numuneler UPLC cihazına analiz edilmiş ve tüm validasyon parametreleri plazma için de değerlendirilmiştir. Yapılan spektrum taraması neticesinde 320nm'de çalışılması uygun bulunmuştur. Her iki etkin madde (imatinib mesilat ve erlotinib HCl) için de plazmada validasyon çalışmaları yürütülmüş, r^2: 0,999 bulunmuştur. Diğer parametreler için düşük standart sapma değerleri elde edilmiş ve hesaplanan tüm değerler için bağıl standart sağma %2'den düşük olarak bulunmuştur. Yöntemlerin etkin maddelere özgün olduğu tesbit edilmiştir. Tüm bu sonuçlar doğrultusunda uygulanan analiz yöntemlerinin bilimsel çalışmalarda kullanılabilir olduğu kanıtlanmıştır.

Miktar tayini yöntemi belirlenmesi ile ilgili çalışmalar sonrasında ilk olarak maddelerin çözelti hal stabiliteleri değerlendirilmiştir. İmatinib mesilat, erlotinib HCl ve deksketoprofen trometamolün distile su, pH:7,4 fosfat tamponu ve DMEM ortamlarında çözeltileri hazırlanmış ayrıca erlotinib HCl'in pH 3 asetat tamponunda da çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin t0 ölçümleri yani sıfırıncı (0.) gün miktar tayini ölçümleri gerçekleştirildikten sonra 4°C, 25°C ve 37°C sıcaklıklardaki stabilite kabinlerine kaldırılmış ve 1.; 2. ve 3. günlerde miktar tayinleri yapılarak stabiliteleri değerlendirilmiştir. Maddelerin çözelti hallerinin bu sıcaklıklarda 3 gün boyunca stabil olduğu tesbit edilmiştir. çözelti haldeki maddelerin çalışma şartlarında 3 gün boyunca

özelliklerini koruyacakları, herhangi bir bozunmaya uğramayacakları yapılan testlerle gösterilmiştir.

Etkin maddelere ait sitotoksisite testleri, uygulanacak olan formülasyonların sağlıklı hücreler üzerine etkilerinin görülmesi amacıyla L929 fibroblast hücrelerine uygulanmıştır. L-929 hücreleri fare fibroblast hücresi olup, değişik maddeleri içeren çözeltilerin sitotoksik konsantrasyonlarını belirlemede sıklıkla kullanılmaktadırlar. Ayrıca uluslararası standartlar (ISO 10993 part 5, 1999; ISO 7405, 1997) tarafından sitotoksisite testi için referans hücre olarak gösterilmektedirler (Fischera ve diğerleri, 2003). Formülasyonlarda yer alacak imatinib mesilat, erlotinib HCl, deksketoprofen trometamol, folik asit, PEG2000, kuantum noktacıkları, kitozan ve tripolifosfat maddeleri L929 fibroblast hücreleri üzerinde hücresel toksisiteleri açısından incelenmiştir. Literatürlerde benzer şekilde sitotoksisite testleri yapılmış olup %50'nin üzerindeki canlılık oranının uygun olduğu bildirilmiştir (Sakaguchi ve diğerleri, 2009; Mutlu ve diğerleri, 2011). Sitotoksik açıdan değerlendirilen bu maddelerin tüm konsantrasyonları için yüksek hücre canlılığı elde edilmiştir. Yapılan testler sonrasında formülasyonlarda kullanılacak olan etkin madde dozları belirlenmiştir. Madde miktarı imatinib mesilat için %50 öldürücü doz olan 4,8 mg olarak seçilmişken; erlotinib HCl için 3 mg olarak seçilmiştir. Erlotinib HCl'in %50 öldürücü dozu için sitotoksisite testlerinde kullanılan en yüksek miktardan (9,6 mg) bile daha fazla dozda kullanılması gerekmektedir. Ancak çok düşük miktarda antitümöral etkinlik elde edilmeye çalışıldığından 9,6 mg doz olarak seçilmemiştir. 1 mg kullanımı ile ise istenilmesi hedeflenen etkinin sağlanamayabileceği göz önüne alınarak 3 mg dozda kullanılmıştır. Deksketoprofen tremetamol ise 0,09 mg olacak şekilde belirlenmiştir. Çalışmalar ile PEG2000 ve folik asitin dozdan bağımsız olarak sitotoksik etki göstermediği görülmüştür. Bu durum, hücrelerin gelişme ve büyümeleri için PEG2000 ve folik asite ihtiyaç duymaları ile bağdaşlaştırılmıştır. Kitozan ve tripolifosfat miktarının artışına bağlı olarak hücre canlılığında azalma gözlenmiştir. Hücre canlılığında kitozan konsantrasyonuna bağlı olarak görülen azalma, kitozanın çözülebilmesi için kullanılan glasiyal asetik asit ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Ayrıca kitozanın çözünmesi için gerekli asit ortam da hücre pH'sında farklılıklara neden olabilmektedir. Tripolifosfat ise, tuz bazlı bir madde olup osmotik etki yaratmış olabileceği düşünülmüştür.

5.2. Formülasyon Çalışmaları

5.2.1. Kuantum noktacıklarına ait karakterizasyon çalışmaları

Çizelge 3.5'de formülasyonları verilen ZnO kuantum noktacıkları; Değim ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma temel alınarak üretilmiştir (Değim ve Kadıoğlu, 2013). Üretim yöntemi; sol-jel tekniği olarak adlandırılmaktadır (Bera ve diğerleri, 2008). Bu şekilde üretilen kuantum noktacıklarına ilişkin olarak yapılan formülasyon çalışmalarında üretim üzerine ölçeklemenin bir etkisi görülmemiştir ve bu nedenle belirtilen şartlar altında her oranda kuantum noktacığı elde edilebileceği düşünülmüştür. Formülasyonlar değerlendirildiğinde, sıcaklığın 80ºC'nin üzerine çıkması halinde istenen sonuç ürün elde edilemediğinden ara ürünün sıcaklıktan etkilendiği sonucuna varılmıştır. Sıcaklığın ara ürün üzerinde bozulmalara neden olduğu veya çözücü olarak kullanılan metanolü hızla uzaklaştırdığından reaksiyonun gerçekleşme süresini kısalttığı dolayısıyla da reaksiyonun tamamlanabilmesine imkan tanımadığından ara ürün oluşamadığı şeklinde yorumlanmıştır. Ürün oluşsa bile üründe görülen agregasyon nedeniyşe partikül büyüklüğü istenen aralıkta olmadığından kuantum noktacığı karakterini kazanamamaktadır. Safsızlıkların azaltılması açısından ise; çözeltilerin filtrelenmesi uygun bulunmuştur. Sonuç ürün eldesi açısından; nitrik asit miktarının artırılmasının verimliliği artırdığı ve sodyum hidroksit konsantrasyonunun ise formülasyon üzerinde kritik bir önemi olduğu görülmüştür. Ayrıca, damlatma sırasında kullanılan enjektör ucu çapının yani gauge cinsinden derecesinin de elde edilen sonuç üzerine etkisi olduğu görülmüştür.

Zhao ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada; ZnO kuantum noktacıklarının 337 nm'de ışıma yaptığı bildirilmiştir (Zhao ve diğerleri, 2013). Üretilen ZnO kuantum noktacıklarının da 360 nm dalga boyunda ışıma verdikleri gözlenmiş ve karakterizasyonları partikül büyüklüğü ve verdiği ışıma yoğunluğu açısından değerlendirilmiştir. Damlatma tekniği ile hazırlanan kuantum noktacıklarında, damla damla ilave etmenin ışımayı artırdığı görülmüştür. Ayrıca, karanlık ortamda üretilmeleri ile ışımanın artığı gözlemlenmiştir. Buna göre; en uygun formülasyon olarak Çizelge 3.5'te yer alan F7 formülasyonu seçilmiştir. Bu yöntem ile kuantum noktacıkları üretildikten sonra agrege olmalarını engellemek amacı ile, üretimleri sonrasında SDS ve PEG kullanımına gidilse de beklenildiği gibi iyi bir sonuç alınamamıştır.

İşlem verimliliği ve etkin madde yüklenmesinin zorluğu göz önüne alınarak üretim yöntemi değiştirilmiştir ve kuantum noktacıkları kimyasal hidroliz yöntemine dayanan bir teknik ile üretilmişlerdir (Yuan ve diğerleri, 2010). Bu yöntem ile daha da küçük boyutta kuantum noktaçıklarının eldesine gidilmiştir. Kuantum noktacıkları partikül büyüklüklerine bağlı olarak farklı renklerde ışıma göstermektedirler. 1-10 nm boyutlara sahip olan kuantum noktacıklarında partikül boyutu küçüldükçe ışımanın rengi maviye, partikül boyutu büyüdükçe ışımanın rengi kırmızıya kaymaktadır. Kimyasal hidroliz yöntemi ile üretilen kuantum noktacıklarının partikül boyutları 1nm civarında bulunmuş olup mavi renkte ışıma gösterdikleri görülmüştür. Üretilen kuantum noktacıklarının zeta potansiyelleri ölçülmüş ve negatif yüklü oldukları bulunmuştur. Yapılan kuantum noktacığı hazırlama yöntemi iyileştirme çalışmaları sonucunda çinko asetattan hareketle çinko oksit kuantum noktacıklarının suda disperse olabildiği ve oldukça küçük boyutlara sahip olduğu görülmüştür. Kuantum noktacıklarının sitotoksisiteleri de değerlendirilmiş, fare fibroblast hücrelerinde %50'nin üzerinde canlılık oluşturduğu görülmüştür. Kuantum noktacıkları TEM cihazı ile görüntülenmiş ve morfolojik olarak incelenmiştir. Kuantum noktacıkları küresel yapıda olup yapıya PEG2000 ilave edilmesi ile yüzeylerinde saçaklı yapıların oluşturuğu gözlenmiştir. DSPE-PEGFA gibi fonksiyonel grup ilavesi ile yüzeysel bir katman oluştuğu gözlenmiş ancak PEG2000'de olduğu kadar geniş saçaklı yapılar gözlenmemiştir. Bu durum kullanılan DSPE-PEGFA miktarının oldukça düşük olmasına bağlanmaktadır. Üretilen kuantum noktacıklarına etkin maddeler yüklenmiş, yükleme kapasitleri değerlendirilmiştir. İmatinib mesilat için ortalama %80; erlotinib HCl için ortalama %50 yükleme kapasitesi bulunmuş olup her iki etkin madde formülasyonları için de deksketoprofen yükleme kapasiteleri %100'e yakın olarak bulunmuştur. Kuantum noktacıklarında imatinib mesilat yüklemesi erlotinib HCl yüklenmesine göre daha yüksek oranda gerçekleşmiştir. Bu durumun temel sebebi katyonik yüklü olan kuantum noktacığı-kitozan yapısının negatif yüklü imatinib mesilat ile daha kolay bağ yapması olabilmektedir. Ayrıca imatinib mesilatın suda çözünürlüğünün erlotinib HCl'den daha yüksek olduğu da göz önünde bulundurulduğunda suda çözünen kuantum noktacıklarına afinitesinin (ilgisinin) daha fazla olabileceği düşünülmüştür. Zeta potansiyelleri değerlendirildiğinde, negatif yüklü kuantum noktacıkları pozitif yüklü kitozan polimeri ile muamele edildikten sonra pozitif yüklü oldukları görülmektedir. İmatinib mesilatın negatif yüzey yüküne sahip olması ve erlotinib HCl'in pozitif yüzey yüküne sahip olması iki etkin madde arasındaki yükleme kapasiteleri arasındaki farkı açıklayabilmektedir. Negatif yüklü deksketoprofen tremetamol ise her iki etkin madde formülasyonlarında da oldukça yüksek

oranda yüklenebilmiştir. Deksketoprofen tremetamol miktarının oldukça düşük olması (etkin madde miktarının yaklaşık %3'ü) yükleme kapasitesindeki etkinliğinin bir göstergesi olarak yorumlanabilmektedir.

Kuantum noktacıkları için; Çizelge 3.17'de yer alan, etkin madde içermeyen 3 ve etkin madde içerikli 6 farklı formülasyon olmak üzere toplam 9 farklı formülasyon *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda kullanılmak üzere başarı ile üretilmiştir.

5.2.2. Nanopartiküllere ait karakterizasyon çalışmaları

Nanopartiküllerin üretimi Nano Spray Dryer cihazına dayandırılmıştır. Kitozan nanopartikülleri için tam bir çözünme gösteren formülasyon elde edilmiş ve bu formülasyon üzerinden Nano Spray Dryer cihazına ait çalışmalar sürdürülmüştür. İlk olarak cihaza ait formülasyon parametreleri belirlenmiş ve optimize edilmiştir. Aynı konsantrasyonda hazırlanmış numunelerin farklı sprey hızı ve farklı por çapına sahip sprey ucu ile püskürtülmesinin yanı sıra farklı konsantrasyonlarda numunelerin püskürtülmesinin de sonuç ürün etkisi incelenmiştir. Elde edilen bulgular sonucunda, düşük por çaplı sprey ucu kullanımı ile daha düşük boyutlu partiküller elde edilebileceği sonucuna ulaşılmıştır. Yapılan deneylerde, sprey hızı etkisinin (spreyleme yüzdesi); partikül büyüklüğünden ziyade işlem verimi üzerinde belirgin olduğu görülmüştür. Sprey yüzdesinin düşürülmesi ile çalışma süresinin uzadığı ve verimin de düştüğü görülmüştür. Patriza ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada da benzer sonuçlar alındığı rapor edilmiştir (Patriza AR vd, 2014). Püskürtme yüzdesinin azalması ile partikül büyüklüklerinde ufak artışlar görülmüş ancak bu durum polidispersite indeksini etkilememiştir. Bunun yanı sıra polidispersite indeksinin sprey başlığının değişiminden etkilendiği ve sprey başlığı küçüldüğünde polidispersite oranın arttığı görülmüştür. Ayrıca, konsantrasyon artışının da partikül büyüklüğünü artırdığı tesbit edilmiştir. Konsantrasyon artışı cihazın verimli çalıştığı süreyi de etkilemiştir. Yoğun konsantrasyonlar zaman zaman cihazdaki püskürtücü başlıkta tıkanmalara neden olmuştur bu da işlem verimliliğini olumsuz yönde etkilemiştir. Li ve arkadaşlarının Nano Spray Dryer cihazı ile yaptıkları bir çalışmada ise incelenen bu parametreler açısından benzer değerler elde edildiği görülmüştür (Li vd, 2010). Püskürtme ile ilgli dikkat edilen ölçülen bir diğer bulgu ise; yüzey gerilimi'dir. Bu amaçla etanol, Tween80 ve PEG işlem verimliliği ve püskürtme sırasındaki etkinlikleri açısından karşılaştırılmıştır. Yüzey geriliminin küçük olması püskürtmedeki etkinliği artırmaktadır.

Partikül büyüklüğünün sprey çapı ile orantılı olarak artmasına rağmen polidispersite indeksinin daha düşük olması ve % veriminin daha yüksek olması nedeniyle optimum formülasyon olarak Çizelge 3.20'de yer verilen N2 formülasyonu seçilmiştir. Bu formülasyon cihazdaki püskürtme işlemi sonrasında katı olarak alınmış, DMEM'de çözüldükten sonra sitotoksisitesi açısından değerlendirilmiştir. Fare fibroblastları kullanılarak yapılan test sonucunda %50'nin üzerinde canlılık bulunmuştur.

Etkin madde içermeyen ve etkin madde içeren tüm formülasyonlarda piknometre ile gerçek yoğunluk tayinleri yapılmış ardından da damla hacmi ve yüzey gerilimleri ölçülmüştür. İmatinib mesilat etkin maddesinin yüzey geriliminde artışa neden olduğu, erlotinib HCl'in ise yüzey gerilimini düşürdüğü görülmüştür. Deneysel olarak da erlotinib HCl ile çalışıldığında cihazın işlem verimliliğinin artığı gözlenmiştir.

Formülasyonlar partikül büyüklüğü dağılımı, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli, çalışma süresi, örnek hacmi ve % verim açısından değerlendirilmiştir. Formülasyonlarla ilgili bulgulara Çizelge 4.28'de yer verilmiştir. Formülasyonlarda partikül büyüklüğü sonuçları incelendiğinde, formülasyona fonksiyonel madde ilavesinin partikül büyüklüğünü artırdığı görülmektedir. NP-İMA-PEGFA kodlu formülasyon hariç tüm formülasyonların zeta potansiyelleri pozitif yüklüdür. Bu formülasyonun zeta potansiyelinin negatif çıkması, partikül yüzeyinde yer alan negatif yüklü PEG2000 ve folik asit maddelerinin yüzey yüklerinin baskın olmasına dayandırılmaktadır. Tüm formülasyonlar için %90'ın üzerinde oldukça yüksek geri elde gözlenmiştir. Partiküller morfolojik olarak incelendiğinde; küresel yapıda oldukları ve fonksiyonel grup ilave edilen partiküllerde yüzey yüklemesinin başarılı olduğu görülmektedir.

5.2.3. İn vitro etkin madde çıkış çalışmaları

Formülasyonlar üzerindeki salım çalışmaları ilk olarak çalışma sırasında çözünürlük problemi gösterdiği gözlenen erlotinib HCl etkin maddesi üzerinden sürdürülmüştür. Bu bağlamda ilk olarak, Çizgelge 3.23'de yer verildiği üzere Franz difüzyon hücrelerinden salım çalışmaları sürdürülmüştür. Franz hücrelerinde donör kompartman olarak; etkin maddenin saf distile su ortamında çözülmemesi üzerine, yardımcı solvan ilavesi ile çözünürlüğü artırılmış ve %20 etanol veya %20 PG (propilen glikol) içerikli distile su ortamı kullanılmıştır. Bu ortamda sitotoksisite testleri ile ERLO'nun belirlenen dozu (3

mg/mL) ve DEX'in belirlenen dozu (0,09 mg/mL) çözülmüştür. Çalışmalar DEX'in dozu sabit tutulacak şekilde ERLO'nun 3 mg; 0,375 mg; 0,05 mg ve 0,0044 mg'lık dozları ile sürüdürlmüştür. Membran olarak diyaliz membran veya selofan membran kullanılmış ancak membranlar arasında belirgin bir fark gözlenmemiştir. Diyaliz membran ile çalışmalar yürütülmüş ve reseptör kompartman distile su; pH 7,4 fosfat tamponu ve DMEM olarak seçilmiştir. Ancak çözelti formunda yüksek salım gözlenememesi üzerine bu ortamlara çözünürlüğü artırması adına yardımcı çözücü olarak etanol veya yüzey etkin madde olarak PG, SDS, sodyum taurokolat gibi maddeler ilave edilmiştir. Ayrıca pH 5,2 ve pH 3 asetat tamponları da reseptör kompartman olarak denenmiştir. Franz difüzyon hücrelerinde en iyi sonuca pH 3 asetat tamponu ile ERLO'nun 0,05 mg'lık dozu ile ulaşılmıştır. İMA içerikli çözelti için de Franz difüzyon hücrelerinde pH 7,4 fosfat tamponunda çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalarla ilgili bulgulara Çizelge 4.29, Çizelge 4.30, Çizelge 4.31 ve Çizelge 4.32'de yer verilmiştir. Franz difüzyon hücrelerinde İMA ve ERLO için formülasyonlarda kullanılmak üzere belirlenen dozları ile yüksek etkin madde çıkışı gözlenemediğinden ve dozun azaltılmasına bağlı olarak etkin madde çıkışında artış gözlendiğinden sink koşulun bu şartlar ile sağlanamadığı sonucuna ulaşılmış ve diyaliz torba yöntemi ile etkin madde çıkış oranları incelenmiştir. Diyaliz torba yönteminde; 1,5 mL'sinde belirtilen dozlarda etkin madde içeren çözelti ve formülasyonları olacak şekilde hazırlanarak diyaliz torba içerisine ilave edilmiştir. İMA için pH 7,4 fosfat tamponunda ERLO için ise pH 3 asetat tamponunda etkin madde çıkış deneyleri sürdürülmüştür.

Salım çalışmalarında diyaliz torba ile yapılan deneylerde tekrarlanabilirliğin daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca, Franz difüzyon hücreleri ile yapılan sonuçlar incelendiğinde; deksketoprofen tremetamol sonuçlarında % 100'den fazla sonuçlar alınmıştır. Bu nedenle diyaliz torba kullanılarak elde edilen sonuçların Franz difüzyon hücresinden elde edilen sonuçlara oranla çok daha tutarlı olduğu görülmektedir.

Kuantum noktacıklarında nihai formülasyon olarak belirlenen QD-İMA; QD-İMA-PEG; QD-İMA-PEGFA; QD-ERLO; QD-ERLO-PEG ve QD-ERLO-PEGFA formülasyonları için disolüsyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda İMA formülasyonları için yapıya eklenen fonksiyonel grubun etkin madde çıkışını artırdığı ancak her üç formülasyon için de %50'nin altında bir etkin madde çıkışı olduğu görülmüştür. ERLO formülasyonları için ise daha yüksek bir etkin madde çıkışı gözlenmiş olup yapıya eklenen fonksiyonel grubun

etkin madde çıkışını azalttığı görülmüştür. QD-ERLO-PEGFA için etkin madde çıkışı %50'nin altında kalmışken, ERLO içeren diğer iki formülasyon için ise etkin madde çıkışı %50'nin üzerindedir. Kuantum noktacıkları yapısal olarak suda çözünür olduklarından kendisi gibi suda çözünürlüğü yüksek olan İMA'yı daha çok yapılarına almakta ancak etkin maddenin taşıyıcıyı daha fazla sever hale gelmesi ve zayıf H^+ bağı kurması dolayısıyla salımda daha düşük bir seyir görülmektedir. Suda çözünürlüğü düşük olan erlotinib için ise salım oranı nisbeten daha yüksektir. Ancak formülasyon içeriğine PEG ve PEG-FA dahil olması durumunda yani taşıyıcı sistemin daha dallı hale gelmesi ile erlotinib salımının engellendiği, buna karşın imatinib salımının artığı görülmektedir. Bu durum; erlotinibin yüzeyde bulunan dallı yapılardan çıkamaması ancak imatinibin bu yapılara daha kolay geçebilmesi ile açıklanabilmektedir.

Nanopartiküllerde NP-İMA; NP-İMA-PEG; NP-İMA-PEGFA; NP-ERLO; NP-ERLO-PEG ve NP-ERLO-PEGFA formülasyonları için disolüsyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda İMA formülasyonları için yapıya eklenen fonksiyonel grubun etkin madde çıkışını artırdığı ve NP-İMA-PEGFA formülasyonundan etkin madde çıkışının %50'nin üzerinde olduğu gözlenmiştir. ERLO formülasyonları için ise daha düşük bir etkin madde çıkışı gözlenmiş olup yapıya eklenen fonksiyonel grubun etkin madde çıkışını artırdığı görülmüştür.

İn vitro ortamda diyaliz torba yöntemi ile formülasyonlardan etkin madde çıkışının incelendiği bu çalışmada etkin madde çıkışının hangi disolüsyon profiline uyduğu da matematiksel hesaplarla değerlendirilmiştir (Çizelge 4.34). Sıfırıncı derece ve birinci derece salım kinetikleri, Hixon-Crowell, Higuchi ve Korsmayer-peppas salım kinetikleri tüm formülasyonlar ve kapsül dozaj şekli için değerlendirilmiş ve r^2 değeri en yüksek olan salım kinetiğine uyum gösterdiği göz önünde bulundurulmuştur. En iyi formülasyon olduğu düşünülen QD-İMA-PEG-FA kodlu formülasyonun; matris yapılı formlar için değerlendirilen Higuchi kinetiği ile salım yapmakta olduğu bulunmuştur. Öte yandan bu formülasyonun liyofilize toz haline getirilip kapsüllere doldurulması ile ("KAPSÜL" kodlu formülasyon) sıfır derece kinetik ile salım yaptığı görülmüştür. Liyofilize edilen toz çalışmalarda kullanılan "M" numaralı kapsüllere kapsül dolum aparatı ile konulmuştur. 4,8 mg İMA içerikli tek bir hayvan dozundaki formülasyon, liyofilize toz haline getirildikten sonra 10 mg ağırlığında bulunmuştur. Bir kapsüle ise, tamamen sıkıştırılarak en fazla 5 mg liyofilize toz doldurulabilmiştir. Bu durumdan kaynaklı olarak, kapsül formu ile yapılan

salım çalışmalarında sıkıştırmanın etkisi ile sıfırıncı derece kinetik ile salım elde edildiği düşünülmüştür. Ayrıca, dozda bir kayıp yaşanmaması amacı ile hayvan çalışmaları sırasında deney hayvanlarına iki kapsül verilmiştir.

Çözelti halinde bulunan diğer formülasyonlar için diyaliz torba yöntemi kullanılmıştır. Diyaliz torba yönteminde 200 mL örnek hacmi ile çalışılmıştır. Katı dozaj şekillerinden biri olan kapsül formundan etkin madde salım deneyleri ise USP Aparat II (Palet Yöntemi) ile yürütülmüştür. Bu yöntemde ise 200 mL örnek hacmi paleti tamamen içerisine alacak sıvı miktarını karşılayamadığı için örnek hacmi 250 mL'ye çıkarılmıştır. Çözelti formları için elde edilen sonuçlar 200 mL örnek hacmi üzerinden ve kapsül formu için elde edilen sonuçlar 250 mL örnek hacmi üzerinden değerlendirilmiştir.

5.3. Hücre Çalışmaları

5.3.1. Caco-2 hücreleri ile yapılan çalışmalar

Caco-2 hücrelerinden geçiş çalışmalarında 3.gün sonunda formülasyonlardan geçişin devam ettiği gözlenmiştir. Ancak, deney koşulları altında hücre canlılıklarının 3.gün sonunda azalabileceği ihtimaline karşın deney 3 gün sonunda sonlandırılmıştır. Geçiş çalışmaları ile diyaliz torba salım sonuçlarına paralel olacak şekilde ERLO içerikli formülasyonların daha yüksek geçiş gösterdikleri bulunmuştur. Fakat, NP-İMA içerikli formülasyon çözelti ile hemen hemen aynı geçiş oranını göstermiştir. Deksketoprofen tremetamol maddesine ait geçiş yüzdeleri de diyaliz torba sonuçlarına oranla daha yüksek bulunmuştur.

Deney bitiminde hücre canlılıkları da değerlendirilmiş, deney başlangıcında ölçülen kontrol grubu ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Deney süresince hücrelerin canlılıklarını korudukları TEER ölçüm sonuçları ile kanıtlanmıştır.

Diyaliz torba deneyi ile Caco-2 hücreleri ile yapılan deney sonuçlarında elde edilen salım/geçiş sonuçları ile diyaliz membran ve Caco-2 tek tabakalı hücre membranı yüzeylerindeki permeabilite katsayıları hesaplanmıştır. Her iki yüzey için bulunan permeabilite sonuçları arasında oldukça büyük farklar gözlenmiştir. Bu farklılığa dayanarak maddelerin aktif transport mekanizması ile taşındıkları sonucu çıkarılmıştır.

Ayrıca Caco-2 hücrelerinden geçişlerin diyaliz torbadan geçişlere göre daha hızlı olduğu görülmektedir, dolayısıyla hücresel aktivitelerin çok daha baskın olduğu söylenebilmektedir. Caco-2 hücre membranlarından geçiş çalışmalarında; PEGFA içerikli formülasyonların diyaliz torbadan gerçekleştirdikleri salım yüzdelerine oranla biraz daha yüksek salım gerçekleştirdikleri görülmektedir. Bu durumun Caco-2 hücre yapılarında folat reseptörlerinin varlığından kaynaklandığı düşünülmüştür. Ayrıca canlı hücrelerden aktif transportun da etkisiyle daha iyi bir salım sağladığı düşünülmektedir.

Salım profilinin şekilleri göz önüne alındığında ise Caco-2 hücre membranından geçiş sonuçları diyaliz torba sonuçlarını desteklemektedir.

5.3.2. WEHI 164 hücreleri ile yapılan antitümöral etkinlik çalışmaları

WEHI 164 hücreleri metilkolantren uygulanarak fibrosarkoma oluşturulmuş farelerden alınan hücrelerdir. İn vivo deneylere paralellik oluşturması açısından bu hücreler üzerinde antitümöral etkinlik değerlendirilmiştir.

Antitümöral etkinlik değerlendirmesinde MTT testi esas alınmıştır. Yöntemin temeli sitotoksisite testi ile aynı olup sitotoksisite değerlendirmesinde L-929 sağlıklı fibroblast hücreleri kullanılırken antitümöral aktivite testinde WEHI 164 kanserli fibrosarkoma hücreleri kullanılmıştır. Sitotoksisite testinde etkin veya yardımcı maddelerin ve taşıyıcı sistemlerin sağlıklı hücreler üzerine etkisi değerlendirilmiş, antitümöral aktivite testinde ise formülasyonların kanserli hücreler üzerine etkisi değerlendirilmiştir.

Deney sonucunda; antikanserojen maddeye maruz kalmamış olan kontrol grubu canlılığını korumuştur. Kontrol grubunda şiddetli mor renk gözlenmiş ve yapılan spektrofotometrik ölçümde yüksek oranda absorbans (mor rengin şiddeti) değeri elde edilmiştir.

Etkin maddelere ait çözelti formlarının uygulanması sonucu elde edilen verilere bakıldığında etkin maddelere DEX yüklenmesinin antitümöral aktiviteyi artırdığı görülmektedir. Ayrıca imatinib mesilatın bu kanser türü üzerine antikanserojen etkinliğinin daha yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu kanser türü için İMA'nın ERLO'ya göre daha potens bir etkin madde olduğu söylenebilmektedir.

Kuantum noktacıkları taşıyıcı sistemleri ile üretilmiş formülasyonlar için antitümöral aktivite sonuçları değerlendirildiğinde; etkin madde içeren tüm formülasyonların %50 civarında etkinlik gösterdiği görülmektedir. En yüksek aktivite gösteren formülasyon; QD-İMA kodlu formülasyondur. En yüksek aktivite gösteren ikinci formülasyon ise; QD-ERLO-PEG-FA kodlu formülasyon olup en yüksek aktivite gösteren üçüncü formülasyon ise; QD-İMA-PEG-FA kodlu formülasyondur. QD-ERLO-PEG-FA kodlu formülasyon (%54,096) ile QD-İMA-PEG-FA kodlu formülasyonun (%53,968) antitümöral aktivite değerleri birbirlerine oldukça yakın çıkmıştır.

Antitümöral aktivite sonuçları incelendiğinde, nanopartikül taşıyıcı sistemi ile üretilmiş formülasyonların neredeyse tamamının kuantum noktacıklarına göre daha yüksek etki gösterdiği görülmektedir. Nanopartikül taşıyıcı sistemleri için; etkin madde içeren tüm formülasyonlar %50'nin üzerinde etkinlik göstermiştir. En yüksek aktivite gösteren formülasyon; NP-İMA-PEG-FA kodlu formülasyondur. En yüksek aktivite gösteren ikinci formülasyon ise; NP-ERLO-PEG-FA kodlu formülasyondur. Bu sonuçlara bakıldığında; folik asit kullanımı ile kanserli hücreler üzerinde daha yüksek bir etki alındığı görülmektedir. Bu sonuçlar folik asit etkinliği açısından kuantum noktacıkları formülasyonları ile paralellik göstermektedir. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda nanopartikül taşıyıcı sistemleri ile üretilmiş bu iki formülasyon arasındaki fark anlamlı olarak bulunmuştur.

Her iki taşıyıcı sistem için de İMA yüklü formülasyonlarda daha yüksek antitümöral aktivite gözlenmiştir ve DSPE-PEGFA kullanımının antitümöral aktivite üzerine etkisinin PEG2000 kullanımına oranla daha yüksek olduğu görülmüştür. Nanopartikül formülasyonlarında DSPE-PEGFA maddesinin kullanılmasının tümör hücreleri üzerinde antikanser etkinliği belirgin bir şekilde artırdığı görülmektedir. Kuantum noktacıklarına ait veriler incelendiğinde, boş kuantum noktacıklarının dahi %20'nin üzerinde etkinlik gösterdiği görülmektedir. Bu durum, kuantum noktacıklarının iyileştirici etkisi bulunan ZnO yapısında olması ile açıklanabilmektedir.

5.4. Deney Hayvanları Çalışmaları

5.4.1. Farmakokinetik verilerin değerlendirilmesi

Farmakokinetik veriler incelendiğinde intraperitonal veriliş ile maksimum kan konsantrasyonunun ve eğri altında kalan alan değerlerinin her iki etkin madde ile daha yüksek olduğu görülmektedir. Herhangi bir dokuya uğramadan ve olası ilk geçiş etkisine maruz kalmadan doğrudan kan sistemine verilen ilacın konsantrasyonunun daha yüksek olacağı beklenen bir durumdur.

Formülasyonlar incelendiğinde, PEG kullanımı ile yarılanma ömrünün ve MRT'lerinin yani vücutta ortalama kalış sürelerinin arttığı görülmektedir. PEG ilavesi formülasyonların makrofajlardan kaçarak kanda daha uzun sure kalmalarını sağlamaktadır. Kanda daha uzun süre kalan bu formülasyonların AUC (eğri altında kalan alan) değerleri de yüksek olduğu farmakokinetik verilerle kanıtlanmıştır.

ERLO yüklü formülasyonlarda fonksiyonel grup içermeyen ve PEG içeren kuantum noktacıklarının maksimum kan konsantrasyonları ve eğri altında kalan alan değerleri daha yüksek bulunmuştur ancak PEGFA yardımcı maddesi taşıyan formülasyonlar için bu durum tam tersi şeklinde gerçekleşmiştir. Bunun nedeni PEGFA yüklü kuantum noktacıklarının yarılanma ömürlerinin oldukça yüksek bulunması (62 saat) ile açıklanabilmektedir. İMA yüklü tüm formülasyonlarda ise; yine kuantum noktacıklarının yarılanma ömürlerinin yüksek olmasına bağlı olarak maksimum kan konsantrasyonları ve eğri altında kalan alan değerleri nanopartiküllerde daha yüksek bulunmuştur.

Farmakokinetik parametrelere bakıldığında; Cmax ve AUC değerlerinin imatinib mesilat etkin maddesi taşıyan formülasyonlarda erlotinib HCl içerikli olanlara oranla daha yüksek olduğu dikkat çekmektedir. Ayrıca; her iki etkin madde açısından da, oral yola verilen çözelti hallerinin yarılanma ömrünün tüm formülasyonlara oranla çok daha düşük olduğu, formülasyonların daha yavaş salım sağlayarak tedavi süresini uzattıkları görülmüştür. Özellikle en yüksek yarılanma ömrünün kuantum noktacıklı sistemlerde olduğu görülmüştür. Bu durum oldukça küçük partikül boyutuna sahip olması ve küçük partikül boyutu sayesinde sirkülasyonda daha uzun sure kalması ile açıklanabilmektedir.

5.4.2. Antikanser etkinliğin değerlendirilmesi

Antikanser etkinliğin değerlendirilmesi çalışmalarına geçilmeden önce kontrol grubu ve tedavi grupları için hayvanlar beşerli gruplara ayrılmışlardır. Bu hayvanların seçiminde tümör büyüklükleri sonuçların karşılaştırılabilmesi açısından yaklaşık olarak eşit tümör büyüklüğüne sahip hayvanlar ile çalışılması uygun bulunmuştur. Tümör büyüklüğü ortalama 15,62 ± 1,60 mm olan hayvanlar gruplara bölündükten sonra tedaviye başlanmıştır. Seçilen ortalama tümör büyüklüğü daha önce yapılan benzer çalışmalar ile paralellik göstermektedir (Fooladi ve diğerleri, 2008). Çizelge 4.46'da yer alan tümör büyüklüklerinin kumpas yardımıyla ölçülmesi deneyinde ölçüm sonuçları değerlendirildiğinde; kontrol grubuna ait tümör büyüklüklerinde iki hafta sonunda %100 artış gözlenmiştir. Oldukça agresif olan bu tümör çeşidi için iki haftalık boyunca gün aşırı uygulanan tedavi sonrasında en etkili formülasyonlar olarak NP-İMA; QD-İMA-DEX-PEGFA; KAPSÜL-QD-İMA-DEX-PEGFA ve QD-ERLO-DEX-PEG bulunmuştur. %100 olan tümör boyutunu NP-İMA %38'e; QD-İMA-DEX-PEGFA %76'ya; KAPSÜL-QD-İMA-DEX-PEGFA %89'a ve QD-ERLO-DEX-PEG de %91'e düşürmüştür. İlaçla tedavisi henüz mümkün olmayan bu kanser türü için başarılı sonuçlar alınmıştır.

Sonuçlar histopatolojik olarak incelendiğinde; en etkili iyileşme sağlayan formülasyonlar %30'un üzerinde iyileşme göstermişlerdir. Bu formülasyonlar; QD-İMA-DEX-PEGFA; QD-ERLO-DEX-PEG; QD-ERLO-DEX ve QD-İMA-DEX'tir. Histopatolojik olarak en etkin formülasyonlar kuantum noktacıkları ile elde edilmiştir. En yüksek iyileşme yüzdesi QD-İMA-DEX-PEGFA ve QD-ERLO-DEX-PEG kodlu formülasyonlar ile elde edilmiş olup iyileşme yüzdeleri %36 olarak bulunmuştur. Bu iki formülasyon arasından kapsül formunda uygulanacak formülasyon olarak; antitümöral aktivite ve tümör ölçüm sonuçlarına göre daha yüksek etkinlik gösteren İMA etkin maddesini içermesi açısından QD-İMA-DEX-PEGFA seçilmiştir. Kapsül formunda da %14 oranında etkinlik göstermiştir.

Doku dağılımlarına ait bulgular değerlendirildiğinde etkin maddelerin en fazla karaciğerde bulundukları görülmektedir. Karaciğer çok fazla kanlanması olan ve etkin maddelerin metabolize edilmeleri nedeni ile fazla tutulduğu bir organdır. Öte yandan imatinib mesilat içerikli formülasyonlar değerlendirildiğinde karaciğerde en fazla toplanan taşıyıcı sistemin kuantum noktacıkları olduğu görülmektedir. Partikül büyüklüğü küçük olan maddelerin

karaciğerde tutulumlarının yüksek olması nedeniyle kuantum noktacıklarının karaciğerde daha fazla oranda bulunmaları açıklanabilmektedir. Kuantum noktacıklarının ise oldukça küçük partikül büyüklükleri dolayısıyla fenestrasyon etkisi göstermiş olabileceği düşünülmüştür. Erlotinib içerikli formülasyonlar düşünüldüğünde ise; erlotinibin lipofilik yapısı sebebiyle karaciğer ve dalakta tutulumunun daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum; eritrositlerin membran yapısının lipofilik olduğu düşünüldüğünde erlotinibin eritrositlere afinitesinin daha yüksek olacağı dolayısıyla da karaciğer ve dalak gibi kanlanmanın fazla olduğu bölgelere kaçma eğiliminde olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Doku dağılımlarına ait bulgularda tümörde yer alan etkin madde oranları da değerlendirilmiştir. Buna göre; deksketoprofen ilavesiyle tümör bölgesinde etkin madde oranının yükseldiği görülmektedir.

Formülasyonların enzimsel aktiviteleri yapılarında bulunan İMA ve ERLO etkin maddeleri, DEX yardımcı etkin maddesi ve folik asit fonksiyonel grubu açısından değerlendirilmiştir. Tirozin kinaz intihitör özelliği bulunan İMA ve ERLO için tirozik kinaz reseptör inhibisyon etkinliği değerlendirilmiştir. Etkin maddelere ait çözelti formları için sonuçlar incelendiğinde, imatinib mesilat'ın daha yüksek inhibisyon etkinlik gösterdiği ve her iki etkin madde için de DEX ilavesinin sinerjik etki yaratarak inhibisyon etkinliğini artırdığı görülmektedir. Kuantum noktacıkları için en yüksek etkinlik imatinib mesilat kullanımı ile alınmaktayken nanopartiküllerde erlotinib HCl'in daha etkin olduğu görülmektedir. Ancak tüm formülasyonlar içerisinde en yüksek inhibisyon etkinliği QD-İMA-PEGFA kodlu formülasyon ile elde edilmiştir. COX enzim inhibisyonu ise; nanopartiküllerde nisbeten daha yüksek olması ile birlikte tüm formülasyonlar için yüksek oranda bulunmuştur. Folat reseptör inhibisyon etkinliği de değerlendirilmiş ve folik asit içeren formülasyonlarda %90 civarında daha yüksek oranlarda bulunmuştur. Yapılan bu çalışmalar ile formülasyonlara maddelerin iyi oranda yüklendiği ve hücresel düzeyde de etkinlik gösterdikleri gösterilmiştir.

5.5. Stabilite Çalışmaları

Etkin maddelerin piyasadaki tablet formlarının saklama sıcaklığı 30ºC olarak belirtilmektedir. Stabilite çalışmaları; oda sıcaklığında stabil olduğu bilinen kuantum noktacıkları ve kitozan nanopartikülleri için, sonuç ürünlerin oda sıcaklığında saklanması önerilmesinin hedeflenmesi üzerine ICH Q1A(R2) Klavuzu doğrultusunda

gerçekleştirilmiştir. Klavuza göre gerçekleştirilen stabilite test protokolü yanı sıra işlem görmemiş toz halindeki etkin maddelerin saklama koşulları olarak spesifikasyonlarında yer alan +4ºC sıcaklık da Arrhenius denkleminden yararlanılarak hesaplanmıştır. Sonuç ürünün saklama koşulu için oda sıcaklığı önerildiğinden bu sıcaklık değeri için stabilite çalışmaları deneysel olarak sürdürülmemiştir.

Seçilen nihai formülasyonlar etkin madde yüklü halleri, etkin madde yanı sıra PEG2000 yüklü halleri ve etkin madde yanı sıra DSPE-PEG2000-FA yüklenmiş halleri olmak üzere tüm formülasyonlar için stabilite çalışmaları başlatılmıştır. Stabilite çalışmalarında formülasyonlarda partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksindeki artış ile zeta potansiyeli değerlerindeki değişkenliğin 40°C'de daha fazla olduğu gözlenmiştir. % bozunmadan kalan etken madde miktarlarında ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Salım sonuçları değerlendirildiğinde PEG içeren formülasyonların daha yüksek salım profiline ulaştıkları görülmektedir. Ayrıca yine bu preparatların daha yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip oldukları gözlenmiştir. PEG'ün sterik engel teşkil ederek kuantum noktacıklarının birleşmesini engelledikleri bu nedenle de toplamda partikül yüzey alanını artırdığı düşünülmüştür. PEG içerikli formülasyonların ilaç yükleme kapasiteleri yanı sıra stabilite sonuçlarının da daha tutarlı çıkması PEG'ün sterik engel yaratması dolayısıyla yüzey alanını birleşmelerle küçülmesine engel olması ile ilişkilendirilmiştir.

Stabilite çalışmaları ile etkin madde yükleme kapasiteleri üzerinden tüm sıcaklık değerleri için bozunma sabitleri bulunmuş ve bu bozunma sabitlerinden yararlanılarak raf ömürleri bulunmuştur. Tüm sistemler için en düşük raf ömrü 40°C'de ve en yüksek raf ömrü ise 4°C'de gözlenmiştir. Kuantum noktacıkları için yapılan stabilite test çalışmalarına göre (4°C sıcaklık değeri hariç tutulduğunda) en düşük raf ömrü 4 ay, en yüksek raf ömrü 58 ay olarak bulunurken; nanopartiküller için en düşük raf ömrü 8 ay, en yüksek raf ömrü 66 ay olarak bulunmuştur.

5.6. Kapsülde Yapılan Çalışmalar

En iyi formülasyon seçiminde temel olarak hayvan deneyleri esas alınmıştır. Deney grubunda yer alan hayvanlar, 2 haftalık tedavi sonucunda sakrifiye edilmiş ve tümör dokuları histopatalojik olarak incelenmiştir. İnceleme sonucunda sarkom final skoruna göre, 2 hafta boyunca gün aşırı olmak üzere distile sudaki süspansiyonları halinde uygulanan formülasyonlar arasında en iyi formülasyonlar; QD-İMA-PEG-FA ve QD-ERLO-PEG-FA kodlu formülasyonlar olarak belirlenmiştir. Hücreler üzerinde gerçekleştirilen antitümöral aktivite sonuçları iki formülasyon için birbirine yakın çıkmıştır. Ancak hücreler üzerinde gerçekleştirilen antitümöral aktivite çalışmalarında yer alan diğer deney gruplarında (çözelti grupları dahil) hemen hemen her formülasyonda İMA'nın ERLO'dan daha yüksek etki gösterdiği görülmüştür. Bunun yanı sıra Kumpas ile tümör ölçüm sonuçları dikkate alınarak QD-İMA-PEG-FA kodlu formülasyon en iyi formülasyon olarak seçilmiştir.

QD-İMA-PEG-FA formülasyonun 4,8 mg İMA içeren miktarı liyofilize toz haline getirildiğinde katı madde miktarı 10 mg olarak tartılmıştır. Bu katı madde bir kapsüle doldurulamamıştır. Bir kapsülün toz içerisine yerleştirilirken iyice sıkıştırıldığında en fazla 6 mg katı madde alabildiği görülmüştür. 6 mg katı madde sıkıştırılarak kapsüllere doldurulmaya çalışıldığında ise bazı kapsüllerde kapsül duvarında çatlamalar olduğu gözlenmiştir. Bunun üzerine bir kapsüle 5 mg katı madde doldurulmuş ve nem miktarı, dağılma hızı tezti ve etkin madde miktar tayini dışındaki tüm deneyler iki kapsül üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Nem miktarı liyofilize tozdan 5 mg alınıp IR ışın altında ağırlığı sabit olana kadar bekletilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Dağılma hızı testi için ise bir kapsül kullanılmış olup 250 mL pH 7,4 fosfat tamponu ortamında gerçekleştirilmiştir. Ortam içerisine atılan kapsüllerin çok küçük boyutlarından dolayı batmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle metal sinker'ler kullanılarak tabletlerin ortam içerisinde batması sağlanmıştır. Deney sonucunda 1 dakikanın altında dağılma gösterdiği bulunmuştur.

Kapsülde çözünme hızı deneyi; içeriğindeki İMA etkin maddesi dolayısı ile pH 7,4 fosfat tamponunda gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde USP Aparat II (Palet Yöntemi) kullanılmıştır. Formülasyonların çözelti formları için diyaliz torba metodu ile gerçekleştirilen çözünme hızı deneyinde ortam hacmi 200 mL olarak kullanılmıştır.

Deneyler arasındaki paralellik gözetilerek 200 mL ortam hacmi kullanılması düşünülmüştür. Ancak 200 mL hacim kullanımı ile paletler tamamen ortam içerisinde daldırılamamıştır. 250 mL ortam hacmi kullanıldığında paletlerin tamamen ortamın içerisine daldırılabildiği görülmültür. Bu nedenle ortam hacmi 250 mL'ye çıkarılmıştır. Kapsüller çok küçük boyutlarda olmaları sebebi ile batmaması gözlendiğinden dağılma hızı testinde de kullanıldığı üzere metal sinker'lar kullanılarak deney sürdürülmüştür. 4,8 mg İMA etkin maddesinin miktarının korunması dolayısı ile ortama 2 tablet konularak çalışma gerçekleştirilmiştir.

Kapsül dozaj formu için salım kinetikleri incelendiğinde sıfır derece kinetik ile salım yaptığı görülmektedir. Çözelti formunda uygulandığında Higuchi salım kinetiği göstermesine rağmen kapsül formunda verildiğinde sıfırıncı derece kinetik ile salım göstermesi, liyofilize tozun kapsüle doldurulması aşamasında iyice sıkıştırılmasına dayandırılmıştır.

Kapsül formunun antitümöral aktivite değerlendirmesinde; kumpas ile ortalama tümör çapları ölçüm çalışmaları sonuçlarına göre, tümör boyutunu %88'e kadar düşürdüğü görülmüştür. Kontrol grubu ile aralarında anlamlı derecede fark olduğu bulunmuştur.

Histopatolojik olarak hayvanların tümör dokularının iyileşme yüzdelerine bakıldığında %14,27'lik bir iyileşme görülmüştür. Bu değer çözelti formunun neredeyse yarısı kadardır. Kapsül formunda verildiğinde istenen etkinliğin azaldığı görülmektedir.

Histopatoloji sonuçları mikroskobik olarak incelendiğinde; etkin madde içermeyen formülasyon uygulanmış farelerin tümör dokularına ait görüntüde kayış benzeri çok çekirdekli yapılar ve neoplastik hücreler bulunmaktadır. QD-İMA-PEG-FA kodu ile hayvanlara çözelti formunda uygulanmış formülasyona ait histopatolojik görüntüde; BOŞ-QD- PEG-FA görüntüsünden farklı olarak kayış benzeri yapıların kaybolduğu görülmektedir. Ayrıca bu yapılar kapsül uygulaması ile de kaybolmuştur. Ancak kapsül formunda neoplastik yapıların çözelti formuna göre daha fazla olduğu görülmektedir.

En iyi etkinlik gösterdiği görülen QD-İD-PEG-FA kodlu formülasyon liyofilize edildikten sonra katı toz halindeki raf ömürlerinin stabilite testi yapılan tüm sıcaklıklarda artığı gözlenmiştir. Bu formülasyon için dispersiyon halinde 25°C sıcaklıkta raf ömrü 13 ay

olarak bulunurken, formülasyon liyofilize edildikten sonra toz halinde 25°C sıcaklıkta raf ömrü 21 ay olarak bulunmuştur. Katı toz halinde ilacın stabilitesinin artığı gözlenmiştir.

6. SONUÇ

Etkin maddelere ilişkin karakterizasyon çalışmaları ile yapıları aydınlatılmı, etkin maddelerin yardımcı maddelerle geçimli olduğu bulunmuştur.

Etkin maddeler çözelti hal stabiliteleri açısından değerlendirilmiş ve 3 gün süresince yüksek sıcaklıkta bile (40ºC) stabil oldukları gözlenmiştir.

Analizi yapılacak etkin ve yardımcı maddelere ilişkin uygun bir miktar tayini yöntemi geliştirilmiş ve bu yöntem daha sonraki deneylerde kullanılacak distile su, pH:7,4 fosfat tamponu ve DMEM ortamlarında valide edilmiştir. Ayrıca erlotinib HCl için pH 3 asetat tamponunda da validasyon çalışmaları yapılmıştır. İmatinib mesilat, erlotinib HCl ve deksketoprofen trometamol için tüm bu ortamlardaki validasyon çalışmaları başarılı sonuçlar ile tamamlanmıştır.

Etkin maddeler (İMA ve ERLO), yardımcı maddeler (DEX, PEG2000 ve FA), taşıyıcı sistemler içerisinde yer alan maddeler (CH, TPP) ve taşıyıcı sistemlere ilişkin sitotoksisite testleri sürdürülmüş çalışma sonucunda yüksek canlılık elde edilmiştir. Elde edilen yüksek canlılık ile formülasyonların veya formülasyonlarda yer alan maddelerin sağlıklı hücreler üzerinde olumsuz bir etkisi olmayacağı gösterilmiştir.

Kuantum noktacıkları ve nanopartiküller için çeşitli formülasyonlar denenmiş ve bu taşıyıcılar için amaca yönelik en uygun formülasyonlar üretilebilmiştir.

Optimum formülasyonlar üzerinde salım ve geçiş çalışmaları gerçekleştirilmiş ve bu çalışmalarda paralel sonuçlar elde edilmiştir.

Salım ve geçiş çalışmalarına yönelik permeabilite katsayıları hesaplanarak formülasyonların aktif transport ile hücre içerisine alındıkları şeklinde yorumlanmıştır.

Hücresel antitümöral aktivite sonuçları ile deksketoprofen tremetamol ilavesi ile etkin maddelerin antitümötral etkinliklerinin artığı deneysel olarak gösterilmiştir.

Formülasyonlarda oldukça yüksek antitümöral aktivite değerleri elde edilmiştir.

Hazırlanan formülasyonların farmakokinetik parametreleri hesaplanmış ve PEG kullanımı ile formülasyonların yarılanma ömürlerinin ve ortalama yaşam sürelerinin arttığı bulunmuştur.

Biyoyararlanımın göstergelerinden biri olan AUC değerleri hesaplanmış ve imatinib mesilat içeren formülasyonlar ile çözelti haline yakın değerler elde edilebilmiştir.

Tirozin kinaz enzim inhibisyonu değerlendirilmiş ve deksketoprofen tremetamol kullanımı ile antineoplastik ajanların etkilerinin arttığı gösterilmiştir.

Folat reseptörinhibisyonu değerlendirilmiş ve folik asit kullanımı ile hücrelere hedefleme yapılabildiği gösterilmiştir.

Çözelti halinde yüksek antitümöral etkinlik alınan QD-İMA-PEG-FA kodlu formülasyon liyofilize toz haline getirilerek kapsül formunda katı dozaj şekli haline getirilebilmiştir.

Stabilite çalışmaları sürdürülerek formülasyonların hem sıvı dozaj formunda hem de katı dozaj formunda yüksek stabilite gösterdikleri görülmüştür.

Literatürlere göre çok çok daha düşük miktarda etkin madde içeren formülasyonlarda, gerek antitümöral etkinlik, gerek reseptör inhibisyon etkinlikleri gerekse histopatolojik değerlendirmeler açısından tutarlı ve oldukça ümit verici sonuçlar alınmıştır.

KAYNAKLAR

Açıkgöz, A., Çehreli, R. ve Ellidokuz, H. (2011). Kadınların kanser konusunda bilgi ve tutumları ile erken tanı yöntemlerine yönelik davranışları. ***Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi***, 25(3), 145-154.

Adamczak, M., Krok, M., Pamula, E., Posadowska, U., Szczepanowicz, K., Barbasz, J. and Warszynski, P. (2013). Linseed oil based nanocapsules as delivery system for hydrophobic quantum dots. ***Colloids and Surfaces B: Biointerfaces***, 110, 1-7.

Adeli, M., Hakimpoor, F., Parsamanesha, M., Kalantari, M., Sobhani, Z. and Attyabi, F. (2011). Quantum dot-pseudopolyrotaxane supramolecules as anticancer drug delivery systems. ***Polymer***, 52, 2401-2413.

Advani, A.S., Tiu, R., Saunthararajah, Y., Maciejewski, J., Copelan, E.A., Sobecks, R., Sekeres, M.A., Bates, J., Rush, M.L., Tripp, B., Salvado, A., Noon, E., Howard, M., Jin, T., Hsi, E., Egorin, M.J., Lim, K., Cotta, C.V., Price, C. and Kalaycio, M. (2010). A phase 1 study of imatinib mesylate in combination with cytarabine and daunorubicin for C-kit positive relapsed acute myeloid leukemia. ***Leukemia Research***, 34, 1622–1626.

Akçalı, A. (2010). Araştırmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanılmasının önemi. ***Türk Onkoloji Dergisi***, 25(3), 119-123.

Akşehirli, Ö., Cangür, Ş., Ankaralı, H. ve Sungur, M. A. (2012). 2^4 Faktöriyel tasarımların sağlık alanında kullanımı. ***Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi***, 2(3), 1-6.

Alexander-Bryant, A.A., Vanden Berg-Foels, W.S. and Wen, X. (2013). Bioengineering strategies for designing targeted cancer therapies. ***Advances in Cancer Research***, 118, 1-59.

Ali, M.E. and Lamprechta, A. (2013). Polyethylene glycol as an alternative polymer solvent for nanoparticle preparation. ***International Journal of Pharmaceutics***, 456, 135-142.

Atıcı, E. (2007). Tıp tarihinde kanser ve lösemi. ***Türk Onkoloji Dergisi***, 22(4), 197-204

Baba, K. and Nishida, K. (2012). Calpain inhibitor nanocrystals prepared using Nano Spray Dryer B-90. ***Nanoscale Research Letters,*** 7:436, 1-9.

Babu, C., Subha, M. C. S. and Rao, K. C. (2014). Controlled delivery of Imatinib mesylate from collagen-coated poly (lactic acid) microspheres: In vitro release studies. ***International Journal of Drug Delivery***, 6, 373-379.

Baek, J. H., Agarwal, M. L., Tubbs, R. R., Vladisavljevic, A., Tomita, H., Bukowski, R. M., Milsom, J. W., Kim, J. M. and Kwak, J. Y. (2004). In vivo recombinant adenovirus-mediated p53 gene therapy in a syngeneic rat model for colorectal cancer, ***Journal of Korean Medical Science***, 19, 834-841.

Balimane, P.V. and Chong, S. (2005). Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. ***Drug Discovery Today***, 10(5), 335-343.

Banna, G.L., Collova, E., Gebbia, V., Lipari, H., Giuffrida, P., Cavallaro, S., Condorelli, R., Buscarino, C., Tralongo, P. and Ferrau, F. (2010). Anticancer oral therapy: emerging related issues. ***Cancer Treatment Reviews***, 36, 595-605.

Biswas, A., Bayer, I. S., Biris, A. S., Wang, T., Dervishi, E. and Faupel, F. (2012). Advances in top–down and bottom–up surface nanofabrication: techniques, applications & future prospects. ***Advances in Colloid and Interface Science***, 170, 2–27.

Biswas, S., Dodwadkar, N.S., Deshpande, P.P. and Torchilin, V.P. (2012). Liposomes loaded with paclitaxel and modified with novel triphenylphosphonium-peg-pe conjugate posses low toxicity, target mitochondria and demonstrate enhanced antitumor effects in vitro and in vivo. ***Journal of Controlled Release***, 159, 393-402.

Bodduluru, L.N., Kasala, E.R., Thota, N., Barua, C.C. and Sistla, R. (2014). Chemopretentive and therapeutic effects of nimbolide in cancer: the underlying mechanisms. ***Toxicology in Vitro***, 28, 1026-1035.

Borges, O., Cordeiro-da-Silvia, A., Romeijn, S.G., Amidi, M., de Sousa, A., Borchard, G. And Junginger, H.E. (2006). Uptake studies in rat peyer's patches, cytotoxicity and release studies of alginate coated chitosan nanoparticles for mucosal vaccination. ***Journal of Controlled Release***, 114, 348-358.

Brown, J.M. and Giaccia, A.J. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. ***Cancer Research***, 58, 1408-1416.

Budha, N.R., Frymoyer, A., Smelick, G. S., Jin, Y. J., Yago, M. R., Dresser, M. J., Holden, S. N., Benet, L. Z. and Ware, J. A. (2012). Drug Absorption Interactions Between Oral Targeted Anticancer Agents and PPIs: Is pH-Dependent Solubility the Achilles Heel of Targeted Therapy?. ***Clinical Pharmacology & Therapeutics,*** 22(2), 203-213.

Bulakbaşı Balcı, T. (2009). İlaç Direnci Gelişen Kronik Miyeloid Lösemi Olgularında BCR-ABL1 T3151 Mutasyonları ve AHI1 Gen İfadelenme Düzeylerinin Belirlenmesi (Uzmanlık Tezi), Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi-Ankara.

Bürki, K., Jeon, I., Arpagaus, C. and Betz, G. (2011). New insights into respirable protein powder preparation using nano spray dryer. ***International Journal of Pharmaceutics,*** 408, 248-256.

Carvalho, T., Vala, H., Pinto, C., Pinho, M. and Peleteiro, M. C. (2005). Immunohistochemical studies of epithelial cell proliferation and p53 mutation in bovine ocular squamous cell carcinoma. ***Veteriner Pathology***, 42, 66-73.

Casettari, L., Vllasaliu, D., Lam, J.K., Soliman, M. and Illum, L. (2012). Biomedical applications of amino acid-modified chitosans: a review. ***Biomaterials***, 33(30):7565-83.

Chamberlain, M. and Brown, R. C. (1978). The cytotoxic effects of asbestos and other mineral dust in tissue culture cell lines. ***British Journal of Experimental Pathology***, 59, 183-189.

Chen, J., Li, S. and Shen, Q. (2012). Folic acid and cell-penetrating peptide conjugated PLGA–PEG bifunctional nanoparticles for vincristine sulfate delivery. ***European Journal of Pharmaceutical Sciences***, 47, 430–443.

Chena, T., Zhaoa, T., Weic, D., Weic, Y., Li, Y. and Zhanga, H. (2013). Core–shell nanocarriers with ZnO quantum dots-conjugated Au nanoparticle for tumor-targeted drug delivery. ***Carbohydrate Polymers***, 92, 1124-1132.

D'Addio, S.M. and Prud'homme, R.K. (2011). Controlling drug nanoparticle formation by rapid precipitation. ***Advanced Drug Delivery Reviews***, 63, 417-426.

Dantas, N.O., Monte, A.F.G., Cardoso, W.A., Brito-Madurro, A.G., Madurro, J.M. and Morais, P.C. (2005). Growth and characterisation of ZnO quantum dots in polyacrylamide. ***Microelectronics Journal***, 36, 234-236.

Dash, S. Murthy, P. N., Nath, L. And Chowdhury, P. (2010). Kinetic Modeling on Drug Release FromControlled Drug Delivery Systems. ***Acta Poloniea Pharmaceutica – Drug Research***, 67(3), 217-223.

Degim, I.T. and Kadıoğlu, D. (2013). Cheap, suitable, predictable and manageable nanoparticles for drug delivery: quantum dots. ***Current Drug Delivery***, 10, 32-38.

Delehanty, J.B., Mattoussi, H. and Medintz, I.L. (2009). Delivering quantum dots into cells: strategies, progress and remaining issues. ***Analytical and Bioanalytical Chemistry***, 393, 1091-1105.

Devi, N. A., Hadi, M. A., Rajitha, P., Sharma, J. V. C. and Srinivasa Rao, A. (2013). Formulation and Evaluation of Floating Controlled Release Tablets of Imatinib Mesylate Using Hydrophilic Matrix System. ***International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences***, 5(1), 271-277.

Diagaradjane, P., Orenstein-Cardona, J.M., Colon-Casasnovas, N.E., Deorukhkar, A., Shentu, S., Kuno, N., Schwartz, D.L., Gelovani, J.G. and Krishnan, S. (2008). Imaging epidermal growth factor receptor expression in vivo: pharmaceutic and biodistribution characterization of a bioconjugated quantum dot nanoprobe. ***Clinical Cancer Research***, 14, 731-741.

Domcke, S., Sinha, R., Levine, D.A., Sander, C. and Schultz, N. (2013). Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. ***Nature Communications***, 4:2116, DOI:10.1038

Dora, C. P., Trotta, F., Kushwah, V., Devasari, N., Singh, C., Suresh, S. and Jain, S. (2016). Potential of erlotinib cyclodextrin nanosponge complex to enhance solubility, dissolution rate, in vitro cytotoxicity and oral bioavailability. ***Carbohydrate Polymers***, 137, 339–349.

Dounighi, M.N., Eskandari, R., Avadi, M.R., Zolfagharian, H., Sadeghi, M.M.A. and Rezayat, M. (2012). Preparation and in vitro characterization of chitosan

nanoparticles containing mesobuthus eupeus scorpion venom as an antigen delivery system. ***The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Disease***, 18(1), 44-52.

Drbohlavova, J., Adam, V., Kizek, R. and Hubalek, J. (2009). Quantum dots – characterization, preparation and usage in biological systems. **I*nternational Journal of Molecular Sciences***, 10, 656-673.

Duncan, R. (1999). Polymer conjugates for tumour targeting and ıntracytoplasmic delivery. the epr effect as a common gateway?. ***Pharmaceutical Science and Technology Today***, 2(11), 441-449.

Elsheikh, M.A., Elnaggar, Y.S.R. and Abdallah, O.Y. (2014). Rationale emplotment of cell culture versus conventional techniques in pharmaceutical appraisal of nanocarriers. ***Journal of Controlled Release***, 194, 92-102.

Eryol, C. ve Öner, L. (2005). Çözünme Profili Karşılaştırma Yöntemleri. ***Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği Haberler***, 12(1), 3-11.

Fausel, C. (2007). Targeted chronic myeloid leukemia therapy: seeking a cure. ***American Journal Of Health System Pharmacy***,64, 9–15.

Ferrari, A., Orbach, D., Sultan, I., Casanova, M. and Bisogno, G. (2012). Neonatal soft tissue sarcomas, ***Seminars in Fetal & Neonatal Medicine***, 17, 231-238.

Ferreira, D., Adega, F. and Chaves, R. (2013). The importance of cancer cell lines as in vitro models in cancer methylome analysis and anticancer drugs testing. C. López-Camarillo and E. Aréchaga-Ocampo (Eds.), ***Oncogenomics and Cancer Proteomics – Novel Approaches in Biomarkers Discovery and Therapeutic Targets in Cancer***, InTech, pp. 139-166.

Fletcher, C. D. M., Unni, K. K. and Mertens, F. (2006). Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone, ***IARC Press***, Lyon, France, pp. 141-153.

Fooladi, A. A. I., Sattari, M., Hassan, Z. M., Mahdavi, M., Azizi, T. and Horii, A. (2008). In vivo induction of necrosis in mice fibrosarcoma via intravenous injection of type B staphylococcal enterotoxin, ***Biotechnology Letters***, 30, 2053–2059.

Francoeur, A.M. and Assalian, A. (1996). MICROCAT: A Novel Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay Based on WST-1, ***Biochemica***, 3, 19-25.

Fröhlich, E. and Roblegg, E. (2012). Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products. ***Toxicology***, 291, 10-17.

Gao, X., Chen, J., Chen, J., Wu, B., Chen, H. and Jiang, X. (2008). Quantum dots bearing lectin-functionalized nanoparticles as a platform for in vivo brain imaging. ***Bioconjugate Chemistry***, 19, 2189-2195.

Gennigens, C., Collignon, J., Jerusalem, G., Rorive, A. and Sautois, B. (2009). Therapeutic monoclonal antibodies in hemato-oncology. ***Revue Médicale de Liège***, 64(5-6), 264-267.

Geszke-Moritz, M. and Moritz, M. (2013). Quantum dots as versatile probes in medical sciences: synthesis, modification and properties. ***Materials Science and Engineering C***, 33, 1008-1021.

Goldschmidt, M. H. and Shofer, F. S. (1992). Skin tumors of the dog and cat., ***Pergamon Press***, Oxford, UK.

Gontijo, S. M. L., Guimaraes, P. P. G., Viana, C. T. R., Denadai, A. M. L, Gomes, A. D. M., Campos, P. P., Andrade, S. P., Sinisterra, R. D. and Cortes, M. E. (2015). Erlotinib/hydroxypropyl-b-cyclodextrin inclusion complex: characterization and in vitro and in vivo evaluation. ***Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry***, 83, 267–279.

Goodspeed, A., Heiser, L.M., Gray, J.W. and Costello, J.C. (2016). Tumor-derived cell lines as molecular models of cancer pharmacogenomics. ***Molecular Cancer Research***, 14(1), 3-13.

Goren, D., Horowitz, A.T., Tzemach, D., Tarshish, M., Zalipsky, S. and Gabizon, A. (2000). Nuclear delivery of doxorubicin via folate-targeted liposomes with bypass of multidrug-resistance efflux pump. ***Clinical Cancer Research***, 6, 1949-1957.

Greenhough, A., Smartt, H.J.M., Moore, A.E., Roberts, H.R., Williams, A.C., Paraskeva, C. and Kaidi, A. (2009). The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. ***Carcinogenesis***, 30(3), 377-386.

Gschwind, A., Fischer, O.M. and Ullrich, A. (2004) The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. ***Nature Reviews: Cancer***, 4, 361-370.

Guan, M., Zhou, Y., Zhu, Q.L., Liu, Y., Bei, Y.Y., Zhang, X.N. and Zhang, Q. (2012). N-trimethyl chitosan nanoparticle-encapsulated lactosyl-norcantharidin for liver cancer therapy with high targeting efficacy. ***Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine***, 8, 1172-1181.

Guilherme, M.R., Mauricio, M.R., Tenôrio-Neto, E.T., Kunita, M.H., Cardozo-Filho, L., Cellet, T.S.P., Pereira, G.M., Muniz, E.C., da Rocha, S.R.P. and Rubira, A.F. (2014). Polycaprolactone nanoparticles containing encapsulated progesterone prepared using a $scCO_2$ emulsion drying technique. ***Materials Letters***, 124, 197-200.

Guo, Y., Shi, D., Cho, H., Dong, Z., Kulkarni, A., Pauletti, G.M., Wang, W., Lian, J., Liu, W., Ren, L., Zhang, Q., Liu, G., Huth, C., Wang, L. and Ewing, R.C. (2008). In vivo imaging and drug storage by quantum-dot-conjugated carbon nanotubes. ***Advanced Functional Materials***, 18, 2489-2497.

Gupta, B., Kumar Poudel, B., Pathak, S., Tak, J. W., Lee, H. H., Jeong, J. H., Choi, H. G., Yong, C. S. and Kim, J. O. (2015). Effects of Formulation Variables on the Particle Size and Drug Encapsulation of Imatinib-Loaded Solid Lipid Nanoparticles, ***AAPS PharmSciTech***, 17(3), 652-662.

Hafeman, S., London, C., Elmslie, R. and Dow, S. (2010). Evaluation of liposomal clodronate for treatment of malignant histiocytosis in dogs, Cancer immunology,

immunotherapy, 59, 441–452. Shirzad, H., Taji, F. and Rafieian-Kopaei, M. (2011), Correlation between antioxidant activity of garlic extracts and wehi-164 fibrosarcoma tumor growth in BALB/c mice, ***Journal of Medicinal Food***, 14(9), 969-974.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. ***Cell***, 144, 646-674.

Hanson, S., Lalor, P.A., Niemi, S.M., Northup, S.J., Ratner, B.D., Spector, M., Vale, B.H. and Willson, J.E. (1996). Testing biomaterials. B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons (Eds.), ***Biomaterials Science: an Introduction to Materials in Medicine***, Academic Press Inc, California, USA, pp. 215-220.

Hegde, A. H., Punith, R. and Seetharamappa, J. (2012). Optical, Structural and Thermodynamic Studies of the Association of an Anti-leucamic Drug Imatinib Mesylate with Transport Protein. ***Journal of Fluorescence***, 22, 521–528.

Heng, D., Lee, S. H., Ng, W. K. and Tan R. B. H. (2011). The nano spray dryer B-90. ***Expert Opinion Drug Delivery,*** 8(7), 965-972.

Hild, W.A., Breunig, M. and Goepferich, A. (2008). Quantum dots – nano-sized probes for the exploration of cellular and intracellular targeting. ***European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics***, 68, 153-168.

HogenEsch, H. and Nikitin, A.Y. (2012). Challenges in pre-clinical testing of anti-cancer drugs in cell culture and in animal models. ***Journal of Controlled Release***, 164, 183-186.

Horizon Blue Cross Blue Shield of New Jersey, Oral Anticancer Medication Coverage Law, URL: http://www.horizonblue.com/sites/default/files/pdf/Oral_Anticancer_Medication_List_2013.pdf, Son Erişim Tarihi: 21.07.2014

Hsu, J. and Muro, S. (2011). Nanomedicine and drug delivery strategies for treatment of genetic diseases. Plaseska-Karanfilska, D. (Ed.), ***Human Genetic Diseases***. InTech, China, pp. 241-266.

Hu, C.M.J. and Zhang, L. (2012). Nanoparticle-based combination therapy toward overcoming drug resistance in cancer. ***Biochemical Pharmacology***, 83, 1104-1111.

Hussain, N., Jaitley, V. and Florence, A.T. (2001). Recent advantages in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. ***Advanced Drug Delivery Reviews***, 50, 107-142.

Ilbasmis Tamer, S. and Degim, I.T. (2012) A feasible way to use carbon nanotubes to deliver drug molecules: transdermal application. ***Expert Opinion Drug Delivery***, 9(8), 991-999.

Invitrogen, Gibco, Cell Culture Basics, URL: http://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf, Son Erişim Tarihi: 13.08.2015

Jain, K., Gupta, U. and Jain, N.K. (2014). Dendronized nanoconjugates of lysine and folate for treatment of cancer. ***European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics***, 87, 500-509.

Joo, W.D., Visintin, I. and Mor, G. (2013). Targeted cancer therapy – are the days of systemic chemotherapy numbered?. ***Maturitas***, 6046, 1-7.

Jung, C., Hugot, J.P. and Barreau, F. (2010). Peyer's patches: the immune sensors of the intestine. ***International Journal of Inflammation***, 1-12.

Kawabata, S., Oka, M., Soda, H., Shiozawa, K., Nakatomi, K., Tsurutani, J., Nakamura, Y., Doi, S., Kitazaki, T., Sugahara, K., Yamada, Y., Kamihira, S. and Kohno, S. (2003). Expression and functional analyses of breast cancer resistance protein in lung cancer, ***Clinical Cancer Research***, 9, 3052–3057.

Kızılbey, K. ve Mustafaeva Akdeste, Z. (2013). Melanoma kanseri. ***Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi***, 31, 555-569.

Kloskowski, T., Gurtowska, N., Nowak, M., Joachimiak, R., Bajek, A., Olkowska, J. and Drewa, T. (2011). The influence of ciprofloxacin on viability of A549, HepG2, A375.S2, B16 and C6 cell lines in vitro, ***Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research***, 68(6), 859-865.

Kondo, K., Ito, N., Niwa, T. and Danjo, K. (2013). Design of sustained release fine particles using two-step mechanical powder processing: particle shape modification of drug crystals and dry particle coating with polymer nanoparticle agglomerate. ***International Journal of Pharmaceutics***, 453, 523-532.

Kong, M., Park, H., Cheng, X., and Chen, X. (2013). Spatial–temporal event adaptive characteristics of nanocarrier drug delivery in cancer therapy. ***Journal of Controlled Release***, 172, 281–291.

Kralj, E., Zakelj, S., Trontelj, J., Roskar, R., Cernelc, P. and Kristl, A. (2014). Absorption and elimination of imatinib through the rat intestine in vitro. ***International Journal of Pharmaceutics***, 460(1-2), 144-149.

Krygier, J. and Lewis, V. (2009). Fibrosarcoma of Bone: Review of a Rare Primary Malignancy of Bone, ***Liddy Shriver Sarcoma Initiative***, 6 (2), 1-20.

Kuang, H., Zhao, Y., Ma, W., Xu, L., Wang, L. and Xu, C. (2011). Recent development in analytical applications of quantum dots. ***Trends in Analytical Chemistry***, 30(10), 1620-1636.

Kulhari, H., Kulhari, D.P., Singh, M.K. and Sistla, R. (2014). Colloidal stability and physicochemical characterization of bombesin conjugated biodegradable nanoparticles. ***Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects***, 443, 459-466.

Kulkarni, A. D., Bari, D. B., Surana, S. J. and Pardeshi C. V. (2016). In vitro, ex vivo and in vivo performance of chitosan-based spray-dried nasal mucoadhesive microspheres of diltiazem hydrochloride. ***Journal of Drug Delivery Science and Technology,*** **31**, 108-117.

Kumar, S., Shen, J., Zolnik, B., Sadrieh, N. and Burgess, D. J. (2015). Optimization and dissolution performance of spray-dried naproxen nano-crystals. ***International Journal of Pharmaceutics***, 486, 159-166.

Kumar, V., Prud'homme, R.K. (2009). Nanoparticle stability: processing pathways for solvent removal. ***Chemical Engineering Science***, 64, 1358-1361.

Kurkchubasche, A. G., Halvorson, E. G., Forman, E.N., Terek, R. M. and Ferguson, W.S. (2000). The Role of Preoperative Chemotherapy in the Treatment of Infantile Fibrosarcoma, ***Journal of Pediatric Surgery***, 35, 880-883.

Langdon, S.P. (2004). Basic principles of cancer cell culture, methods in molecular medicine. S. P. Langdon (Ed.), ***Cancer Cell Culture: Methods and Protocols***. ©Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 3-15.

Lee, S. H., Heng, D., Ng, W. K., Chan, H. K. and Tan R. B. H. (2011). Nano spray drying: a novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. ***International Journal of Pharmaceutics,*** 403, 192-200.

Li, L., Yang, Q., Zhou, Z., Zhong, J. and Huang, Y. (2014). Doxorubicin-loaded, charge reversible, folate modified HPMA copolymer conjugates for active cancer cell targeting. ***Biomaterials***, 35, 5171-5187.

Li, W., Zhou, J. and Xu, Y. (2015). Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices (review). ***Biomedical Reports***, 3: 617-620.

Li, X., Anton, N., Arpagaus, C., Belleteix, F. and Vandamme, T. F. (2010). Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: the Buchi nano spray dryer B-90. ***Journal of Controlled Release,*** 147, 304-310.

Liu, W., Chen, X. D. and Selomulya, C. (2015). On the spray drying of uniform functional microparticles. ***Particuology,*** 22, 1-12.

Lu, P., Zhang, H., Satoh, T., Ohkubo, T., Yamazaki, A., Takano, K., Kamiya, T., Zhu, L., Huang, Y., Jiang, Z., Zheng, Y., Yang, M., Mi, Y., Ren, Q. and Shen, H. (2011). Investigation on the stability of water-soluble ZnO quantum dots in KB cells by X-Ray fluorescence and absorption Methods. ***Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B***, 269, 1940-1943.

Maeda, H., Nakamura, H. and Fang, J. (2013). The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinc tumor imaging in vivo. ***Advanced Drug Delivery Reviews***, 65, 71-79.

Mandal, B., Mittal, N. K., Balabathula, P., Thoma, L. A. and Wood, G. C. (2016).Development and in vitro evaluation of core–shell type lipid–polymer hybrid nanoparticles for the delivery of erlotinib in non-small cell lung cancer. ***European Journal of Pharmaceutical Sciences***, 81, 162–171.

Marques, J.G., Gaspar, V.M., Costa, E., Paquete, C.M. and Correia, I.J. (2014). Synthesis and characterization of micelles as carriers of non-steroidal anti-inflammatory

drugs (NSAID) for application in breast cancer therapy. ***Colloids and Surfaces B: Biointerfaces***, 113, 375-383.

Maysinger, D., Lovric, J., Eisenberg, A. and Savic, R. (2007). Fate of micelles and quantum dots in cells, ***European Journal of Pharmaceutics And Biopharmaceutics***, 65, 270-281.

Medina, O.P., Pillarsetty, N., Glekas, A., Punzalan, B., Longo, V., Gönen, M., Zanzonico, P., Jones, P.S. and Larson, S.M. (2011). Optimizing tumor targeting of the lipophilic EGFR-binding radiotracer SKI 243 using a liposomal nanoparticle delivery system. ***Journal of Controlled Release***, 149, 292–298.

Mei, L., Zhang, Z., Zhao, L., Huang, L., Yang, X.L., Tang, J. and Feng, S.S. (2013). Pharmaceutical nanotechnology for oral delivery of anticancer drugs. ***Advanced Drug Delivery Reviews***, 65, 880-890.

Milane, L., Duan, Z. and Amiji, M. (2011). Development of EGFR-targeted polymer blend nanocarriers for combination paclitaxel/lonidamine delivery to treat multi-drug resistance in human breast and ovarian tumor cells. ***Molecular Pharmacology***, 8(1), 185-203.

Miranda, H.F., Noriega, V., Sierralta, F. and Prieto, J.C. (2011). Interaction between dexibuprofen and dexketoprofen in the orofacial formalin test in mice. ***Pharmacology, Biochemistry and Behavior***, 97, 423-427.

Miranda, H.F., Puig, M.M., Dursteler, C., Prieto, J.C. and Pinardi, G. (2007). Dexketoprofen-induced antinociception in animal models of acute pain: synergy with morphine and paracetamol. ***Neuropharmacology***, 52, 291-296.

Moghimi, S.M. and Szebeni, J. (2003). Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. ***Progress in Lipid Research***, 42, 463-478.

Mutlu Ağardan, N.B., Değim, Z. and Yılmaz, Ş. (2014). Antitumoral and MMP-2 inhibition activity of raloxifene or tamoxifen loaded nanoparticles containing dimethyl-b-cyclodextrin, ***Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry***, 80, 31–36.

Mutlu Ağardan, N.B., Değim, Z., Yılmaz, Ş., Altıntaş, L. and Topa, T. (2016). The Effectiveness of Raloxifene-Loaded Liposomes and Cochleates in Breast Cancer Therapy, ***American Association of Pharmaceutical Scientical Scientists PharmSciTech***, Vol. 17, No. 4., 968-977.

Mutlu, N.B., Değim, Z., Yılmaz, Ş., Eşsiz, D. and Nacar, A. (2011). New perspective for the treatment of alzheimer diseases: liposomal rivastigmine formulations. ***Drug Development and Industrial Pharmacy***, 1–15.

Nakagawa, H., Takiguchi, T., Nakamura, M., Furuyama, A., Koyanagi, S., Aramaki, H., Higuchi, S. and Ohdo, S. (2006). Basis for dosing time-dependent change in the anti-tumor effect of imatinib in mice. ***Biochemical Pharmacology***, 72, 1237–1245.

Namvaran, F., Sharifi, A. M., Namvaran, M. M., Tekyemaroof, N. and Azarpira, N. (2015). The effect of tacrolimus on reactive oxygen species and total antioxidant status in pancreatic beta cell line, ***Experimental and Clinical Transplantation***, 13(6), 510-515.

Nazki, F.H., Sameer, A.S. and Ganaie, B.A. (2014). Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. ***Gene***, 533, 11-20.

Nema, R. and Khare, S. (2012). An animal cell culture: advance technology for modern research. ***Advances in Bioscience and Biotechnology***, 3, 219-226.

Nguyen, H., Zhang, S. and Morris, M. E. (2002). Effect of flavonoids on MRP1-mediated transport in Panc-1 cells, ***Journal of Pharmaceutical Sciences***, 92 (2), 250-257.

Nishioka, Y. and Yoshino, H. (2001). Lymphatic targeting with nanoparticulate system. ***Advanced Drug Delivery Reviews***, 47, 55-64.

Niu, N. and Wang, L. (2015). In vitro cell line models to predict clinical response to anticancer drugs. ***Pharmacogenomics***, 16(3), 273-285.

O'Neilla, M.J., O'Mahonya, A.M., Byrneb, C., Darcyb, R. and O'Driscolla, C.M. (2013). Gastrointestinal gene delivery by cyclodextrins – in vitro quantification of extracellular barriers. ***International Journal of Pharmaceutics***, 456, 390–399.

Oh, K.S., Lee, H., Kim, J.Y., Koo, E.J., Lee, E.H., Park, J.H., Kim, S.Y., Kim, K., Kwon, I.C. and Yuk, S.H. (2013). The multilayer nanoparticles formed by layer by layer approach for cancer-targeting therapy. ***Journal of Controlled Release***, 165, 9–15.

Ozkan, M. (2004). Quantum dots and other nanoparticles: what can they offer to drug discovery?. ***Drug Discovery Today***, 9(24), 1065-1071.

Papagiannaros, A., Levchenco, T., Hartner, W., Mongayt, D. and Torchillin, V. (2009). Quantum dots encapsulated in phospholipid micelles for imaging and quantification of tumors in the near-infrared region. ***Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine***, 5, 216-224.

Parhi, P., Mohanty, C. and Sahoo, S.K. (2012). Nanotechnology-based combinational drug delivery: an emerging approach for cancer therapy. ***Drug Discovery Today***, 17, 17/18, 1044-1052.

Parveen, S. and Sahoo, S.K. (2011). Long circulating chitosan/PEG blended PLGA nanoparticle for tumor drug delivery. ***European Journal of Pharmacology***, 670, 372-383.

Patil, Y., Sadhukha, T., Ma, L. and Panyam, J. (2009). Nanoparticle-mediated simultaneous and targeted delivery of paclitaxel and tariquidar overcomes tumor drug resistance. ***Journal of Controlled Release***, 136, 21-29.

Payne, S. and Miles, D. (2008). Mechanisms of anticancer drugs, M. Gleeson (Ed.), ***Scott-Brown's Otorhinolaryngology: Head and Neck Surgery,*** 7 Edition, 3 Volume, CRC Press, pp. 34-46.

Pinto, A. C., Ângelo, S., Moreira, J. N. and Simões, S. (2012). Development, Characterization and In Vitro Evaluation of Single or Co-Loaded Imatinib Mesylate Liposomal Formulations, ***Journal of Nanoscience and Nanotechnology***, 12(3), 2891-2900.

Pinto, A. C., Moreira, J. N. and Simões, S. (2011). Liposomal Imatinib-Mitoxantrone Combination: Formulation Development and Therapeutic Evaluation in an Animal Model of Prostate Cancer. ***The Prostate***, 71, 81-90.

Plapied, L., Duhem, N., des Rieux, A. and Preat, V. (2011). Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. ***Current Opinion in Colloid&Interface Science***, 16, 228-237.

Plumb, J.A. (2004). Cell sensitivity assays: the MTT assay, Methods in Molecular Medicine, SP. Langdon (Ed.), ***Cancer Cell Culture: Methods and Protocols***, Vol. 88, © Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 165-169.

Price, K.D. and Rao, G.K. (2013). Biological therapies for cancer, L. M. Plitnick, D. J. Herzyk (Eds.), ***Nonclinical Development of Novel Biologics, Biosimilars and Specialty Biologics***, pp. 303-342.

Probst, C.E., Zrazhevskiy, P., Bagalkot, V. and Gao, X. (2013). Quantum dots as a platform for nanoparticle drug delivery vehicle design. ***Advanced Drug Delivery Rewievs***, 65, 703-718.

Pujeri, S. S., Khader, A. M. A. and Seetharamappa, J. (2009). Validated Stability-Indicating Chromatographic Method for the Assay of Erlotinib Active Pharmaceutical Ingredient. ***Analytical Letters***, 42: 1855–1867.

Qwens, D.E. and Peppas, N.A. (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. ***International Journal of Pharmaceutics***, 307, 93-102.

Rahnama, M., Mahmoudi, M., Zamani Taghizadeh Rabe, S., Balali-Mood, M., Karimi, G., Tabasi, N. and Riahi-Zanjani, B. (2015). Evaluation of anti-cancer and immunomodulatory effects of carnosol in a Balb/c WEHI-164 fibrosarcoma model, ***Journal of Immunotoxicology***, 12(3), 231-238.

Rahnama, M., Mahmoudi, M., Zamani Taghizadeh Rabe, S., Balali-Mood, M., Karimi, G., Tabasi, N. and Riahi-Zanjani, B. (2015). Evaluation of anti-cancer and immunomodulatory effects of carnosol in a Balb/c WEHI-164 fibrosarcoma model, ***Journal of Immunotoxicology***, 12(3), 231-238.

Ramazani, F., Chen, W., Van Nostrum, C.F., Storm, G., Kiessling, F., Lammers, T., Hennink, W.E. and Kok, R.J. (2015).Formulation and characterization of microspheres loaded with imatinib for sustained delivery. ***International Journal of Pharmaceutics***, 482, 123–130.

Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P., Bellich, B. and Cesâro, A. (2013). Chitosan nanoparticles: preparation, size evolution and stability. ***International Journal of Pharmaceutics***, 455, 219-228.

Rasola,A., Anguissola, S., Ferrero, N., Gramaglia, D., Maffe, A., Maggiora, P., Comoglio, P. M. and Di Renzo, M. F. (2004). Hepatocyte growth factor sensitizes human ovarian carcinoma cell lines to paclitaxel and cisplatin, ***Cancer Research***, 64, 1744–1750.

Riss, T.L., Moravec, R.A. and Niles, A.L. (2011). Cytotoxicity testing: measuring viable cells, dead cells and detecting mechanism of cell death, M. J. Stoddart (Ed.), ***Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology***, Vol. 740, © Springer Science+Business Media, LLC, pp. 103-114.

Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Duellman, S., Benink, H.A., Worzella, T.J. and Minor, L. (2004). Cell Viability Assays, G. S. Sittampalam, N. P. Coussens, H. Nelson et. al. (Eds.), ***Assay Guidance Manual***, Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, pp. 1-30.

Robertson, J.H.P., Yu Yang, S., Iga, A.M., Seifalian, A.M. and Winslet, M.C. (2008). An in vivo rat model for early development of colorectal cancer metastasis to liver, ***International Journal of Experimental Pathology***, 89, 447-457.

Robertson, K.A., Nalepa, G., Yang, F.C., Bowers, D.C., Ho, C.Y., Hutchins, G.D., Croop, J.M., Vik, T.A., Denne, S.C., Parada, L.F., Hingtgen, C.M., Walsh, L.E., Yu, M., Pradhan, K.R., Edwards-Brown, M.K., Cohen, M.D., Fletcher, J.W., Travers, J.B., Staser, K.W., Lee, M.W., Sherman, M.R., Davis, C.J., Miller, L.C., Ingram, D.A. and Clapp, D.W. (2012). Imatinib mesylate for plexiform neurofibromas in patients with neurofibromatosis type 1: a phase 2 trial. ***The Lancet Oncology***, 13(12), 1218-24.

Roger, M., Clavreul, A., Venier-Julienne, M.C., Passirani, C., Montero-Menei, C. and Menei P. (2011). The potential of combinations of drug-loaded nanoparticle systems and adult stem cells for glioma therapy. ***Biomaterials***, 32, 2106-2116.

Rosenthal, S.J., Chang, J.C., Kovtun, O., McBridge, J.R. and Tomlinson, I.D. (2011). Biocompatible quantum dots for biological applications. ***Chemistry&Biology***, 18, 10-24.

Rukazenkov, Y., Spaeke, G., Marshall, G., Anderton, J., Davies, B.R., Wilkinson, R.W., Marck Hickinson, D. and Swaisland, A. (2009). Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: similar but different?. ***Anticancer Drugs***, 20(10), 856–866.

Saha, S.K. and Khuda-Bukhsh, A.R. (2013). Molecular approaches towards development of purified natural products and their structurally known derivatives as efficient anti-cancer drugs: current trends. ***European Journal of Pharmacology***, 714, 239-248.

Sakthivel, T., Toth, I. and Florence, A.T. (1999). Distribution of a lipidic 2,5nm diameter dendrimer carrier after oral administration. ***International Journal of Pharmaceutics***, 183, 51-55.

Sanchez, A., Tripathy, D., Yin, X., Luo, J., Martinez, J.M. and Grammas, P. (2013). Sunitinib enhances neuronal survival in vitro via NF-κB-mediated signaling and

expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. ***Journal of Neuroinflammation***, 10:93, 1-9.

Sarı, S., Kılıç, N., Kurt, G., Doğulu, F., Çeviker, N., Özer, Y., Dönmez, U., Yıldırım, Z. ve Yavuz, S. (2016). Benign ve malign beyin tümörlerinde içeri doğru düzeltici ve iki gözenekli potasyum kanalı proteinlerinin serum düzeylerinin araştırılması. ***Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences***, 36(1), 7-13.

Savage, D. G. and Antman, K. H. (2002). Imatinib Mesylate — A New Oral Targeted Therapy. ***The New England Journal of Medicine***, 346(9), 683-693.

Savla, R., Taratula, O., Garbuzenko, O. and Minko, T. (2011). Tumor targeted quantum dot-mucin 1 aptamer-doxorubicin conjugate for imaging and treatment of cancer. ***Journal of Controlled Release***, 153, 16-22.

Schmid, K., Arpagaus, C. and Friess, W. (2011). Evaluation of the nano spray dryer B-90 for pharmecutical applications. ***Pharmaceutical Development and Technology,*** 16(4), 287-294.

Schneider, R., Balan, L. and Aldeek, F. (2011). Synthesis, characterization and biological applications of water-soluble ZnO quantum dots. M. Rahman (Ed.), ***Nanomaterials***, InTech, Croatia, pp. 27-42

Schroeder, J.E., Shweky, I., Shmeeda, H., Banin, U. and Gabizon, A. (2007). Folate-mediated tumor cell uptake of quantum dots entrapped in lipid nanoparticles. ***Journal of Controlled Release***, 124, 28-34.

Shen, M., Huang, Y., Han, L., Qin, J., Fang, X., Wang, J. and Yang, V.C. (2012). Multifunctional drug delivery system for targeting tumor and ıts acidic microenvironment. ***Journal of Controlled Release***, 161, 884-892.

Shirzad, H., Taji, F. and Rafieian-Kopaei, M. (2011), Correlation between antioxidant activity of garlic extracts and wehi-164 fibrosarcoma tumor growth in BALB/c mice, ***Journal of Medicinal Food***, 14(9), 969-974.

Sikkema, A.H., den Dunnen, W.F.A., Diks, S.H., Peppelenbosch, M.P. and de Bont, E.S.J.M. (2012). Optimizing targeted cancer therapy: towards clinical application of systems biology approaches. ***Critical Reviews in Oncology/Hematology***, 82, 171–186.

Singh, R. and Lillard, Jr. J.W. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. ***Experimental and Molecular Pathology***, 86(3), 215-223.

Singh, S.R. (2013). Cancer stem cells: recent developments and future prospects. ***Cancer Letters***, 338, 1-2.

Slobbe, P., Poot, A.J., Windhorst, A.D. and Van Dongen, G.A.M.S. (2012). PET imaging with small-molecule tyrosine kinase inhibitors: TKI-PET. ***Drug Discovery Today***, 17, 21/22, 1175-1187.

Song, X.R., Cai, Z., Zheng, Y., He, G., Cui, F.Y., Gong, D.Q., Hou, S.X., Xiong, S.J., Lei, X.J. and Wei, Y.Q. (2009). Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation

of vincristine and verapamil in PLGA nanoparticles. ***European Journal of Pharmaceutical Sciences***, 37, 300-305.

Sonvico, F., Cagnani, A., Rossi, A., Motta, S., Di Bari, M.T., Cavatorta, F., Alonso, M.J., Deriu, A. and Colombo, P. (2006). Formation of self-organized nanoparticles by lecitin/chitosan ıonic ınteraction. ***International Journal of Pharmeceutics***, 324, 67-73.

Sosnik, A. and Seremeta, K. P. (2015). Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. ***Advances in Colloid and Interface Science***, 223, 40-54.

Srinivasan, A. R. and Shoyele, S. A. (2014). Influence of Surface Modification and the pH on the Release Mechanisms and Kinetics of Erlotinib from Antibody-Functionalized Chitosan Nanoparticles. ***Industrial & Engineering Chemistry Research***, 53, 2987−2993.

Stout, A.P. (2006). Fibrosarcoma; the malignant tumor of fibroblast, F. R. Khuri (Ed.), ***Cancer***, American Cancer Society, pp. 30-63

Subramani, K. and Ahmed, W. (2012). Nanoparticulate drug delivery systems for oral cancer treatment, K. Subramani and W. Ahmed (Eds.), ***Emerging nanotechnologies in Dentistry***, Elseiver Inc., pp. 303-345

Suzuki, K., Aoki, K., Ohnami, S., Yoshida, K., Kazui, T., Kato, N., Inoue, K., Kohara, M. and Yoshida, T. (2003). Adenovirus-mediated gene transfer of interferon a improves dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis in rat model, ***Gene Therapy***, 10, 765–773.

Şengel-Türk, C.T., Hasçiçek, C. ve Gönül, N. (2007) Beyne ilaç hedeflendirilmesinde nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler. ***Journal of Neurological Sciences***, 24(3), 254-263.

Talmadge, J. E. and Fidler, I. J. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. ***Cancer Research***, 70(14), 5649-5669.

Tavano, L., Vivacqua, M., Carito, V., Muzzalupo, R., Caroleo, M.C. and Nicoletta, F. (2013). Doxorubicin loaded magneto-niosomes for targeted drug delivery. ***Colloids and Surfaces B: Biointerfaces***, 102, 803-807.

Thanki, K., Gangwal, R. P., Sangamwar, A. T. and Jain, S. (2013). Oral delivery of anticancer drugs: Challenges and opportunities. nanocarriers. ***Journal of Controlled Release***, 170, 15-40.

Tian, B., Al-Jamal, W.T., Al-Jamal, K.T. and Kostarelos, K. (2011). Doxorubicin-loaded lipid-quantum dot hybrids: surface topography and release properties. ***International Journal of Pharmaceutics***, 416, 443-447.

Tomczak, N., Janczewski, D., Han, M. and Vancso, G.J. (2009). Designer polymer-quantum dot architectures. ***Progress in Polymer Science***, 34, 393-430.

Truong, D. H., Tran, T. H:, Ramasamy, T., Choi, Y. J., Lee, H. H., Moon, C., Choi, H. G., Yong, C. S. and Kim, J. O. (2015). Development of Solid Self-Emulsifying Formulation for Improving the Oral Bioavailability of Erlotinib. ***AAPS PharmSciTech***, 17 (2), 466-473.

Türker, A. ve Kayaalp, S.O. (2005). Kanser kemoterapisini esasları ve antineoplastik ilaçlar. Kayaalp, O. (Ed.), ***Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji***, 317-344.

United States Pharmacopeia (USP 26-NF 21), The United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD, 2003.

van der Lubben, I.M., Verhoef, J.C., van Aelst, A.C., Borchard, G. and Junginger, H.E. (2001). Chitosan microparticles for oral vaccination: preparation, characterization and preliminary in vivo uptake studies in murine peyer's patches. ***Biomaterials***, 22, 687-694.

Vasanthavada, M., Wang, Y., Haefele, T., Lakshman, J. P., Mone, M., Tong, W., Joshi, Y. M. and Serajuddın, A. T. M. (2011). Application of Melt Granulation Technology Using Twin-screw Extruder in Development of High-dose Modified-release Tablet Formulation. ***Journal of Pharmaceutical Sciences***, 100(5), 1923-1934.

Vrignaud, S. Hureaux, J., Wack, S., Benoit, J. P. and Saulnier, P. (2012).Design, optimization and in vitro evaluation of reverse micelle-loaded lipid nanocarriers containing erlotinib hydrochloride. ***International Journal of Pharmaceutics***, 436, 194–200.

Vrignaud, S., Hureaux, J., Wack, S., Benoit, J.P. and Saulnier, P. (2012). Design, optimization and in vitro evaluation of reverse micelle-loaded lipid nanocarriers containing erlotinib hydrochloride. ***International Journal of Pharmaceutics***, 436, 194-200.

Wais, U., Jackson, A. W., He, T. and Zhang, H. (2016). Nanoformulation and encapsulation approaches for poorly water-soluble drug nanoparticles. ***Nanoscale***, 8, 1746-1769.

Wan, F. and Yang, M. (2016). Design of PLGA-based depot delivery systems for biopharmaceuticals prepared by spray drying. ***International Journal of Pharmaceutics,*** 498, 82-95.

Wang, Y. and Chen, L. (2011). Quantum dots, lighting up the research and development of nanomedicine. ***Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine***, 7, 385-402.

Wang, Y., Zhang, Q., Zhang, C. and Li, P. (2012). Characterisation and cooperative antimicrobial properties of chitosan/nano ZnO composite nanofibrous membranes. ***Food Chemistry***, 132, 419-427.

Warrick, J., Shuman, L., Zheng, Z., Yamashita, H., Amponsa, V.O. and DeGraff, D. (2016). Molecular subtyping and in vivo phenotyping studies identify human cell lines suitable for bladder cancer research, ***The Federation of American Societies***

for Experimental Biology Journal, 30(1), http://www.fasebj.org/content/30/1_Supplement/445.3

Widmer, N., Bardin, C., Chatelut, E., Paci, A., Beijnen, J., Levêque, D., Veal, G. and Astier, A. (2014). Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part two-targeted therapies, ***European Journal of Cancer***, 50, 2020-2036.

Woodruff, M.A. and Hutmacher, D.W. (2010). The return of a forgotten polymer-polycaprolactone in the 21st century. ***Progress in Polymer Science***, 35, 1217-1256.

Xiong, H.M., Xu, Y., Ren, Q.G. and Xia, Y.Y. (2008). Stable aqueous ZnO@Polymer core-shell nanoparticles with tunable photoluminescence and their application in cell imaging. ***Journal of American Chemical Society***, 130, 7522-7523.

Yan, E., Wang, C., Wang, S., Sun, L., Wang, Y., Fan, L. and Zhang, D. (2011). Synthesis and characterization of fluorescent chitosan-ZnO hybrid nanospheres. ***Materials Science and Engineering B***, 176, 458-461.

Yang, C., Gu, B., Xu, C. and Xu, X. (2011). Self-assembled ZnO quantum dot bioconjugates for direct electrochemical determination of allergen. ***Journal of Electroanalytical Chemistry***, 660, 97-100.

Yang, T., Choi, M.K., Cui, F.D., Kim, J.S., Chung, S.J., Shim, C.K. and Kim, D.D. (2007). Preparation and evaluation of paclitaxel loaded pegylated immunoliposome. ***Journal of Controlled Release***, 120, 1769-1773

Yang, Y.J., Tao, X., Hou, Q. and Chen, J.F. (2009). Fluorescent mesoporous silica nanotubes incorporating CdS quantum dots for controlled release of ibuprofen. ***Acta Biomaterialia***, 5, 3488-3496.

Yao, L., Daniels, J., Wijesinghe, D., Andreev, O.A. and Reshetnyak, Y.K. (2013). pHLIP®-mediated delivery of pegylated liposomes to cancer cells. ***Journal of Controlled Release***, 167, 228-237.

Yu, W.W., Chang, E., Drezek, R. and Colvin, V.L. (2006). Water-soluble quantum dots for biomedical applications. ***Biochemical and Biophysical Research Communications***, 348, 781-786.

Yuan, Q., Hein, S. and Misra, R.D.K. (2010). New generation of chitosan-encapsulated ZnO quantum dots loaded with drug: synthesis, characterization and in vitro drug delivery response. ***Acta Biomaterialia***, 6, 2732-2739.

Zegpi, C., Gonzalez, C., Pinardi, G. and Miranda, H.F. (2009). The effect of opioid antagonists on synergism between dexketoprofen and tramadol. ***Pharmacological Research***, 60, 291-295.

Zhang, L., Lu, J., Jin, Y. and Qiu, L. (2014). Folate-conjugated beta-cyclodextrin-based polymeric micelles with enhanced doxorubicin antitumor efficacy. ***Colloids and Surfaces B: Biointerfaces***, 1-36.

Zhang, Y., Haage, A., Whitley, E.M., Schneider, I.C. and Clapp, A.R. (2012). Mixed-surface, lipid-tethered quantum dots for targeting cells and tissues. ***Colloids and Surfaces B: Biointerfaces***, 94, 27-35.

Zhao, D., Song, H., Hao, L., Liu, X., Zhang, L. and Lv, Y. (2013). Luminescent ZnO quantum dots for sensitive and selective detection of dopamine. ***Talanta***, 107, 133–139.

Zhao, P., Wang, H., Yu, M., Liao, Z., Wang, X., Zhang, F., Ji, W., Wu, B., Han, J., Zhang, H., Wang, H., Chang, J. and Niu, R. (2012). Paclitaxel loaded folic acid targeted nanoparticles of mixed lipid-shell and polymer-core: ın vitro and ın vivo evaluation. ***European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics***, 81, 248-256.

Zheng, Y., Thomas-Schoemann, A., Sakji, L., Boudou-Rouquette, P., Dupin, N., Mortier, L., Vidal, M., Goldwasser, F. and Blanchet, B. (2013). An HPLC-UV method for the simultaneous quantification of vemurafenib and erlotinib in plasma from cancer patients. ***Journal of Chromatography B***, 928, 93– 97.

Zhu, S., Qian, F., Zhang, Y., Tang, C. and Yin, C. (2007). Synthesis and characterization of peg modified n-trimethylaminoethylmethacrylate chitosan nanoparticles. ***European Polymer Journal***, 43, 2244-2253.

EKLER

Ek-1. Formülasyonların reaksiyon kinetiklerine ait değerlendirme sonuçları

Form. Adı	Sıfırıncı Derece			Birinci Derece			Weibull			Higuchi			Hixon-Crowell			Korsmayer-Peppas		
	m	n	r^2	m	n	r^2	m	n	r^2	m	n	r^2	m	n	r^2	m	n	r^2
QD-İMA	0,038	1,949	0,830	0,004	0,323	0,788	0,273	-1,761	0,903	0,527	1,038	0,947	-0,005	3,355	0,814	0,268	0,236	0,904
QD- İMA-PEG	0,174	1,932	0,974	0,008	0,383	0,850	0,524	-1,765	0,899	2,255	-1,494	0,976	-0,012	3,294	0,906	0,501	0,235	0,903
QD- İMA-PEG-FA	0,227	3,834	0,902	0,008	0,513	0,738	0,602	-1,589	0,963	3,011	-1,196	0,977	-0,013	3,102	0,807	0,567	0,301	0,948
QD-ERLO	37,670	4,745	0,948	0,431	1,107	0,766	0,566	-0,300	0,764	55,999	-7,560	0,944	-1,053	2,342	0,833	0,956	1,654	0,952
QD-ERLO-PEG	23,326	6,854	0,800	0,332	1,099	0,689	0,345	-0,486	0,646	36,732	-2,255	0,895	-0,741	2,323	0,708	0,757	1,524	0,902
QD-ERLO-PEG-FA	14,881	6,138	0,817	0,262	1,045	0,705	0,274	-0,635	0,690	23,969	-0,061	0,956	-0,532	2,415	0,742	0,595	1,380	0,920
NP-İMA	5,602	-0,371	0,990	0,232	0,297	0,884	0,530	-1,234	0,808	14,042	-5,556	0,912	-0,367	3,443	0,934	1,028	0,696	0,948
NP- İMA-PEG	6,975	-2,118	0,961	0,242	0,282	0,961	0,617	-1,217	0,849	16,769	-7,752	0,815	-0,405	3,512	0,989	1,024	0,704	0,940
NP- İMA-PEG-FA	10,302	-2,197	0,995	0,263	0,395	0,880	0,665	-1,057	0,832	25,353	-11,193	0,884	-0,480	3,370	0,958	1,193	0,844	0,987
NP-ERLO	11,558	7,534	0,733	0,172	1,126	0,742	0,170	-0,650	0,661	19,577	2,023	0,949	-0,352	2,272	0,769	0,385	1,345	0,940
NP-ERLO-PEG	24,321	10,295	0,834	0,248	1,281	0,760	0,280	-0,367	0,700	39,108	0,211	0,972	-0,606	1,980	0,794	0,553	1,597	0,950
NP-ERLO-PEG-FA	23,392	12,024	0,798	0,213	1,340	0,766	0,241	-0,341	0,692	38,396	1,760	0,969	-0,530	1,854	0,795	0,473	1,610	0,953
KAPSÜL	0,152	0,353	0,984	0,009	0,166	0,943	0,531	-1,957	0,851	1,845	-2,139	0,894	-0,012	3,532	0,982	0,513	0,044	0,857

Ek–2. Etik Kurul Onayı – 1

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : 66332047-604.01.02/ 203-26353 27/11/2013
KONU :

Sayın
Prof.Dr.Zelihagül DEĞİM
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Eczacılık Teknolojisi Bölümü
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Zelihagül DEĞİM, İ.Tuncer DEĞİM, Gülen Melike DEMİR, Özlem ÇOBAN, Sema TUNA TORUNOĞLU, Dinç EŞSİZ ve Şükran YILMAZ'dan oluşan, G.Ü.ET-13.075 kod numaralı ve ***"İmatinib-deksketoprofen ve erlotinib-deksketoprofen içeren nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistem formülasyonlarının fibrosarkomalı fareler üzerindeki etkilerinin araştırılması"*** başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-13.075 and entitled ***"Investigation on the Effect of Nanosized Drug Delivery System's Formulations Prepared With imatinib-Dexketoprofen and Erlotinib-Dexketoprofen in Fibrosarcomatous Mice"*** is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Commitee regulations.

With my best regards.

EK : 1 Liste

Prof.Dr. Leyla AÇIK
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

T.C.Gazi Üniversitesi Rektörlüğü, 06500 Teknikokullar, Ankara
Tel : 0 312 202 20 57 Faks: 0 312 202 20 63

Ek-2. Etik Kurul Onayı – 2

Evrak Tarih ve Sayısı: 04/12/2015-139628

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Zelihagül DEĞİM
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Zelihagül DEĞİM, İsmail Tuncer DEĞİM, Dinç EŞSİZ, Levent ALTINTAŞ, Şükran YILMAZ, Gülen Melike DEMİR, Özlem ÇOBAN, Sema TUNA TORUNOĞLU'dan oluşan, G.Ü.ET-15.077 kod numaralı ve "***İmatinib-deksketoprofen ve Erlotinib –deksketoprofen İçeren Nano Boyutlu İlaç Taşıyıcı Sistem Formülasyonlarının Farmakokinetik Etkilerinin Fareler Üzerinde Araştırılması"*** adlı başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-15.077 and entitled ***"Investigation on the Pharmacokinetic Effects of Nanosized Drug Delivery System's Formulations Prepared with Imatinib-Dexketoprofen and Erlotinib-dexketoprofen in Mice"*** is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Commitee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Leyla AÇIK
Kurul Başkanı

EK :
1 Liste

Ankara
Tel:0 (312) 202 20 57 Faks:0 (312) 202 20 63
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://dhek.gazi.edu.tr/

Bilgi için :Şenay Seloğlu
Genel Evrak Sorumlusu

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı :DEMİR, Gülen Melike

Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti

Doğum tarihi ve yeri : 1989, MERSİN

Medeni hali : Bekar

Telefon : 3122023058

Faks : 3122127958

e-mail : gmdemir@gazi.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2012
Lise	Abdulkerim Bengi Anadolu Lisesi	2007

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2013-	Ankara/Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce, İtalyanca

Yayınlar

G. M. Demir, N. Tarımcı, P. Colombo, A. Rossi, Dome Matrix® Assembled System For Two Pulse Release Of Esomeprazole, 10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-11), 26-29/06/2012

G. M. Demir, A. Karaküçük, D. Bektaş, Ö. Çoban, H. E. Gülpınar, S. T. Torunoğlu, Z. Değim, Stirring Speed Effects On Physical Characteristics Of Theophylline Microspheres, ICNFA 2014 - 5th International Conference on Nanotechnology: Fundamentals and Applications, 41, 11-13/08/2014

O. Coban, G.M. Demir, S. Tuna Torunoğlu, Z. Degim, I.T. Degim, Simultaneous Determination Of Imatinib Mesylate And Dexketoprofen Trometamol Using UPLC, 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-11), 277, 9-12/06/2015

G. M. Demir, O. Coban, S. Tuna Torunoglu, Z. Degim, I. T. Degim, Development Of A Nanocarrier Sytem Containing Combination Of Drugs (Erlotinib-Dexketoprofen) For Effective Anticancer Therapy, AAPS | 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition, AM-15-2458, 25-29/10/2015

G. M. Demir, I. T. Degim, Preperation of chitosan nanoparticles by nanospray drying technology, GPSS, 12-15/11/2015

Hobiler

Yüzme, moldel uçak tasarımı, seyehat, kişisel gelişim, denemeler yazma

GAZİ GELECEKTİR..