



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**PROSTAT KANSERİ TEDAVİSİNE YÖNELİK
POLİMERİK NANOPARTİKÜLER İLAÇ TAŞIYICI
SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE
ANTİPROLİFERATİF ETKİNLİKLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

İsmail Safa BULUT

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ceyda Tuba ŞENGEL TÜRK

ANKARA

2024

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROSTAT KANSERİ TEDAVİSİNE YÖNELİK
POLİMERİK NANOPARTİKÜLER İLAÇ TAŞIYICI
SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE
ANTİPROLİFERATİF ETKİNLİKLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

İsmail Safa BULUT

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ceyda Tuba ŞENGEL TÜRK

ANKARA

2024

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü' ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Prostat Kanseri Tedavisine Yönelik Polimerik Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve Antiproliferatif Etkinliklerinin Değerlendirilmesi" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: İsmail Safa BULUT

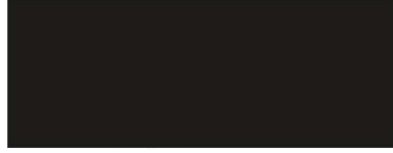
Tarih: 12.07.2024

İmza

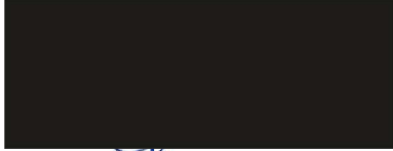
KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında
İsmail Safa BULUT tarafından hazırlanan
"Prostat Kanseri Tedavisine Yönelik Polimerik Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı
Sistemlerin Geliştirilmesi ve Antiproliferatif Etkinliklerinin Değerlendirilmesi" adlı
tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/~~OY~~
~~ÇOKLUĞU~~ ile kabul/~~ret~~ edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 12.07.2024



İmza
Prof. Dr. Ayşegül KARATAŞ
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı



İmza
Prof. Dr. Fatma Nur TUĞCU
DEMİRÖZ
Gazi Üniversitesi



İmza
Prof. Dr. Ceyda Tuba ŞENGEL
TÜRK
Ankara Üniversitesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Prostat Kanseri Tedavisine Yönelik Polimerik Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve Antiproliferatif Etkinliklerinin Değerlendirilmesi

Prostat kanseri, dünyada kansere bağlı ölümler arasında akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Temel tedavi rejimlerinden olan androjen ablasyon tedavisi ve kemoterapi; metastatik hastalığı veya ileri lokal hastalığı olan erkeklerde önemli bir sağ kalım oranı sağlayamadığından, yeni tedavi yaklaşımlarına önemli düzeyde ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla bu tez çalışmasında çeşitli kanser türleri üzerinde kemopreventif etkinliği kanıtlanmış statin grubu bir etkin madde olan Pitavastatin molekülünün polimerik nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemleri hazırlanmış ve PC-3 prostat kanseri hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkinliği tayin edilmiştir. Bu kapsamda hazırlanan polimerik nanopartikül formülasyonların in-vitro özelliklerinin belirlenmesi amacıyla etkin madde yükleme etkinliği, partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı, yüzey yükü, morfolojik özellikleri ve in-vitro etkin madde salım hızı tayini gerçekleştirilmiştir. Belirlenen optimum Pitavastatin yüklü polimerik nanopartikül formülasyonu üzerinde ise in-vitro sitotoksite analizi gerçekleştirilmiş olup optimum Pitavastatin yüklü nanopartikül formülasyonunun saf moleküle kıyasla PC-3 hücre canlılığı üzerinde anlamlı derecede antiproliferatif etkinliğe sahip olduğu sonucu tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, PC-3 hücreleri, Pitavastatin, Prostat kanseri

SUMMARY

Development of Polymeric Nanoparticle Drug Delivery Systems for Prostate Cancer Treatment and Evaluation of Antiproliferative Activities

Prostate cancer is the second most common cancer-related death in the world after lung cancer. Although androgen ablation therapy and chemotherapy which are the basic treatment strategies, can not be obtain significant survival rate in men with metastatic disease or advanced local disease, there is a significant need for new treatment approaches. The main of this thesis was to develop the polymeric nanoparticles of Pitavastatin molecule, which is a member of statins, with proven chemopreventive efficacy on various types of cancer, and to determine their antiproliferative activity on PC-3 prostate cancer cells. In this context, the encapsulation efficiency, particle size and size distribution, surface charge, morphological properties and in-vitro drug release profiles were carried out in order to determine the in-vitro properties of polymeric nanoparticle formulations. In-vitro cytotoxicity analysis was performed on the optimum Pitavastatin-loaded polymeric nanoparticle formulation and it was determined that the optimum Pitavastatin-loaded nanoparticle formulation had a significant antiproliferative activity on PC-3 cell viability compared to the pure molecule.

Keywords: Nanoparticle drug delivery systems, PC-3 cells, Pitavastatin, Prostate cancer

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	ix
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xii
Çizelgeler	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser	1
1.1.1. Kanser Oluşumu	2
1.1.2. Kansere Sebep Olan Risk Faktörleri	3
1.1.3. Kanserin Tedavi Seçenekleri	3
1.1.4. Kanser Tedavisinde Sitatinlerin Yeri ve Önemi	4
1.2. Prostat Kanseri	5
1.2.1. Prostat Kanserinde Risk Faktörleri	8
1.3. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler	8
1.3.1. Polimer Bazlı Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler	10
1.3.2. Kanser Tedavisinde Nanopartiküller İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Yeri	11
1.3.3. Prostat Kanserinde Nanopartiküler Sistemlerin Yeri	12
1.4. Nanopartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler	13
1.4.1. Çalışmamızda Kullanılan Yardımcı Maddeler	14
1.4.1.1. PLGA	14
1.4.1.2. Polivinil Alkol (PVA)	16
1.4.1.3. Poloksamer 188	17
1.5. Polimerik Nanopartikülleri Hazırlama Yöntemleri	17
1.5.1. Nanoprespitasyon Yöntemi	19
1.6. Pitavastatin	20
1.6.1 Pitavastatinin Fizikokimyasal Özellikleri	20
1.6.2. Pitavastatinin Farmakolojik Özellikleri	21
1.6.3. Pitavastatinin Farmakokinetik Özellikleri ve Biyoyarlanımı	21
1.6.4. Pitavastatinin Metabolizma ve Eliminasyonu	22
1.6.5. Pitavastatinin Antikanser Etkinliği	22
2. GEREÇ ve YÖNTEM	24
2.1. Gereçler	24
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	24
2.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler	25
2.2. Yöntem	25
2.2.1. Etkin Maddenin Özelliklerinin Belirlenmesi	26
2.2.1.1. Etkin Maddenin Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC) Analizi	26
2.2.2. Etkin Maddenin Kalibrasyonu ve Analitik Validasyon	26

2.2.2.1 Etkin Maddenin HPLC Kullanılarak Kalibrasyonuna Yönelik Analitik Validasyon Çalışmaları	27
2.2.2.1.1. Seçicilik	27
2.2.2.1.2. Sistem Uygunluğu	28
2.2.2.1.3. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)	28
2.2.2.1.4. Teşhis limiti (LOD) & Tayin limiti (LOQ)	28
2.2.2.1.5. Doğrusallık ve Aralığı	28
2.2.2.1.6. Doğruluk	29
2.2.3. Polimerik Nanopartikül Formülasyon Çalışmaları	29
2.2.3.1. Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması	29
2.2.4. Nanopartikül Formülasyonları Üzerinde Yapılan Kontroller	30
2.2.4.1 Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımı (PDI) Tayini	30
2.2.4.2. Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliğinin Tayini	31
2.2.4.3. Nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Analizi	31
2.2.4.4. İn Vitro Etkin Madde Açığa Çıkış Hızı Tayini	31
2.2.4.5 Nanopartiküllerin Etkin Madde Salım Kinetiğinin İncelenmesi	32
2.2.4.6. Nanopartiküllerin DSC Analizi	32
2.2.4.7. Nanopartiküllerin Morfolojik Özellikleri	33
2.2.4.8. Stabilite Çalışmaları	33
2.2.5 Nanopartiküllerin Antiproliferatif Aktivitelerinin Tayini	33
2.2.5.1. Hücre Kültürü	33
2.2.5.2. CCK-8 Analizi	34
2.2.5.3. Akridin oranj/Propidyum İyodür Boyama Analizi	34
2.2.6 İstatistiksel Değerlendirme	35
3. BULGULAR	36
3.1. Etkin Maddenin Özelliklerinin Belirlenmesi	36
3.1.1. Etkin Maddenin DSC Analiz Bulguları	36
3.2. Etkin Maddenin HPLC Kullanılarak Belirlenen Kalibrasyonuna Yönelik Analitik Validasyon Bulguları	36
3.2.1. Seçicilik	36
3.2.2. Sistem Uygunluğu	38
3.2.3. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)	38
3.2.4. Teşhis limiti (LOD) & Tayin limiti (LOQ)	38
3.2.5. Doğrusallık ve Aralığı	39
3.2.6. Doğruluk	40
3.3. Polimerik Nanopartikül Formülasyon Çalışma Bulguları	41
3.3.1. Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve PDI Tayin Bulguları	41
3.3.2. Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Etkinlik Tayin Bulguları	41
3.3.3 Nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Tayin Bulguları	42
3.3.4. İn Vitro Etkin Madde Açığa Çıkış Hızı Tayin Bulguları	42
3.3.5. Optimum Formülasyonun Çözünme Hızı Verilerinin Kinetik Açından Değerlendirilmesi	55
3.3.6. Optimum Formülasyonun DSC Analiz Bulguları	56
3.3.7. Optimum Formülasyonun Morfolojik Özellik Bulguları	56
3.3.8. Optimum Formülasyonun Stabilite Bulguları	57

3.3.9. Optimum Formülasyonunun PC-3 Hücrelerinde Antikanser Etkinliğine Dair Bulgular	57
3.3.10. Optimum Formülasyonunun PC-3 Hücrelerinde Hücre Morfolojisinde Etkisinin Değerlendirilmesi	58
4. TARTIŞMA	60
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ	85

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, çeşitli kanser türleri üzerinde kemopreventif etkinliği kanıtlanmış bir statin grubu etkin madde olan Pitavastatin molekülünün polimerik nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerinin geliştirilmesi ve PC-3 prostat kanseri hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkinliğinin tayin edilmesi amaçlanmıştır. Hazırlanan polimerik nanopartikül formülasyonlarının in-vitro özelliklerinin belirlenmesi amacıyla etkin madde yükleme etkinliği, partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı, yüzey yükü, morfolojik özellikleri, etkin madde-yardımcı madde etkileşimi ve in-vitro etkin madde açığa çıkış tayini gerçekleştirilmiştir.

Gerçekleştirdiğim bu tez çalışmasının tamamlanması sürecinde birçok kişinin desteği ve katkısı bulunmaktadır.

Tezli yüksek lisans eğitim sürecimde deneysel çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için gerekli imkanları sunan Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanlığına,

Tezli yüksek lisans eğitim sürecine başladığım andan itibaren benden yardımlarını esirgemeyen, karşılaştığım her zorlukta ilgisi ve desteği ile bana yön veren Prof. Dr. Ceyda Tuba Şengel Türk hocama,

BİDEB 2210A - Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı TUBİTAK koordinatörlüğünün bursiyer desteğine,

Tezli yüksek lisans eğitim sürecinde bana her daim destek olan yöneticilerime ve çalışma arkadaşlarıma,

Deneysel çalışmalarım sırasında her türlü bilgi ve birikimini benimle paylaşan ve bu süreçte her daim desteği ile yol gösteren Çağrı Güzey abime,

Her zaman yanımda olan, desteklerini benden esirgemeyen, beni her daim cesaretlendiren ve yönlendiren ablam Arzu Bulut'a, eniştem İsa Bulut'a ve yeğenim Leylaya,

Bu tezin başarılı bir şekilde tamamlanmasında en büyük paya sahip olan, hayatım boyunca bana her zaman inanan, güvenen ve hep yanımda olan annem Seçkin Bulut'a ve babam Ayhan Bulut'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

A.O.K.T	Artık ortalama kareler toplamı
AUC	İlacın sistemik dolaşıma geçen miktarı
BSS	Bağıl standart sapma
Cmax	İlacın kanda ulaştığı maksimum konsantrasyon
CO ₂	Karbondioksit
Da	Dalton
DSC	Diferansiyel Tarama Kalorimetresi
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
Dk	Dakika
F	Kinetik modele uyumu ifade eden değer
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi
FESEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HMGCR	3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A redüktaz
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
JP	Japon Farmakopesi
K	Higuchi salım hızı sabiti
K ₀	sıfıncı derece hız sabiti
K ₁	Birinci derece hız sabiti
log P	N-oktanol/su bölme katsayısı
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LOD	Teşhis limiti
LOQ	Tayin limiti
μ	Mikro
μL	Mikrolitre
μM	Mikrometre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mV	Milivolt
nm	Nanometre
NP	Nanopartikül
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PLA-PCL	Poli (laktid-ko-kaprolakton)
PLGA	Poli (laktik-ko-glikolik asit)

PLGA-PCL	Poli (laktid-ko-kaprolakton-ko-glikolid)
PLL	Poli(L-lizin)
PMMA	Poli(metil metakrilat)
PVA	Polivinil alkol
SS	Standart Sapma
TS	Test solüsyonu
UGT	Üridin 5'-difosfat glukuronosiltransferaz
VLDL	Çok düşük yoğunluklu lipoprotein

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. 2019'da 70 yaş altındaki bireylerde ölüm nedeni olarak kanserin sıralaması	2
Şekil 1.2. 2020 Yılında dünya genelinde en çok karşılaşılan kanser tipleri ve vaka sayıları	2
Şekil 1.3. 1975-2020 Yılları arasında 100.000 kişideki yeni vaka ve ölüm oranı	6
Şekil 1.4. Prostat kanserinin yaş grubuna göre yeni vaka yüzdesi oranı	6
Şekil 1.5. 2016-2020 Yılları arasında yaş gruplarına göre ölüm oranları	7
Şekil 1.6. Dünya Sağlık Örgütü tarafında 2016 yılında yapılan prostat kanseri sınıflandırması	8
Şekil 1.7. Nanopartikül türlerinin şematik gösterimi	9
Şekil 1.8. Nanoküre ve nanokapsül yapıları	11
Şekil 1.9. PLGA kimyasal yapısı	15
Şekil 1.10. PLGA'nın hidrolizi	15
Şekil 1.11. Polivinil alkolün kısmen hidrolize yapısal formülü ve tamamen hidrolize yapısal formülü	16
Şekil 1.12. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanma yöntemleri	18
Şekil 1.13. Nanoprespitasyon tekniğinin şematik gösterimi	19
Şekil 1.14. Pitavastatin kimyasal yapısı	20
Şekil 1.15. Pitavastatin metabolizması	22
Şekil 3.1. Pitavastatin DSC termogramı	36
Şekil 3.2.a. Pitavastatin içermeyen nanopartiküle ait kromotogram	37
Şekil 3.2.b. Pitavastatin yüklü nanopartiküle ait kromotogram	37
Şekil 3.3.a. Instant paket programı ile çizilmiş lineer regresyon grafiği	39
Şekil 3.3.b. Microsoft excell programı ile çizilmiş lineer regresyon grafiği	40
Şekil 3.4.a. Etkin madde/Polimer oranının sabit (1:5), Poloksamer 188 oranının (%1, %2, %3) değişken olduğu F1, F2 ve F3 formülasyonlarının 7 günlük salım profilleri	43
Şekil 3.4.b. Etkin madde/Polimer oranının sabit (1:5), Poloksamer 188 oranının (%1, %2, %3) değişken olduğu F1, F2 ve F3 formülasyonlarının ilk 6 saatlik salım profilleri	43
Şekil 3.5.a. Etkin madde/Polimer oranının sabit (1:10), Poloksamer 188 oranının (%1, %2, %3) değişken olduğu F4, F5 ve F6 formülasyonlarının 7 günlük salım profilleri	44
Şekil 3.5.b. Etkin madde/Polimer oranının sabit (1:10), Poloksamer 188 oranının (%1, %2, %3) değişken olduğu F4, F5 ve F6 formülasyonlarının ilk 6 saatlik salım profilleri	44
Şekil 3.6.a. Etkin madde/Polimer oranının sabit (1:15), Poloksamer 188 oranının (%1, %2, %3) değişken olduğu F7, F8 ve F9 formülasyonlarının 7 günlük salım profilleri	45
Şekil 3.6.b. Etkin madde/Polimer oranının sabit (1:15), Poloksamer 188 oranının (%1, %2, %3) değişken olduğu F7, F8 ve F9 formülasyonlarının ilk 6 saatlik salım profilleri	45
Şekil 3.7.a. Poloksamer 188 oranının sabit (%1), Etkin madde/Polimer oranının (1:5, 1:10, 1:15) değişken olduğu F1, F4 ve F7 formülasyonlarının 7 günlük salım profilleri	46

Şekil 3.7.b. Poloksamer 188 oranının sabit (%1), Etkin madde/Polimer oranının (1:5, 1:10, 1:15) 46	değişken olduğu F1, F4 ve F7 formülasyonlarının ilk 6 saatlik salım profilleri
Şekil 3.8.a. Poloksamer 188 oranının sabit (%2), Etkin madde/Polimer oranının (1:5, 1:10, 1:15) 47	değişken olduğu F2, F5 ve F8 formülasyonlarının 7 günlük salım profilleri
Şekil 3.8.b. Poloksamer 188 oranının sabit (%2), Etkin madde/Polimer oranının (1:5, 1:10, 1:15) 47	değişken olduğu F2, F5 ve F8 formülasyonlarının ilk 6 saatlik salım profilleri
Şekil 3.9.a. Poloksamer 188 oranının sabit (%3), Etkin madde/Polimer oranının (1:5, 1:10, 1:15) 48	değişken olduğu F3, F6 ve F9 formülasyonlarının 7 günlük salım profilleri
Şekil 3.9.b. Poloksamer 188 oranının sabit (%3), Etkin madde/Polimer oranının (1:5, 1:10, 1:15) 48	değişken olduğu F3, F6 ve F9 formülasyonlarının ilk 6 saatlik salım profilleri
Şekil 3.10.a. Etkin madde/Polimer oranının sabit (1:5), PVA oranının (%1, %2, %3) değişken 49	olduğu F10, F11 ve F12 formülasyonlarının 7 günlük salım profilleri.
Şekil 3.10.b. Etkin madde/Polimer oranının sabit (1:5), PVA oranının (%1, %2, %3) değişken 49	olduğu F10, F11 ve F12 formülasyonlarının ilk 6 saatlik salım profilleri
Şekil 3.11.a. Etkin madde/Polimer oranının sabit (1:10), PVA oranının (%1, %2, %3) değişken 50	olduğu F13, F14 ve F15 formülasyonlarının 7 günlük salım profilleri
Şekil 3.11.b. Etkin madde/Polimer oranının sabit (1:10), PVA oranının (%1, %2, %3) değişken 50	olduğu F13, F14 ve F15 formülasyonlarının ilk 6 saatlik salım profilleri.
Şekil 3.12.a. Etkin madde/Polimer oranının sabit (1:15), PVA oranının (%1, %2, %3) değişken 51	olduğu F16, F17 ve F18 formülasyonlarının 7 günlük salım profilleri
Şekil 3.12.b. Etkin madde/Polimer oranının sabit (1:15), PVA oranının (%1, %2, %3) değişken 51	olduğu F16, F17 ve F18 formülasyonlarının ilk 6 saatlik salım profilleri
Şekil 3.13.a. PVA oranının sabit (%1), Etkin madde/Polimer oranının (1:5, 1:10, 1:15) değişken 52	olduğu F10, F13 ve F16 formülasyonlarının 7 günlük salım profilleri
Şekil 3.13.b. PVA oranının sabit (%1), Etkin madde/Polimer oranının (1:5, 1:10, 1:15) değişken 52	olduğu F10, F13 ve F16 formülasyonlarının ilk 6 saatlik salım profilleri
Şekil 3.14.a. PVA oranının sabit (%2), Etkin madde/Polimer oranının (1:5, 1:10, 1:15) değişken 53	olduğu F11, F14 ve F17 formülasyonlarının 7 günlük salım profilleri
Şekil 3.14.b. PVA oranının sabit (%2), Etkin madde/Polimer oranının (1:5, 1:10, 1:15) değişken 53	olduğu F11, F14 ve F17 formülasyonlarının ilk 6 saatlik salım profilleri
Şekil 3.15.a. PVA oranının sabit (%3), Etkin madde/Polimer oranının (1:5, 1:10, 1:15) değişken 54	olduğu F12, F15 ve F18 formülasyonlarının 7 günlük salım profilleri
Şekil 3.15.b. PVA oranının sabit (%3), Etkin madde/Polimer oranının (1:5, 1:10, 1:15) değişken 54	olduğu F12, F15 ve F18 formülasyonlarının ilk 6 saatlik salım profilleri
Şekil 3.16. Optimum formülasyon yapısındaki pitavastatin yüklü nanopartikülün ve boş 56	nanopartikülün DSC termogramı
Şekil 3.17. Optimum nanopartikül formülasyona ait FESEM görüntüsü 56	

- Şekil 3.18.** Saf Pitavastatin, optimum nanopartikül formülasyon ve Pitavastatin içermeyen nanopartikül formülasyonunun PC-3 hücrelerinde antikanser etkisinin CCK-8 analizi ile değerlendirilmesi 58
- Şekil 3.19.** Saf Pitavastatin ve optimum nanopartikül formülasyon uygulanan PC-3 hücrelerinde morfolojik değişimlerin AO/PI boyaması ile görüntülenmesi 59

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Nanopartiküllerde kullanılan polimerlerin sınıflandırılması	14
Çizelge 2.1. Pitavastatinin kalibrasyon ve analitik validasyonu	26
Çizelge 2.2. Pitavastatinin analitik validasyon çalışması için kullanılan parametreler	27
Çizelge 2.3. Nanoprespitasyon tekniği kullanılarak hazırlanan formülasyon denemeleri	30
Çizelge 3.1. Sistem uygunluğu parametre bulguları	38
Çizelge 3.2. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik) parametre bulguları	38
Çizelge 3.3. LOD & LOQ parametre bulguları	39
Çizelge 3.4. Doğrusallık ve aralığı parametre bulguları	39
Çizelge 3.5. Doğruluk parametre bulguları	40
Çizelge 3.6. Nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve PDI bulguları	41
Çizelge 3.7. Nanopartikül formülasyonlarının enkapsülasyon etkinlik bulguları	41
Çizelge 3.8. Nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyel bulguları	42
Çizelge 3.9. Nanopartikül formülasyonlardan açığa çıkan % etkin madde miktarları	55
Çizelge 3.10. Optimum formülasyonunun çözünme hızı verilerinin kinetik açıdan değerlendirilmesi	55
Çizelge 3.11. Optimum formülasyonunun 4°C sıcaklık değerindeki 6 aylık stabilite verileri	57

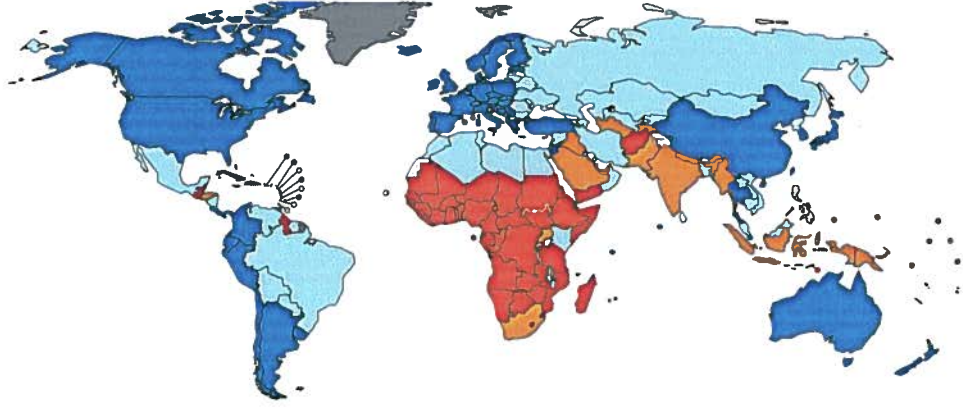
1. GİRİŞ

Prostat kanseri dünya genelinde en sık teşhis edilen dördüncü, erkeklerde ise cilt kanseri'nden sonra en sık karşılaşılan kanser türüdür. 2020 yılında dünya genelinde 1.414.259 kişiye prostat kanseri teşhisi konulmuş olup, 2023 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde tahminen 288.300 erkeğe prostat kanseri teşhisi konulacaktır (Amerikan Klinik Onkoloji Derneği, 'Prostate Cancer', Erişim: 25 Haziran 2023). Nanoteknoloji, kanserin teşhisinden, saptanmasına ve tedavisine kadar kanserin yönetimi için geniş çapta kullanılmaktadır. Kanser tedavisi için nanopartiküller ile yapılan araştırmaların çoğu prelinik fazda olsa da önemli oranda klinik uygulama da bulunmaktadır (Tomlinson vd., 2015).

1.1. Kanser

Kanser, hücrelerin anormal bölünmesi veya çoğalması ile ortaya çıkan, genetik ve çevresel faktörlerin etkisi ile gelişebilen komplike bir hastalıktır. Kanser hastalığının tedavisi için çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemler arasından kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemler standart tedavi yöntemleri olarak kabul edilmektedir. Teknolojik gelişmeler sayesinde aşilar ve gen terapileri de hastalığın tedavisi için kullanılmaya başlanmıştır. (Baykara, 2016). Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2019 yılı verilerine göre kanser hastalığı, 183 ülkenin 112'sinde 70 yaş altı ölüm nedenleri arasında birinci veya ikinci, 23 ülkede ise üçüncü veya dördüncü sırada yer almaktadır (Tanık vd., 2022).

Dünya genelinde 2019 yılında 70 yaş altındaki bireylerde kanser nedeniyle gerçekleşen ölümlere ait sıralama aşağıda Şekil 1.1'de yer almaktadır. 2020 yılında yaklaşık 19.3 milyon kişide yeni kanser vakası tespit edilmiş olup, yaklaşık 10 milyon kişininde kanser sebebiyle vefatının gerçekleştiği tahmin edilmektedir. 2020 yılında Dünya genelinde en çok karşılaşılan kanser tipleri Şekil 1.2'de yer almaktadır.



■	1.
■	2.
■	3-4.
■	5-9.
■	Veri Yok

Şekil 1.1. 2019'da 70 yaş altındaki bireylerde ölüm nedeni olarak kanserin sıralaması (Dünya Sağlık Örgütü, Erişim: 30 Aralık 2022).

Kanser Tipi	Vaka Sayısı (Kişi)
Meme Kanseri	2.261.419
Akciğer	2.206.771
Prostat Kanseri	1.414.259
Cilt Kanseri	1.198.073
Kolon	1.148.515
Mide	1.089.103
Karaciğer	905.677
Rektum	732.210
Rahim Ağzı	604.127
Yemek Borusu	604.100
Tiroid	586.202
Mesane	573.278

Şekil 1.2. 2020 yılında dünya genelinde en çok karşılaşılan kanser tipleri ve vaka sayıları.

1.1.1. Kanser Oluşumu

Kanserin henüz net olarak tedavi edilemediği göz önüne alındığında, geçen yüzyılın başından bu yana birçok hipotez veya teori öne sürülmektedir. Bu teoriler arasında; kansere virüslerin neden olduğu, kromozomal anormallikler, somatik mutasyonlar, çoklu mutasyonlar, immünolojik sürveyanslar, iyileşmeyen yaralar ve mutajenik olmayan mekanizmalar gibi

farklı teoriler bulunmaktadır. Mevcut yaygın kanser teorileri, kanserin hücre büyümesini ve farklılaşmasını kontrol eden kritik genlerde rastgele mutasyonların ilerleyici birikiminin neden olduğu kontrolsüz bir somatik hücre proliferasyonu olduğunu savunmaktadır (Meng vd., 2012). Kanser hücre proliferasyonunu artıran sürücü gen mutasyonlarının kademeli olarak birikmesinin bir sonucu olduğu artık yaygın olarak kabul edilmektedir. Normal bir insan kök hücresi her bölündüğünde yaklaşık üç mutasyonun meydana geldiği kanıtlanmıştır. Bu nedenle, kök hücre bölünmeleri ile kanser insidansı arasındaki ilişkinin temel nedenlerinin, bu bölünmelerden rastgele kaynaklanan sürücü gen mutasyonları olduğu sonucuna varılmıştır (Tomasetti vd., 2017).

1.1.2. Kansere Sebep Olan Risk Faktörleri

Kansere sebep olan çeşitli risk faktörleri bulunmaktadır. Bu faktörler arasında çevresel faktörler, yaşam tarzı ve genetik faktörler kansere sebep olan risk faktörleri olarak değerlendirilebilir. Pestisit ve radyasyona maruziyet, çevresel faktörlere örnek teşkil ederken; beslenme bozuklukları, hareketsiz yaşam tarzı ve sigara/alkol tüketimi yaşam tarzı ile ilişkili faktörlere örnek verilebilir. Wiskott-Aldrich ve Beckwith-Wiedemann sendromları da genetik sebeplerden kaynaklı risk faktörleri olarak kanser nedenleri arasında yer almaktadır (Goyal ve Kumar, 2014).

1.1.3. Kanser Tedavi Seçenekleri

Kanser hastalığının tedavisi farklı yöntemler ile gerçekleştirilebilmektedir. Bu yöntemler arasında; radyasyon ile tedavi, cerrahi yöntemler ile tedavi, kemoterapi, hormon replasman tedavisi, hedefe yönelik ilaç tedavisi ve immunoterapi gibi çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Cerrahi müdahale ile tedavi yöntemi en sık kullanılan yöntem olmasına karşın tedavi yöntemi belirlenirken hastalığın evresi ve hastanın koşulları da göz önüne alınmaktadır. Cerrahi müdahale ile tümörler veya kanserli hücreler vücuttan uzaklaştırılarak tedavi gerçekleştirilmektedir. Bu işlemin devamında kemoterapi veya radyasyon ile hastalığın tedavisine devam edilebilmektedir. Kemoterapi, kanserli dokunun tedavisinde ilaç kullanılarak gerçekleştirilen tedavi yöntemidir. Fakat kemoterapi için kullanılan ilaçlar yüksek doz kullanılması durumunda sitotoksik etkilere sebep olabilmektedir. Radyasyon ile tedavi ise gama ışınları, x ışınları ve yüklü parçacıklı ışınlar kullanılarak gerçekleştirilen tedavi

yöntemidir. Bu yöntemler haricinde yeni bir tedavi yöntemi olan immunoterapi, vücudun bağışıklık sistemi sayesinde kanserli hücelere karşı daha efektif bir mücadele ile kanserli hücelerin gelişimini durdurmayı ya da kanserli hücelerin yok edilmesini hedeflemektedir (Goyal ve Kumar, 2014).

1.1.4. Kanser Tedavisinde Statinlerin Yeri ve Önemi

Statinler, kolesterol sentez yolundaki anahtar enzim olan 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A redüktazın (HMG-CoA redüktaz, HMGCR olarak kısaltılır) rekabetçi inhibitörleridir. Statinlerin HMG-CoA redüktazı inhibe etme yeteneği, statinlerin asidik formu ile HMGCR'nin doğal substratı olan HMG-CoA arasındaki yapısal benzerlikten kaynaklanmaktadır. HMGCR, HMG-CoA'nın kolesterol öncüsü olan mevalonata dönüşümünü katalize etmektedir. HMG-CoA redüktazın inhibisyonu mevalonat düzeylerinde bir azalmaya, dolayısıyla hücre yüzeyindeki düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptörlerinin sayısında ve LDL katabolizmasında artışa yol açmaktadır. Bazı statinler, öncüleri olan çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) sentezini önleyerek karaciğerde LDL sentezini de inhibe edebilirler. Ayrıca klinik veriler, bazı statin grubu moleküllerin (Lovastatin, Pravastatin ve Simvastatin) yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) seviyesini artırabileceğini göstermiştir. Bu nedenle statinler, kardiyovasküler hastalıkların tedavisi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Matuszewicz vd., 2015).

Statinlerin bu mucizevi etkilerinin gözlemlenmesi sonucunda diğer hastalıkların tedavisinde de rol oynayabileceği düşünülmüş olup, bu doğrultuda kanser tedavisi için de statinlere dair araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda statinlerin inflamasyonu, anjiyogenezi ve proliferasyonu inhibe etme, apoptozu indüklemeye yetenekleri ile kanserin önlenmesi ve tedavisinde önemli etkinlik gösterdikleri belirlenmiştir (Demierre vd., 2005).

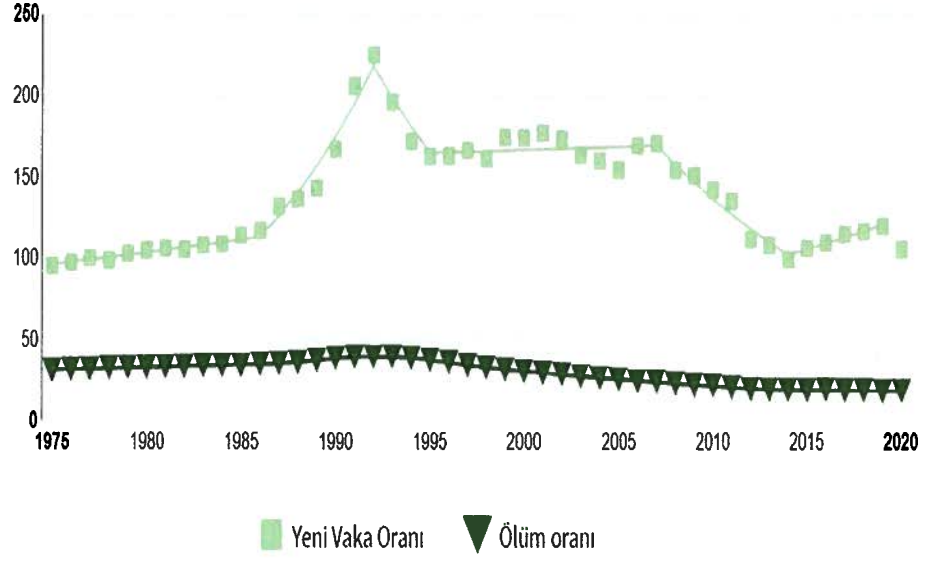
Statinler, kanser hüceleri üzerinde sitostatik bir etkiye sahip olabilir ve kanser hastalarının hayatta kalma süresini uzatabilirler. Ayrıca antioksidatif, antiinflammatuar ve anjiyojenik etkin maddeler olarak da işlev göstermeleri nedeniyle kanser hücelerindeki büyümeyi önleyebilirler (Kuoppala vd., 2008).

Son yıllarda yayınlanan araştırmalar, statinlerin kanserli hastalarda sağkalım oranını arttırdığını göstermiştir. Danimarka da 1995 ile 2009 yılları arasında Danimarka nüfusundaki yetişkin bireylerin oluşturduğu (> 40 yaş) bir kohort çalışması yürütülmüştür. 18.721 kişi kanser teşhisi konulmadan önce düzenli olarak statin kullanmış ve 277.204 kişi hiç statin kullanmamıştır. Kanser tanısından önce hiç statin almamış hastalarla karşılaştırıldığında, tanıdan önce statin kullananların herhangi bir nedenden ölüm riskinin %15 daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Nielsen vd., 2012).

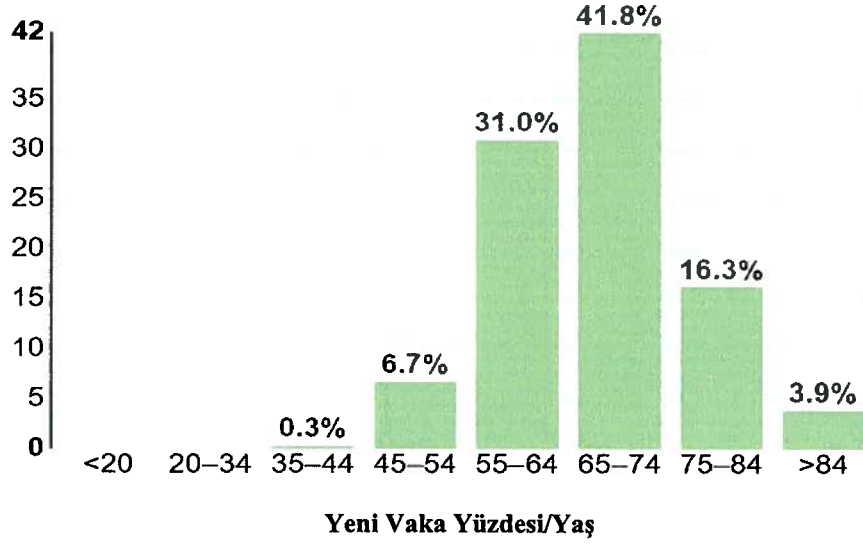
1.2. Prostat Kanseri

Prostat kanseri, erkeklerde cilt kanserinden sonra en sık karşılaşılan kanser türüdür. 2020 yılında Dünya çapında tahminen 1.414.259 kişiye prostat kanseri teşhisi konulmuştur. Dünyada en sık teşhis edilen dördüncü kanser türüdür (Amerikan Klinik Onkoloji Derneği, 'Prostate Cancer', Erişim: 25 Haziran 2023). Prostat kanseri, Amerika Birleşik Devletlerinde tüm yeni kanser vakalarının %14,7'sini temsil etmektedir. 2023 yılında 288.300 yeni prostat kanseri vakası olacağı ve 34.700 kişinin bu hastalıktan öleceği tahmin edilmektedir. (Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı, 'Prostate Cancer', Erişim: 25 Haziran 2023).

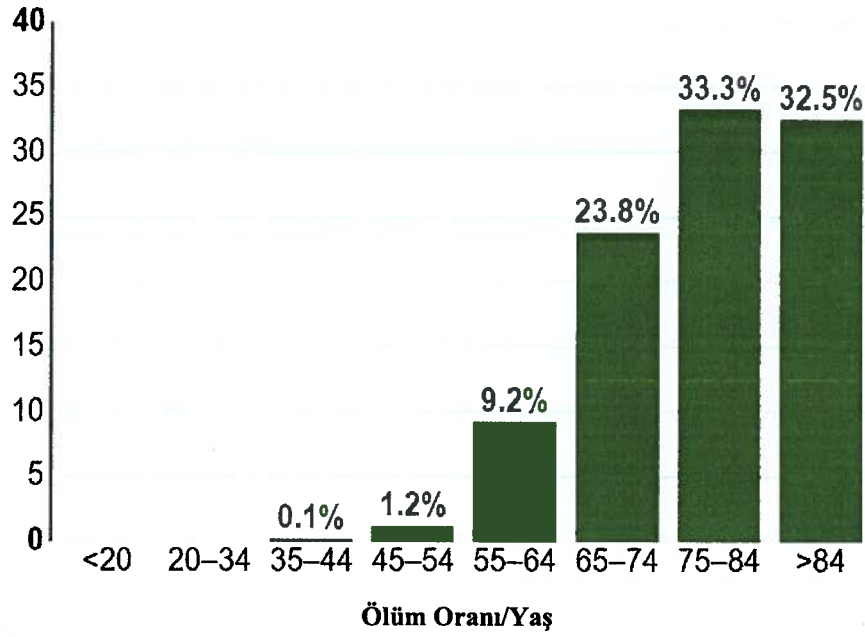
Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı 2023 verilerine göre, prostat kanserinin 1975-2020 yılları arasında 100.000 kişideki yeni vaka ve ölüm oranı Şekil 1.3'te yer almaktadır. Prostat kanserinin yaş grubuna göre yeni vaka yüzdesi, Şekil 1.4'te ve 2016-2020 yılları arasında yaş gruplarına göre ölüm oranları Şekil 1.5'te yer almaktadır. Şekil 1.4 ve Şekil 1.5 incelendiğinde, en çok prostat kanserinin yer aldığı yaş grubunun 65-74 yaş aralığı olmasına karşın en çok ölümlerin 75-84 yaş aralığında gerçekleştiği gözlenmektedir (National Cancer Institute, Prostate Cancer - Cancer Stat Facts, Erişim: 25 Haziran 2023).



Şekil 1.3. 1975-2020 Yılları arasında 100.000 kişideki yeni vaka ve ölüm oranı (National Cancer Institute, Prostate Cancer — Cancer Stat Facts, Erişim: 25 Haziran 2023).



Şekil 1.4. Prostat kanserinin yaş grubuna göre yeni vaka yüzdesi oranı (National Cancer Institute, Prostate Cancer — Cancer Stat Facts, Erişim: 25 Haziran 2023).



Şekil 1.5. 2016-2020 Yılları arasında yaş gruplarına göre ölüm oranları (National Cancer Institute, Prostate Cancer — Cancer Stat Facts, Erişim: 25 Haziran 2023).

Prostat kanserinin farklı evreleri bulunmaktadır. Bu evreler, Evre 1'den başlayarak sırası ile Evre 4'e kadar numaralandırılmaktadır. Kural olarak sayı ne kadar düşük ise kanser yayılımı o kadar azdır. Günümüzde kullanılan en yaygın evreleme sistemi TNM sistemidir. TNM sistemi altında beş başlık bulunmakta olup bu doğrultuda kanserin evresi belirlenmektedir. Bu başlıklar ise aşağıda detaylı şekilde yer almaktadır.

- T kategorisi: Ana tümörün boyutu
- N Kategorisi: Kanserin çevredeki lenf düğümlerine olan yakınlığı
- M kategorisi: Kanserin vücuda yayılıp yayılmadığını
- Tanı anında Prostat Spesifik Antijen düzeyi
- Gleason Skoru (Bu skor, prostat biyopsisi veya ameliyatı sonucuna göre belirlenmektedir.)

Bilimsel çalışmalardaki ilerlemeler sayesinde farklı tipte bulunan prostat kanserleri tespit edilmektedir. Bu doğrultuda 2016 yılında DSÖ tarafından belirlenen sınıflandırma (Şekil 1.6) aşağıda yer almaktadır. Aşağıda ifade edilen "Asiner Adenokarsinom" en sık karşılaşılan prostat kanser tipidir.

Prostat Kanseri Tipleri	Prostat Kanserinin Alt Tipleri
• Glandüler Neoplazmlar	Asiner Adenokarsinom
	İntraduktal Karsinom
	Duktal Adenokarsinom
• Skuamöz Neoplazmlar	Adenoskuamöz Karsinom
	Skuamöz Hücre Karsinoması
• Nöroendokrin Tümörler	Nöroendokrin Farklılaşması olan Adenokarsinom
	Küçük Hücreli Nöroendokrin Karsinom
	Büyük Hücreli Nöroendokrin Karsinom
• Ürotelyal Karsinom	
• Bazal Hücreli Karsinom	

Şekil 1.6. Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2016 yılında yapılan prostat kanseri sınıflandırması.

Prostat kanserinin tedavisinde, cerrahi müdahale, radyasyon tedavisi, hormon replasman tedavisi ve kemoterapi gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır. Temel tedavi rejimlerinden olan androjen ablasyon tedavisi ve kemoterapi; metastatik hastalığı veya ileri lokal hastalığı olan erkeklerde önemli bir sağ kalım oranı sağlayamadığından, yeni tedavi yaklaşımlarına önemli düzeyde ihtiyaç duyulmaktadır (Andrews vd., 2002).

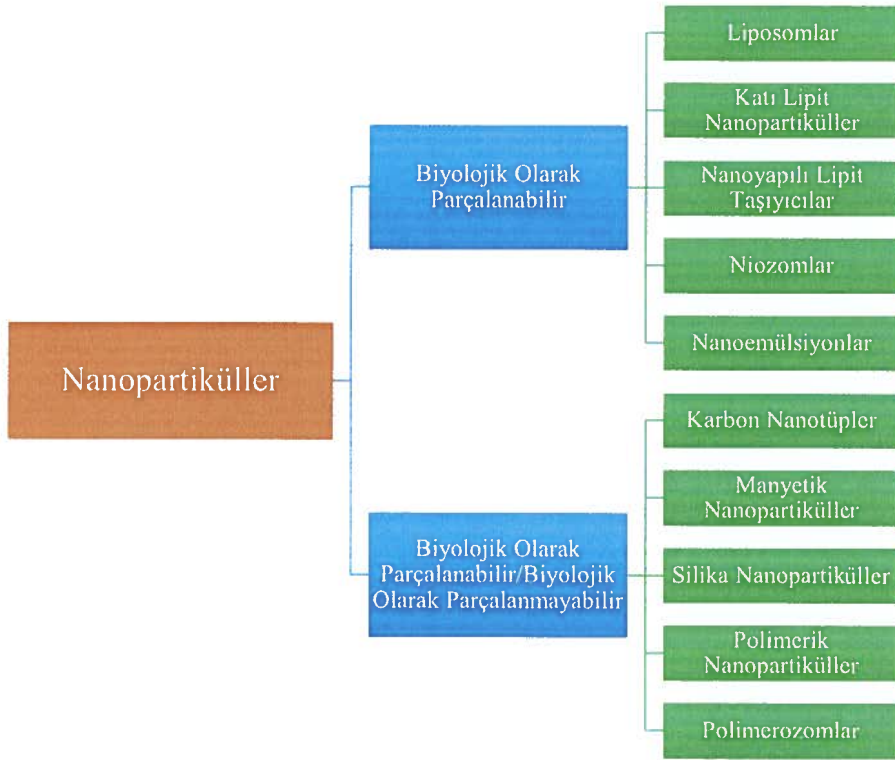
1.2.1. Prostat Kanserinde Risk Faktörleri

Prostat kanserine sebep olan çeşitli risk faktörleri bulunmaktadır. Bu faktörler endojen ve eksojen olarak iki sınıfta incelenmektedir. Aile öyküsü, ırk, hormon ve yaş gibi faktörler endojen faktör olarak ifade edilirken; diyet, çevre ajanları ve mesleki maruziyet eksojen faktör olarak ifade edilmektedir. Bu risk faktörlerinin dışında, sigara maruziyeti, alkol kullanımı, seksüel aktivite ve çeşitli ilaç kullanımları da prostat kanserine neden olan sebepler arasında yer almaktadır (Bostwick vd., 2004).

Prostat kanseri risk faktörleri arasından yaş ve ırk değiştirilemeyen risk faktörleri olarak ifade edilmektedir. Yapılan bir çalışmada, dünya genelinde prostat kanseri için en yüksek insidans oranına Afrikalı-Amerikalı erkeklerin sahip olduğu tespit edilmiştir (Bostwick vd., 2004). Bir başka çalışmaya göre ise prostat kanseri insidans oranları Güney ve Doğu Avrupa ülkelerine göre Kuzey ve Orta Avrupa ülkelerinde daha yüksek olma eğilimindedir (Leitzmann ve Rohrmann, 2012).

1.3. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nanoteknoloji, 1959 yılında ünlü fizikçi Richard Feynman'ın, "altta çok yer var" ifadesini Amerikan Fizikçiler Derneği konferansında ilk defa ifade etmesi ile dikkat çekmeye başlamıştır. Nanopartiküller ilk olarak yaklaşık 50 yıl önce geliştirilmeye başlanmıştır. Başlangıç olarak aşılarda ve kanser kemoterapi ajanları için araştırmalar yapılmış olup sonrasında araştırma alanları genişletilmiştir. Nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemler, biyolojik olarak parçalanabilen polimer veya lipit malzemelerden oluşan ve boyutları 10 ila 1.000 nm arasında değişen kararlı, katı kolloidal parçacıklardır (Kingsley vd., 2006). Nanopartiküller bu özellikleri sayesinde farmasötik ve biyoteknolojik araştırmalar ile tıbbi cihazlarda teşhis ve görüntüleme gibi farklı alanlarda kullanılabilir (Kadian, 2018; Liu vd., 2017). Aşağıdaki şekilde (Şekil 1.7) farklı nanopartikül türlerinin şematik diyagramı yer almaktadır.



Şekil 1.7. Nanopartikül türlerinin şematik gösterimi (Duan vd., 2020).

Modern ve gelişmiş sentez teknikleri, çeşitli malzemelerin kullanılmasıyla birlikte farklı şekil ve boyutlarda çok çeşitli nanopartiküllerin hazırlanmasına yol açmıştır. Nanopartiküllerin sınıflandırılması, farklı fiziksel ve/veya kimyasal parametrelere dayalı olabilmektedir. Nanopartiküller, etkin maddelerin ve tanısal ajanların çözünürlük, yarılanma

mr, toksisite, farmakokinetik ve biyodağılım gibi parametreleri modifiye ederek eczacılık alanına yenilik getirmektedir (Fuster vd., 2021).

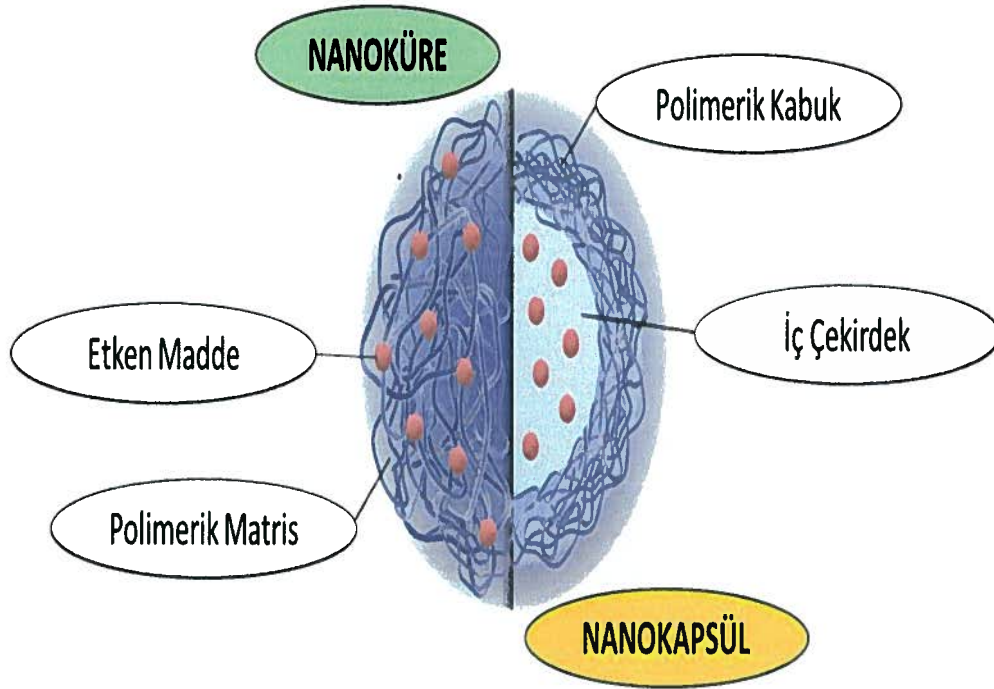
Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin çeşitli üstünlükleri bulunmaktadır. Bu stnlkleri arasından en önemlisi partikül boyutları ve bu boyutların istenildiği şekilde ayarlanabilmesidir. Etkin bir ilaç taşıyıcı sistemde partikül büyüklüğü damarlardan sızmayacak kadar büyük, fagositik sistem tarafından tespit edilemeyecek kadar da küçük olmalıdır (Singh ve Lillard, 2009).

Partikül büyüklüğündeki farklılıklar sebebiyle ilaç taşıyıcı sistemler vücudun çeşitli doku ve organlarında birikebilmektedir. Özellikle kan damarlarının yapısında ortaya çıkan bozulmalara ya da ilaç taşıyıcı partiküllerin komşu dokuya sızarak o bölgede istenilmeyen etkilerinin oluşmasına sebep olabilmektedir. Bu yaklaşıma pasif hedeflendirme stratejisinden yararlanılarak geliştirilen nanopartikül formülasyonlu etkin maddenin istenilen bölgeye etkili bir şekilde taşınmasını sağlayabilmektedir. Nanopartiküllerin bir diğer önemli özelliği ise yüzey modifikasyonuna uygun olmalarıdır. Nanopartikül yüzeyinin çeşitli hidrofilik ajanlar ile kaplanması ile makrofajlar tarafından tanınarak dolaşımdan uzaklaştırılması engellenebilmekte ve sistemik dolaşımda daha uzun süre kalabilmeleri sağlanabilmektedir. Böylece pasif hedeflendirme etkinliği artırılmaktadır. Ayrıca katyonik ya da anyonik yüzey kaplama maddeleri ile kaplanarak nanopartikülün yüzey yükü ayarlanabilmektedir. Nanopartiküllerin etkin maddenin çözünürlüğünü arttırması, enzimatik ve hidrolitik parçalanmaya karşı molekülü koruması diğer önemli özelliklerindedir. Tüm bu özellikleri sayesinde nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, konvansiyonel ilaç taşıyıcı sistemlere oranla hem istenmeyen yan etkiler ortadan kaldırılarak daha güvenilir bir tedavi sağlamakta hem de etkin maddenin biyoyarlanımı artırılacağı için daha etkili bir tedaviye imkan vermektedirler (Bilensoy, 2014).

1.3.1. Polimer Bazlı Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Polimerik yapılı nanopartiküller son yıllarda önem kazanan, doğal ya da sentetik yapıda olabilen kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Polimer bazlı nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, kan veya hücrede etkin maddenin optimum terapötik konsantrasyonunun korunması, sık dozlanmanın ortadan kaldırılması ve daha yüksek hasta uyuncu elde edilmesi gibi geleneksel ilaç taşıyıcı sistemlere göre çeşitli avantajlara sahiptir (Ram Prasad vd., 2017).

Poli(metil metakrilat) (PMMA), polistiren ve poliakrilatlar polimerik yapılı nanopartiküller için kullanılan ilk polimerlerdir. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan yöntemlere bağlı olarak nanoküreler veya nanokapsüller oluşmaktadır. Nanoküreler, etkin maddenin yapı içerisinde dağıldığı veya yüzeye adsorbe olduğu matris sistemlerdir. Nanokapsüller ise, etkin maddenin polimerik bir kabukla çevrelendiği çekirdek (sulu veya yağlı) içinde olduğu veziküler sistemlerdir (Gagliardi vd., 2021). Nanoküre ve nanokapsül yapıları Şekil 1.8'de görülmektedir.



Şekil 1.8. Nanoküre ve nanokapsül yapıları (Gagliardi vd., 2021).

1.3.2. Kanser Tedavisinde Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Yeri

Günümüzde kanser tedavisi için araştırmalar devam etmektedir. Çünkü kanserli dokuların tespiti zordur. Bunun yanı sıra tümör hücrelerinde hedeflenen miktarda etkin madde miktarına ulaşamayabilmekte ve sağlıklı hücrelerinde etkilenme olasılığı bulunmaktadır. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler ile kanser tedavisinde iyi bir farmakokinetik profil, tümör hücrelerinin direk hedeflenmesi, yan etki insidansının

azaltılması, etkin maddenin stabilitesini artırması, biyoyararlanım profilinin iyileştirebilmesi ve dozlama sıklığının azaltılabilmesi gibi birçok avantajı bulunmaktadır. Bununla birlikte, zayıf çözünürlükteki etkin maddelerin enkapsüle edilmeleri ile çözünme hızlarının artması söz konusudur. Hedefleme stratejisi ile sağlıklı hücrelerin etkin madde sebebiyle oluşan sitotoksiteden etkilenmesi engellenerek kanser tedavisinin olumsuz etkileri hafifletilebilmektedir (Yao vd., 2020).

Spesifik olarak kanser hücrelerine hedeflenme, normal hücreleri sitotoksiteden koruduğu ve terapötik etkinliği arttırdığı için nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemlere yönelik önemli bir özelliktir. Aktif ve pasif olarak ifade edilen iki çeşit hedeflendirme mekanizması bulunmaktadır. Aktif hedefleme, ligandlar ve reseptörler arasındaki doğrudan etkileşimler yoluyla spesifik olarak kanser hücrelerinin hedeflenmesidir. Nanopartiküllerin yüzeyindeki ligandlar, kanser hücrelerinin yüzeyinde aşırı eksprese edilen molekülleri hedeflemek üzere seçilir ve bu şekilde hedeflenen hücreleri sağlıklı hücrelerden ayırt edilebilmeleri sağlanır. Pasif hedefleme, tümörün ve normal dokunun farklı özelliklerini kullanan hedefleme stratejisidir. Pasif hedeflemede, etkin madde terapötik etkinliği için hedef bölgeye başarılı bir şekilde iletilmektedir. Kanser hücrelerinin yüksek oranda çoğalması, neovaskülarizasyonu indükler ve vasküler duvardaki büyük gözenekler, normal damarlara kıyasla tümör damarlarının geçirgenliğinin artmasına yol açmaktadır. Bu doğrultuda, nanopartiküller tümör bölgesi damar ağının artmış geçirgenlik ve tutma etkisi (EPR) ile tümör dokusuna girişi yapabilmektedirler. Böylelikle pasif hedeflendirmeye istenilen bölgeye ulaşabilmektedirler. (Yao vd., 2020).

FDA tarafından, metastatik meme kanseri ve metastatik yumurtalık kanseri için onaylı Doxil, pasif hedeflendirilme mekanizması ile geliştirilmiş bir nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemdir.

1.3.3. Prostat Kanserinde Nanopartiküler Sistemlerin Yeri

Prostat kanserinin tedavisinde kullanılan nanopartiküllerin üretimi ve geliştirilmesi için son yıllarda önemli adımlar atılmıştır. Yük, partikül boyutu, belirli geometri, ligand eki ile organik ve inorganik nanopartiküllerin sentezindeki gelişmeler, kanser bölgesinde daha fazla biyoyumluluk ve aktif hedefleme temin etmektedir (Barani vd., 2020).

Yapılan bir çalışmada, prostat hücre hatlarının fototermal tedavisi için Galyum-Altın yüklü mezogözenekli silika nanoparçacıkları kullanılmıştır. Bu nanoparçacıkların etkinliği (LNCap ve DU145) kanser hücre dizileri üzerinde incelenmiştir. İn vitro değerlendirme verileri fototermal tedavinin prostat kanseri hücrelerini yok edebildiğini etkili bir şekilde göstermiştir (Gu vd., 2020).

Biyolojik olarak parçalanabilen Dositaksel yüklü PLGA-PCL ve PLA-PCL nanopartikülleri geliştirilmiştir. Prostat kanseri hücreleri üzerindeki sonuçlar incelediği zaman, serbest moleküle kıyasla Dositaksel yüklü PLGA-PCL nanopartiküllerin daha yüksek antiproliferatif aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Sanna vd., 2011).

Yapılan başka bir çalışmada, Doksorubisin yüklü lipozomlar geliştirilmiştir. Bu şekilde etkin madde, sigma reseptörlerini aşırı eksprese eden prostat kanseri hücrelerine iletilmiştir. Doksorubisin yüklü lipozomların enjekte edildiği transgenik farelerde nanopartiküller toksisiteyi azaltarak tümör büyümesinin inhibisyonunu sağlamışlardır. Bu çalışma ile hem in-vitro hem de in-vivo çalışmalarda lipozomların prostat kanserini eksprese eden sigma reseptörlerine verimli bir şekilde hedeflediğini doğrulamıştır (Banerjee vd., 2004).

1.4. Nanopartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler

Son yıllarda nanopartiküllerin hazırlanmasında çeşitli polimerlerin kullanımı söz konusudur (Şenel vd., 2014). Polimerik nanopartiküller hazırlamak için doğru polimer seçimi çok önemlidir. Etkin madde ve yardımcı maddelerin polimer ile stabilite ve uyumluluk sorunu formülasyonun hazırlanması sırasında gözlemlenebilmektedir. Polimerler, moleküllerin konjuge edildiği inert taşıyıcılar olarakta rol almaktadır. Böylece polimer, etkin maddeyi hedeflenen bölgeye taşımak için bir araç olarak değerlendirilebilmektedir (Sur vd., 2019). Polimerler, hem sentetik hem de doğal olabilmektedir. Doğal kaynaklardan elde edilen polimerler tarih boyunca kullanılmışlardır. Selüloz, diğer polisakkaritler ve ligninden oluşan keten liflerinin 30.000 yıl önce kullanıldığına dair arkeolojik kanıtlar vardır (Wurm ve Weiss, 2014). Sentetik polimerler ise biyoparçalanır olan ve biyoparçalanır olmayan polimerler olarak ikiye ayrılır.

Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan polimerlerin sınıflandırılması aşağıda yer almaktadır.

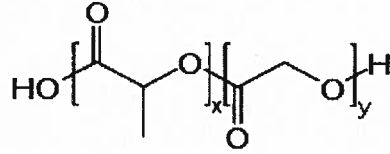
Çizelge 1.1. Nanopartiküllerde kullanılan polimerlerin sınıflandırılması.

Sınıflandırma	Polimer Adı
Doğal Polimerler	
Protein-Bazlı Polimerler	<ul style="list-style-type: none">• Kolajen• Albumin• Jelatin
Polisakkaritler	<ul style="list-style-type: none">• Agaroz• Kitozan• Hiyalüronik asit• Aljinat
Sentetik Polimerler (Biyoparçalanır Olan)	
Poliesterler	<ul style="list-style-type: none">• Poli(laktik asit)• Poli(glikolik asit)
Polianhidritler	<ul style="list-style-type: none">• Poli(sebazik asit)• Poli(adipik asit)
Poliamidler	<ul style="list-style-type: none">• Poli(imino karbonatlar)• Poliamino asitler
Fosfor-Bazlı Polimerler	<ul style="list-style-type: none">• Polifosfatlar• Polifosfonatlar• Polifosfazener
Diğerleri	<ul style="list-style-type: none">• Poliüretanlar• Poliorto esterler• Polidihidropiranlar• Poliasetaller
Sentetik Polimerler (Biyoparçalanır Olmayanlar)	
Selüloz Türevleri	<ul style="list-style-type: none">• Karboksimetil selüloz• Etil selüloz• Selüloz asetat
Silikonlar	<ul style="list-style-type: none">• Polidimetilsiloksan
Akrilik Polimerler	<ul style="list-style-type: none">• Polimetakrilatlar• Poli(metil metakrilat)
Diğerleri	<ul style="list-style-type: none">• Polivinil pirolidon• Etil vinil asetat• Poloksamerler

1.4.1. Çalışmamızda Kullanılan Yardımcı Maddeler

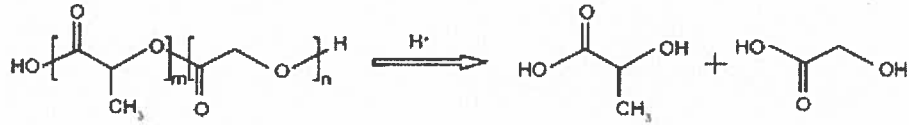
1.4.1.1. PLGA

Poli (laktik-ko-glikolik asit), glikolik asit ve laktik asidin siklik dimerlerinin (1, 4-dioksan-2, 5-dionlar) rastgele halka açma kopolimerizasyonu yoluyla sentezlenen bir kopolimerdir (Şekil 1.9) (Tabatabaei Mirakabad vd., 2014).



Şekil 1.9. PLGA kimyasal yapısı (Koerner vd., 2019).

Poli (laktik-ko-glikolik asit) vücuttan atılabilen, toksik olmayan ürünlere ayrışabilen ve en iyi karakterize edilmiş biyolojik olarak parçalanabilen kopolimerlerden biridir. (Şekil 1.10)



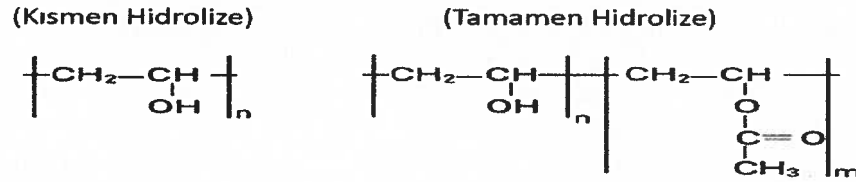
Şekil 1.10. PLGA'nın hidrolizi (Dinarvand vd., 2011).

Polimerizasyon reaksiyonu sırasında laktitin glikolide oranı değiştirilerek farklı PLGA türleri elde edilebilmektedir. Yüksek glikolik asit içeriğine sahip düşük moleküler ağırlıklı olanlar daha hidrofilik ve amorfur. Dolayısıyla daha kısa bozunma süresine sahiptirler. PLGA farklı fizikokimyasal özellikteki etkin maddelerin enkapsülasyonu için tercih edilen biyoparçalanabilir ve biyoyumlu polimerlerden biridir. PLGA hemen hemen her türlü konfigürasyonda işlenebilir ve çeşitli molekülleri enkapsüle etmek için kullanılabilir. PLGA polimerleri, tetrahidrofur, aseton, diklorometan, kloroform ve etil asetat gibi çeşitli uçucu organik çözücüler içinde çözünmektedir. Moleküler ağırlığı, polidispersite indeksi ve kristallik derecesi gibi fiziksel özelliklerin polimerin şişme davranışını, biyolojik bozunma hızını ve mekanik mukavemetini etkilediği bilinmektedir (Sharma vd., 2016).

PLGA, biyolojik olarak parçalanabilmesi, biyolojik olarak uyumlu olması, uygun biyobozunma kinetiği, mekanik özellikleri ve işlenme kolaylığı nedeniyle FDA tarafından ilaç taşıyıcı sistemler için onaylanmış bir polimerdir. Mikropartiküller, nanopartiküller, implantlar ve çeşitli tıbbi cihazların hazırlanması için yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyobozunur PLGA nanopartiküller, DNA'yı endolizozomlardaki bozunmaya karşı koruma yetenekleri sayesinde küçük moleküller, proteinler, peptidler ve son zamanlarda plazmit DNA dahil olmak üzere farklı terapötik ajanların sürekli ve hedefe taşınması araştırılan temel taşıyıcılardandır (Lü vd., 2009).

1.4.1.2. Polivinil Alkol (PVA)

PVA, $(C_2H_4O)_n$ formülü ile temsil edilen sentetik bir polimerdir. Vinil asetat polimerinin uzunluğuna ve hidroliz derecesine göre PVA farklı moleküler ağırlıklarda (20.000–400.000 g/mol) sentezlenebilmektedir. Kısmen veya tamamen hidrolize olma durumuna göre iki gruba ayrılır (Şekil 1.11) (Rivera-Hernandez vd., 2021).



Şekil 1.11. Polivinil alkolün kısmen hidrolize yapısal formülü ve tamamen hidrolize yapısal formülü (Rivera-Hernandez vd., 2021).

Genel olarak PVA suda çözünür, etanolde az çözünür ve diğer organik çözücülerde çözünmez. Tatsız ve kokusuzdur. pH, viskozite, erime noktası, kırılma indisi gibi özellikleri moleküler ağırlık ve hidroliz yüzdesine bağlıdır. PVA'nın mekanik özellikleri, yüksek film oluşturma kabiliyeti, toksik olmaması, suda çözünebilmesi, kanserojen olmaması, hidrofilikliği, biyolojik olarak uyumlu ve parçalanabilir olması nedeniyle biyomedikal alanında en çok kullanılan polimerlerden biridir (Rivera-Hernandez vd., 2021).

PVA nanopartikülleri, düşük maliyetle üretilibilmeleri ve yüksek biyouyumluluk göstermeleri sebebiyle farklı dokularda bulunan kanserli hücrelerin tedavisi için uygun ilaç taşıyıcı sistemler olarak kabul edilmektedir. Örneğin, Yallapu vd. (2010), kurkuminin kanser tedavisinde uygulanabilirliğini geliştirmek için nanoprespitasyon tekniğini kullanarak poli(vinil alkol) ve poli(L-lizin) (PVA ve PLL) stabilizatörlerinin varlığında PLGA nanopartiküllerini geliştirmişlerdir. Bu çalışmada nanopartiküller, serbest kurkumin ile karşılaştırıldığında sırasıyla sisplatin dirençli A2780CP yumurtalık ve metastatik MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde gerçekleştirilen hücresel tutulumda iki ve altı kat artış göstermiştir.

1.4.1.3 Poloksamer 188

Poloksamer 188, Pluronic F68 ticari adı ile ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış triblok kopolimer yapısındaki bir yüzey aktif maddedir. Formülü $C_6H_{18}O_3$ ve molekül ağırlığı 162.23 g/mol'dür. Farklı yapısal şekilleri bulunan poloksamerin, farmasötik uygulamalar için en çok tercih edileni Poloksamer 188'dir. Etkin maddelerin biyoyararlanım profillerinin geliştirilmesinde ve nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin oluşturulmasında da önemli bir role sahiptir. Poloksamer 188, bir yüzey etken madde olarak yapay kan çözeltilerinde, oküler formülasyonların ve katı dispersiyonların hazırlanmasında öncelikle tercih edilmektedir (de Francisco vd., 2019).

Yapılan bir çalışmada FDA tarafından onaylı yardımcı maddeler olan Dextran 70,000 ve Poloksamer 188 ile dizayn edilmiş selenyum nanopartiküllerin sentezi için bir oksidasyon-indirgeme yöntemi kullanmış ve nanopartiküllerin anti-tümör aktiviteleri değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalar, Dextran 70,000 ve Poloksamer 188'in selenyum nanopartiküllerinin stabilitesini önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir. Dondurularak kurutulmuş Poloksamer 188-Selenyum nanopartiküllerinin ve dondurularak kurutulmuş Dextran 70,000-Selenyum nanopartiküllerinin partikül boyutu, altı ay boyunca 4°C'de stabil kalmıştır. Dextran 70,000-Selenyum nanopartiküllerinin ve Poloksamer 188-Selenyum nanopartiküllerinin, mitokondriyal membran potansiyelini azaltarak ve reaktif oksijen türleri içeriğini artırarak HepG2 hücreleri üzerinde apoptozu indüklemişlerdir (Wang vd., 2022).

1.5. Polimerik Nanopartikülleri Hazırlama Yöntemleri

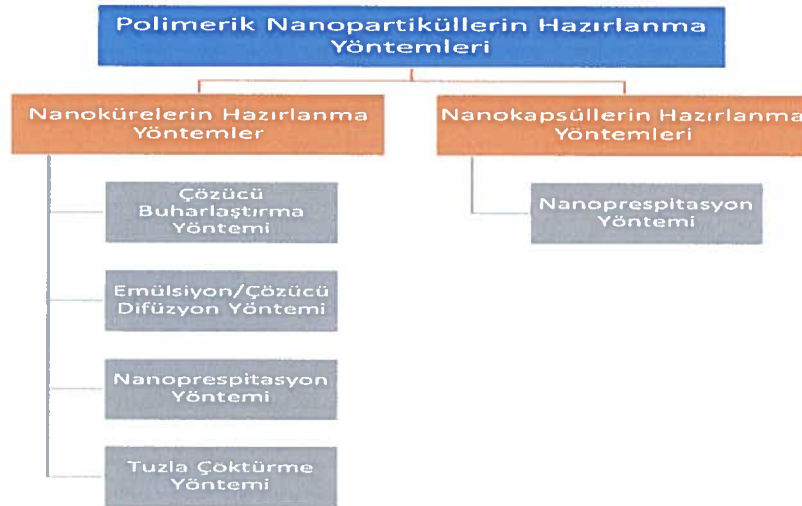
Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında farklı yöntemler kullanılmaktadır. Aşağıda yer alan ifadeler yöntemin belirlenmesi için dikkate alınan kriterlerdir.

- Etkin madde yükleme etkinliğinin yüksek olması
- Organik çözücü miktarının en az indirgenmesi
- Ölçek büyütme işleminin rahatlıkla gerçekleştirebilmesi
- Final ürünün hedeflenen kalite standartlarında üretiminin sağlanması

Yukarıda ifade edilen kriterler dışında; etkin madde ve yardımcı maddelerin fizikokimyasal özellikleri, polimerlerin özellikleri ve ortam koşulları da dikkat edilmesi gereken parametrelerdir.

Nanopartiküllerin hazırlanması genellikle iki temel adım içermektedir. Emülsifiye edilmiş bir sistemin hazırlanması birinci adıma karşılık gelirken, sürecin ikinci adımında nanopartiküller oluşturulur. Bu ikinci adım, polimerin çökmesi, jelleşmesi veya monomerlerin polimerizasyonu ile elde edilmektedir. Genelde bu ikinci adımın prensibi yöntem adıdır. Birkaç durumda nanopartiküller başlangıçta emülsifiye edilmiş sistemle aynı zamanda oluşmaktadır. Uygun emülsifiye edilmiş sistemler emülsiyonlar, nano emülsiyonlar ve mikro emülsiyonlar olabilir. Diğer birkaç yöntemde nanopartiküllerin elde edilmesinden önce bir emülsiyonun hazırlanmasına gerek yoktur (Vauthier ve Bouchemal, 2009).

Polimerik nanopartiküllerin hazırlanma yöntemleri Şekil 1.12’de yer almaktadır.

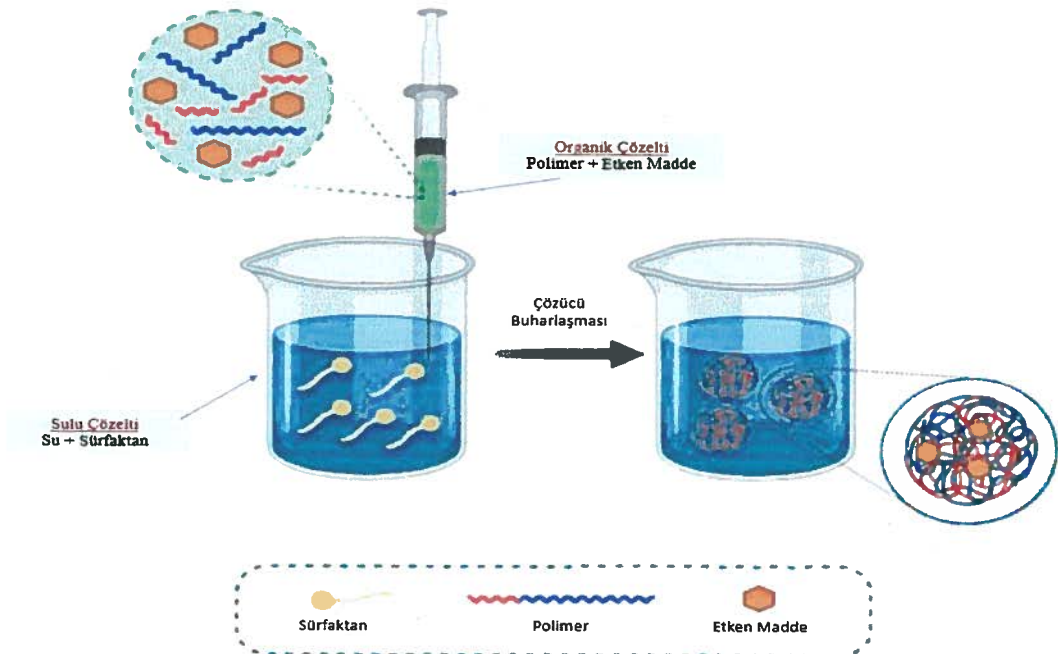


Şekil 1.12. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanma yöntemleri.

1.5.1. Nanoprespitasyon Yöntemi

Bu yöntem ilk olarak Fessi ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Yöntemin prensibi ise organik çözücünün lipofilik yapıdaki çözeltiden sulu faza yer değiştirmesini takiben polimerin ara yüzeyde çökmesidir. Polimer, yarı polar ve su ile karışabilen bir çözücünde çözülür. Bu çözelti, sulu bir çözeltiye karıştırma işlemi sırasında (damla damla) ya da kontrollü ekleme işlemi ile kademeli olarak eklenmektedir (Salatin vd., 2017). Çözücü, nanodamlacıklar aracılığıyla dışarı yayılırken, polimer nanokapsüller veya nanoküreler biçiminde çökeltmektedir. Bu üretim prosesinde genel olarak organik faz sulu faza eklenmektedir (Rivas vd., 2017). Bu yöntemde, yüzey aktif maddeler koloidal yapıdaki süspansiyonun stabilitesini güvence altına almak için sürece dahil edilmekte olup nanopartikül yapının oluşumu için zorunlu değildir. Elde edilen nanopartiküller iyi tanımlanmış bir partikül boyutu ve dar bir boyut dağılımı ile karakterize edilmektedir (Bilati vd., 2005).

Bu yöntem yaklaşık 100-200 nm boyutlara sahip polimerik nanopartiküllerin hazırlanması için tercih edilmektedir. Şekil 1.13'te yöntemin üretim basamaklarının şematik gösterimi yer almaktadır.



Şekil 1.13. Nanoprespitasyon tekniğinin şematik gösterimi (Zielinska vd., 2020).

Bu yöntemin etkinliğini belirleyen faktörler arasında organik fazın su fazına ilave edilme hızı ve ilave edilme şekli, sulu fazın karıştırılma hızı, organik ve su fazların birbirine oranları, polimer ile etkin maddenin birbirine oranları ve yüzey etkin madde konsantrasyonu yer almaktadır (Rao ve Geckeler, 2011).

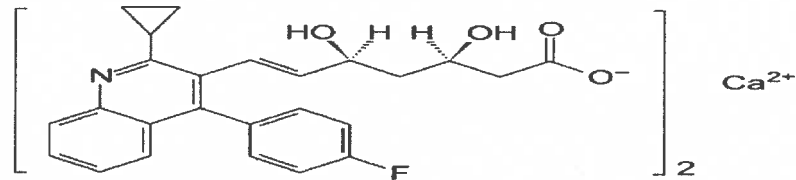
Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan diğer yöntemlere göre, daha basit olması ve tekrarlanabilir bir yöntem olması nedeniyle tez çalışmamızda bizde nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması için bu yöntemi tercih ettik.

1.6. Pitavastatin

Pitavastatin, Japonya'da Nissan Chemical Industries tarafından keşfedilmiş ve Tokyo'daki Kowa Pharmaceuticals tarafından geliştirilmiş bir moleküldür (Mukhtar vd., 2005). FDA tarafından 2009 yılında onaylanmıştır.

1.6.1 Pitavastatinin Fizikokimyasal Özellikleri

Pitavastatin, kimyasal okunuşu (+)-Monokalsiyum bis(3R,5S,6E)-7-[2-siklopropil-4-(4-fluorofenil)-3-kinolil]-3,5-dihidroksi-6-heptenoat (C₅₀H₄₆CaF₂N₂O₈) olan kolesterol sentezinin ilk adımını katalize eden HMG-CoA redüktaz enziminin bir inhibitörüdür. Pitavastatinin moleküler ağırlığı 421,5 gram/mol'dür. Kokusuz ve beyazdan soluk sarıya değişen renkte bir toz halinde bulunur. Piridin, kloroform, seyreltik hidroklorik asit ve tetrahidrofuranda serbestçe çözünür. Etilen glikolde çözünür, metanolde az çözünür. Suda veya etanolde ise çok az çözünür (Şekil 1.14) (Kajinami vd., 2003).



Şekil 1.14. Pitavastatin kimyasal yapısı (Kajinami vd., 2003).

1.6.2. Pitavastatinin Farmakolojik Özellikleri

Pitavastatin, primer hiperlipidemi veya karışık dislipidemili yetişkin hastaların tedavisinde kullanılmaktadır. Genellikle tedaviye 1 mg ile başlanılmakta olup tedavi amacı ve hastanın tedaviye verdiği yanıt doğrultusunda kişiselleştirilmelidir. Günde alınacak maksimum doz ise 4 mg olmalıdır. Miyalji, klinik deneylerde Pitavastatine bağlı advers reaksiyonlar arasında en sık görülen durumdur. Bunun yanı sıra kabızlık, ishal, dispepsi ve bulantı daha az sıklıkta karşılaşılan advers reaksiyonlardır. Pitavastatinin emilimi ve biyoyararlanımı Serivastatin ve Simvastatine benzer şekilde gıdalardan etkilenmemektedir.

1.6.3. Pitavastatinin Farmakokinetik Özellikleri ve Biyoyararlanımı

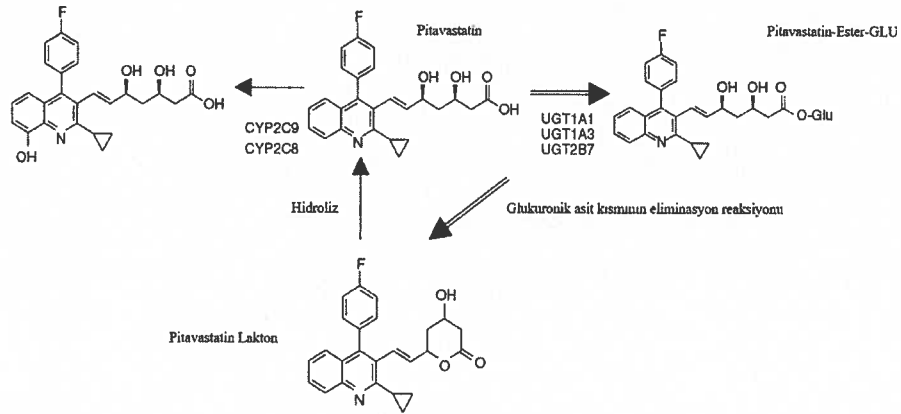
Pitavastatin, diğer birçok statin gibi aktif b-hidroksi asit formunun kalsiyum tuzu olarak uygulanır. Tüm statinlerde olduğu gibi hedef enzim HMG-CoA redüktazın aktif bölgesine bağlanan kısım olan dihidroksi heptenoik asit yan zincirinden oluşur. Ancak diğer statinlerden farklı olarak siklopropil grubu da taşır. Ticari olarak temin edilebilen statinler arasında, log P'si (N-oktanol/su bölme katsayısı) 1.49 olan Pitavastatin, en hidrofilik olan Pravastatin (-0.84) ile karşılaştırıldığında orta derecede lipofilik bir etkin maddedir (Mukhtar vd., 2005).

Pitavastatin, ağız yoluyla uygulamadan 1 saat sonra doruk plazma konsantrasyonlarına ulaşmaktadır. Hem C_{maks} hem de AUC_{0-inf} , tekli pitavastatin dozları için günde bir kez 1 mg'dan 24 mg'a yaklaşık olarak doz ile orantılı olarak artmaktadır. Pitavastatinin mutlak biyoyararlanımı %51'dir. Yapılan çalışmalarda, Pitavastatinin absorpsiyonu Atorvastatin, Lovastatin ve Pravastatin'e göre daha iyi bir emilim sergiler iken; Fluvastatin ve Serivastatinden'e göre ise daha düşük bir emilim sergilemektedir. Pitavastatin, plazma proteinlerine özellikle albümin veya a1-asit glikoproteine yüksek oranda bağlanır ve bu da yüksek protein bağlanma oranlarına neden olmaktadır. Pitavastatinin sıçanlar kullanılarak dokulara dağılımı incelenmiştir. Bu araştırma, tüm vücut otoradyografisi veya doku örneklerinde radyoaktivitenin ölçülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Radyo işaretli Pitavastatinin tek oral doz uygulamasından sonra, sıçanlarda hızla ve geniş çapta dağılım gösterdiği ve en yüksek seviyesine karaciğerde ulaştığı tespit edilmiştir (Mukhtar vd., 2005).

1.6.4. Pitavastatinin Metabolizma ve Eliminasyonu

Pitavastatin metabolizmasının ana hattı, karaciğer üridin 5'-difosfat glukuronosiltransferaz (UGT) aracılığıyla glukuronidasyon ve sonrasında Pitavastatin lakton oluşumudur. CYP enzimi ile minimum düzeyde metabolize olmakta olup, çoğunlukla CYP2C9 ve az miktarda CYP2C8 ile metabolize olmaktadır. Plazmadaki ana metabolit, UGT'ler (UGT1A1, UGT1A3, UGT2B7) tarafından ester tipi Pitavastatin glukuronid konjugatı aracılığıyla oluşturulan laktondur.

Çeşitli hayvan türlerinde (sıçan, tavşan, köpek, maymun ve insan) yapılan çalışmalarda, intravenöz uygulamadan sonra Pitavastatin üç kat yüksek düzeyde elimine olmuştur. Uygulama yoluna bakılmaksızın köpeklerde, sıçanlarda, tavşanlarda ve maymunlarda Pitavastatin için yaklaşık 4 ile 5.3 saatlik bir eliminasyon yarı ömür rapor edilmiştir. Ancak sağlıklı insan gönüllülerde yapılan çalışmalarda Pitavastatin ve laktonunun enterohepatik dolaşımının doğrudan bir sonucu olan 11 saatlik daha uzun bir terminal eliminasyon yarı ömür belirlenmiştir. Bu doğrultuda, insanda Pitavastatinin uzun etkili bir HMG-CoA redüktaz inhibitörü olabileceği değerlendirilmiştir (Mukhtar vd., 2005).



Şekil 1.15. Pitavastatin metabolizması (Mukhtar vd., 2005).

1.6.5. Pitavastatinin Antikanser Etkinliği

Pitavastatin molekülünün kolesterol tedavisinde önemli bir rol oynaması, bilim camiasında bu moleküle dair yeni araştırmaların yapılmasına neden olmuştur. You vd. (2016) yaptıkları bir çalışmada, Pitavastatinin karaciğer kanseri Huh-7 hücrelerini ve SMMC7721 hücrelerini zamana bağlı ve doza bağlı bir şekilde inhibe ettiği belirlenmiştir. Pitavastatin, karaciğer kanseri hücrelerinin büyümesini ve koloni oluşumunu önemli ölçüde engellediği tespit edilmiştir.

Pitavastatinin insan oral kanser hücreleri (SCC4 ve SCC15) ve kolon kanseri hücreleri (HT29, HCT116 ve SW480) üzerindeki antikanser etkinliğini değerlendirmek için hücre canlılığı testi yapılmıştır. Hücrelerin, Pitavastatin ile tedavisi sonucunda test edilen kanser hücre dizileri arasında oral kanser hücresi SCC15 ve kolon kanseri hücresi SW480'de hücre canlılığının önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir (Jeong vd., 2022). Pitavastatinin hedefi olan HMGCR'ın, incelenen tüm yumurtalık kanseri hücre hatlarında aşırı eksprese edildiği ve yumurtalık kanserinde yaygın olarak değiştirilen bir gen olan mutasyona uğramış TP53 tarafından yukarı regüle edildiği bulunmuştur. Pitavastatin kaynaklı apoptoz, HMGCR yolunun ürünleri olan geranilgeraniol ve mevalonat tarafından bloke edilmiş ve Pitavastatinin HMGCR'yi inhibe ederek hücre ölümüne neden olduğunu doğrulamıştır (de Volf vd., 2017).

Yapılan başka bir çalışmada, MCF7 meme kanseri hücrelerinde Doksorubisin ve Pitavastatinin kombine tedavisinin antikanser aktivitesi araştırılmıştır. Kombine Doksorubisin ve Pitavastatin tedavisinin sinerjistik sitotoksikite ve hücre ölümü sağladığı gözlenmiştir (Aliwaini vd., 2020).

Bu tezin amacı, çeşitli kanser türleri üzerinde kemopreventif etkinliği kanıtlanmış bir statin grubu etkin madde olan Pitavastatin molekülünün polimerik nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerinin geliştirilmesi ve PC-3 prostat kanseri hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkinliğinin tayin edilmesidir. Bu kapsamda hazırlanan polimerik nanopartikül formülasyonların in-vitro özelliklerinin belirlenmesi amacıyla etkin madde yükleme etkinliği, partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı, yüzey yükü, morfolojik özellikleri, etkin madde-yardımcı madde etkileşimi ve in-vitro etkin madde açığa çıkış tayini gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan Pitavastatin yüklü optimum polimerik nanopartikül formülasyonu ile antiproliferatif etkinliğinin belirlenebilmesi amacıyla hücre kültürü çalışmaları da gerçekleştirilmiştir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereçler

Tez çalışması kapsamında yapılan literatür araştırmaları doğrultusunda prostat kanseri tedavisine yönelik Pitavastatin içeren polimerik nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem formülasyonlarının oluşturulabilmesi için kullanılan tüm gereçler ve temin edildikleri kurum, firma, yer ile marka bilgileri Bölüm 2.1.1 ve Bölüm 2.1.2' de verilmiştir.

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Pitavastatin	Nobel İlaç Sanayi ve Ticaret A.S., Türkiye
Asetik Asit	Merck, Almanya
Sodyum Asetat (TS)	Merck, Almanya
PLGA (50:50) (MA:40-75 kDa)	Sigma-Aldrich, Almanya
Poloksamer 188	Sigma-Aldrich, Almanya
PVA (87-89%)	Sigma-Aldrich, Almanya
Aseton	Merck, Almanya
Asetonitril	Sigma-Aldrich, Almanya
Disodyum Hidrojen Fosfat	Merck, Almanya
Potasyum Dihidrojen Fosfat	Merck, Almanya
Sodyum Klorür	Merck, Almanya
Sodyum Hidroksit	Merck, Almanya
Tween 20	Merck, Almanya
Diyaliz Membran	Sigma-Aldrich, Almanya
PC-3 Hücre Hattı	ATCC, Almanya
L-glutamin	Sigma-Aldrich, ABD
Fetal sığır serumu	FBS, Gibco, Thermo Scientific, ABD
Penisilin-Streptomisin	Gibco, Thermo Scientific, ABD
RPMI Besiyeri	Gibco, Thermo Scientific, ABD
Tripan Mavisi	Sigma-Aldrich, ABD
Tripsin/EDTA zeltisi	Gibco, Thermo Scientific, ABD

CCK8 Boyası	RayBiotech, ABD
PBS	Gibco, Thermo Scientific, ABD
Paraformaldehit	Sigma Aldrich, ABD
Akridin oranj/Propidyum İyodür	Sigma Aldrich, ABD

2.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	Shimadzu Corporation, Japonya
Partikül Büyüklüğü Tayin Cihazı	ZetaSizer Nano ZS, Malvern Inst. Ltd., İngiltere
Hassas Terazi	Mettler Toledo S-20K, İsviçre
Yüksek Devirli Santrifüj	Sigma 3K15, Almanya
Çalkalayıcı İnkübatör	Jeio Tech SI-300, Jeio Tech Co. Ltd., Kore
Manyetik Karıştırıcı	Stuart SB 162-3, İngiltere
Liyofilizatör	Christ Gamma 2-16 LSC, Almanya
pH Metre	Mettler Toledo S-20K, İsviçre
Ultrasonik Banyo	Ultrasonic LC30, Almanya
İklim Dolabı	Nüve, Türkiye
Taramalı Elektron Mikroskobu	FEI Nova NanoSem 430, Japonya
Diferansiyel Tarama Kalorimetresi	Shimadzu DSC-60, Japonya
Hücre Kültürü Kabini	Sanyo, Almanya
Hücre Sayım Cihazı	Countless II, Invitrogen, ABD
ELISA Cihazı	Allsheng, Çin
Görüntüleme Cihazı	EVOS FL Cell Imaging System, Thermo Fisher Scientific, ABD
Hücre Canlılık Değerlendirme Cihazı	GraphPad Prism 8, La Jolla, ABD
Santrifüj	Sigma-Aldrich USA
Etüv	Thermo Scientific, USA
Vorteks	Holten, Almanya

2.2. Yöntem

2.2.1. Etkin Maddenin Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.1.1. Etkin Maddenin Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC) Analizi

DSC, formülasyonda yer alan etkin ve yardımcı maddelerin ısı ile maruziyetindeki davranışını incelemek için kullanılan bir analitik tekniktir. Çalışmamızda yer alan Pitavastatin etkin maddesinden 1,5 mg tartılmıştır. Kapaklı bir alüminyum pan içine oturtulmuş ve 300 °C sıcaklık aralığında 50 °C/dakika hızda ısıtılarak termogramlar elde edilmiştir.

2.2.2. Etkin Maddenin Kalibrasyonu ve Analitik Validasyon

Pitavastatin'in miktar tayini için geliştirilen yöntem Japon Farmakopesi (JP) 18 referans alınarak aşağıda Çizelge 2.1'de yer alan detaylar doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.1. Pitavastatinin kalibrasyon ve analitik validasyonu.

Sistem:	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)
Kolon:	C18 , 150 × 4,6 mm, 5µ veya eşdeğeri
Kolon Sıcaklığı:	25°C
Akış Hızı:	1 mL/dakika
Dalga Boyu:	245 nm
İnjesiyon Hacmi:	20 µL
Kromatografi Süresi:	30 dakika
Kalibrasyon Noktaları:	0,125 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,50 µg/ml, 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10µg/ml
Mobil faz A:	10 mL seyreltik asetik asit 1000 mL'ye saf su ile tamamlanır. Bu çözeltinin 800 mL'sine seyreltilmiş sodyum asetat TS (1/100 oranında) eklenerek pH'ı 3,8'e ayarlanır.
Mobil faz B:	Asetonitril Mobil faz A: Mobil faz B (60:40)

Çizelge 2.1. Devam

Çözücü:	400 ml Saf su içerisine 600 ml asetonitril eklenir.
Standart Çözeltisi:	50 ml'lik balon jöjeye 5 mg Pitavastatin tartılır, 50 ml çözücü eklenir. 1 dk sonike edildikten sonra belirlenmiş olan hacme çözücü ile seyreltilir. Bu çözeltiden 1.0 ml alınır, 100 ml'ye çözücü ile seyreltilir.
İşlem:	Hazırlanan çözeltiler sisteme enjekte edilir. Standart çözeltisinin ardışık yapılan 6 enjeksiyonuna ait sonuçların % bağıl standart sapması (BSS) 2.0'den fazla olmamalıdır.

2.2.2.1 Etkin Maddenin HPLC Kullanılarak Kalibrasyonuna Yönelik Analitik Validasyon Çalışmaları

Pitavastatin etkin maddesine ait miktar tayininde kullanılacak olan yöntemin validasyon çalışmasında aşağıda yer alan parametreler incelenmiştir.(Çizelge 2.2)

Çizelge 2.2. Pitavastatinin analitik validasyon çalışması için kullanılan parametreler.

Yöntem	Parametreler
Miktar Tayini Yöntemi	<ul style="list-style-type: none">• Seçicilik• Sistem Uygunluğu• Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)• Teşhis&Tayin Limiti (LOD&LOQ)• Doğrusallık ve Aralığı• Doğruluk (% Geri kazanım)

2.2.2.1.1. Seçicilik

Bu parametre, analizi yapılan maddenin numunede yer alan veya alabilecek diğer maddelerin varlığından etkilenmediğini kanıtlamaktır. Bu amaçla; etkin madde içeren nanopartikül ile etkin madde içermeyen nanopartikül sisteme enjekte edilerek 245 nm dalga boyunda elde edilen kromotogramları incelenmiştir.

2.2.2.1.2. Sistem Uygunluğu

Bu parametre yapılacak olan analizler için sistemin uygun olduğunu kanıtlamak için yapılmaktadır. Bu doğrultuda ardışık enjeksiyonlara ait pik alanları arasındaki BSS değerinin %2'den küçük olup olmadığı incelenmiştir.

2.2.2.1.3. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)

Bu parametre birbiri ardına yapılan ölçümler arasındaki benzerliği ifade eder. % BSS ve standart sapma katsayılarıyla değerlendirilir (Şengel-Türk, 2009). Hazırlanan çözeltinin ardına 6 enjeksiyonundaki veriler ile test edilmektedir. Herbiri sisteme, aynı çalışma şartlarında kısa zaman aralığında enjekte edilmektedir. Bu doğrultuda, pik alanları ve alıkonma zamanları arasındaki BSS'nın maksimum % 2 olup olmadığı incelenmiştir.

2.2.2.1.4. Teşhis limiti (LOD) & Tayin limiti (LOQ)

Bu parametrede yer alan LOD ve LOQ değerleri, sinyal/gürültü oranına göre hesaplanmaktadır. Bu amaçla hazırlanan etkin madde belirli konsantrasyonlarda seyreltilerek gelen piklerin sinyal/gürültü oranları gözlenmektedir. Tespit edilen seviyelerde hazırlanan LOQ çözeltileri ardışık şekilde enjekte edilerek BSS değerleri belirlenmektedir. LOD çözeltilerinin enjeksiyonundan elde edilen S/N oranının yaklaşık 3 oranında olması LOD seviyesinin doğruluğunu göstermektedir.

2.2.2.1.5. Doğrusallık ve Aralığı

Bu parametre ile incelenen örnekte yer alan etkin madde derişimi ve deney sonuçlarının arasındaki orantı tespit edilir. Seçilen bir aralıkta numunedeki etkin madde miktarı ve elde edilen cevap arasındaki ilişkiyi saptamak amacıyla lineer regresyon analizi yapılır. Doğrusallık aralığı; araştırılan etkin maddenin bulunduğu alt ve üst sınırlar içerisindeki miktarının kesinlik, doğruluk ve doğrusallık bakımından incelendiği aralıktır (Şengel-Türk,

2009). Bu doğrultuda, etkin maddenin 0,125 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,50 µg/ml, 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml çalışma konsantrasyonlarında standart çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler enjekte edilmiştir. Konsantrasyonlara karşılık elde edilen alanlar grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğriye ait eğim, kesişim değeri ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır.

2.2.2.1.6. Doğruluk

Bu parametre elde edilen deneysel sonuçların gerçek değerlere ne oranda yaklaştığı hakkında bilgi verir. Seçilen analitik yöntemin hatasızlığının ölçüsüdür (Şengel-Türk, 2009). Bu doğrultuda, etkin maddenin 0,50 µg/ml, 2,5 µg/ml ve 5 µg/ml çalışma konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır. Elde edilen alan verileri yardımıyla ortalama % geri kazanım ve standart sapma (SS) verileri kullanılarak yöntemin doğruluğu kanıtlanmıştır.

2.2.3. Polimerik Nanopartikül Formülasyon Çalışmaları

2.2.3.1. Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

Yapılan araştırmalar ve değerlendirmeler sonucunda hazırlanacak formülasyonlar için nanopresipitasyon yönteminin kullanılması kararlaştırılmıştır. Bu doğrultuda 20 adet farklı formülasyon tasarlanmıştır. Tasarlanan formülasyonlarda yer alan etkin madde (Pitavastatin) ve diğer bileşenler (Polikaprolakton, PLGA, Poloxomer 188 veya PVA) belirlenen miktarlarda hassas terazide tartılmıştır. Tartım işleminin tamamlanması ile organik fazı oluşturan Pitavastatin ve Polikaprolakton ya da PLGA sabit hızlı karıştırıcı üzerinde aseton içinde çözülmüştür. Sulu fazı oluşturan Poloksamer 188 ya da PVA ise sabit hızlı karıştırıcı üzerinde su içinde çözülmüştür. Oluşan organik faz otomatik pipet yardımıyla su fazına damla damla ilave edilmiştir. Disperse haldeki yapı manyetik karıştırıcı üzerinde 600 rpm sabit hızda oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırılarak asetonun buharlaştırılması sağlanmıştır. Süspande haldeki nanopartiküller önce 30.000 rpm hızda 4°C sıcaklıkta 60 dakika süre ile santrifüjlenmiştir. Sonrasında yıkama işlemi yapılarak 30 dakika daha santrifüjlenmiştir. Tekrar yıkama işlemi yapılmasının ardından 48 saat süreyle liyofilize edilerek kuru toz halde saklanmıştır. Formülasyon içerikleri Çizelge 2.3'te yer almaktadır.

Çizelge 2.3. Nanoprespitasyon tekniği kullanılarak hazırlanan formülasyon denemeleri.

Formül Kodu	Etkin Madde (Pitavastatin) / Polimer Oranı (Polikaprolakton) (mg)/(mg)	Etkin Madde (Pitavastatin) / Polimer Oranı (PLGA) (mg)/(mg)	Poloksamer 188 % Oranı (mg/ml)	PVA % Oranı (mg/ml)	Aseton (ml)	Distile su (ml)
F1	-	1:5	%1	-	10	30
F2	-	1:5	%2	-	10	30
F3	-	1:5	%3	-	10	30
F4	-	1:10	%1	-	10	30
F5	-	1:10	%2	-	10	30
F6	-	1:10	%3	-	10	30
F7	-	1:15	%1	-	10	30
F8	-	1:15	%2	-	10	30
F9	-	1:15	%3	-	10	30
F10	-	1:5	-	%1	10	30
F11	-	1:5	-	%2	10	30
F12	-	1:5	-	%3	10	30
F13	-	1:10	-	%1	10	30
F14	-	1:10	-	%2	10	30
F15	-	1:10	-	%3	10	30
F16	-	1:15	-	%1	10	30
F17	-	1:15	-	%2	10	30
F18	-	1:15	-	%3	10	30
F19*	1:10	-	%2	-	10	30
F20*	1:10	-	-	%2	10	30

*Nanopartikül elde edilememiştir.

2.2.4. Nanopartikül Formülasyonları Üzerinde Yapılan Kontroller

2.2.4.1 Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımı (PDI) Tayini

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler için partikül büyüklüğü ve PDI tayini önemli bir parametredir. Çünkü geliştirilen nanopartiküler yapının hücre içine girişi ve hücre içine girişi sonrası oluşturduğu biyolojik yanıtta partikül büyüklüğü ve PDI kritik bir etmen olarak değerlendirilmektedir. Bu doğrultuda hazırlanan polimerik nanopartikül formülasyonlarının

partikül büyüklükleri ve PDI değerleri incelenmiştir. Hazırlanan polimerik nanopartikül formülasyonlarında partikül büyüklüğü tayin işlemleri için foton korelasyon spektroskopisi cihazı kullanılmıştır. Bu analiz elde edilen bütün nanopartikül formülasyonları için ard arda üç ölçüm yapılarak tekrarlanmıştır.

2.2.4.2. Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliğinin Tayini

Hazırlanan polimerik nanopartikül formülasyonlarına yüklenen Pitavastatin miktarının belirlenmesi amacıyla indirekt yöntem kullanılmıştır. Bu amaçla ultrasantrifüj işleminden sonra elde edilen süpernatant uygun oranda seyreltildikten sonra HPLC’de okunmuştur. Polimerik nanopartiküllere yüklenen Pitavastatinin enkapsülasyon etkinliği aşağıda yer alan formül kullanılarak hesaplanmıştır (Şengel-Türk vd., 2021).

$$\% \text{ Enkapsülasyon Etkinliği} = (W_{\text{toplam pitavastatin}} - W_{\text{serbest pitavastatin}} / W_{\text{toplam pitavastatin}}) \times 100$$

2.2.4.3. Nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Analizi

Nanopartiküller ilaç taşıyıcı sistemler için zeta potansiyel tayini önemli bir parametredir. Çünkü hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyel değeri ile yüzey yükü, stabilitesi ve hücre zarı ile olan etkileşimi hakkında değerlendirme yapılabilmektedir. Zeta potansiyeli -10 ila +10 mV arasında olan nanopartiküller nötr olarak kabul edilirken, zeta potansiyeli +30 mV'den büyük veya -30 mV'den düşük olan nanopartiküller sırasıyla güçlü katyonik ve güçlü anyonik olarak kabul edilir. Çoğu hücre zarı negatif yüklü olduğundan, zeta potansiyeli bir nanopartikülün hücre zarlarından geçebilme eğilimini etkileyebilir; katyonik yapı nanopartiküller genellikle hücre duvarı bozulmasıyla ilişkili olarak daha fazla toksisite sergileyebilir (Clogston ve Patri, 2011). Hazırlanan polimerik nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyel değerlerinin ölçülmesinde Zetasizer Nano Series (Nano-ZS) (Malvern Inst., İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Bu amaçla uygun şekilde disperse edilen polimerik nanopartikül formülasyonları zeta potansiyel ölçüm kuvetine konulmuştur ve her bir ölçüm üç kere tekrarlanmıştır.

2.2.4.4. İn Vitro Etkin Madde Açığa Çıkış Hızı Tayini

Geliştirilen polimerik nanopartikül formülasyonlarından Pitavastatinin açığa çıkış profilinin tayin edilmesi amacıyla statik bir yöntem olan diyaliz membran tekniği uygulanmıştır. Prostat tedavisine yönelik olarak geliştirilen nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerde gerçekleştirilen in-vitro etkin madde salım hızı çalışmaları kullanılan ortam açısından irdelendiğinde pH 7.4 fosfat tampon ortamının kullanıldığı belirlenmiştir (Sengel-Turk vd., 2022). Bu kapsamda polimerik nanopartikül formülasyonlarının in-vitro etkin madde açığa çıkış profillerinin incelenmesinde bu tampon ortamının kullanılması kararı alınmıştır. Nanopartikül dispersiyonları moleküler büyüklüğü 12.000 Da olan diyaliz membranların içine yerleştirildikten sonra membranlar 100 ml'lik 37°C tampon ortamı içine alınmıştır. Hazırlanan sistemler 100 rpm dönü hızında inkübatörlü çalkalayıcı da inkübe edilmiştir ve önceden belirlenen zaman aralıklarında (1, 2, 4, 6, 24, 48,72, 96, 120, 144 ve 168. saat) örnek alınarak açığa çıkan Pitavastatin miktarı HPLC'de analiz edilmiştir (n=3) (Avgoustakis vd., 2002; Gryparis vd., 2007; Mukerjee ve Vishwanatha, 2009).

Tez çalışması süresince nanopresipitasyon yöntemi ile elde edilen çeşitli nanopartikül formülasyonlar arasından enkapsülasyon etkinliği en yüksek olan ve partikül boyutu ile PDI değeri en düşük olan F10 kodlu formülasyon optimum gereklilikleri sağlamıştır. Bu doğrultuda DSC analizi, morfolojik inceleme, stabilite çalışmaları ve hücre kültürü çalışmaları F10 kodlu optimum formülasyon üzerinde gerçekleştirilmiştir.

2.2.4.5. Nanopartiküllerin Etkin Madde Salım Kinetiğinin İncelenmesi

Nanopartikül formülasyonlarında etkin maddenin salım kinetiğinin belirlenebilmesi için çözünme hızı deneyleri sonucunda optimum nanopartikülden birim zamanda açığa çıkan etkin madde miktarı hesaplanmış ve çözünme hızı kinetiklerinden hangi kinetik modele uyduğu SPPS 20 paket programı kullanılarak saptanmıştır.

2.2.4.6. Nanopartiküllerin DSC Analizi

Pitavastatin yüklü optimum polimerik nanopartikül formülasyonundaki olası etkin madde ile yardımcı madde etkileşimlerinin saptanabilmesi ve ayrıca etkin maddenin polimerik matris yapısı içindeki fiziksel durumunun belirlenebilmesi için DSC analizi yapılmıştır. Bu

doğrultuda saf etkin madde, etkin madde içeren ve içermeyen optimum nanopartikül formülasyonu hassas bir şekilde tartılmış ve kapaklı alüminyum pan içine yerleştirilmiştir. 250°C sıcaklık aralığında 5°C/dk hızda ısıtılarak DSC termogramları elde edilmiştir.

2.2.4.7. Nanopartiküllerin Morfolojik Özellikleri

Nanopresipitasyon yöntemi ile hazırlanan optimum polimerik nanopartikül formülasyonunun şekil ve yüzey morfolojisinin incelenmesi amacıyla Taramalı Elektron Mikroskobu (FESEM) kullanılmıştır. Bu doğrultuda liyofilize haldeki nanopartiküller silindirik yapıya sahip bir örnek tutucuya, iletken çift taraflı bir bant üzerine yayılarak tutturulmuş ve soğuk saçılımlı kaplayıcı kullanılarak altın ile kaplanmıştır. Kaplı numuneler FESEM cihazına yerleştirilerek elektron mikrografları çekilmiştir (Turk vd., 2014).

2.2.4.8. Stabilite Çalışmaları

Belirlenen optimum formülasyonun liyofilize edildikten sonra final kalite özelliklerinin takip edilmesi açısından saklama sıcaklığı olarak belirlenen 4 °C'de 6 ay süre boyunca stabilite takibi yapılmıştır. Bu amaçla liyofilize şeklindeki polimerik nanopartikül formülasyonunun 6. ayda enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü ve dağılımı ile zeta potansiyel değerleri tayin edilmiştir.

2.2.5 Nanopartiküllerin Antiproliferatif Aktivitelerinin Tayini

2.2.5.1. Hücre Kültürü

Derin dondurucuda (-80°C) stoklanan PC-3 hücreleri 37°C su banyosunda çözdürüldükten sonra, 1500 rpm 5 dakika santrifüj edilerek RPMI besiyeri içeren 75 cm²'lik flasklara ekilmiş ve 37°C'de % 5 CO₂'de inkübe edilmiştir. Hücreler %70-80 konfluens duruma geldiklerinde flasktan besiyerleri uzaklaştırılmış ve sonra hücreler PBS ile yıkanmıştır. Sonrasında her bir flaska Tripsin-EDTA eklenerek hücreler 37°C'de 5 dakika inkübe edilmiş ve besiyeri eklenerek 5 dakika 1500 rpm'de santrifüjlenmiştir. Sonrasında

süpernatant uzaklaştırılarak deneylerin gerçekleştirilmesi için 10 µL hücre süspansiyonu ile 10 µL tripan mavisi pipetaj yapıldıktan sonra Countless II hücre sayım cihazı ile hücre sayısı belirlenmiştir.

2.2.5.2. CCK-8 Analizi

Saf Pitavastatin, Pitavastatin içeren optimum nanopartikül ve Pitavastatin içermeyen nanopartikül formülasyonunun PC-3 kastrasyon dirençli metastatik prostat kanseri hücrelerinde sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi için, PC-3 hücreleri 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyuya 2×10^4 hücre olacak şekilde ekilip, 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücrelerin medyumu taze medyum ile değiştirilerek aynı konsantrasyonlarda (0.5, 1, 2.5, 5 ve 10 µM) saf Pitavastatin, Pitavastatin içeren optimum nanopartikül ve Pitavastatin içermeyen nanopartikül formülasyon 24 ve 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Belirlenen süreler sonunda, her bir kuyucuğa 10 µl CCK-8 boyası eklenerek 1 saat boyunca 37°C % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakılmış ve ELISA okuyucu cihazı kullanılarak 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Her deney 3 kez tekrar edilmiş olup, kontrol grubunun absorbans değerleri % 100 canlılık olarak kabul edilerek deney gruplarının canlılık yüzdeleri hesaplanmıştır.

2.2.5.3. Akridin oranj/Propidyum İyodür Boyama Analizi

PC-3 hücrelerinde saf Pitavastatin, Pitavastatin içeren optimum nanopartikül ve Pitavastatin içermeyen nanopartikül formülasyonunun morfolojik etkisinin gözlemlenmesi için PC-3 hücreleri 12 kuyucuklu plakalara her bir kuyuya 5×10^4 hücre olacak şekilde ekilip, 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler CCK-8 analizine göre etkin olduğu belirlenen 5 ve 10 µM saf Pitavastatin ve Pitavastatin içeren optimum nanopartikül ile 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sonrasında hücrelerden medyum uzaklaştırılarak hücreler 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Sonrasında hücreler % 4 paraformaldehit ile fikse edilmiştir. 30 dakika inkübasyon sonunda, hücreler 3 kez PBS ile yıkandı ve 1 mL akridin oranj/propidyum iyodür boyası ile 30 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. Sonrasında PBS ile yıkandıktan sonra, EVOS FL Cell Imaging System ile görüntülenmiştir.

Hücre canlılığının değerlendirilmesinde istatistiksel analiz için GraphPad Prism 8 kullanılmıştır. Çoklu karşılaştırmalar için Post-hoc Tukey testi ile tek yönlü ANOVA analizi gerçekleştirilmiştir. $P < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

2.2.6 İstatistiksel Değerlendirme

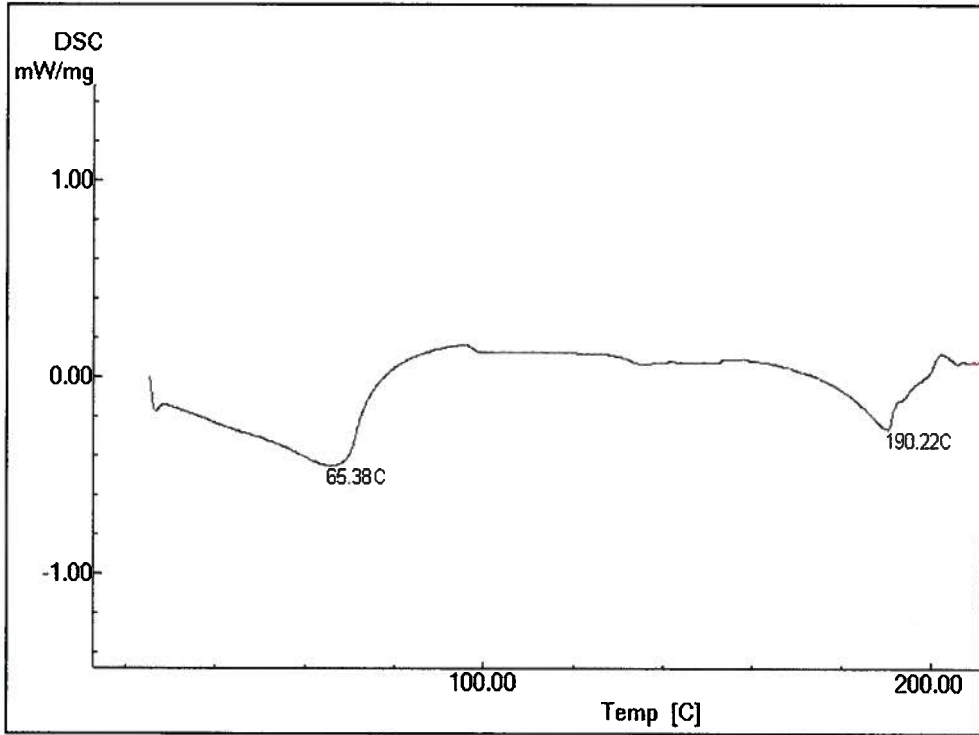
Elde edilen verilerin değerlendirilmesi için One-Way ANOVA testi kullanılmış olup, tek yönlü ANOVA testinin alt test grubu olan Tukey's Post Hoc testi ile gruplar arasındaki fark değerlendirilmiştir. Grupların ikiserli karşılaştırılmasında ise Paired Sample T testinden yararlanılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Etkin Maddenin Özelliklerinin Belirlenmesi

3.1.1. Etkin Maddenin DSC Analiz Bulguları

Pitavastatin molekülüne ait DSC analiz ile elde edilen termogram Şekil 3.1'de yer almaktadır.

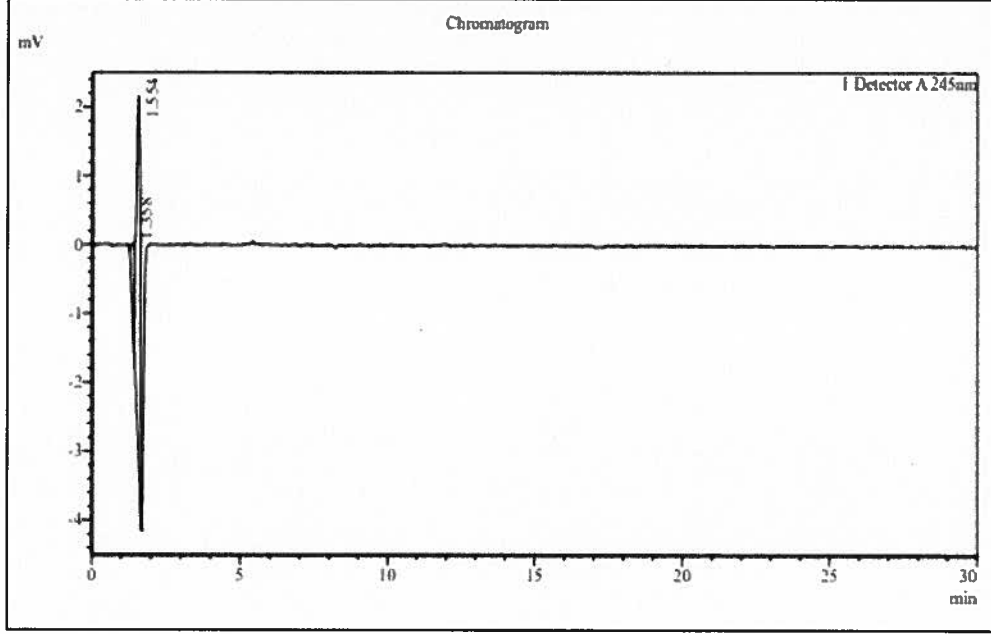


Şekil 3.1. Pitavastatin DSC termogramı.

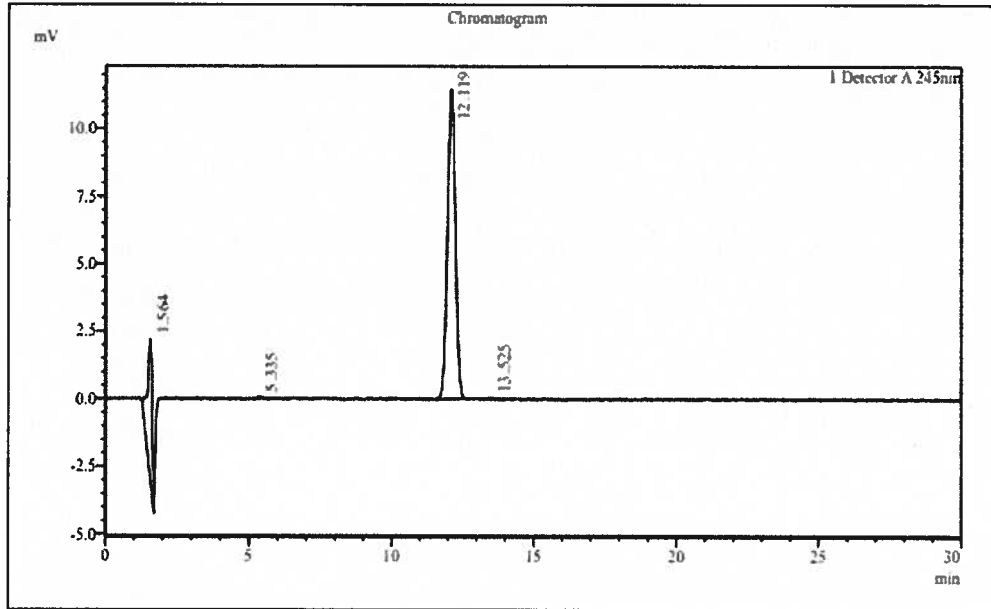
3.2. Etkin Maddenin HPLC Kullanılarak Belirlenen Kalibrasyonuna Yönelik Analitik Validasyon Bulguları

3.2.1. Seçicilik

Kabul kriteri olarak; Pitavastatin etkin maddesinin alıkonma zamanında yardımcı maddelerden kaynaklanan herhangi bir pik ile karşılaşılması gerekmektedir. Çalışma bulguları aşağıdaki Şekil 3.2’de yer almaktadır.



Şekil 3.2.a. Pitavastatin içermeyen nanopartiküle ait kromotogram.



Şekil 3.2.b. Pitavastatin yüklü nanopartiküle ait kromotogram.

3.2.2. Sistem Uygunluğu

Kabul kriteri olarak; ardışık enjeksiyonlara ait pik alanları arasındaki BSS'nin %2'den küçük olması gerekmektedir. Çalışma bulguları aşağıdaki Çizelge 3.1'de yer almaktadır.

Çizelge 3.1. Sistem uygunluğu parametre bulguları.

Konsantrasyon	Alıkonma Zamanı	Alan
Numune 1 (1.00 µg/ml)	12,1	219,286
Numune 2 (1.00 µg/ml)	12,1	220,457
Numune 3 (1.00 µg/ml)	12,0	220,819
Numune 4 (1.00 µg/ml)	12,0	221,844
Numune 5 (1.00 µg/ml)	12,0	222,615
Numune 6 (1.00 µg/ml)	12,0	223,296
Ortalama	221,386	
Bağıl Standart Sapma	0,66	

3.2.3. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)

Kabul kriteri olarak; pik alanları ve alıkonma zamanları arasındaki BSS'nin maksimum %2 olması gerekmektedir. Çalışma bulguları aşağıdaki Çizelge 3.2'de yer almaktadır.

Çizelge 3.2. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik) parametre bulguları.

Konsantrasyon	Alıkonma Zamanı	Alan
Numune 1 (1.00 µg/ml)	11,9	222,566
Numune 2 (1.00 µg/ml)	11,9	222,575
Numune 3 (1.00 µg/ml)	11,8	222,512
Numune 4 (1.00 µg/ml)	11,8	222,792
Numune 5 (1.00 µg/ml)	11,8	222,953
Numune 6 (1.00 µg/ml)	11,8	222,871
Ortalama	222,712	
Bağıl Standart Sapma	0,08	

3.2.4. Teşhis limiti (LOD) & Tayin limiti (LOQ)

Kabul kriteri olarak; LOQ çöztisinden yapılan ardışık enjeksiyonlar arası alanlara ait BSS'nin % 2'den az olmalıdır. LOD çöztisinin enjeksiyonundan elde edilen S/N oranının yaklaşık 3 oranında olması LOD seviyesinin doğruluğunu göstermektedir. Çalışma bulguları aşağıdaki Çizelge 3.3'te yer almaktadır.

Çizelge 3.3. LOD & LOQ parametre bulguları.

Tayin Limiti (LOQ)					
Enjeksiyon	1	2	3	ORTALAMA	BSS
Alan	29,617	29,555	29,511	29,579	0,27
S/N Oranı	20,55	20,40	20,17		

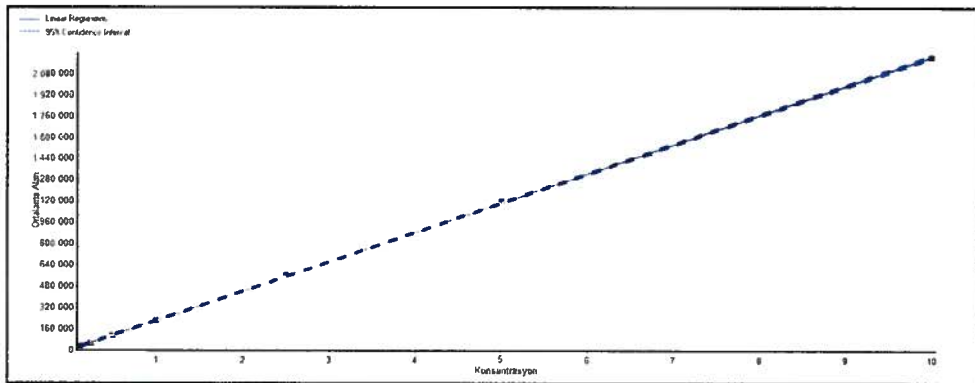
3.2.5. Doğrusallık ve Aralığı

Kabul kriteri olarak; R^2 değerlerinin 0.995'in üzerinde bulunması ve kesim noktasının eğiminin \pm % 10 aralığında olması genel olarak regresyon doğrusunun uyumunun iyi olduğunun kanıtıdır. Bu validasyon parametresi için INSTAT paket programı ve microsoft excel programı kullanılmış olup aşağıda yer alan grafik (Şekil 3.3) bu program ile çizilmiştir. Çalışma bulguları aşağıdaki Çizelge 3.4'de yer almaktadır.

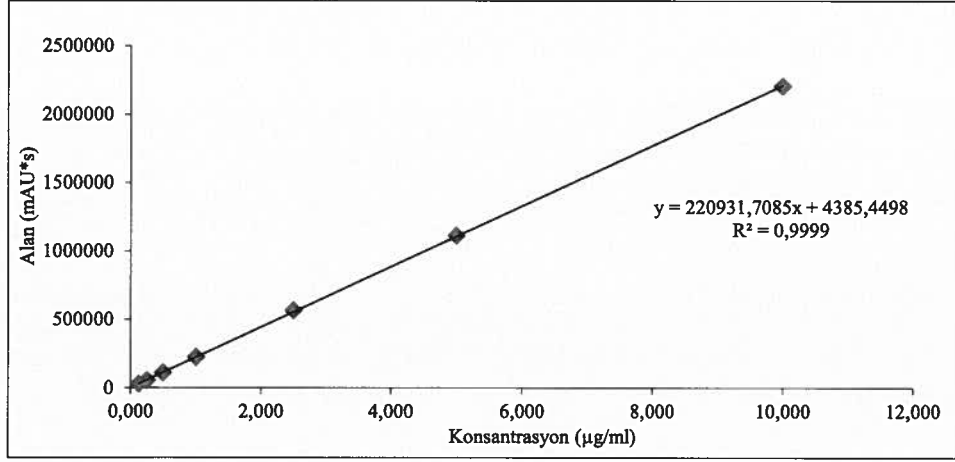
Çizelge 3.4. Doğrusallık ve aralığı parametre bulguları.

Çalışılan Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Ortalama Alan
0,13	29058
0,25	55260
0,50	111350
1,00	225340
2,50	566951
5,00	1114614
10,00	2208677
m	220931,7085
n	4385,4498
R^2	0,9999
$y = mx + n$	220931,7085x + 4385,4498

a)



b)



Şekil 3.3. a) Instant paket programı, b) Microsoft excell programı ile çizilmiş lineer regresyon grafiği.

3.2.6. Doğruluk

Kabul kriteri olarak; her bir geri kazanım % 90 - % 110 aralığında yer almalı ve % geri kazanım çalışmalarının ortalaması % 95 güven aralığında yer almalıdır. Çalışma bulguları aşağıda Çizelge 3.5'de yer almaktadır.

Çizelge 3.5. Doğruluk parametre bulguları.

Eklene Konsantrasyon	Alan-1	Ortalama	% BSS	Bulunan Konsantrasyon	% Geri kazanım
0.5 µg/ml	110,106	109,654	0,43	0,498371	99,67
	109,697			0,496520	99,30
	109,157			0,494076	98,82
2.5 µg/ml	558,288	560,143	0,95	2,526971	101,08
	566,155			2,562579	101,59
	555,986			2,516551	100,66
5 µg/ml	1.121,755	1.123,099	0,1	5,077383	101,55
	1.123,655			5,085983	101,72
	1.123,888			5,087038	101,74
Ortalama % Geri Kazanım					100,68
Standart Sapma					1,14
%95 Güvenilirlik Üst Limiti					101,54
%95 Güvenilirlik Alt Limiti					99,82

3.3. Polimerik Nanopartikül Formülasyon Çalışma Bulguları

3.3.1. Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve PDI Tayin Bulguları

Pitavastatin yüklü nanopartikül formülasyonları için partikül büyüklüğü ve PDI tayini gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular Çizelge 3.6'da yer almaktadır.

Çizelge 3.6. Nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve PDI bulguları.

Formülasyon Kodu	Partikül Büyüklüğü (nm) (Ortalama \pm SH*)	PDI (Ortalama \pm SH*)
F1	164,1 \pm 2,52	0,286 \pm 0,030
F2	191,3 \pm 0,96	0,211 \pm 0,008
F3	229,1 \pm 1,60	0,273 \pm 0,011
F4	190,4 \pm 0,82	0,244 \pm 0,007
F5	222,2 \pm 1,92	0,289 \pm 0,022
F6	271,9 \pm 0,66	0,276 \pm 0,009
F7	227,0 \pm 2,13	0,216 \pm 0,013
F8	290,5 \pm 1,15	0,257 \pm 0,033
F9	317,4 \pm 2,81	0,292 \pm 0,049
F10	76,9 \pm 2,46	0,061 \pm 0,009
F11	101,0 \pm 1,09	0,077 \pm 0,008
F12	139,2 \pm 1,03	0,065 \pm 0,020
F13	138,4 \pm 1,91	0,063 \pm 0,039
F14	160,6 \pm 1,51	0,088 \pm 0,025
F15	191,1 \pm 0,82	0,114 \pm 0,005
F16	165,0 \pm 1,81	0,123 \pm 0,046
F17	178,5 \pm 2,11	0,073 \pm 0,057
F18	217,4 \pm 1,63	0,138 \pm 0,005

*SH: Standart Hata

3.3.2. Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Etkinlik Tayin Bulguları

Bölüm 2.2.4.2'de ifade edilen yöntem kullanılarak gerçekleştirilen tayin işlemi sonucunda formülasyonlara ait enkapsülasyon etkinliği değerleri Çizelge 3.7'de yer almaktadır.

Çizelge 3.7. Nanopartikül formülasyonlarının enkapsülasyon etkinlik bulguları.

Formülasyon Kodu	Enkapsülasyon Etkinliği (%) (Ortalama \pm SH*)
F1	28,15 \pm 0,035
F2	29,91 \pm 0,022
F3	40,49 \pm 0,013
F4	42,78 \pm 0,027
F5	47,79 \pm 0,007
F6	47,39 \pm 0,025
F7	29,04 \pm 0,004

Çizelge 3.7. Devam

Formülasyon Kodu	Enkapsülasyon Etkinliği (%) (Ortalama \pm SH*)
F8	29,71 \pm 0,009
F9	31,22 \pm 0,036
F10	64,26 \pm 0,005
F11	48,42 \pm 0,032
F12	45,97 \pm 0,030
F13	55,14 \pm 0,025
F14	50,79 \pm 0,034
F15	49,08 \pm 0,010
F16	49,89 \pm 0,009
F17	43,12 \pm 0,018
F18	40,31 \pm 0,020

*SH: Standart Hata

3.3.3 Nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Tayin Bulguları

Bölüm 2.2.4.3'de ifade edilen yöntem kullanılarak gerçekleştirilen tayin işlemi sonucunda formülasyonlara ait zeta potansiyel değerleri Çizelge 3.8'de yer almaktadır.

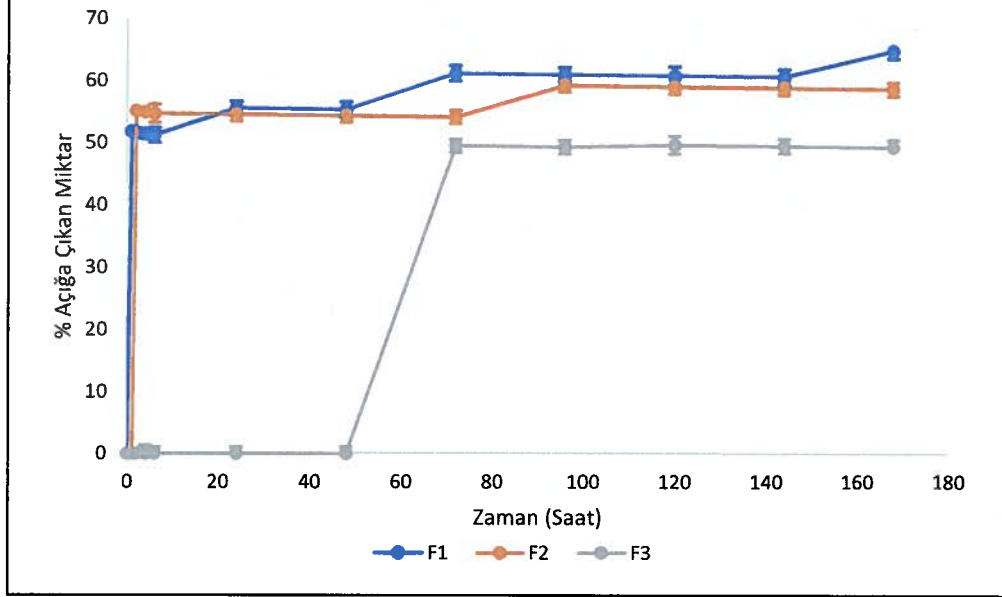
Çizelge 3.8. Nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyel bulguları.

Formülasyon Kodu	Yüzey Yükü (mV) (Ortalama \pm SH*)
F1	-6,9 \pm 1,44
F2	-5,9 \pm 1,87
F3	-1,7 \pm 0,12
F4	-4,4 \pm 1,73
F5	-3,6 \pm 0,19
F6	-1,3 \pm 0,07
F7	-3,3 \pm 0,59
F8	-1,4 \pm 0,15
F9	-0,7 \pm 0,11
F10	-13,8 \pm 1,44
F11	-16,4 \pm 1,67
F12	-18,4 \pm 0,52
F13	-15,2 \pm 1,33
F14	-18,6 \pm 0,91
F15	-21,5 \pm 0,28
F16	-16,8 \pm 1,47
F17	-19,2 \pm 0,32
F18	-22,7 \pm 1,83

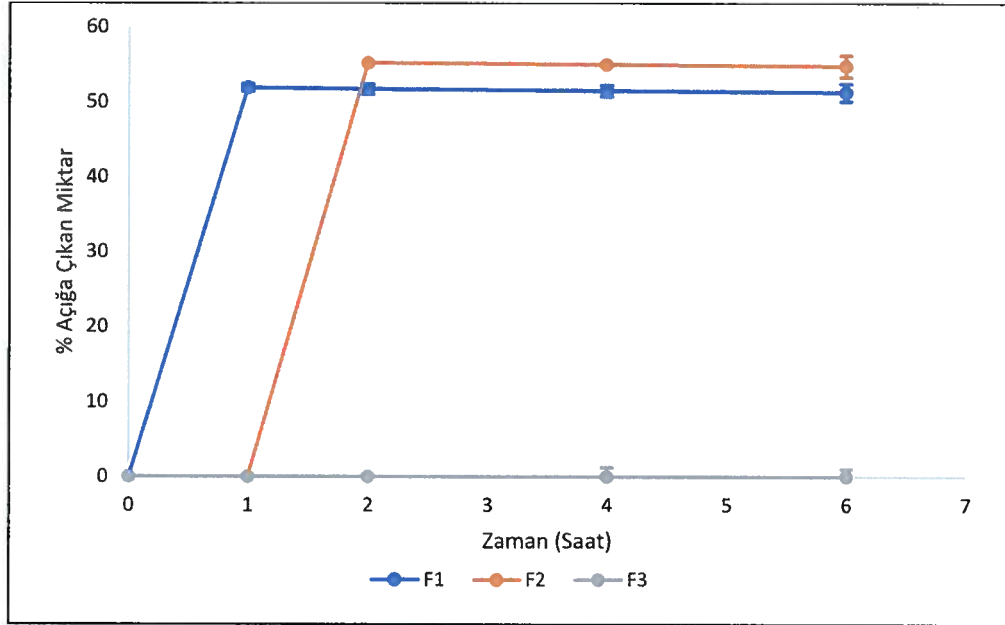
*SH: Standart Hata

3.3.4. İn Vitro Etkin Madde Açığa Çıkış Hızı Tayin Bulguları

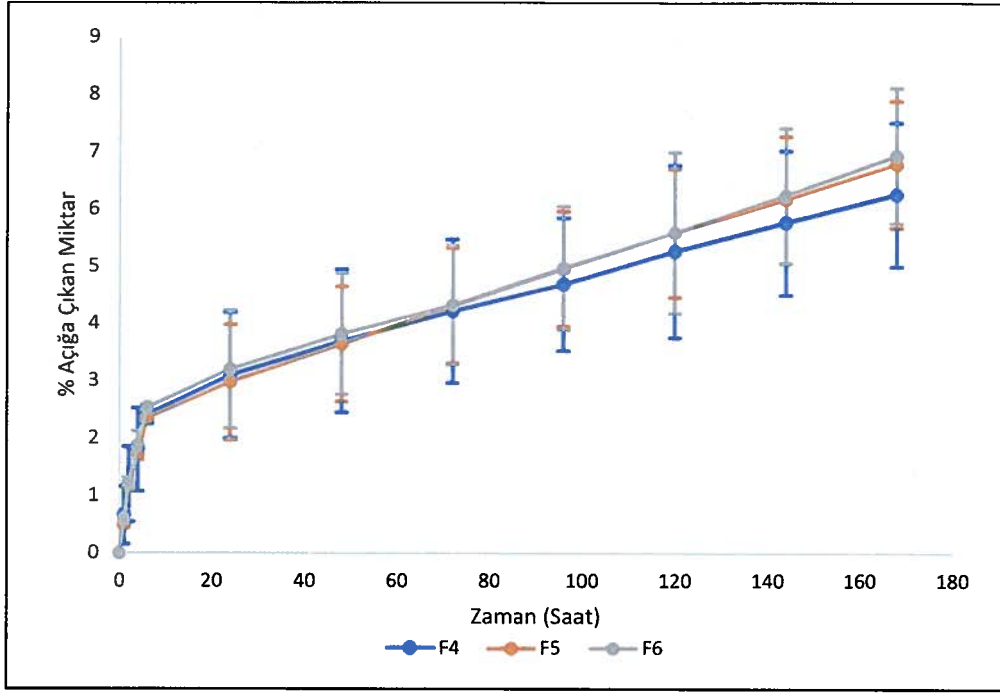
Bölüm 2.2.4.4.'de ifade edilen yöntem kullanılarak gerçekleştirilen tayin işlemi sonucunda nanopartikül formülasyonlara ait zamana bağlı etkin madde açığa çıkış hızı grafikleri aşağıda yer almaktadır.



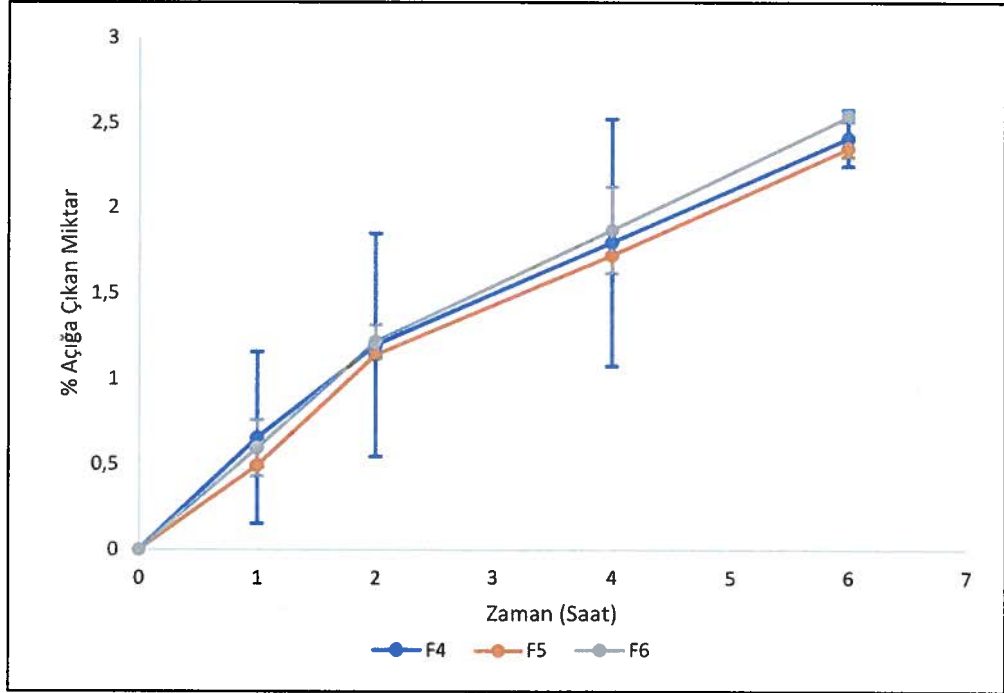
Şekil 3.4.a. Etkin madde/Polimer oranının sabit (1:5), Poloksamer 188 oranının (%1, %2, %3) değişken olduğu F1, F2 ve F3 formülasyonlarının 7 günlük salım profilleri.



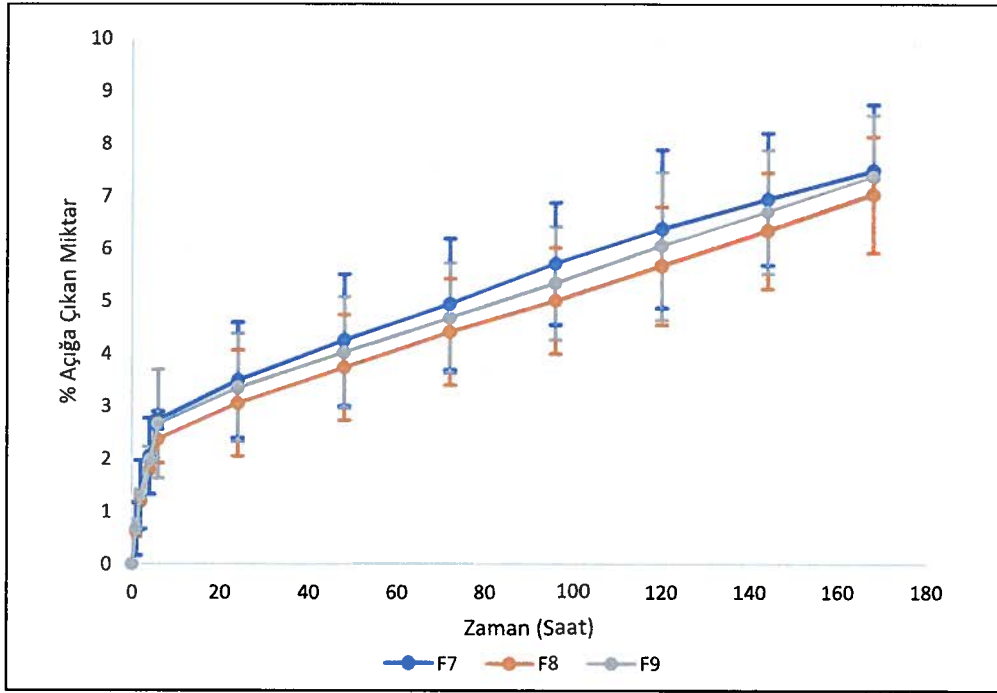
Şekil 3.4.b. Etkin madde/Polimer oranının sabit (1:5), Poloksamer 188 oranının (%1, %2, %3) değişken olduğu F1, F2 ve F3 formülasyonlarının ilk 6 saatlik salım profilleri.



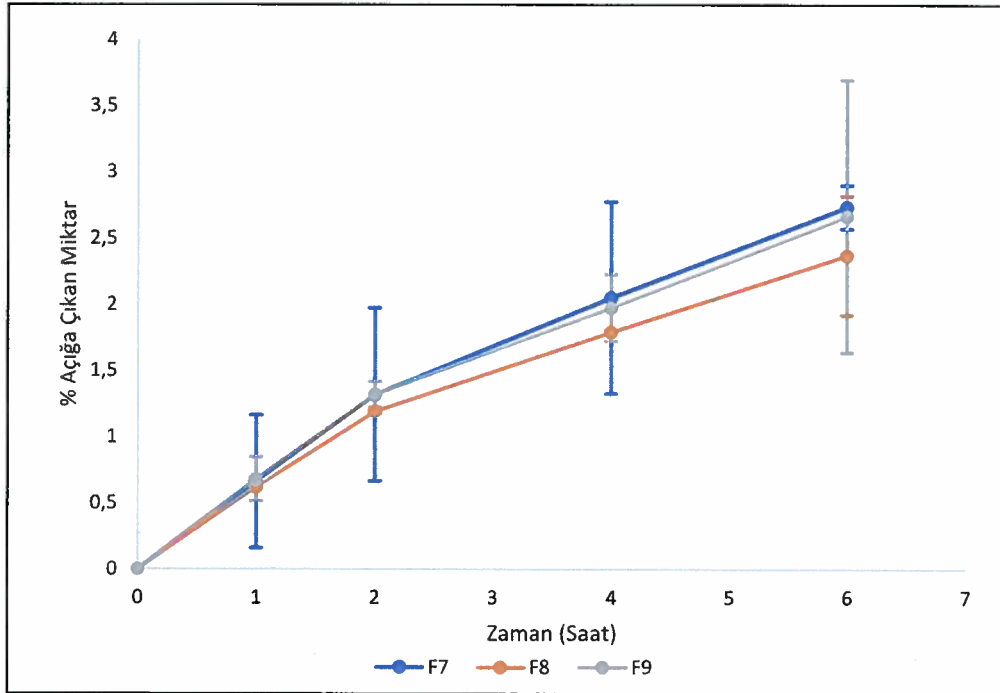
Şekil 3.5.a. Etkin madde/Polimer oranının sabit (1:10), Poloksamer 188 oranının (%1, %2, %3) değişken olduğu F4, F5 ve F6 formülasyonlarının 7 günlük salım profilleri.



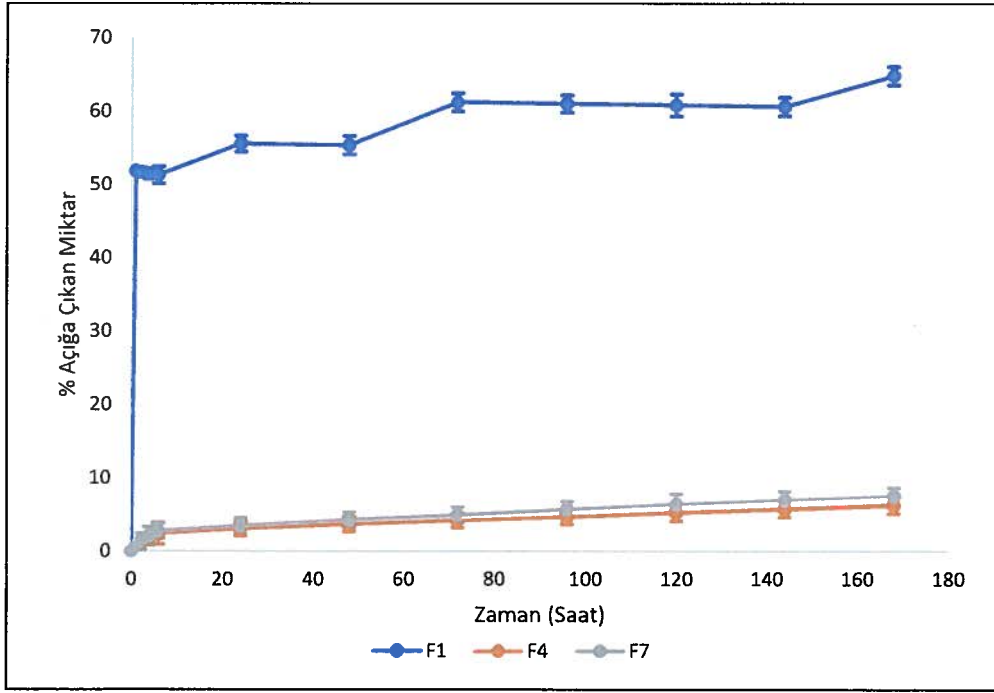
Şekil 3.5.b. Etkin madde/Polimer oranının sabit (1:10), Poloksamer 188 oranının (%1, %2, %3) değişken olduğu F4, F5 ve F6 formülasyonlarının ilk 6 saatlik salım profilleri.



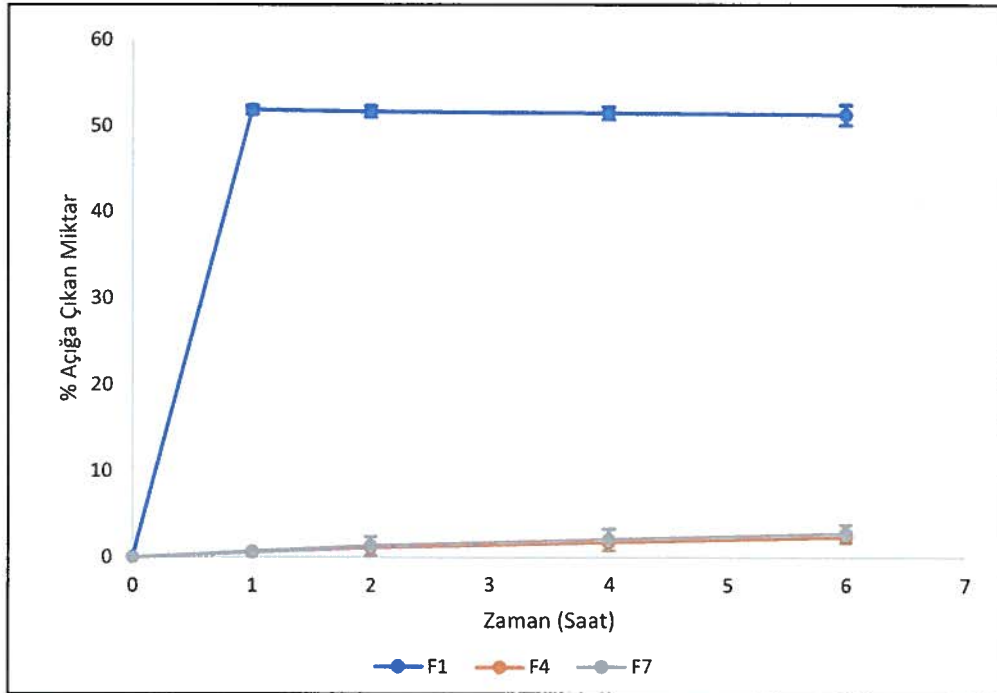
Şekil 3.6.a. Etkin madde/Polimer oranının sabit (1:15), Poloksamer 188 oranının (%1, %2, %3) değişken olduğu F7, F8 ve F9 formülasyonlarının 7 günlük salım profilleri.



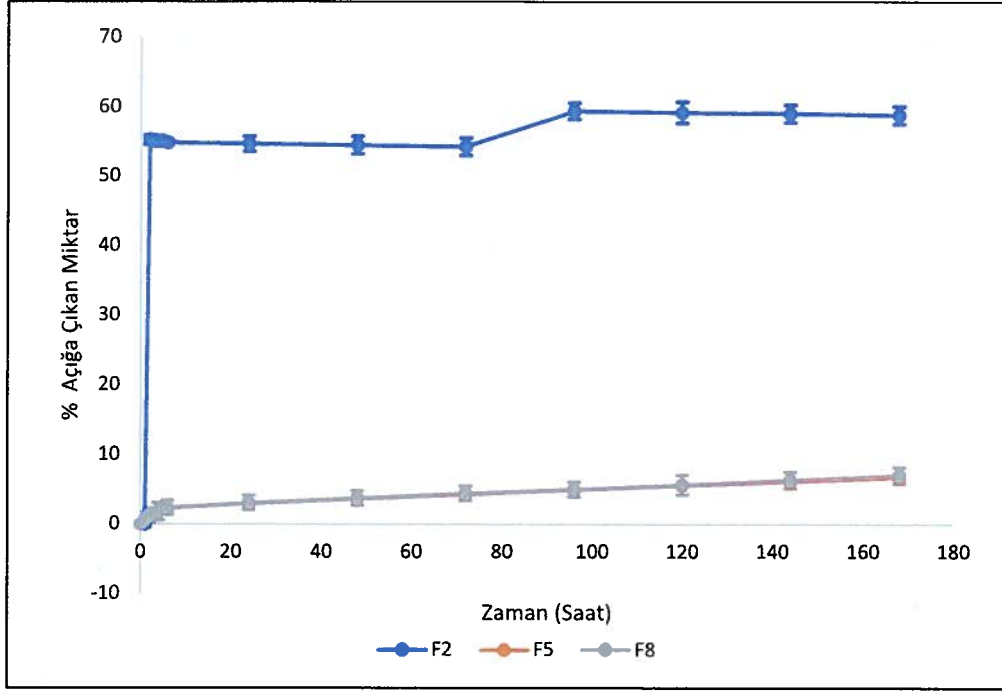
Şekil 3.6.b. Etkin madde/Polimer oranının sabit (1:15), Poloksamer 188 oranının (%1, %2, %3) değişken olduğu F7, F8 ve F9 formülasyonlarının ilk 6 saatlik salım profilleri.



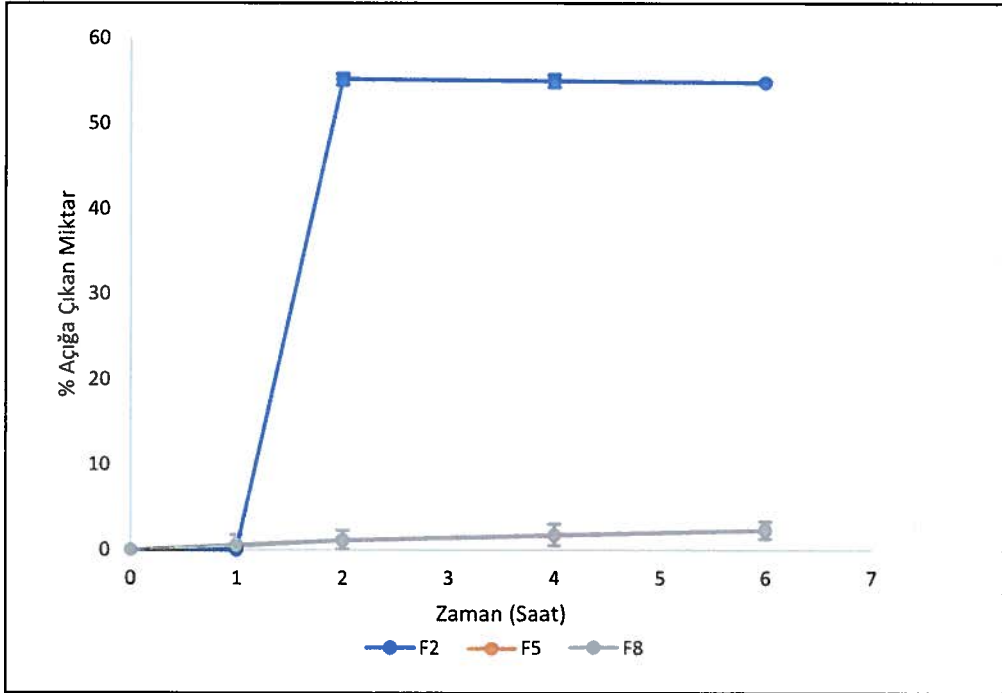
Şekil 3.7.a. Poloksamer 188 oranının sabit (%1), Etkin madde/Polimer oranının (1:5, 1:10, 1:15) değişken olduğu F1, F4 ve F7 formülasyonlarının 7 günlük salım profilleri.



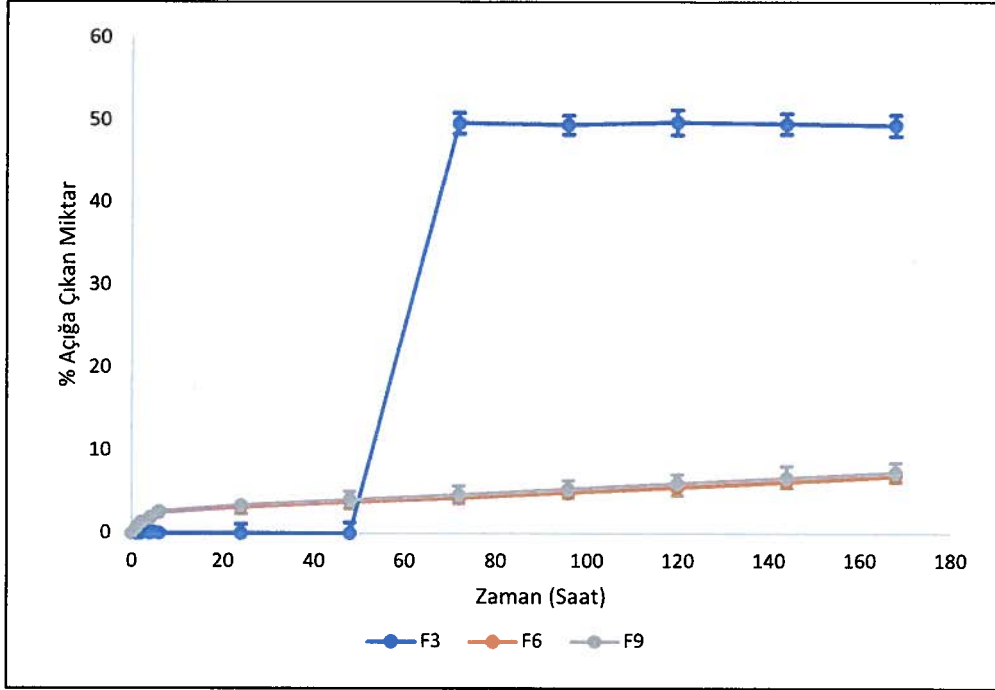
Şekil 3.7.b. Poloksamer 188 oranının sabit (%1), Etkin madde/Polimer oranının (1:5, 1:10, 1:15) değişken olduğu F1, F4 ve F7 formülasyonlarının ilk 6 saatlik salım profilleri.



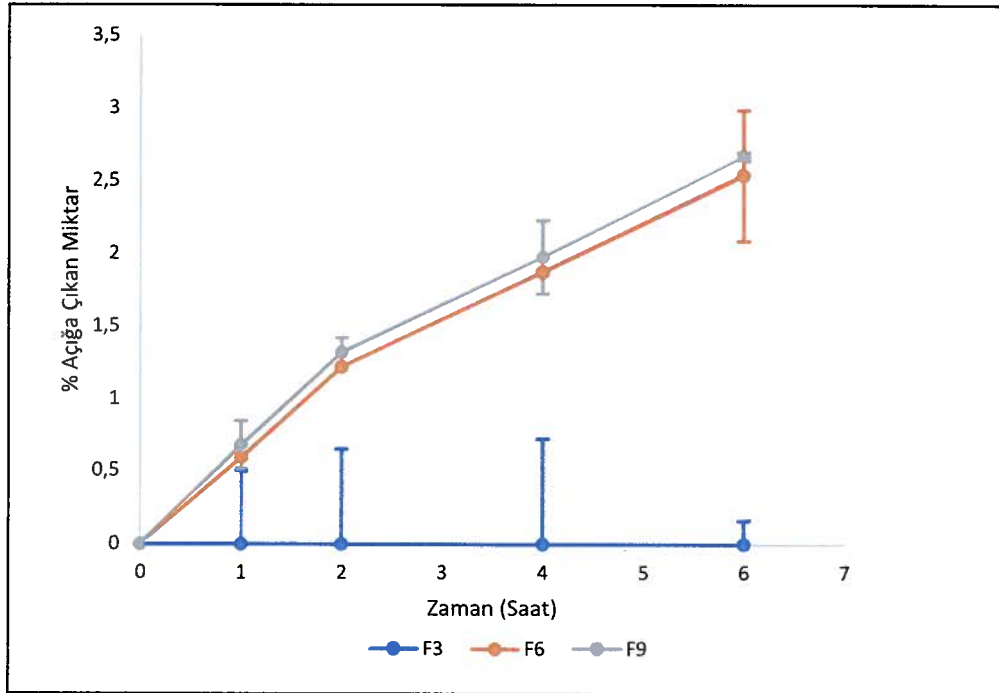
Şekil 3.8.a. Poloksamer 188 oranının sabit (%2), Etkin madde/Polimer oranının (1:5, 1:10, 1:15) değişken olduğu F2, F5 ve F8 formülasyonlarının 7 günlük salım profilleri.



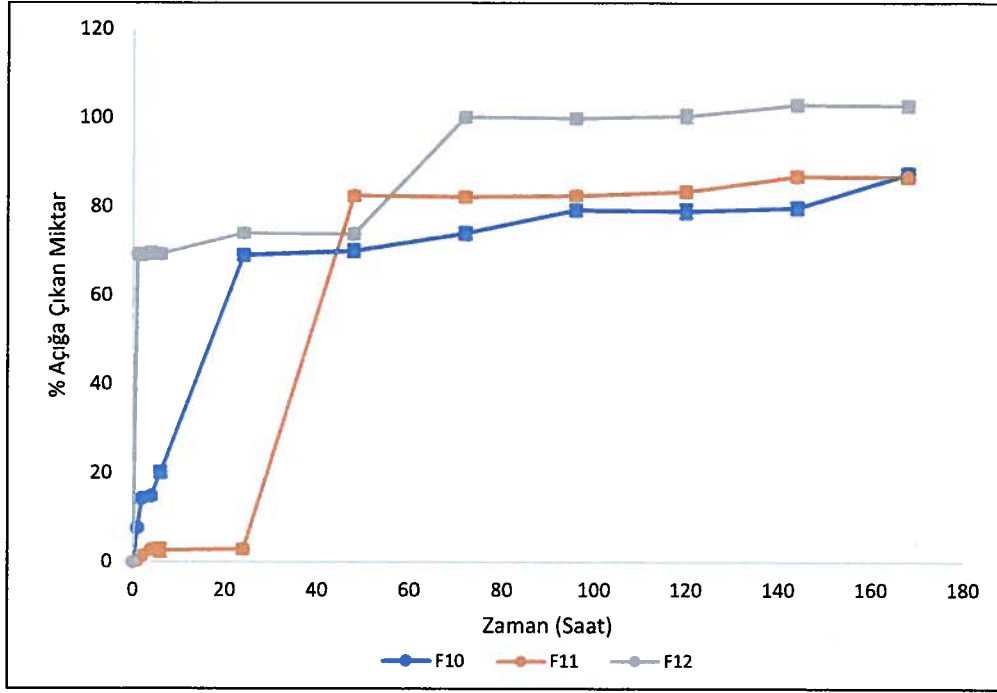
Şekil 3.8.b. Poloksamer 188 oranının sabit (%2), Etkin madde/Polimer oranının (1:5, 1:10, 1:15) değişken olduğu F2, F5 ve F8 formülasyonlarının ilk 6 saatlik salım profilleri.



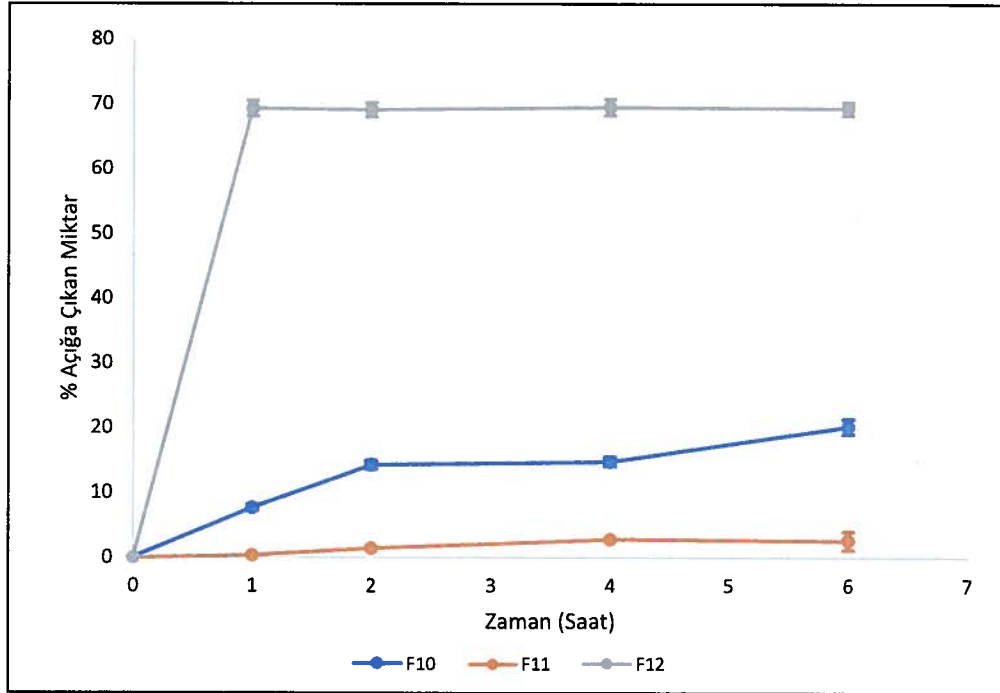
Şekil 3.9.a. Poloksamer 188 oranının sabit (%3), Etkin madde/Polimer oranının (1:5, 1:10, 1:15) değişken olduğu F3, F6 ve F9 formülasyonlarının 7 günlük salım profilleri.



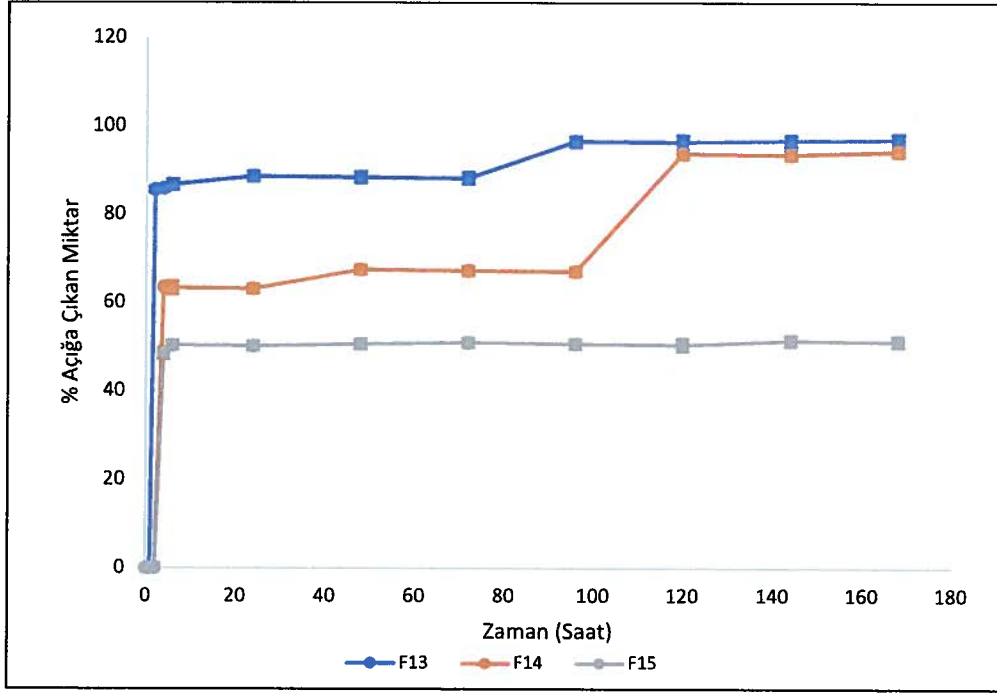
Şekil 3.9.b. Poloksamer 188 oranının sabit (%3), Etkin madde/Polimer oranının (1:5, 1:10, 1:15) değişken olduğu F3, F6 ve F9 formülasyonlarının ilk 6 saatlik salım profilleri.



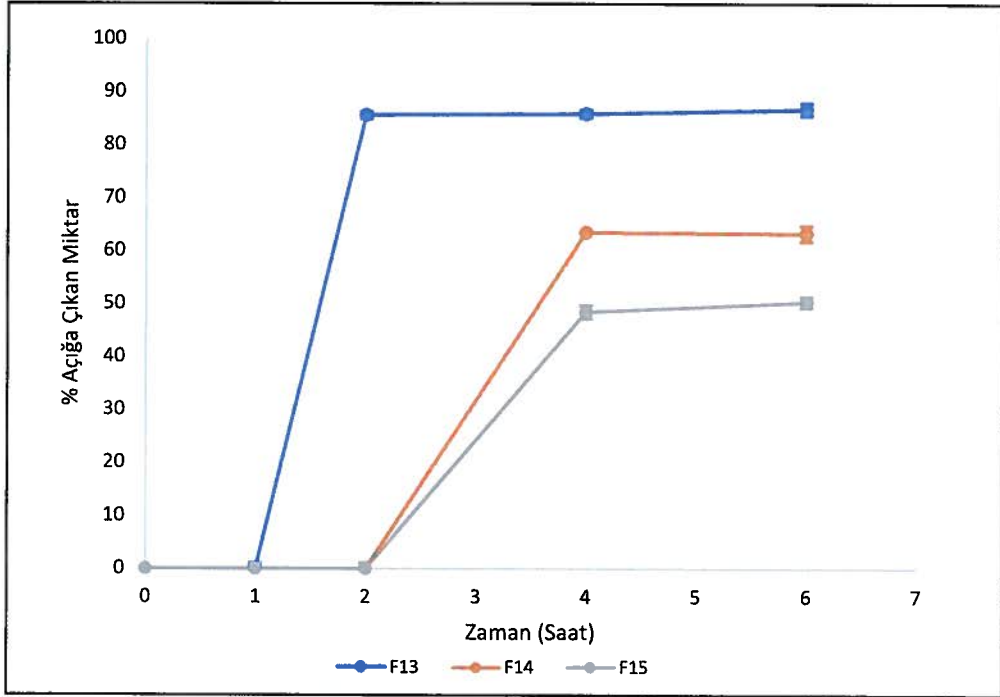
Şekil 3.10.a. Etkin madde/Polimer oranının sabit (1:5), PVA oranının (%1, %2, %3) değişken olduğu F10, F11 ve F12 formülasyonlarının 7 günlük salım profilleri.



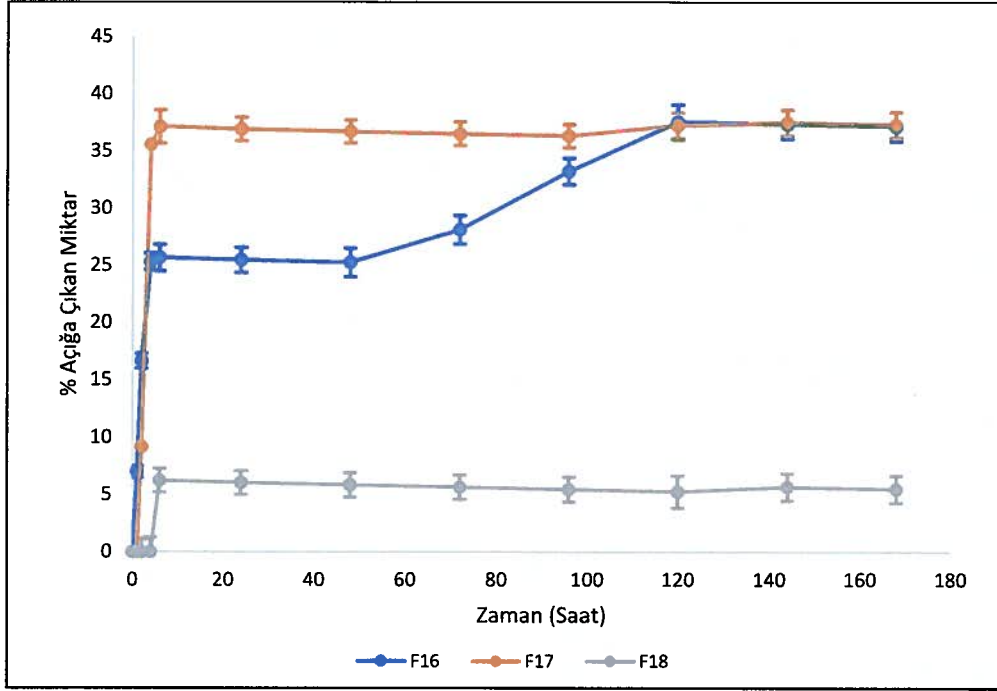
Şekil 3.10.b. Etkin madde/Polimer oranının sabit (1:5), PVA oranının (%1, %2, %3) değişken olduğu F10, F11 ve F12 formülasyonlarının ilk 6 saatlik salım profilleri.



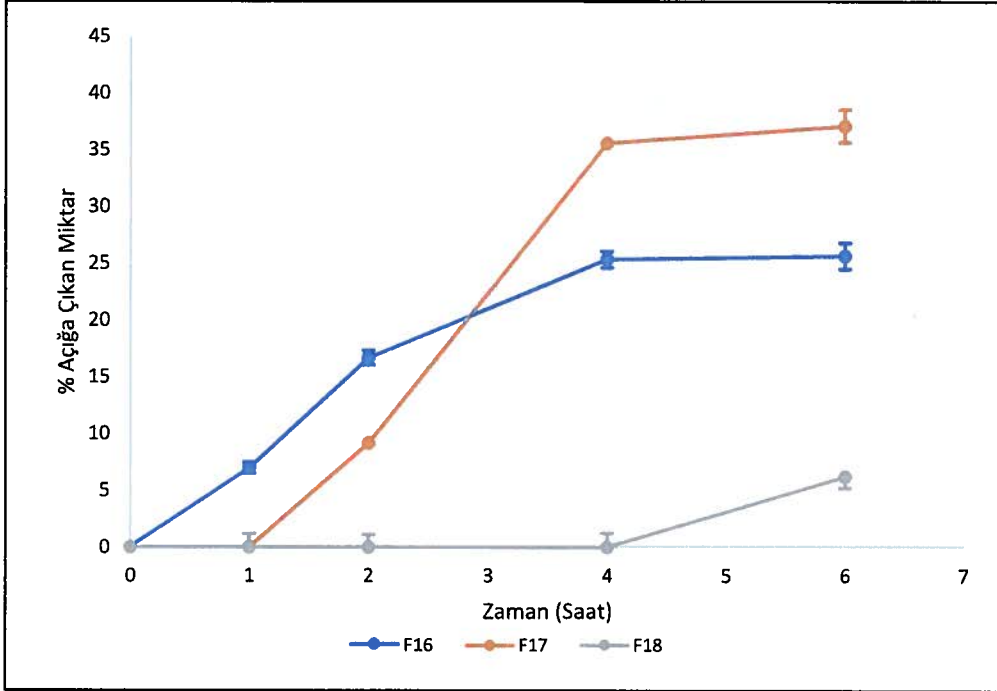
Şekil 3.11.a. Etkin madde/Polimer oranının sabit (1:10), PVA oranının (%1, %2, %3) değişken olduğu F13, F14 ve F15 formülasyonlarının 7 günlük salım profilleri.



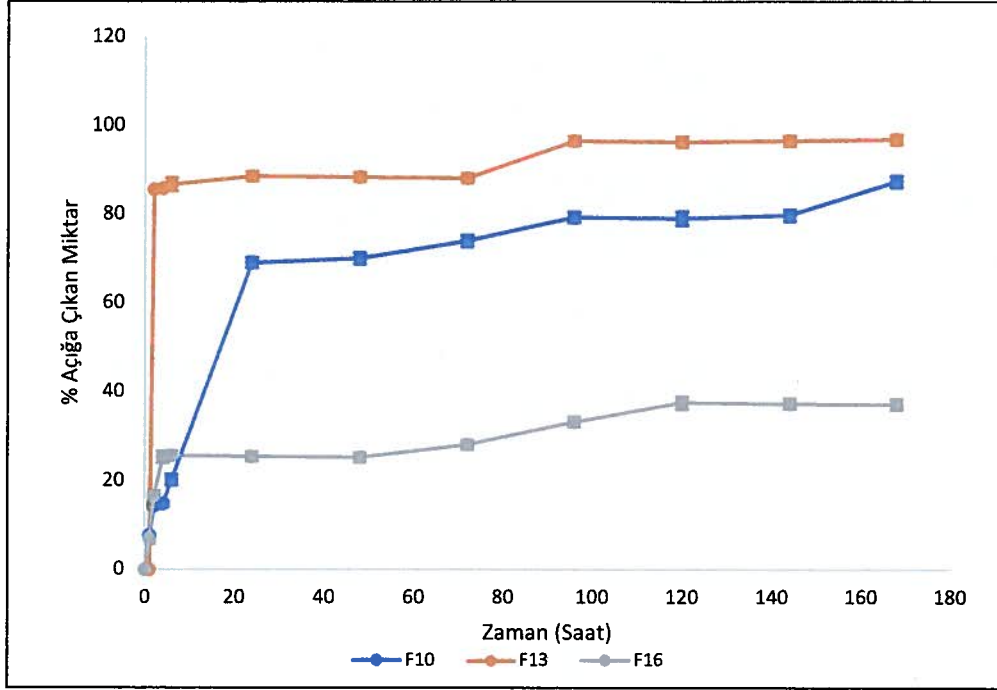
Şekil 3.11.b. Etkin madde/Polimer oranının sabit (1:10), PVA oranının (%1, %2, %3) değişken olduğu F13, F14 ve F15 formülasyonlarının ilk 6 saatlik salım profilleri.



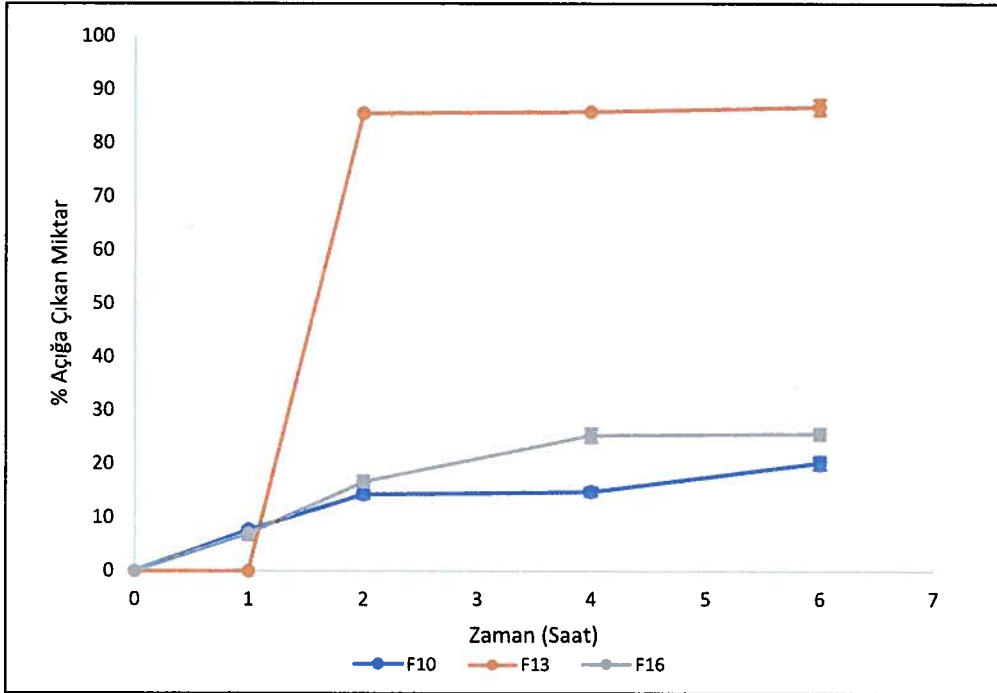
Şekil 3.12.a. Etkin madde/Polimer oranının sabit (1:15), PVA oranının (%1, %2, %3) değişken olduğu F16, F17 ve F18 formülasyonlarının 7 günlük salım profilleri.



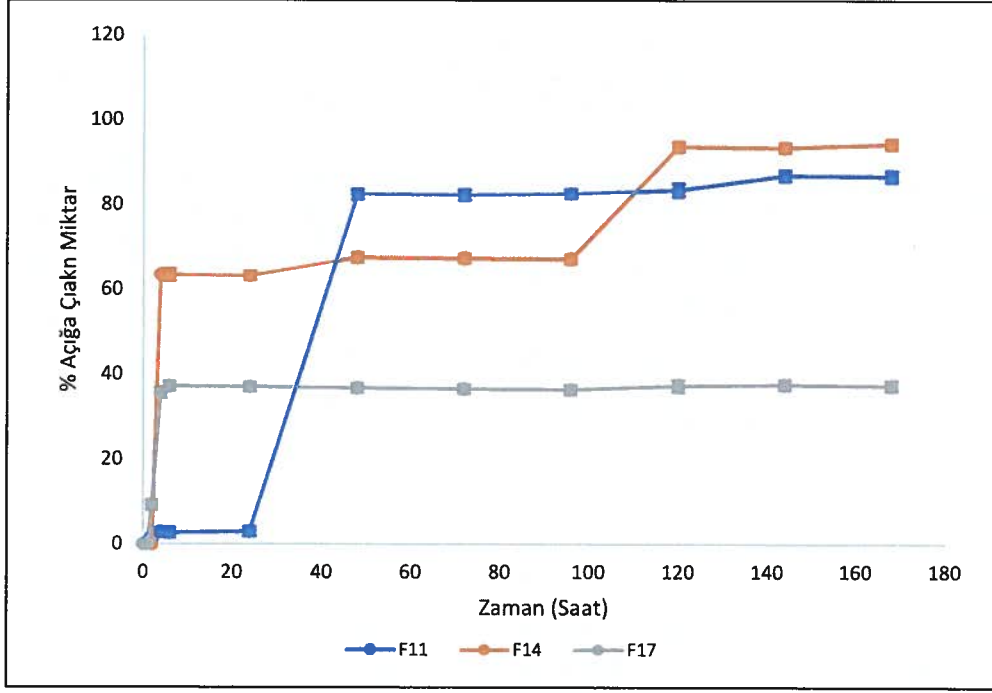
Şekil 3.12.b. Etkin madde/Polimer oranının sabit (1:15), PVA oranının (%1, %2, %3) değişken olduğu F16, F17 ve F18 formülasyonlarının ilk 6 saatlik salım profilleri.



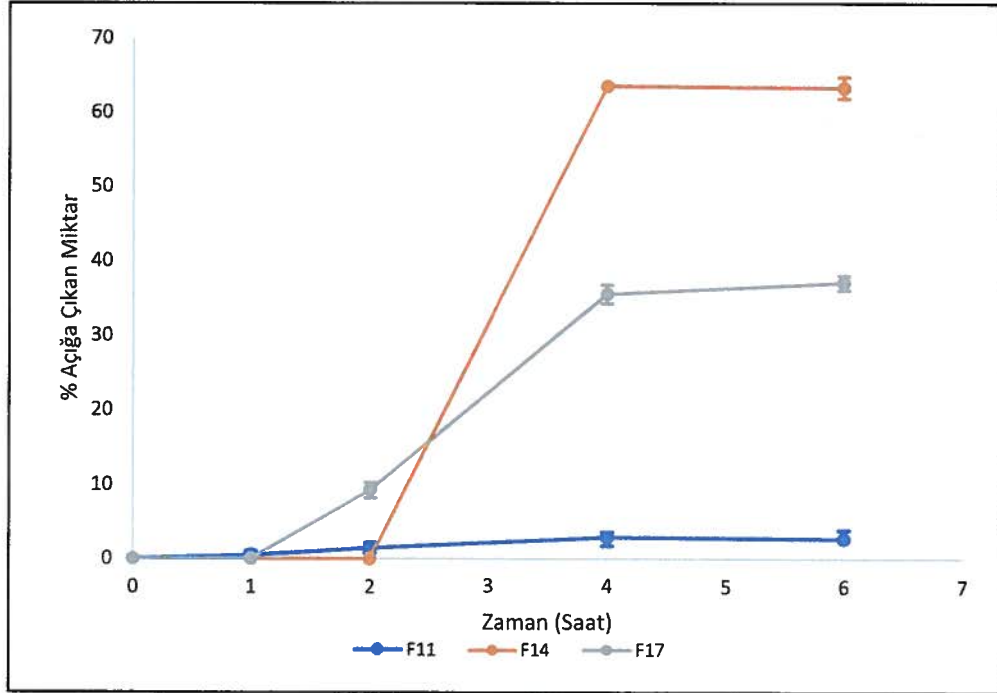
Şekil 3.13.a. PVA oranının sabit (%1), Etkin madde/Polimer oranının (1:5, 1:10, 1:15) değişken olduğu F10, F13 ve F16 formülasyonlarının 7 günlük salım profilleri.



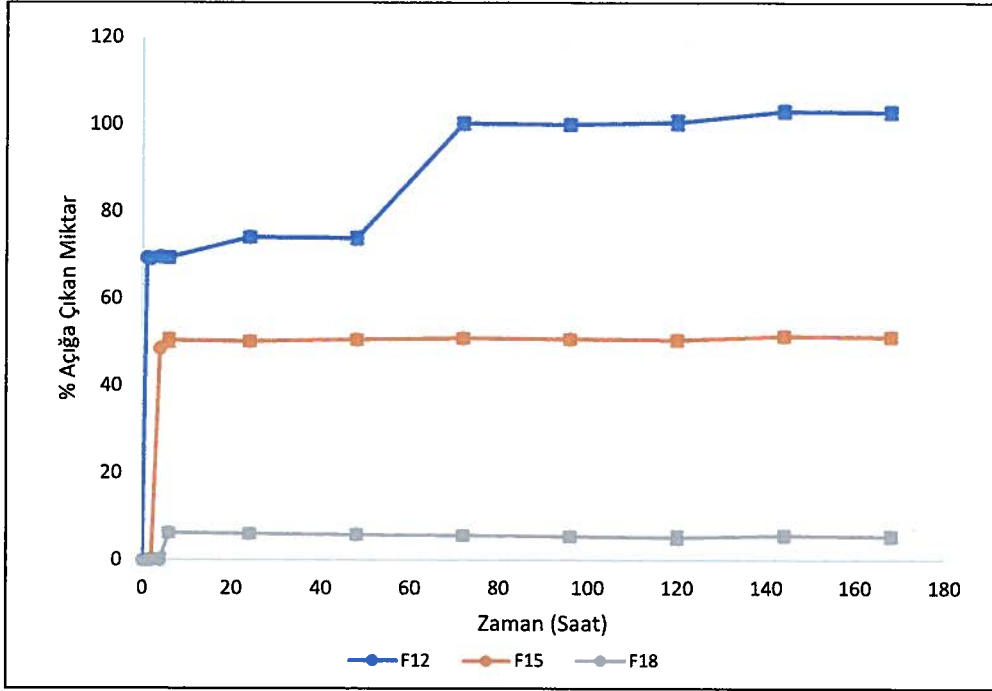
Şekil 3.13.b. PVA oranının sabit (%1), Etkin madde/Polimer oranının (1:5, 1:10, 1:15) değişken olduğu F10, F13 ve F16 formülasyonlarının ilk 6 saatlik salım profilleri.



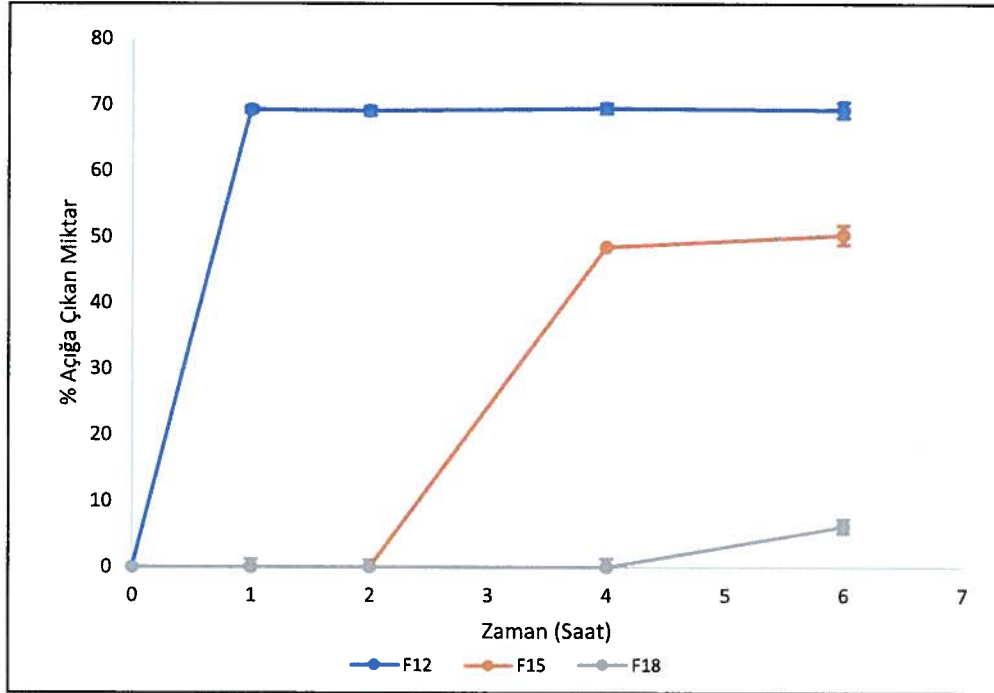
Şekil 3.14.a. PVA oranının sabit (%2), Etkin madde/Polimer oranının (1:5, 1:10, 1:15) değişken olduğu F11, F14 ve F17 formülasyonlarının 7 günlük salım profilleri.



Şekil 3.14.b. PVA oranının sabit (%2), Etkin madde/Polimer oranının (1:5, 1:10, 1:15) değişken olduğu F11, F14 ve F17 formülasyonlarının ilk 6 saatlik salım profilleri.



Şekil 3.15.a. PVA oranının sabit (%3), Etkin madde/Polimer oranının (1:5, 1:10, 1:15) değişken olduğu F12, F15 ve F18 formülasyonlarının 7 günlük salım profilleri.



Şekil 3.15.b. PVA oranının sabit (%3), Etkin madde/Polimer oranının (1:5, 1:10, 1:15) değişken olduğu F12, F15 ve F18 formülasyonlarının ilk 6 saatlik salım profilleri.

Çizelge 3.9. Nanopartikül formülasyonlardan açığa çıkan % etkin madde miktarları.

Formülasyonlar	Açığa çıkan % etkin madde miktarları										
	1. saat	2. saat	4. saat	6. saat	24. saat	48. saat	72. saat	96. saat	120. saat	144. saat	168. saat
F1	51,87	51,67	51,47	51,27	55,58	55,38	61,24	61,04	60,84	60,64	64,88
F2	0,00	55,22	55,02	54,82	54,62	54,42	54,22	59,33	59,13	58,93	58,73
F3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	49,59	49,39	49,71	49,51	49,31
F4	0,66	1,20	1,80	2,41	3,10	3,70	4,22	4,69	5,26	5,77	6,26
F5	0,50	1,14	1,73	2,35	2,98	3,65	4,32	4,97	5,59	6,17	6,79
F6	0,60	1,22	1,87	2,54	3,20	3,82	4,33	4,98	5,59	6,24	6,94
F7	0,66	1,32	2,05	2,74	3,49	4,26	4,94	5,72	6,38	6,95	7,49
F8	0,62	1,19	1,80	2,37	3,06	3,74	4,42	5,01	5,68	6,35	7,03
F9	0,68	1,32	1,98	2,67	3,36	4,03	4,68	5,34	6,05	6,71	7,37
F10	7,65	14,26	14,77	20,18	69,03	70,00	73,96	79,28	79,08	79,77	87,39
F11	0,41	1,45	2,87	2,67	2,91	82,45	82,25	82,55	83,53	86,98	86,78
F12	69,30	69,10	69,51	69,31	74,02	73,82	100,16	99,96	100,49	103,00	102,80
F13	0,00	85,62	85,91	86,78	88,64	88,44	88,24	96,63	96,43	96,69	96,98
F14	0,00	0,00	63,61	63,41	63,21	67,54	67,35	67,15	93,86	93,66	94,46
F15	0,00	0,00	48,52	50,39	50,20	50,64	50,94	50,74	50,54	51,44	51,24
F16	6,96	16,65	25,32	25,65	25,45	25,25	28,13	33,23	37,55	37,35	37,15
F17	0,00	9,17	35,60	37,13	36,93	36,73	36,54	36,34	37,26	37,51	37,31
F18	0,00	0,00	0,00	6,24	6,04	5,85	5,65	5,45	5,25	5,67	5,47

3.3.5. Optimum Formülasyonun Çözünme Hızı Verilerinin Kinetik Açından Değerlendirilmesi

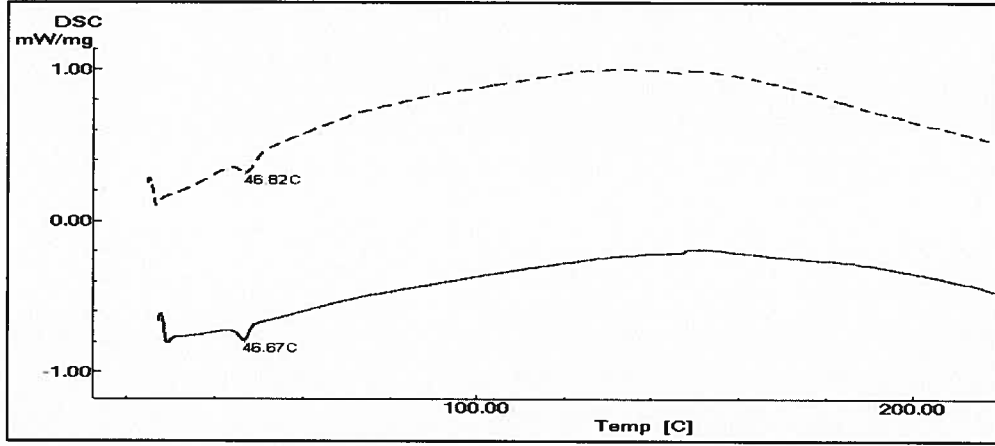
Optimum formülasyondaki etkin maddenin salım kinetiğinin belirlenmesi amacıyla SPSS 20 paket programı kullanılarak hesaplanan parametreler aşağıdaki çizelgede yer almaktadır.

Çizelge 3.10. Optimum formülasyonunun çözünme hızı verilerinin kinetik açıdan değerlendirilmesi.

Kinetik	Parametre	Sayısal Değer
0. Derece	R^2	0,844
	k_0	0,667
	F	59,322
	A.O.K.T.	606,239
1. Derece	R^2	0,612
	k_1	2,988
	F	14,191
	A.O.K.T.	0,356
Higuchi Kinetiği	R^2	0,960
	K	7,723
	F	264,225
	A.O.K.T.	154,643

3.3.6. Optimum Formülasyonun DSC Analizi Bulguları

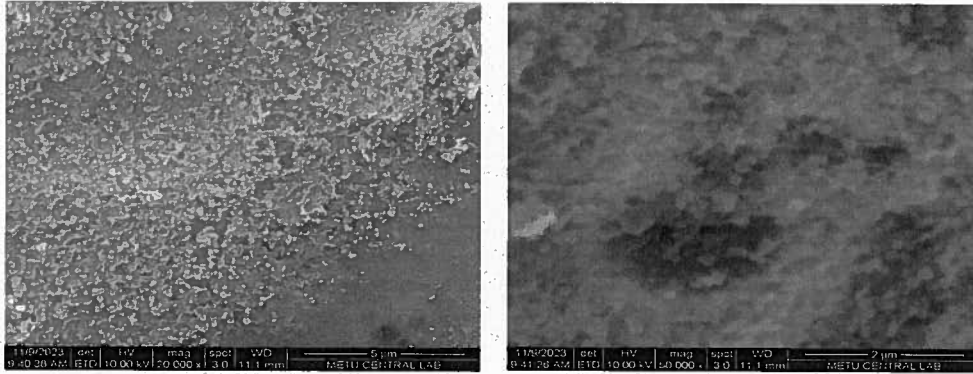
Pitavastatin yüklü optimum nanopartikül formülasyonunun ve etkin madde içermeyen nanopartikülün DSC termogramı aşağıdaki Şekil 3.16'da yer almaktadır.



Şekil 3.16. Optimum formülasyon yapısındaki pitavastatin yüklü nanopartikülün ve boş nanopartikülün DSC termogramı. ((----- Etkin madde içermeyen nanopartikül) ve (———— Pitavastatin yüklü nanopartikül))

3.3.7. Optimum Formülasyonun Morfolojik Özellik Bulguları

Nanoprespitasyon tekniği kullanılarak oluşturulan pitavastatin yüklü liyofilize haldeki optimum nanopartikül formülasyonunun taramalı elektron mikroskopisi kullanılarak elde edilen görüntüleri Şekil 3.17'deki gibi elde edilmiştir.



Şekil 3.17. Optimum nanopartikül formülasyonuna ait FESEM görüntüsü.

3.3.8. Optimum Formülasyonun Stabilite Bulguları

Bölüm 2.2.4.8’de ifade edilen şekilde gerçekleştirilen stabilite çalışmaları kapsamında; optimum formülasyona ait enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü ve PDI ile zeta potansiyel bulguları aşağıda Çizelge 3.11’de yer almaktadır.

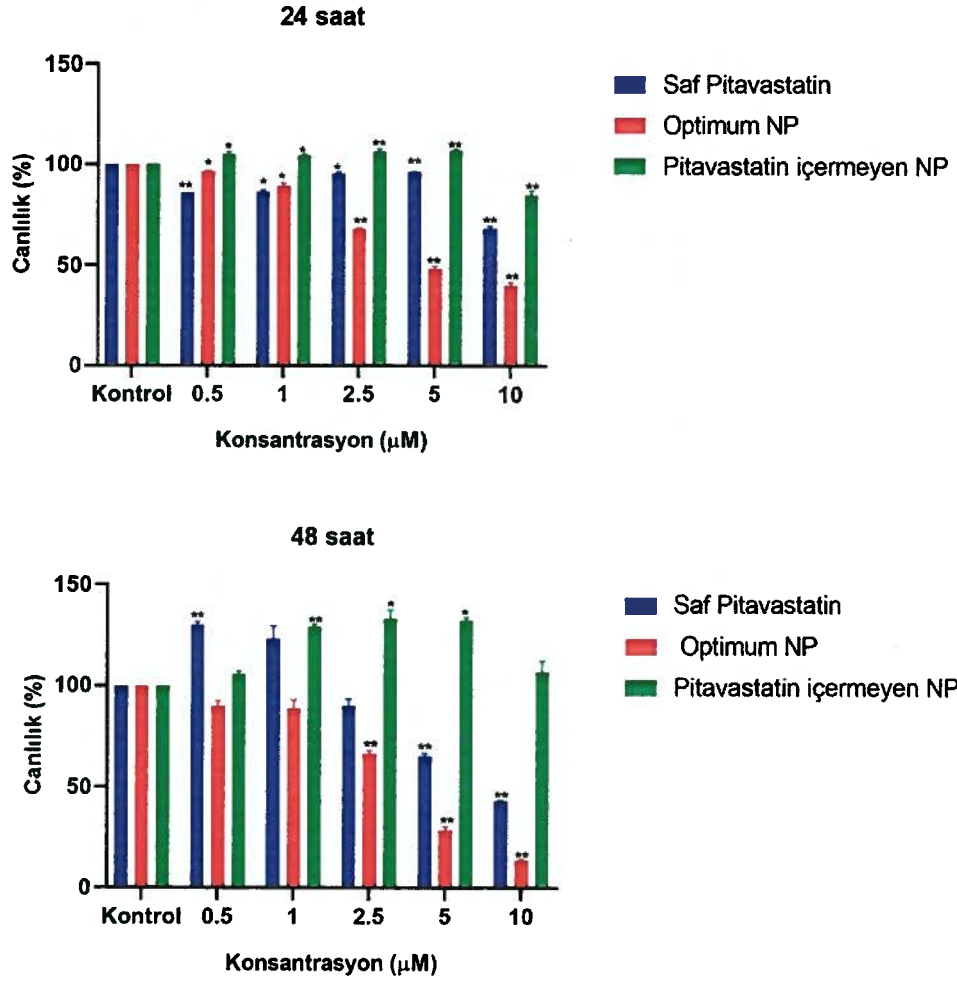
Çizelge 3.11. Optimum formülasyonun 4°C sıcaklık değerindeki 6 aylık stabilite verileri.

Zaman	Enkapsülasyon Etkinliği (%) (Ortalama ± SH*)	Partikül Büyüklüğü (nm) (Ortalama ± SH*)	PDI (Ortalama ± SH*)	Zeta Potansiyel (mV) (Ortalama ± SH*)
Başlangıç	64,26 ± 0,005	76,9 ± 2,46	0,061 ± 0,009	-13,8 ± 1,44
3.Ay	65,05 ± 0,031	78,4 ± 3,14	0,075 ± 0,007	-14,2 ± 1,12
6. ay	64,51 ± 0,025	77,2 ± 2,11	0,086 ± 0,008	-14,9 ± 1,37

*SH: Standart Hata

3.3.9. Optimum Formülasyonunun PC-3 Hücrelerinde Antikanser Etkinliğine Dair Bulgular

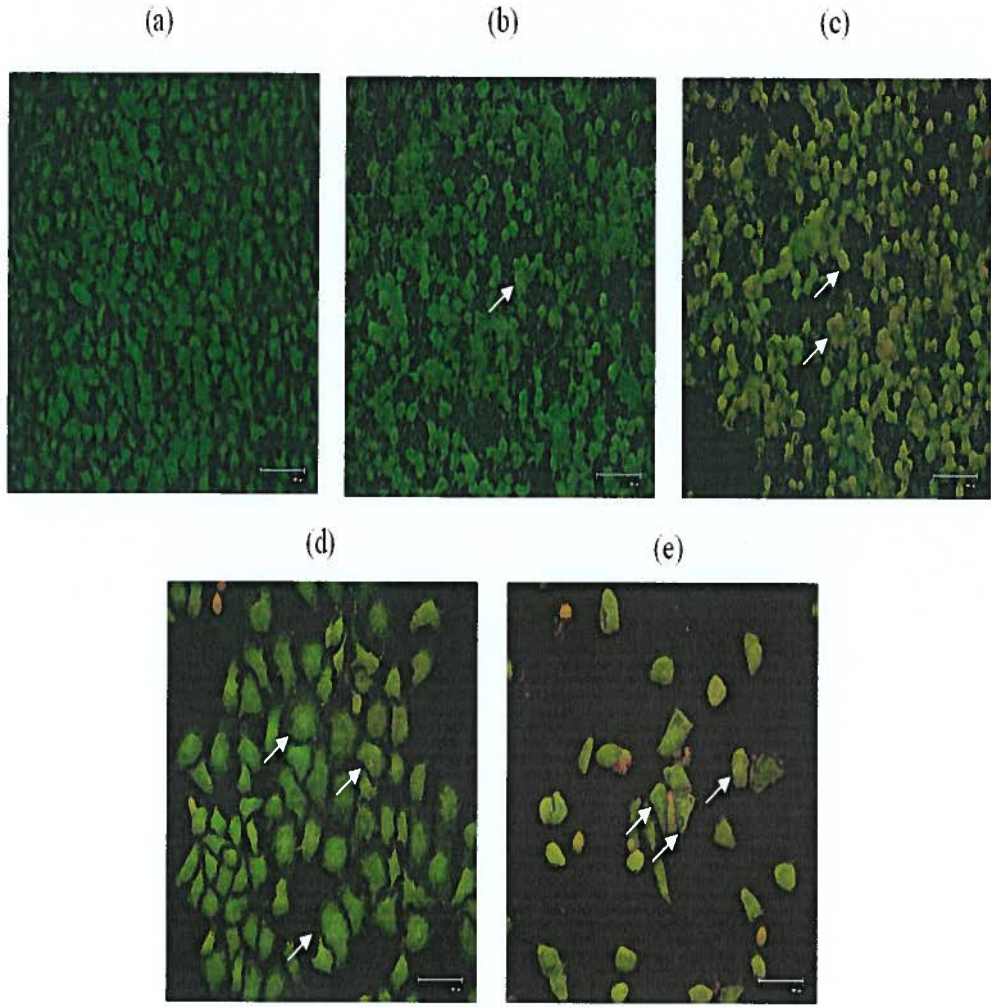
Optimum nanopartikül formülasyonunun (Optimum NP), saf Pitavastatin ve Pitavastatin içermeyen nanopartikül formülasyonu ile karşılaştırmalı olarak antikanser etkisinin değerlendirilmesi için CCK-8 analizi gerçekleştirilmiş ve elde edilen bulgular aşağıdaki Şekil 3.18’de yer almaktadır.



Şekil 3.18. Saf Pitavastatin, optimum nanopartikül formülasyon ve Pitavastatin içermeyen nanopartikül formülasyonunun PC-3 hücrelerinde antikanser etkisinin CCK-8 analizi ile değerlendirilmesi ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$).

3.3.10. Optimum Formülasyonunun PC-3 Hücrelerinde Hücre Morfolojisinde Etkisinin Değerlendirilmesi

Optimum nanopartikül formülasyonunun, saf Pitavastatin ile karşılaştırmalı olarak hücre morfolojisinde etkisinin değerlendirilmesi için AO/PI boyaması yapılarak elde edilen bulgular aşağıdaki Şekil 3.19'da yer almaktadır.



Şekil 3.19. Saf Pitavastatin ve optimum nanopartikül formülasyon uygulanan PC-3 hücrelerinde morfolojik değişimlerin AO/PI boyaması ile görüntülenmesi (a) Kontrol, (b) 5 μ M ve (c) 10 μ M Pitavastatin, (d) 5 μ M ve (e) 10 μ M optimum nanopartikül uygulamaları.

4. TARTIŞMA

Prostat kanseri tedavisinde antiproliferatif etkinliğin tespiti amacıyla yapılan deneylerde kullanılmak üzere temin edilen Pitavastatin molekülüne dair özelliklerin belirlenebilmesi için DSC analizi gerçekleştirilmiştir. Pitavastatin etkin maddesi üzerinde gerçekleştirilen ve Şekil 3.1’de verilen DSC termogramı incelendiğinde, 60–80°C aralığında geniş bir endotermik pik ile karşılaşılmasıdır. Bu pik, ilgili su moleküllerinin buharlaşmasından kaynaklanmaktadır (Eldeeb vd., 2022). Termogramda 190.22°C keskin bir endotermik pik daha yer almaktadır. Bu pik ise saf Pitavastatin molekülüne ait erime derecesini göstermektedir (Nagajyothi, 2013). Elde edilen bulgular ile Pitavastatin molekülüne dair yapılan literatür çalışmaları arasındaki sonuçların uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Tez çalışması süresince analitik yöntemin validasyonunun tespit ve tayini için seçicilik, sistem uygunluğu, kesinlik (tekrarlanabilirlik), teşhis tayini limiti (LOD&LOQ), doğrusallık ve aralığı ve doğruluk (% geri kazanım) parametreleri incelenmiştir. Seçicilik parametresi için Pitavastatin etkin maddesinin alıkonma zamanında yardımcı maddelerden kaynaklanan herhangi bir pik ile karşılaşılması gerekmektedir. Seçicilik çalışması sonucunda, formülasyonda yer alan yardımcı maddelerin 245 nm dalga boyunda herhangi bir pik vermediği gözlemlenmiş olup seçilen yöntemin Pitavastatine özgü olduğu sonucuna varılmıştır.

Sistem uygunluğu parametresi için ardışık enjeksiyonlara ait pik alanları arasında BSS’nin değeri % 2’den küçük olması gerekmektedir. Bölüm 3.2.2’de BSS değeri 0,66 olarak hesaplanmıştır. Sonucun kabul kriterleri içinde olması ile sistemin uygun olduğu kanıtlanmıştır.

Kesinlik parametresi için pik alanları ile alıkonma zamanları arasındaki BSS değeri maksimum % 2 olması gerekmektedir. Bölüm 3.2.3’te piklerin alıkonma zamanları ve alanları arasındaki BSS değerinin % 2’nin altında olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonucun kabul kriterleri içinde olması ile sisteme ait kesinlik parametresi kanıtlanmıştır.

LOD ve LOQ parametreleri için LOQ çözeltisinden yapılan ardışık enjeksiyonlar arası alanlara ait BSS değerinin % 2’den az olması gerekmektedir. LOD çözeltisinin enjeksiyonundan elde edilen S/N oranının yaklaşık 3 oranında olması LOD seviyesinin doğruluğunu göstermektedir. Bölüm 3.2.4’teki sonuçlar doğrultusunda saptanan LOQ seviyelerinde hazırlanan LOQ çözeltisinin 3 ardışık enjeksiyonundan elde edilen etkenler arasındaki BSS’nin

% 10'un altında olması ve S/N oranının yaklaşık 20 olması LOQ seviyesinin doğruluğunu kanıtlamıştır.

Doğrusallık ve aralığı parametresi için Pitavastatin molekülünün farklı konsantrasyonlarda doğru orantılı olarak cevap vermesi gerekmektedir. Bölüm 3.2.5'teki sonuçlar doğrultusunda konsantrasyona karşılık gelen alanlar arasında çizilen grafikte en küçük kareler yöntemine göre hesaplanan regresyon doğru denklemi ve bunun korelasyon katsayısı (R^2) değerlendirilmiştir. R^2 değerinin 0,995'in üzerinde bulunması ve kesim noktası eğiminin \pm %10 aralığında olması genel olarak regresyon doğrusunun uyumunun iyi olduğunu kanıtlamıştır.

Doğruluk parametresi için geri kazanımın %90 ile %110 arasında olması ve % geri kazanım çalışmalarının ortalamasının %95 güven aralığında olması gerekmektedir. Bölüm 3.2.6'daki sonuçlar doğrultusunda % geri kazanım değerinin ortalaması %100,68 ve geri kazanım çalışmalarının ortalamaları %95 güvenilirlik sınırları içinde bulunmuştur. Bu sonuçlara göre Pitavastatin için belirlenen konsantrasyon aralığında doğru sonuçların tespit edildiği kanıtlanmıştır.

Tez çalışması süresince hazırlanan tüm nanopartikül formülasyonların partikül büyüklükleri ve PDI değerleri foton korelasyon spektroskopisi ile tayin edilmiş olup elde edilen bulgular Çizelge 3.6'da yer almaktadır. Partikül büyüklüğü ve PDI sonuçları elde edilecek biyolojik yanıt hakkında yorum yapılabilmesi için önemli bir parametredir. Hazırlanan Pitavastatin yüklü nanopartikül formülasyonların partikül büyüklükleri 76 - 318 nm aralığında ve PDI değerleri 0,061 – 0,292 aralığında yer almaktadır.

Pitavastatin ile PLGA; F1, F2, F3 formülasyonlarında 1:5 oranında, F4, F5, F6 formülasyonlarında 1:10 oranında ve F7, F8, F9 formülasyonlarında 1:15 oranında yer alırken, Poloksamer 188 miktarı %1, %2 ve %3 oranlarında değişken tutulmuştur. Formülasyonlarda Poloksamer 188 miktarının artması ile partikül büyüklüğü artışı gözlenirken, elde edilen bulguların istatistiksel olarak farklı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.005$). Düşük konsantrasyonlarda Poloksamer 188 adsorpsiyonunun tek katmanlı olduğu, daha yüksek konsantrasyonların ise çok katmanlı olduğu için adsorpsiyonu kolaylıkla gerçekleşmektedir. Bu sebepten ötürü Poloksamer 188 konsantrasyonu arttıkça nanopartiküllerin partikül büyüklüğü de o kadar büyük olmuştur (Madani vd., 2018). Poloksamer 188 miktarının sabit olduğu,

Pitavastatin ile PLGA oranının değişken tutulduğu formülasyonlar incelendiğinde ise PLGA miktarının artması ile partikül büyüklüğünün de artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0.005$). Yapılan bir çalışmada, nanopresipitasyon yöntemi kullanılarak PLGA nanopartikülleri hazırlanmıştır. Hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğünün; PLGA:stabilizan oranına, organik faz:sulu faz oranına ve organik çözücü tipine bağlı olduğu ifade edilmiştir. Polimer konsantrasyonunda artışın, polimer çözeltisinin viskozitesini artırabildiği ve bu sebepten ötürü organik fazın sulu faz içerisinde zayıf bir dağılım gösterdiği ve partikül büyüklüğünde de artışa sebep olduğu ifade edilmiştir (Kara vd., 2014).

Pitavastatin ile PLGA; F10, F11, F12 formülasyonlarında 1:5 oranında, F13, F14, F15 formülasyonlarında 1:10 oranında ve F16, F17, F18 formülasyonlarında 1:15 oranında yer alırken PVA miktarı %1, %2 ve %3 oranlarında değişken tutulmuştur. Pitavastatin ile PLGA oranının sabit tutulduğu formülasyonlarda PVA miktarının artması ile partikül büyüklüğü artışı gözlenmiştir. PVA miktarının sabit olduğu, Pitavastatin ile PLGA oranının değişken tutulduğu formülasyonlar incelendiğinde ise PLGA miktarının artması ile partikül büyüklüğünde artış gözlenmiş olup, formülasyonlar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). 2014 yılında yapılan bir çalışmaya göre, farklı konsantrasyonlarda PVA kullanılarak nanopartikül yapılar elde edilmiştir. Elde edilen nanopartikül yapılara ait partikül büyüklükleri incelendiğinde; PVA konsantrasyonunun artması ile daha büyük partikül büyüklüğüne sahip formülasyonlar elde edilmiştir. Bu durumun sebebi olarak, nanopartiküllerin hazırlanması sırasında yüksek yüzey aktif madde konsantrasyonlarında sulu fazın daha yüksek viskoziteye sahip olabileceği ve bu durumun partikül büyüklüğündeki artışa sebep olduğu ifade edilmiştir (Saadati ve Dadashzadeh, 2014).

Formülasyonlar PDI açısından incelendiğinde; Poloksamer 188 kullanılarak hazırlanan formülasyonların PDI değerleri 0,211 ile 0,292 değer aralığında, PVA ile hazırlanan formülasyonların PDI değerleri ise 0,061 ile 0,138 değer aralığında olduğu tespit edilmiştir. Nanopartiküler yapılarda PDI değerinin 0,3 değerinden küçük olması, partiküllerin benzer boyutlara sahip olduğunun ve sistemin homojen olduğunun bir göstergesi olarak ifade edilmektedir (Amasya, 2014). Bu doğrultuda, elde edilen tüm formülasyonların PDI değerlerinin kabul edilebilir aralıkta olduğu sonucuna varılmıştır.

Tüm formülasyonlara ait partikül büyüklüğü ve PDI bulguları incelendiğinde, PVA ile hazırlanan formülasyonlarda daha düşük partikül büyüklüğü ve PDI değerleri gözlenmiş olup,

en düşük partikül büyüklüğü ve PDI değerine sahip olan formülasyonun F10 kodlu formülasyon olduğu tespit edilmiştir. 2008 yılında yapılan bir çalışmada, Poloksamer 188 ve PVA kullanılarak çeşitli PLGA'lı nanopartikül yapılar elde edilmiştir. Elde edilen nanopartikül yapılar için incelemeler sonucunda, PVA ile hazırlanan nanopartiküllerin, 220 nm altında partikül büyüklüğüne sahip olarak elde edilmesi için ve partikül tekdüzeliği açısından daha uygun olduğu ifade edilmiştir (Feczko vd. 2008). Literatür çalışmasından elde edilen sonuçlar ile hazırladığımız nanopartikül yapılar için sonuçların uyumlu olması dikkat çekmiştir.

Tüm nanopartikül formülasyonlara yüklenen Pitavastatin miktarının belirlenmesi amacıyla enkapsülasyon etkinliği tayini gerçekleştirilmiştir. Bu tayin işlemi için indirek yöntem kullanılmış olup elde edilen bulgular Çizelge 3.7'de yer almaktadır.

Poloksamer 188 miktarının arttığı, Pitavastatin ile PLGA oranının sabit tutulduğu formülasyonlar enkapsülasyon etkinliği açısından incelendiğinde; Poloksamer 188 miktarının artışı genel olarak enkapsülasyon etkinliğini arttırmış olup elde edilen bulgular arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$). Poloksamer 188 miktarının sabit tutulduğu Pitavastatin ile PLGA oranının değişken tutulduğu formülasyonlar incelendiğinde ise PLGA miktarının artışı bazı formülasyonlarda enkapsülasyon etkinliğini arttırmışken bazı formülasyonlarda enkapsülasyon etkinliğinin azalmasına neden olduğu gözlenmiştir. Elde edilen bulgular arasındaki farkın ise istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Pitavastatin ile PLGA oranının 1:10 olduğu ve Poloksamer 188 miktarının %2 olduğu F5 kodlu formülasyon enkapsülasyon etkinliği olarak en yüksek değere sahip (% 47.79) olan formülasyon olmuştur. Bu formülasyonun partikül büyüklüğü incelendiğinde ise 222,2 nm olduğu gözlenmiştir. Enkapsülasyon etkinliği açısından en düşük değere sahip (% 28.15) olan formülasyon ise Pitavastatin ile PLGA oranının 1/5 olduğu ve Poloksamer 188 miktarının %1 olduğu F1 kodlu formülasyon olmuştur. F1 kodlu formülasyonun partikül büyüklüğü incelendiğinde ise 164,1 nm olduğu gözlenmiştir. Bu iki formülasyon PDI değeri açısından birbirine çok yakın değerlere sahip olmasına karşın (F5: 0.289 ve F1: 0.286) enkapsülasyon etkinliği ve partikül büyüklüğü açısından farklılık göstermiştir.

PVA miktarının arttığı, Pitavastatin ile PLGA oranının sabit tutulduğu formülasyonlar incelendiğinde; PVA miktarı arttıkça enkapsülasyon etkinliğinin azaldığı tespit edilmiştir. PVA miktarının sabit tutulduğu, Pitavastatin ile PLGA oranının değişken tutulduğu formülasyonlarda ise PLGA miktarı arttıkça genel olarak enkapsülasyon etkinliğinin azaldığı gözlenmiştir. Elde

edilen edilen bulgular arasındaki farkın ise istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). PVA ile hazırlanan formülasyonlardan F10 kodlu formülasyon en yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip olan formülasyon olmuştur. F10 kodlu formülasyonda Pitavastatin ile PLGA oranı 1:5 oranında, PVA ise %1 oranında yer almıştır. F10 kodlu formülasyonun partikül büyüklüğü 76,9 nm ve PDI değeri 0,061 ile formülasyonlar içinde en düşük değere sahip olan formülasyon olmuştur. Pitavastatin ile PLGA oranının 1:15 oranında olduğu, PVA'nın %3 oranında olduğu F18 kodlu formülasyon ise en düşük enkapsülasyon etkinliğine sahip olan formülasyon olmuştur. F18 kodlu formülasyon PVA ile hazırlanan formülasyonlar arasında en yüksek partikül büyüklüğüne (217,4 nm) ve PDI değerine (0,138) sahip olan formülasyon olmuştur.

Tüm formülasyonlara ait enkapsülasyon etkinliği incelendiğinde ise PVA ile hazırlanan formülasyonlarda enkapsülasyon etkinliğinin daha yüksek değerlerde olduğu ve en yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip olan formülasyonun F10 kodlu formülasyon olduğu tespit edilmiştir. PVA ile hazırlanan formülasyonlar arasından enkapsülasyon etkinliği yüksek olan formülasyonlarda daha düşük partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımı gözlenmiştir. Esim vd. (2020) yaptığı bir çalışmada, Epirubisin yüklü PLGA'lı nanopartikül formülasyonları tasarlamışlardır. Tasarlanan nanopartiküllerde yüzey aktif madde olarak PVA ve Poloksamer 188 kullanmışlardır. PVA konsantrasyonu arttıkça Epirubisinin enkapsülasyon etkinliği artmıştır. Bu durumun sebebi olarak partikül yüzeyine adsorbe edilen yüzey aktif madde miktarı, etkin maddeler için bariyer görevi görerek enkapsülasyon etkinliği üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu ifade edilmiştir.

Tez çalışması süresince hazırlanan tüm nanopartikül formülasyonların zeta potansiyel değeri lazer doppler anemometri prensibi ile tayin edilmiş olup elde edilen bulgular Çizelge 3.8'de yer almaktadır. Nanopartikül formülasyonların zeta potansiyel değeri -22,7 mV ile -0,7 mV aralığında yer almıştır. F1'den F9'a kadar olan formülasyonların zeta potansiyel değerleri -6,9 ile -0,7 mV aralığında yer almıştır. Formülasyonlar zeta potansiyel değeri açısından incelendiğinde; Poloksamer 188 miktarının ya da PLGA miktarının formülasyonlarda artış göstermesi, zeta potansiyel değerinde azalmaya sebep olmuş olup, bulguların istatistiksel olarak farklı olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). F10'dan F18'e kadar olan formülasyonların zeta potansiyel değerleri -22,7 ile -13,8 mV aralığında yer almaktadır. Formülasyonlarda PVA miktarının ya da PLGA miktarının artması sonucunda zeta potansiyel değerlerinde de artış gözlenmiş olup, bu bulgularında istatistiksel olarak farklı olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$).

PVA ile hazırlanan formülasyonlarda negatif yüzey yükü, nanopartikül yüzeyindeki PVA'nın iyonize karboksil gruplarının varlığından ileri gelmektedir (Sahoo vd., 2002). Bu doğrultuda, formülasyonlardaki PVA miktarının artması ile zeta potansiyel değerlerindeki artış beklenen bir durum olarak değerlendirilmiştir.

Tez çalışması süresince hazırlanan nanopartikül formülasyonların in-vitro etkin madde açığa çıkış hızı Bölüm 2.2.4.4'de ifade edildiği gibi statik bir yöntem olan diyaliz membran tekniği uygulanarak tayin edilmiştir. Yapılan tayin işlemleri sonucunda elde edilen bulgular Şekil 3.4'den Şekil 3.15'e kadar olan grafiklerde yer almaktadır.

Poloksamer 188'in değişken tutulduğu, Pitavastatin ile PLGA oranının sabit olduğu formülasyonlar in-vitro etkin madde açığa çıkış hızı açısından incelenmiştir. Şekil 3.4'e göre, Poloksamer 188 miktarının %2 oranına çıkması ile Pitavastatinin 1. saatin sonunda salınımına başladığı, Poloksamer 188 miktarının %3 oranına çıkması sonucunda ise Pitavastatinin 50. saatin sonunda salınımına başlamış olduğu gözlemlenmiştir. 168. saatin sonunda ise %1 oranında Poloksamer 188 içeren F1 ve %2 oranında Poloksamer 188 içeren F2 kodlu formülasyonlarda açığa çıkan etkin madde miktarı %50'nin üzerindeyken, %3 oranında Poloksamer 188 içeren F3 kodlu formülasyonda açığa çıkan etkin madde miktarı %50 değerinin altında kalmış olup elde edilen bulgular arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Şekil 3.5 ve Şekil 3.6'da yer alan F4, F5, F6 (etkin madde/polimer oranının 1:10 olduğu ve sırasıyla %1, %2 ve %3 oranında Poloksamer 188 içeren formülasyonlar) ve F7, F8 ve F9 (etkin madde/polimer oranının 1:15 olduğu ve sırasıyla %1, %2 ve %3 oranında Poloksamer 188 içeren formülasyonlar) formülasyonlarına ait etkin madde açığa çıkış hızı grafikleri incelendiğinde, formülasyonların tamamı ilk 6 saat içerisinde maksimum salınım hızına ulaştıktan sonra doğrusal bir şekilde salınımına devam etmiştir. Bulgular arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0.05$).

Poloksamer 188'in sabit olduğu, Pitavastatin ile PLGA oranının değişken tutulduğu formülasyonlar da in-vitro etkin madde açığa çıkış hızı açısından incelenmiştir. Şekil 3.7'ye göre, F1 kodlu formülasyonda 1. saatin sonunda açığa çıkan etkin madde miktarı %50 değerinin üzerine çıkmasına karşın, sırasıyla etkin madde/polimer oranı 1:10 ve 1:15 olan F4 ve F7 formülasyonlarında benzer durum gözlenmemiştir. F4 ve F7 kodlu formülasyonlarda 168. saatin sonunda açığa çıkan etkin madde miktarı %10'un altında kalmıştır. Elde edilen verilere

göre, istatistiksel olarak F1'in F4 ve F7 den farklı olduğu ($p<0.05$), F4 ve F7'nin ise birbirleriyle istatistiksel açıdan farklı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$).

Poloksamer 188 oranı %2 olan ve sırasıyla etkin madde/polimer oranı 1:5, 1:10 ve 1:15 olan F2, F5 ve F8 kodlu formülasyonlara ait in-vitro etkin madde açığa çıkış hızı profilleri şekil 3.8'de yer almaktadır. F2 kodlu formülasyonda 2. saatin sonunda açığa çıkan etkin madde miktarı %50 değerinin üzerine ulaşırken, PLGA miktarının artırıldığı F5 ve F8 kodlu formülasyonlarda benzer durum gözlenmemiştir. F5 ve F8 kodlu formülasyonlarda 168. saatin sonunda açığa çıkan etkin madde miktarı %10'un altında kalmıştır. Elde edilen verilere göre, istatistiksel olarak F2'nin F5 ve F8 den farklı olduğu ($p<0.05$), F5 ve F8'in ise birbirleriyle istatistiksel açıdan farklı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$).

Poloksamer 188 oranı %3 olan ve sırasıyla etkin madde/polimer oranı 1:5, 1:10 ve 1:15 olan F3, F6 ve F9 kodlu formülasyonlara ait in-vitro etkin madde açığa çıkış hızı profilleri şekil 3.9'da yer almaktadır. F3 kodlu formülasyonda 50. saatin sonuna kadar etkin madde açığa çıkmamasına karşın 168. saatin sonunda diğer iki formülasyona göre açığa çıkan etkin madde miktarı daha yüksek olmuştur. Elde edilen verilere göre, istatistiksel olarak F3'ün F6 ve F9 dan farklı olduğu ($p<0.05$), F6 ve F9 arasındaki farkın ise istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$). PLGA miktarının artışı partikül büyüklüğünde artışa neden olmakla beraber etkin maddenin açığa çıkış miktarında da azalmalara neden olmuştur. Nanopartiküllerin partikül büyüklüklerinin artmasına bağlı olarak partiküllerin sahip oldukları yüzey alanlarının azalmasından dolayı birim zamanda açığa çıkan etkin madde miktarları azalmış ve partikül büyüklüğü daha büyük olan nanopartiküllerden daha yavaş bir etkin madde salınımı gözleendiği belirlenmiştir (Şengel-Türk, 2009).

PVA ile hazırlanan formülasyonlar in-vitro etkin madde açığa çıkış hızı profilleri açısından incelenmiştir. Şekil 3.10, Şekil 3.11 ve Şekil 3.12'de yer alan formülasyonlarda Pitavastatin ile PLGA oranı sabit tutulurken, PVA miktarı değişken tutulmuştur. %1 oranında PVA içeren F10, %2 oranında PVA içeren F11 ve %3 oranında PVA içeren F12 kodlu formülasyonlara ait in-vitro etkin madde açığa çıkış hızı profilleri şekil 3.10'da yer almaktadır. Şekil 3.10'a göre, %3 oranında PVA içeren F12 kodlu formülasyonda 1. saatin sonuna gelindiğinde açığa çıkan etkin madde miktarı %70 değerine ulaşmıştır. 168. saatin sonunda ise 3 formülasyonda da %80'in üzerinde etkin madde salınımı gerçekleşmiştir ($p<0.05$).

F13, F14 ve F15 kodlu formülasyonlara ait in-vitro etkin madde açığa çıkış hızı profilleri şekil 3.11'de yer almaktadır. Şekil 3.11'e göre, %1 oranında PVA içeren F13 kodlu formülasyon 1. saat itibariyle salınımına başlarken, %2 oranında PVA içeren F14 ve %3 oranında PVA içeren F15 kodlu formülasyonlar ise 2. saat itibari ile salınımına başlamıştır. F13 ve F14 kodlu formülasyonlarda açığa çıkan etkin madde miktarları yaklaşık olarak %100 değerine ulaşırken, F15 kodlu formülasyonda açığa çıkan etkin madde miktarı %60 değerinin altında kalmıştır ($p<0.05$).

F16, F17 ve F18 kodlu formülasyonlara ait in-vitro etkin madde açığa çıkış hızı profilleri şekil 3.12'de yer almaktadır. Şekil 3.12'ye göre, %1 oranında PVA içeren F16 kodlu formülasyon anında salınımına başlarken, %2 oranında PVA içeren F17 kodlu formülasyon 1. saat itibariyle ve %3 oranında PVA içeren F18 kodlu formülasyon 4. saat itibariyle salınımına başlamıştır. 168. saatin sonunda F16 ve F17 kodlu formülasyonlarda etkin madde açığa çıkış miktarı yaklaşık olarak %40 değerine ulaşırken, F18 kodlu formülasyonda ise %10 değerinin altında kalmıştır ($p<0.05$).

PVA'nın sabit olduğu Pitavastatin ile PLGA oranının değişken tutulduğu formülasyonlara ait in-vitro etkin madde açığa çıkış hızı profilleri şekil 3.13, şekil 3.14 ve şekil 3.15'de yer almaktadır. Şekil 3.13'e göre F10 ve F16 kodlu formülasyonlar anında salınımına başlarken, F13 kodlu formülasyon 1. saat itibariyle salınımına başlamıştır. F13 kodlu formülasyon geç salınımına başlamasına karşın, 168. saatin sonunda %100'e yakın etkin madde salınımı gerçekleştirerek bu formülasyonlar arasında en yüksek değere ulaşan formülasyon olmuştur ($p<0.05$).

PVA oranı %2 olan ve sırasıyla etkin madde/polimer oranı 1:5, 1:10 ve 1:15 olan F11, F14 ve F17 kodlu formülasyonlara ait in-vitro etkin madde açığa çıkış hızı profilleri şekil 3.14'de yer almaktadır. Şekil 3.14'e göre, F14 kodlu formülasyon 2. saat itibariyle salınımına başlayarak en geç salınımına başlayan formülasyon olurken, 168. saatin sonunda en yüksek etkin madde açığa çıkan formülasyon olmuştur. F17 kodlu formülasyon ise en hızlı salınımına başlayan formülasyon olurken, 168. saatin sonunda en düşük etkin madde açığa çıkan formülasyon olmuştur ($p<0.05$).

PVA oranı %3 olan ve sırasıyla etkin madde/polimer oranı 1:5, 1:10 ve 1:15 olan F12, F15 ve F18 kodlu formülasyonlara ait in-vitro etkin madde açığa çıkış hızı profilleri şekil

3.15'de yer almaktadır Şekil 3.15'e göre, F12 kodlu formülasyon anında salınma başlarken, F15 kodlu formülasyon 2. saat itibariyle, F18 kodlu formülasyon ise 4. saat itibariyle salınma başlamıştır. 168. saatin sonunda F12 kodlu formülasyonda açığa çıkan etkin madde miktarı yaklaşık %70 iken, F15 ve F16 kodlu formülasyonlardan açığa çıkan etkin madde miktarı %60 değerinin altında kalmıştır ($p < 0.05$).

Tüm formülasyonlara ait in-vitro etkin madde açığa çıkış hızı grafikleri incelendiğinde, Pitavastatin ile PLGA oranının sabit olduğu Poloksamer 188'in değişken olduğu F4, F5, F6 ve F7, F8, F9 formülasyonlarının birbirleriyle istatistiksel olarak farklı olmadığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte bu formülasyonlarda açığa çıkan Pitavastatin miktarlarının diğer formülasyonlara bakarak daha düşük değerlerde kaldığı gözlemlenmiştir. Polimerik nanopartikül sistemlerden etkin maddenin salım hızını etkileyen parametrelerin ve özelliklerin başında; formülasyonda yer alan etkin madde ve polimerlerin fizikokimyasal özellikleri, nanopartiküllerin hazırlanması sırasında kullanılan organik çözücüler ve yüzey aktif maddeler ile nanopartiküllerin partikül büyüklüğü sayılabilir. Bu faktörlerden en etkin olan parametre ise nanopartikül sistemin partikül büyüklüğüdür. Parçacık boyutu küçüldükçe yüzey alanı/hacim oranı artar, bu da geniş bir yüzey alanıyla sonuçlanır. Bu durumda kapsüllenmiş terapötik maddenin daha yüksek in-vitro salınımıyla sonuçlanması beklenir (Şengel-Türk, 2009, Feczko vd. 2008). Bu doğrultuda, istatistiksel olarak farklı olmadığı tespit edilen formülasyonların partikül büyüklüklerinin diğer formülasyonlara kıyasla daha yüksek değerde olması, in-vitro salınımın daha düşük değerlerde kalmasının sebebi olarak değerlendirilmiştir.

Tez çalışmamızda nanopresipitasyon yöntemi ile elde edilen çeşitli nanopartikül formülasyonlar arasından enkapsülasyon etkinliği en yüksek, partikül büyüklüğü ve PDI en düşük değer olan F10 kodlu formülasyon, optimum gereklilikleri sağlamıştır. Bu doğrultuda DSC analizi, morfolojik inceleme, stabilite çalışmaları ve hücre kültürü çalışmaları F10 kodlu optimum formülasyon üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Optimum nanopartikül formülasyonunun çözünme hızı verileri kinetik açıdan değerlendirildiğinde en yüksek uyum, Higuchi kinetiğinde görülmüştür. Higuchi kinetiğine uyum, nanopartiküllerin matris yapısının göstergesidir.

Pitavastatin yüklü polimerik nanopartikül formülasyonlarının olası etkin madde ile yardımcı madde etkileşimlerinin saptanabilmesi ve etkin maddenin polimerik matris yapı

içerisindeki fiziksel yapısını tayin etmek için DSC analizi yapılmıştır. Şekil 3.16'da yer alan Pitavastatin yüklü (F10 kodlu formülasyon) ve yüklü olmayan optimum polimerik nanopartiküllere ait DSC termogramları ile Şekil 3.1'deki saf Pitavastatine ait DSC termogramı karşılaştırıldığında, saf Pitavastatine ait DSC termogramında bulunan piklerin şekil 3.16'da gözlenmediği tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda bu durumun sebebi Pitavastatinin nanopartiküllere enkapsüle edildiğinde kristal yapısının amorf yapıya dönüşmesindedir (Nagajyothi, 2013). Bunun yanı sıra PLGA polimerine ait camsı geçiş sıcaklığının (Tg) Pitavastatin yüklü olmayan nanopartikül yapıda 46,82°C'de olduğu, Pitavastatin yüklü nanopartikül yapıda ise 46,62°C'de olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan polimerik materyallere yönelik benzer sonuçlar yapılan çeşitli çalışmalarda da yer almaktadır (Saka vd., 2020 ve Şengel Türk, 2009).

Tez çalışmamız doğrultusunda optimum olarak belirlenen polimerik nanopartikül formülasyona (F10 kodlu formülasyon) ait morfolojik özelliklerin tespiti FESEM ile gerçekleştirilmiş olup mikrografları Şekil 3.17'de yer almaktadır. Mikrografların incelenmesi sonucunda Pitavastatin yüklü optimum nanopartiküle ait yapının küresel olduğu, dar bir partikül büyüklük dağılımı gösterdiği ve elde edilen partikül büyüklüğü dağılım değerini destekler nitelikte olduğu tespit edilmiştir.

Pitavastatin yüklü optimum polimerik nanopartikül formülasyonunun (F10 numaralı formülasyon) 4°C sıcaklık değerindeki 6 aylık stabilite verileri Çizelge 3.11'de yer almaktadır. Yapılan incelemeler sonucunda, optimum nanopartiküle ait partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı, enkapsülasyon etkinliği ve zeta potansiyel değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik ile karşılaşmamıştır ($p>0.05$). Bu sonuçlar doğrultusunda belirlenen saklama koşullarının optimum nanopartikül için uygun olduğu ve stabilitesi açısından bir problemin söz konusu olmadığı tespit edilmiştir.

Optimum nanopartikül formülasyonunun PC-3 hücrelerinde antikanser etkinliğine ait veriler Şekil 3.18 ve 3.19'da yer almaktadır. Belirlenen optimum nanopartikül formülasyonunun 0.5, 1, 2.5, 5 ve 10 μ M konsantrasyonda PC-3 prostat kanseri hücre hattına uygulanmasıyla hücre canlılığı düzeyleri sırasıyla %96.5, %89.4, %67.7, %47.9 ve %39.8 olarak belirlenmiştir. Aynı konsantrasyonlarda saf Pitavastatin uygulanan hücrelerde ise canlılık sırasıyla %85.8, %86.3, %95.4, %96.2 ve %68.0 olarak tespit edilmiştir ($p<0.01$). İnkübasyon süresi 48 saat olarak uygulandığında ise nanopartikül grubunda hücre canlılığı sırasıyla %90.1, %88.9, %66.6,

%28.8 ve %13.9 olarak tespit edilmiştir. Saf Pitavastatin uygulanan hücrelerde hücre canlılığı sırasıyla %130.1, %123.0, %90.2, %65.1 ve %42.9 olarak belirlenmiştir ($p<0.01$). Pitavastatin içermeyen nanopartikül formülasyonunun PC-3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinliği incelendiğinde, 24 saat süresince 0.5, 1, 2.5, 5 ve 10 μM konsantrasyon uygulanan hücrelerde canlılık oranları sırasıyla %104.9, %104.3, %106.5, %106.7 ve %85.6 iken ($p<0.01$), 48 saat inkübasyon sonunda sırasıyla %105.9, %129.1, %133.2, %132.4 ve %107.3 olarak tespit edilmiştir ($p<0.05$). Saf Pitavastatin uygulanan hücrelerde kontrol grubuna göre Pitavastatinin artan konsantrasyonuna bağlı olarak nükleer hasarın arttığı ve hücrelerde erken apoptotik ölümün gözlemlendiği belirlenmiştir. Ayrıca hücre-hücre bağlantılarında kopmaların olduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan 5 ve 10 μM konsantrasyonda nanopartikül formülasyonu uygulandığında ise PC-3 hücrelerinde kontrol grubuna göre belirgin nükleer hasar ve kromatin yoğunlaşmaları gözlemlenmiştir. Özellikle 10 μM konsantrasyonda optimum nanopartikül uygulanan prostat kanseri hücrelerinde bazı vakuoler yapılar ve geç apoptotik hücre ölümünün daha fazla olduğu belirlenmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında çeşitli kanser türleri üzerinde kemopreventif etkinliği kanıtlanmış bir statin grubu etkin madde olan Pitavastatin molekülünün polimerik nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerinin geliştirilmesi ve PC-3 prostat kanseri hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkinliğinin tayin edilmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda hazırlanan polimerik nanopartikül formülasyonlarının in-vitro özelliklerinin belirlenmesi amacıyla; enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı, yüzey yükü, etkin madde-yardımcı madde etkileşimi, morfolojik özellikleri ve in-vitro etkin madde açığa çıkış tayinleri gerçekleştirilmiştir. Tespit edilen optimum nanopartikül ile PC-3 prostat kanseri hücre hattında antiproliferatif etkinlik tayin edilmiştir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda elde edilen sonuçlar aşağıda yer almaktadır.

- Hazırlanan formülasyonlarda Pitavastatin/PLGA oranı, Poloksamer 188 ya da PVA miktarları değişken olarak kullanılmıştır. Bu değişkenler ile oluşturan 18 formülasyona ait partikül büyüklükleri 76 ile 318 nm aralığında ve PDI değerleri 0,061 ile 0,292 değerleri aralığında yer almıştır. PLGA, Poloksamer 188 ya da PVA miktarının artması nanopartiküllerin partikül büyüklükleri üzerinde bir artışa sebep olmuştur. Bunun yanı sıra partikül büyüklüğü dağılımı tüm formülasyonlar için 0,3 değerinden küçük tayin edilmiş olup homojen bir partikül büyüklüğü dağılımını tanımlamaktadır.
- Hazırlanan formülasyonlar arasında PVA ile hazırlanan formülasyonların Poloksamer 188 ile hazırlanan formülasyonlara göre enkapsülasyon etkinliğinin daha yüksek olduğu ve PVA miktarındaki artışın, nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliğini azalttığı tespit edilmiştir. Pitavastatin yüklü polimerik nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinlikleri %64,26 ile %28,15 aralığında belirlenmiştir.
- Hazırlanan formülasyonlarda kullanılan Poloksamer 188 ve PVA'nın zeta potansiyeline olan etkisi incelendiğinde, Poloksamer 188 miktarı arttıkça nanopartiküllerin zeta potansiyel değeri azalırken, PVA miktarı arttıkça nanopartiküllerin zeta potansiyel değeri artmıştır.
- Hazırlanan formülasyonlarda PLGA miktarı arttırıldığında, Poloksamer 188 kullanılan formülasyonlarda zeta potansiyel değerlerinin azaldığı, PVA kullanılan formülasyonlarda ise zeta potansiyel değerlerinin arttığı tespit edilmiştir.
- Hazırlanan formülasyonlara ait in-vitro etkin madde açığa çıkış hızı grafikleri incelendiğinde, F4, F5, F6 ve F7, F8, F9 formülasyonların birbirleriyle istatistiksel olarak farklı olmadığı, diğer karşılaştırmaları yapılan formülasyonların ise birbirleriyle istatistiksel olarak anlamlı farklılıklara sahip olduğu bulunmuştur. İstatistiksel olarak

farklı olmadığı tespit edilen formülasyonlarda açığa çıkan etkin madde miktarı düşüktür. Bu durumun özellikle bu formülasyonların partikül büyüklüklerinin diğer formülasyonlara kıyasla daha yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

- Pitavastatin yüklü optimum polimerik nanopartikül formülasyonun 4°C sıcaklıkta altı ay boyunca gerçekleştirilen stabilite çalışmaları sonucunda final ürün özelliklerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılığa rastlanılmamıştır. Bu durum, 4°C sıcaklık değerinin, liyofilize formdaki nanopartiküllerin saklanması için uygun bir ortam koşulu olduğunu göstermiştir.
- Geliştirilen optimum nanopartikül formülasyonunun saf Pitavastatin'e göre PC-3 hücrelerinde daha fazla antiproliferatif etkiye sahip olduğu ve Pitavastatin içermeyen nanopartikül formülasyonunun PC-3 hücrelerinde herhangi bir sitotoksik etkisinin bulunmadığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, Akridin oranj/Propidyum İyodür boyaması sonucunda elde edilen görüntüler optimum nanopartikül formülasyonunun PC-3 hücrelerinde daha fazla hasara ve özellikle yüksek konsantrasyonlarda hücrelerde belirgin geç apoptotik ölüme neden olduğunu göstermiştir.

Tez çalışmamızdan elde edilen sonuçlardan yola çıkarak, aşağıda belirtilen öneriler verilebilir.

- Nanopresipitasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan Pitavastatin yüklü nanopartikül formülasyonlarından elde edilen veriler bu çalışmaya özgü olmasına rağmen Pitavastatin etkin maddesine benzer fizikokimyasal özelliklere sahip moleküller için formülasyon geliştirme çalışmalarında çalışmamız yol gösterici olarak kullanılabilir.
- Pitavastatin, primer hiperlipidemi veya karışık dislipidemili yetişkin hastaların tedavisinde FDA tarafından onaylı bir molekül olup ticari preparatları oral yolla kullanılmaktadır. Yaptığımız çalışma ile hazırladığımız nanopartikül formülasyonların ise parenteral yolla (intavenöz) kullanımı (Pasif hedeflendirme mekanizması ile) hedeflenmiştir. Bu doğrultuda, Pitavastatin molekülünün alternatif bir uygulama yolu olarak parenteral kullanımının değerlendirilebileceği önerilmektedir.
- Kemopreventif etkinliği kanıtlanmış bir statin grubu etkin madde olan Pitavastatin molekülünün insan PC3 prostat kanseri hücreleri üzerindeki etkinliğinin ve etki mekanizmasının tayin edilmesi ilk defa bu çalışmada gerçekleştirilmiştir. Gerekli koşulların sağlanması ile gerçekleştirilecek klinik çalışmalar ile çalışmamızdan elde edilen optimum nanopartikül formülasyonun prostat kanseri tedavisinde kullanılan diğer ilaçlara alternatif yeni bir ürün olarak değerlendirilebileceği önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Aliwaini, S., El-Bashiti, T., & Mortaja, K. (2020). Pitavastatin Enhances Doxorubicin-induced Apoptosis in MCF7 Breast Cancer Cells. *Jordan Journal of Biological Sciences*.
- Amasya, G. (2014). Deri kanserlerinin tedavisinde uygulanmak üzere 5-florourasil içeren lipid nanopartiküllerin tasarımıyla kalite çalışmaları ve değerlendirilmeleri.
- Andrews, J., Djakiew, D., Krygier, S., & Andrews, P. (2002). Superior effectiveness of ibuprofen compared with other NSAIDs for reducing the survival of human prostate cancer cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 50, 277-284.
- ASCO, Amerika Klinik Onkoloji Derneği. 'Prostate Cancer'. [<https://www.asco.org/>] Erişim: 25/06/2023.
- Avgoustakis, K., Beletsi, A., Panagi, Z., Klepetsanis, P., Karydas, A., & Ithakissios, D. (2002). PLGA–mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. *Journal of controlled release*, 79(1-3), 123-135.
- Banerjee, R., Tyagi, P., Li, S., & Huang, L. (2004). Anisamide-targeted stealth liposomes: a potent carrier for targeting doxorubicin to human prostate cancer cells. *International journal of cancer*, 112(4), 693-700.
- Barani, M., Sabir, F., Rahdar, A., Arshad, R., & Kyzas, G. Z. (2020). Nanotreatment and nanodiagnosis of prostate cancer: recent updates. *Nanomaterials*, 10(9), 1696.
- Başpınar, Y., Gündoğdu, E., Köksal, Ç., & Karasulu, E. (2015). Pitavastatin-containing nanoemulsions: Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 29, 117-124.
- Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 154-165.
- Bilati, U., Allémann, E., & Doelker, E. (2005). Nanoprecipitation versus emulsion-based techniques for the encapsulation of proteins into biodegradable nanoparticles and process-related stability issues. *Aaps Pharmscitech*, 6, E594-E604.
- Borley, N., & Feneley, M. R. (2009). Prostate cancer: diagnosis and staging. *Asian journal of andrology*, 11(1), 74.

- Bostwick, D. G., Burke, H. B., Djakiew, D., Euling, S., Ho, S.-m., Landolph, J., Morrison, H., Sonawane, B., Shifflett, T., Waters, D. J., & Timms, B. (2004). Human prostate cancer risk factors. *Cancer*, *101*(S10), 2371-2490. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cncr.20408>
- Breuhahn, K., Gores, G., & Schirmacher, P. (2011). Strategies for hepatocellular carcinoma therapy and diagnostics: lessons learned from high throughput and profiling approaches. *Hepatology*, *53*(6), 2112-2121.
- Clogston, J. D., & Patri, A. K. (2011). Zeta potential measurement. Characterization of nanoparticles intended for drug delivery, 63-70.
- Crucho, C. I., & Barros, M. T. (2017). Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science and Engineering: C*, *80*, 771-784.
- Dadashzadeh, S., Derakhshandeh, K., & Shirazi, F. H. (2008). 9-nitrocamptothecin polymeric nanoparticles: cytotoxicity and pharmacokinetic studies of lactone and total forms of drug in rats. *Anti-cancer drugs*, *19*(8), 805-811.
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, *10*(2), 57.
- de Francisco, L. M. B., Rosseto, H. C., de Toledo, L. d. A. S., dos Santos, R. S., de Souza Ferreira, S. B., & Bruschi, M. L. (2019). Organogel composed of poloxamer 188 and passion fruit oil: Sol-gel transition, rheology, and mechanical properties. *Journal of Molecular Liquids*, *289*, 111170.
- de Sousa Marcial, S. P., Carneiro, G., & Leite, E. A. (2017). Lipid-based nanoparticles as drug delivery system for paclitaxel in breast cancer treatment. *Journal of Nanoparticle Research*, *19*, 1-11.
- de Wolf, E., Abdullah, M. I., Jones, S. M., Menezes, K., Moss, D. M., Drijfhout, F. P., Hart, S. R., Hoskins, C., Stronach, E. A., & Richardson, A. (2017). Dietary geranylgeraniol can limit the activity of pitavastatin as a potential treatment for drug-resistant ovarian cancer. *Scientific reports*, *7*(1), 1-10.
- Demierre, M.-F., Higgins, P. D., Gruber, S. B., Hawk, E., & Lippman, S. M. (2005). Statins and cancer prevention. *Nature Reviews Cancer*, *5*(12), 930-942.
- Dinarvand, R., Sepehri, N., Manoochehri, S., Rouhani, H., & Atyabi, F. (2011). Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *International journal of nanomedicine*, 877-895.

- DSÖ, Dünya Sağlık Örgütü. 'Prostate Cancer'. [www.who.int]. Erişim: 30/12/2022.
- Duan, Y., Dhar, A., Patel, C., Khimani, M., Neogi, S., Sharma, P., Kumar, N. S., & Vekariya, R. L. (2020). A brief review on solid lipid nanoparticles: Part and parcel of contemporary drug delivery systems. *RSC advances*, *10*(45), 26777-26791.
- El-Habashy, S. E., Allam, A. N., & El-Kamel, A. H. (2016). Ethyl cellulose nanoparticles as a platform to decrease ulcerogenic potential of piroxicam: formulation and in vitro/in vivo evaluation. *International journal of nanomedicine*, 2369-2380.
- Eldeeb, A. E., Salah, S., Mabrouk, M., Amer, M. S., & Elkasabgy, N. A. (2022). Dual-drug delivery via zein in situ forming implants augmented with titanium-doped bioactive glass for bone regeneration: preparation, in vitro characterization, and in vivo evaluation. *Pharmaceutics*, *14*(2), 274.
- Esim, O., Bakirhan, N. K., Sarper, M., Savaser, A., Ozkan, S. A., & Ozkan, Y. (2020). Influence of emulsifiers on the formation and in vitro anticancer activity of epirubicin loaded PLGA nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *60*, 102027.
- Famuyiwa, T. O., & Kumi-Diaka, J. K. (2018). Nanoparticle (NP) delivery of chemotherapy drugs to prostate cancer patients. *J Cancer Prev Curr Res*, *9*(5), 218-220.
- Farina, N. H., Zingiryan, A., Vrolijk, M. A., Perrapato, S. D., Ades, S., Stein, G. S., Lian, J. B., & Landry, C. C. (2018). Nanoparticle - based targeted cancer strategies for non - invasive prostate cancer intervention. *Journal of cellular physiology*, *233*(9), 6408-6417.
- Feczko, T., Tóth, J., & Gyenis, J. (2008). Comparison of the preparation of PLGA-BSA nano- and microparticles by PVA, poloxamer and PVP. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *319*(1-3), 188-195.
- Felimban, R. I., Tayeb, H. H., Chaudhary, A. G., Felemban, M. A., Alnadwi, F. H., Ali, S. A., Alblowi, J. A., ALfayez, E., Bukhary, D., & Alissa, M. (2023). Utilization of a nanostructured lipid carrier encapsulating pitavastatin-Pinus densiflora oil for enhancing cytotoxicity against the gingival carcinoma HGF-1 cell line. *Drug Delivery*, *30*(1), 83-96.
- Fuster, M. G., Carissimi, G., Montalbán, M. G., & Villora, G. (2021). Antitumor activity of rosmarinic acid-loaded silk fibroin nanoparticles on HeLa and MCF-7 cells. *Polymers*, *13*(18), 3169.

- Gagliardi, A., Giuliano, E., Venkateswararao, E., Fresta, M., Bulotta, S., Awasthi, V., & Cosco, D. (2021). Biodegradable polymeric nanoparticles for drug delivery to solid tumors. *Frontiers in Pharmacology*, *12*, 601626.
- Gleason, D. F., & Mellinger, G. T. (1974). Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *The Journal of urology*, *111*(1), 58-64.
- Goyal, R., & Kumar, S. (2014). Nanotechnology: A novel approach towards cancer treatment. *Journal of Innovative Biology June*, *1*(2), 084-096.
- Grönberg, H. (2003). Prostate cancer epidemiology. *The Lancet*, *361*(9360), 859-864.
- Gryparis, E. C., Hatzia Apostolou, M., Papadimitriou, E., & Avgoustakis, K. (2007). Anticancer activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles on LNCaP prostate cancer cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *67*(1), 1-8.
- Gu, C., Li, C., Zhang, J., Li, X., Wang, L., Ju, Y., Liu, Y., & Xu, Y. (2020). Ultra-effective near-infrared Photothermal therapy for the prostate cancer Nursing care through novel intended and surface tailored photo-responsive Ga-Au@ MPS nanovesicles. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *202*, 111685.
- Gumustas, M., Sengel - Turk, C. T., Hascicek, C., & Ozkan, S. A. (2014). Optimization of a validated stability - indicating RP - LC method for the determination of fulvestrant from polymeric based nanoparticle systems, drugs and biological samples. *Biomedical Chromatography*, *28*(10), 1409-1417.
- Hans, M. L., & Lowman, A. M. (2002). Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, *6*(4), 319-327.
- Hasçıçek, C., Sengel-Turk, C., Gumustas, M., Ozkan, A., Bakar, F., Das-Evcimen, N., Savaser, A., & Ozkan, Y. (2017). Fulvestrant-loaded polymer-based nanoparticles for local drug delivery: Preparation and in vitro characterization. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *40*, 73-82.
- IARC, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı. 'Prostate Cancer'. [<https://www.iarc.who.int/>] Erişim: 25/06/2023.
- Inamura, K. (2018). Prostatic cancers: understanding their molecular pathology and the 2016 WHO classification. *Oncotarget*, *9*(18), 14723.

- Jain, A. K., Swarnakar, N. K., Godugu, C., Singh, R. P., & Jain, S. (2011). The effect of the oral administration of polymeric nanoparticles on the efficacy and toxicity of tamoxifen. *Biomaterials*, *32*(2), 503-515.
- Jeong, C.-H., Tiliya Pun, N., Lee, N., & Song, S.-H. (2022). Pitavastatin induces cancer cell apoptosis by blocking autophagy flux. *Frontiers in Pharmacology*, 841.
- Kadian, R. (2018). Nanoparticles: A promising drug delivery approach. *Asian J Pharm Clin Res*, *11*(1), 30-35.
- Kara, A., Ozturk, N., Sarisozen, C., & Vural, I. (2014). Investigation of formulation parameters of plga nanoparticles prepared by nanoprecipitation technique. Proceedings of the 5th International Conference on Nanotechnology: Fundamentals and Application, Prague, Czech Republic,
- Kajinami, K., Takekoshi, N., & Saito, Y. (2003). Pitavastatin: efficacy and safety profiles of a novel synthetic HMG - CoA reductase inhibitor. *Cardiovascular drug reviews*, *21*(3), 199-215.
- Kharouba, M., El-Kamel, A., Mehanna, R., Thabet, E., & Heikal, L. (2022). Pitavastatin-loaded bilosomes for oral treatment of hepatocellular carcinoma: A repurposing approach. *Drug Delivery*, *29*(1), 2925-2944.
- Khuroo, T., Verma, D., Talegaonkar, S., Padhi, S., Panda, A. K., & Iqbal, Z. (2014). Topotecan-tamoxifen duple PLGA polymeric nanoparticles: investigation of in vitro, in vivo and cellular uptake potential. *International Journal of Pharmaceutics*, *473*(1-2), 384-394.
- Kingsley, J. D., Dou, H., Morehead, J., Rabinow, B., Gendelman, H. E., & Destache, C. J. (2006). Nanotechnology: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, *1*(3), 340-350.
- Koerner, J., Horvath, D., & Groettrup, M. (2019). Harnessing dendritic cells for poly (D, L-lactide-co-glycolide) microspheres (PLGA MS)—mediated anti-tumor therapy. *Frontiers in immunology*, *10*, 707.
- Krishnamoorthy, K., & Mahalingam, M. (2015). Selection of a suitable method for the preparation of polymeric nanoparticles: multi-criteria decision making approach. *Advanced pharmaceutical bulletin*, *5*(1), 57-67.
- Kumar, S. N., & Baghyalakshmi, J. (2007). Determination and quantification of pitavastatin calcium in tablet dosage formulation by HPTLC method. *Analytical letters*, *40*(14), 2625-2632.

- Kuncahyo, I., Choiri, S., Fudholi, A., Martien, R., & Rohman, A. (2023). Development of pitavastatin-loaded super-saturable self-nano emulsion: A continuous screening and optimization approach using statistical technique. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 44(4), 608-617.
- Kuoppala, J., Lamminpää, A., & Pukkala, E. (2008). Statins and cancer: a systematic review and meta-analysis. *European journal of cancer*, 44(15), 2122-2132.
- Leitzmann, M. F., & Rohrmann, S. (2012). Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. *Clinical epidemiology*, 4(1), 1-11.
- Liu, H., Bao, P., Li, L., Wang, Y., Xu, C., Deng, M., Zhang, J., & Zhao, X. (2017). Pitavastatin nanoparticle-engineered endothelial progenitor cells repair injured vessels. *Scientific reports*, 7(1), 18067.
- López-García, R., & Ganem-Rondero, A. (2015). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): occlusive effect and penetration enhancement ability. *Journal of cosmetics, dermatological sciences and applications*, 5(02), 62.
- Lü, J.-M., Wang, X., Marin-Muller, C., Wang, H., Lin, P. H., Yao, Q., & Chen, C. (2009). Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert review of molecular diagnostics*, 9(4), 325-341.
- Madani, F., Goodarzi, A., Hashemi, M., Mujokoro, B., Khosravani, M., & Adabi, M. (2018). Preparation of Methotrexate loaded PLGA nanoparticles coated with PVA and Poloxamer188. *Nanomedicine Research Journal*, 3(1), 19-24.
- Matuszewicz, L., Meissner, J., Toporkiewicz, M., & Sikorski, A. F. (2015). The effect of statins on cancer cells. *Tumor Biology*, 36, 4889-4904.
- Meng, X., Zhong, J., Liu, S., Murray, M., & Gonzalez-Angulo, A. M. (2012). A new hypothesis for the cancer mechanism. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(1), 247-268.
- Mudshinge, S. R., Deore, A. B., Patil, S., & Bhalgat, C. M. (2011). Nanoparticles: emerging carriers for drug delivery. *Saudi pharmaceutical journal*, 19(3), 129-141.
- Mukerjee, A., & Vishwanatha, J. K. (2009). Formulation, characterization and evaluation of curcumin-loaded PLGA nanospheres for cancer therapy. *Anticancer research*, 29(10), 3867-3875.
- Mukhtar, R., Reid, J., & Reckless, J. (2005). Pitavastatin. *International journal of clinical practice*, 59(2), 239-252.

- Nagajyothi, N. (2013). Formulation and evaluation of pitavastatin nanosuspension Swamy Vivekanandha College of Pharmacy, Tiruchengode].
- Nielsen, S. F., Nordestgaard, B. G., & Bojesen, S. E. (2012). Statin use and reduced cancer-related mortality. *New England Journal of Medicine*, 367(19), 1792-1802.
- NIH, National Cancer Institute. 'Prostate Cancer - Cancer Stat Facts' [https://seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html]. Erişim: 25.06.2023.
- Nogueira, D. R., Tavano, L., Mitjans, M., Pérez, L., Infante, M. R., & Vinardell, M. P. (2013). In vitro antitumor activity of methotrexate via pH-sensitive chitosan nanoparticles. *Biomaterials*, 34(11), 2758-2772.
- Öğünç, Y., Demirel, M., Yakar, A., & İncesu, Z. (2017). Vincristine and ε-viniferine-loaded PLGA-b-PEG nanoparticles: pharmaceutical characteristics, cellular uptake and cytotoxicity. *Journal of Microencapsulation*, 34(1), 38-46.
- Panchal, H. J., Suhagia, B. N., Patel, M. M., & Patel, B. H. (2009). Estimation of pitavastatin calcium in tablet dosage forms by column liquid chromatography and ultraviolet spectrophotometry. *Journal of AOAC International*, 92(1), 158-164.
- Prabhu, R. H., Patravale, V. B., & Joshi, M. D. (2015). Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights. *International journal of nanomedicine*, 1001-1018.
- Ram Prasad, R. P., Rishikesh Pandey, R. P., Ajit Varma, A. V., & Ishan Barman, I. B. (2017). Polymer-based nanoparticles for drug delivery systems and cancer therapeutics. In *Natural polymers for drug delivery* (pp. 53-70). CABI Wallingford UK.
- Ramani, V. D., Jani, G. K., Sen, A. K., Sailor, G. U., & Sutariya, V. B. (2019). Development and validation of RP-HPLC method for pitavastatin calcium in bulk and formulation using experimental design. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 9(10), 075-083.
- Rao, J. P., & Geckeler, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in polymer science*, 36(7), 887-913.
- Reis, C. P., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., & Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2(1), 8-21.

- Rivas, C. J. M., Tarhini, M., Badri, W., Miladi, K., Greige-Gerges, H., Nazari, Q. A., Rodríguez, S. A. G., Román, R. Á., Fessi, H., & Elaissari, A. (2017). Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 532(1), 66-81.
- Rivera-Hernandez, G., Antunes-Ricardo, M., Martínez-Morales, P., & Sanchez, M. L. (2021). Polyvinyl alcohol based-drug delivery systems for cancer treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, 600, 120478.
- Saadati, R., & Dadashzadeh, S. (2014). Marked effects of combined TPGS and PVA emulsifiers in the fabrication of etoposide-loaded PLGA-PEG nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 464(1-2), 135-144.
- Sahoo, S. K., Panyam, J., Prabha, S., & Labhasetwar, V. (2002). Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *Journal of controlled release*, 82(1), 105-114.
- Saka, O. M., Öz, U. C., Küçükürkmen, B., Devrim, B., & Bozkır, A. (2020). Central composite design for optimization of zoledronic acid loaded PLGA nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 15, 3-14.
- Salatin, S., Barar, J., Barzegar-Jalali, M., Adibkia, K., Kiafar, F., & Jelvehgari, M. (2017). Development of a nanoprecipitation method for the entrapment of a very water soluble drug into Eudragit RL nanoparticles. *Research in pharmaceutical sciences*, 12(1), 1.
- Sánchez-Moreno, P., Ortega-Vinuesa, J. L., Martín-Rodríguez, A., Boulaiz, H., Marchal-Corrales, J. A., & Peula-García, J. M. (2012). Characterization of different functionalized lipidic nanocapsules as potential drug carriers. *International journal of molecular sciences*, 13(2), 2405-2424.
- Sanna, V., Roggio, A. M., Posadino, A. M., Cossu, A., Marceddu, S., Mariani, A., Alzari, V., Uzzau, S., Pintus, G., & Sechi, M. (2011). Novel docetaxel-loaded nanoparticles based on poly (lactide-co-caprolactone) and poly (lactide-co-glycolide-co-caprolactone) for prostate cancer treatment: formulation, characterization, and cytotoxicity studies. *Nanoscale research letters*, 6(1), 1-9.
- Saxena, V., Naguib, Y., & Hussain, M. D. (2012). Folate receptor targeted 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) loaded polymeric nanoparticles for breast cancer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 94, 274-280.
- Senel, Ş., Bilensoy, E., (2014). *Nanofarmasötikler ve Uygulamaları*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 9-35

- Sengel-Turk, C., Hascicek, C., Dogan, A., Esendagli, G., Guc, D., & Gonul, N. (2014). Surface modification and evaluation of PLGA nanoparticles: the effects on cellular uptake and cell proliferation on the HT-29 cell line. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 24(2), 166-172.
- Sengel-Turk, C. T., Hascicek, C., Bakar, F., & Simsek, E. (2017). Comparative evaluation of nimesulide-loaded nanoparticles for anticancer activity against breast cancer cells. *Aaps Pharmscitech*, 18, 393-403.
- Sengel-Turk, C. T., Ozkan, E., & Bakar-Ates, F. (2022). Box-Behnken design optimization and in vitro cell based evaluation of piroxicam loaded core-shell type hybrid nanocarriers for prostate cancer. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 216, 114799.
- Sengel-Turk, C. T., Ozmen, N., & Bakar-Ates, F. (2021). Design, characterization and evaluation of cucurbitacin B-loaded core-shell-type hybrid nano-sized particles using DoE approach. *Polymer Bulletin*, 78, 3327-3351.
- Sepehri, N., Rouhani, H., Tavassolian, F., Montazeri, H., Khoshayand, M. R., Ghahremani, M. H., Ostad, S. N., Atyabi, F., & Dinarvand, R. (2014). SN38 polymeric nanoparticles: in vitro cytotoxicity and in vivo antitumor efficacy in xenograft balb/c model with breast cancer versus irinotecan. *International Journal of Pharmaceutics*, 471(1-2), 485-497.
- Sharma, A., Goyal, A. K., & Rath, G. (2018). Recent advances in metal nanoparticles in cancer therapy. *Journal of drug targeting*, 26(8), 617-632.
- Sharma, S., Parmar, A., Kori, S., & Sandhir, R. (2016). PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical applications. *TrAC trends in analytical chemistry*, 80, 30-40.
- Sifaoui, I., Díaz-Rodríguez, P., Rodríguez-Expósito, R. L., Reyes-Batlle, M., Lopez-Arencibia, A., Villatoro, L. S., Castelan-Ramírez, I., Omaña-Molina, M., Oliva, A., & Piñero, J. E. (2022). Pitavastatin loaded nanoparticles: a suitable ophthalmic treatment for Acanthamoeba Keratitis inducing cell death and autophagy in Acanthamoeba polyphaga. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.
- Singh, R., & Lillard Jr, J. W. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and molecular pathology*, 86(3), 215-223.
- Strykowska-Góra, A., Karczmarek-Borowska, B., Góra, T., & Krawczak, K. (2015). Statins and cancers. *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia*, 19(3), 167-175.

- Sun, Y., Chen, L., Zhao, S., Shi, L., Li, H., Tian, W., & Qi, G. (2020). Effects of nanoparticle-mediated delivery of pitavastatin on atherosclerotic plaques in ApoE - knockout mice and THP - 1 - derived macrophages. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 19(6), 3787-3797.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Sur, S., Rathore, A., Dave, V., Reddy, K. R., Chouhan, R. S., & Sadhu, V. (2019). Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery system. *Nano-Structures & Nano-Objects*, 20, 100397.
- Şengel Türk, C. T. (2009). Kolona hedeflendirilmek üzere nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ve değerlendirilmesi.
- Şengel-Türk, C. T., Hasçıçek, C., Dogan, A. L., Esendagli, G., Guc, D., & Gönül, N. (2012). Preparation and in vitro evaluation of meloxicam-loaded PLGA nanoparticles on HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Drug development and industrial pharmacy*, 38(9), 1107-1116.
- Tabatabaei Mirakabad, F. S., Nejati-Koshki, K., Akbarzadeh, A., Yamchi, M. R., Milani, M., Zarghami, N., Zeighamian, V., Rahimzadeh, A., Alimohammadi, S., & Hanifehpour, Y. (2014). PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(2), 517-535.
- Tan, Q., Liu, W., Guo, C., & Zhai, G. (2011). Preparation and evaluation of quercetin-loaded lecithin-chitosan nanoparticles for topical delivery. *International journal of nanomedicine*, 1621-1630.
- TANIK, F., & GÜRŞAN, İ. N. (2022). Kanserde Fiziksel Aktivite ve Egzersiz-Koruyucu ve Tedavi Edici Etki. *İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 7(1), 129-132.
- Tomasetti, C., Li, L., & Vogelstein, B. (2017). Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science*, 355(6331), 1330-1334. <https://doi.org/doi:10.1126/science.aaf9011>
- Tomlinson, B., Lin, T.-y., Dall'Era, M., & Pan, C.-X. (2015). Nanotechnology in bladder cancer: current state of development and clinical practice. *Nanomedicine*, 10(7), 1189-1201.

- Turk, C. T. S., Oz, U. C., Serim, T. M., & Hascicek, C. (2014). Formulation and optimization of nonionic surfactants emulsified nimesulide-loaded PLGA-based nanoparticles by design of experiments. *Aaps Pharmscitech*, *15*, 161-176.
- US20190256469A1-Crystalline Forms of Pitavastatin Calcium-Google Patent, [<https://patents.google.com/patent/US20190256469A1/en>]. Erişim: 23.12.2023
- Vauthier, C., & Bouchemal, K. (2009). Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharmaceutical research*, *26*, 1025-1058.
- Vilar, G., Tulla-Puche, J., & Albericio, F. (2012). Polymers and drug delivery systems. *Current drug delivery*, *9*(4), 367-394.
- Wang, Z., Ji, L., Ren, Y., Liu, M., Ai, X., & Yang, C. (2022). Preparation and anti-tumor study of dextran 70,000-selenium nanoparticles and poloxamer 188-selenium nanoparticles. *Aaps Pharmscitech*, *23*, 1-11.
- Wurm, F. R., & Weiss, C. K. (2014). Nanoparticles from renewable polymers. *Frontiers in chemistry*, *2*, 49.
- Yallapu, M. M., Gupta, B. K., Jaggi, M., & Chauhan, S. C. (2010). Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. *Journal of colloid and interface science*, *351*(1), 19-29.
- Yan, F., Zhang, C., Zheng, Y., Mei, L., Tang, L., Song, C., Sun, H., & Huang, L. (2010). The effect of poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *6*(1), 170-178.
- Yao, Y., Zhou, Y., Liu, L., Xu, Y., Chen, Q., Wang, Y., Wu, S., Deng, Y., Zhang, J., & Shao, A. (2020). Nanoparticle-based drug delivery in cancer therapy and its role in overcoming drug resistance. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *7*, 193.
- You, H.-Y., Zhang, W.-J., Xie, X.-M., Zheng, Z.-H., Zhu, H.-L., & Jiang, F.-Z. (2016). Pitavastatin suppressed liver cancer cells in vitro and in vivo. *OncoTargets and therapy*, *9*, 5383.
- Yousaf, R., Khan, M. I., Akhtar, M. F., Madni, A., Sohail, M. F., Saleem, A., Irshad, K., Sharif, A., & Rana, M. (2023). Development and in-vitro evaluation of chitosan and glyceryl monostearate based matrix lipid polymer hybrid nanoparticles (LPHNPs) for oral delivery of itraconazole. *Heliyon*, *9*(3).

- Zhang, B.-F., Xing, L., Qiao, J.-B., Cui, P.-F., Wang, F.-Z., Zhang, J.-L., Xu, C.-X., & Jiang, H.-L. (2016). In vivo synergistic antitumor effect and safety of siRNA and lonidamine dual-loaded hierarchical targeted nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 506(1-2), 207-213.
- Zhang, J., Wang, L., You, X., Xian, T., Wu, J., & Pang, J. (2019). Nanoparticle therapy for prostate cancer: overview and perspectives. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 19(1), 57-73.
- Zielińska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Venkatesh, D. N., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., & Silva, A. M. (2020). Polymeric nanoparticles: production, characterization, toxicology and ecotoxicology. *Molecules*, 25(16), 3731.