



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**KARACİĞER KANSERİ TEDAVİSİNE YÖNELİK AKTİF HEDEFLİ
NANOPARTİKÜL İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMİN HAZIRLANMASI, İN
VİTRO-İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

Doktora Tezi

Mine DİRİL

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

İzmir

2022

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**KARACİĞER KANSERİ TEDAVİSİNE YÖNELİK AKTİF HEDEFLİ
NANOPARTİKÜL İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMİN HAZIRLANMASI, İN
VİTRO-İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

Mine DİRİL

Danışman(lar)

PROF. DR. H. YEŞİM KARASULU

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Farmasötik Teknoloji Doktora Programı

İzmir

2022

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof.Dr. H.Yeşim KARASULU

(Danışman)

Üye : Prof.Dr. Özgen ÖZER

Üye : Prof.Dr. A.Nurten Kaynar

ÖZDEMİR

Üye : Prof.Dr. İ.Tuncer DEĞİM

Üye : Prof.Dr. Işık ÖZGÜNEY

Üye : Prof.Dr. Mesut ARICI

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih:

Önsöz

Bu çalışmada, anti kanser özellik gösteren ve yaygın olarak kullanılan bir etkin maddeyi model etkin madde olarak seçip, nanopartiküler sistemlerden aktif hedefli lipozomal ilaç taşıyıcı sistemleri hazırlamak, seçilen etkin maddenin toksisitesini azaltmak ve geliştirilen lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin fiziksel ve kimyasal stabilitesini arttırmak hedeflenmiştir. Bu amaçla yapılan literatür araştırmaları sonucunda kanser tedavisinde oldukça yaygın kullanılan Doksorubisin Hidroklorür etkin maddesinin kullanılmasına karar verilmiştir. Aktif hedefleyici ajan olarak ise; geleneksel Çin tıbbında aktif farmakolojik etkiye sahip olduğu, hepatoselüler karsinomaya karşı hücre döngüsünü durdurduğu bilinen pentasiklik triterpeneglikozit ile glisirrizin hidroliz ürünü olan Glisirretinik asit molekülü kullanılmıştır. Ayrıca lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerde gözlemlenen fiziksel ve kimyasal stabilite probleminin giderilmesine yönelik aktif hedefli prolipozomal ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Bu tez çalışması formülasyon geliştirme, karakterizasyon ve *in vitro-in vivo* çalışmaları içermektedir. Tez çalışmasının tüm süreçlerinde kıymetli bilgi ve desteği ile her zaman yanımda olan çok değerli hocam Prof. Dr. Yeşim KARASULU'ya sonsuz teşekkür ederim.

İzmir, 2022

Mine DİRİL

Özet

Karaciğer Kanseri Tedavisine Yönelik Aktif Hedefli Nanopartikül İlaç Taşıyıcı Sistemin Hazırlanması, *In Vitro-In Vivo* Değerlendirilmesi Üzerine Çalışmalar

Günümüzde karaciğer kanser tedavisinde, kanser evrelerine ve lokalizasyonuna bağlı olarak çeşitli tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Karaciğer kanseri tedavisinde; Doksorubisin Hidroklorür, Sorafenib, Floksuridin, Sisplatin, 5-florurasil gibi ilaçlar klasik kemoterapi uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, bu ilaçlar ile uygulanan geleneksel tedavi sonrasında, sağlıklı hücreler üzerine de toksik etki sıklıkla görülmektedir. Yaygın olarak kullanılan Doksorubisin Hidroklorür etkin maddesinin başta kardiyotoksisite olmak üzere, myelosupresyon, nöropati, el-ayak sendromu, kusma, bulantı, saç dökülmesi gibi birçok yan etkisi olduğu bilinmektedir. Bu nedenle Doksorubisin Hidroklorür'ün bu yan etkilerini ortadan kaldıracı ve aynı zamanda da karaciğer kanserine yönelik etkin bir tedavi sağlayabilecek ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesi oldukça önemlidir.

Kanser tedavilerinde aktif hedeflemenin, ilaçların spesifik hücre tiplerine taşınmasını sağlayarak terapötik etkiyi arttırdığı bilinmektedir. Bu mekanizmada ilaç hücre içerisine yüksek konsantrasyonda ulaşabilmekte, bunun aksine hedef olmayan bölgelere minimum düzeyde ulaşarak düşük toksisite yaratmaktadır. Aktif hedefleyici molekül olan Glisirretinik asit'in hepatoselüler karsinomaya karşı hücre döngüsünü durdurduğu, otofajini indüklediği ve immünosupresyonun apoptozunu azalttığı yapılan çalışmalarca gösterilmiştir. Bununla birlikte, Glisirretinik asit ile modifiye edilmiş nano taşıyıcıların karaciğer hedefleme verimliliğini önemli ölçüde artırabileceği ve karaciğer kanseri gelişimini inhibe edebileceği de çalışmalarda bildirilmiştir. Bu nedenle aktif hedefli molekül olan Glisirretinik asit konjügasyonu ile sağlıklı dokuların etkin madde ile etkileşmesinin önüne geçilerek tedavi etkinliğinin artması ve yan etkilerin azaltılması sağlanmıştır.

İlaç taşıyıcı sistemlerden lipozomal sistemler, vücudun temel bileşeni olan fosfolipitlerden oluşan, vücutta immünojenik ve toksik etki göstermeyen taşıyıcı sistemlerdir. Bir diğer üstünlükleri ise enkapsüle ilacın absorpsiyon, biyodağılım ve klerensini değiştirerek ilacın farmakokinetiğini değiştirebilmeleridir. Lipozomal sistemler gibi veziküler nanotaşıyıcıların vücuda uygulanmalarına takiben

Retikoendoteriyal sistem (RES) organları tarafından tutulmaları nedeniyle, hedef dokuya ulaşılabilirlikleri ve hedef hücreler tarafından tutulumları azalmaktadır. Fakat nanopartiküllerin yüzey özellikleri modifiye edilerek kan dolaşımındaki stabiliteleri ve kalış süreleri arttırılabilmektedir. Bu amaçla tez çalışmamızda, 1,2-distearol-sn-gliserol-3-fosfoetanolamin-N-[amino(polietilen glikol)-2000] (DSPE-PEG 2000) kullanılarak pegilasyon yöntemi ile sterik stabilizasyon sağlanmış ve antijenler marofaj ve nötrofiller tarafından fagositozunu engelleyerek lipozomal ilaç taşıyıcı sistemin dolaşımda kalış süresi arttırılmıştır.

Lipozomların raf ömrünü sınırlayan fiziksel ve kimyasal stabilite problemleri; fosfolipit hidrolizi, fosfolipit oksidasyonu ve bunlara bağlı olarak agregasyondur. Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin stabilite problemlerinin üstesinden gelebilmek adına disperse edildiğinde lipozomal kolloidal sistem oluşturan prolipozomal ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir.

Karaciğer kanseri tedavisinde geleneksel kemoterapide gözlenen olumsuzlukları elimine etmek ya da en aza indirmek amacıyla, karaciğer hücrelerine aktif hedeflendirilmiş Doksorubisin Hidroklorür içeren liyofilize pegile prolipozom formülasyonu tasarlamak; hücresel düzeylere ilaç taşınmasının artması, düşük dozlarda etkin ve güvenli tedavinin sağlanması, ilacın toksik ve immunojenik özelliklerinin en aza indirilerek sağlıklı dokulara zarar vermeden hedef bölgede istenilen düzeyde farmakolojik etkiyi elde etmek adına oldukça önemlidir. Ayrıca geliştirilmiş Doksorubisin Hidroklorür içeren aktif hedefli pegile prolipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerle, ticari formülasyona göre raf ömrünün uzatılması da söz konusu olabilecektir.

Anahtar kelimeler: Karaciğer kanseri; Doksorubisin Hidroklorür; aktif hedefli pegile lipozomal ilaç taşıyıcı sistemler; aktif hedefli pegile prolipozomal ilaç taşıyıcı sistemler; glisirretinik asit.

Abstract

Recently, various treatment methods have been used in the treatment of liver cancer, depending on the cancer stages and localization. In the treatment of liver cancer, drugs such as Doxorubicin, Sorafenib, Floxoridine, Cisplatin, 5-fluorouracil are widely used in traditional chemotherapy applications. However, after traditional treatment with these drugs, toxic effects on healthy cells are frequently observed. It is known that the active ingredient of Doxorubicin Hydrochloride, which is widely used, has many side effects such as cardiotoxicity, myelosuppression, neuropathy, hand-foot syndrome, vomiting, nausea, hair loss. For this reason, it is very important to develop a drug delivery system that can eliminate these side effects of Doxorubicin Hydrochloride and at the same time provide an effective treatment for liver cancer.

It is known that these systems with active targeting have a greater therapeutic effect compared to the free drug molecule, which enables the transport of active targeting drugs to specific cell types in cancer treatments. In this mechanism, the drug is able to reach the cell in high concentration, on the contrary, it reaches the non-target regions at a minimum level, creating low toxicity. Studies have shown that Glycyrrhetic acid, which is an active targeting molecule, stops cell cycle against hepatocellular carcinoma, induces autophagy and reduces apoptosis of immunosuppression. However, studies have also reported that Glycyrrhetic acid-modified nanocarriers can significantly increase liver targeting efficiency and inhibit liver cancer development. For this reason, the interaction of healthy tissues with the active substance is prevented by conjugation of glycyrrhizic acid, which is an active target molecule, thus increasing the effectiveness of the treatment and reducing the side effects.

Among the drug delivery systems, liposomal systems are carrier systems that are composed of phospholipids, which are the main components of the body, and that do not show immunogenic and toxic effects in the body. Another advantage is that it can change the pharmacokinetics of the encapsulated drug by changing its absorption, biodistribution and clearance. Since vesicular nanocarriers such as liposomal systems are retained by the RES (Reticoendothelial system) organs following their application to the body, their accessibility to the target tissue and their uptake by target cells decrease. However, by modifying the surface properties of nanoparticles, their stability and residence time in the blood circulation can be increased. For this purpose, in our

thesis study, steric stabilization will be achieved by pegylation method using DSPE-PEG 2000 and the residence time of the liposomal drug delivery system in the circulation is increased by preventing the phagocytosis of antigens by macrophages and neutrophils.

Physical and chemical stability problems that limit the shelf life of liposomes; phospholipid hydrolysis and aggregation. In order to overcome the stability problems of liposomal drug delivery systems, proliposomal drug carrier systems that form a liposomal colloidal system when dispersed have been developed.

In the treatment of liver cancer, to design a lyophilized pegylated proliposome formulation containing active targeted doxorubicin to liver cells in order to eliminate or minimize the adverse effects observed in conventional chemotherapy; Increasing drug transport to cellular levels, providing effective and safe treatment at low doses, minimizing the toxic and immunogenic properties of the drug are very important in order to obtain the desired pharmacological effect in the target area without affecting healthy tissues. In addition, it may be possible to extend the shelf life with the developed Doxorubicin Hydrochloride-containing active-targeted pegylated proliposomal drug delivery systems compared to the commercial formulation.

Key words: liver cancer; Doxorubicin Hydrochloride; active targeted pegylated liposomal drug delivery systems; active targeted pegylated proliposomal drug delivery systems; glycyrrhetic acid.

İçindekiler

Önsöz	I
Özet.....	II
Abstract.....	IV
İçindekiler.....	VI
Tablolar Listesi	XV
Şekiller Listesi.....	XIX
Eşitlik Listesi	XXIV
Kısaltmalar Listesi.....	XXV
1 GİRİŞ.....	1
1.1 Araştırmanın Problemi	1
1.2 Araştırmanın Sorusu.....	1
1.3 Araştırmanın Hipotezleri	1
1.4 Araştırmanın Varsayımları.....	2
1.5 Araştırmanın Sınırlılıkları	2
1.6 Araştırmanın Amacı.....	3
2 GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 KARACİĞER YAPISI.....	4
2.1.1 Karaciğer Fonksiyonları	6
2.1.1.1 Safra Üretimi	6
2.1.1.2 Yağda Çözünür Vitaminlerin Depolanması ve/veya Metabolizması	6
2.1.1.3 İlaç Metabolizması	6
2.1.1.4 Bilirubin Metabolizması	7
2.1.1.5 Diğer fonksiyonlar	7
2.1.2 Karaciğer Hastalıkları.....	7
2.1.2.1 Karaciğer Kanseri.....	8
2.1.2.1.1 Kolanjiokarsinom	9
2.1.2.1.2 Hepatoselüler Karsinoma.....	9
2.2 NANOPARTİKÜLER İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER.....	15
2.2.1 Kanser Tedavisinde Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler	16
2.2.2 Lipozomal İlaç Taşıyıcı sistemler	17
2.2.2.1 Lipozomların Sentezi ve Karakterizasyon metodolojisi.....	18
2.2.2.1.1 Lipozomların Sınıflandırması.....	18
2.2.2.1.2 Lipozomların Üretim Teknikleri.....	19

2.2.2.1.3	Lipozom Karakterizasyon Yöntemleri	21
2.2.2.2	Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistem Bileşenleri.....	23
2.2.2.2.1	Doğal Lipitler	25
2.2.2.2.2	Sentetik Lipitler	27
2.2.2.2.3	Sümfaktanlar.....	28
2.2.2.3	İşlevsellik yönünden Lipozomların çeşitleri.....	28
2.2.2.3.1	Konvensiyonel Lipozomlar	28
2.2.2.3.2	Pegile Lipozomlar	29
2.2.2.3.3	Teranostik lipozomlar	29
2.2.2.3.4	Hedefli Lipozomlar	30
2.2.2.4	Klinik ve prelinik kullanımda lipozomal ilaçlar	31
2.2.2.4.1	Analjezik olarak lipozomal ilaç taşıyıcı sistemler	33
2.2.2.4.2	Antibakteriyel.....	33
2.2.2.4.3	Aşı.....	34
2.2.2.4.4	Antikanser	34
2.2.2.5	Lipozomların Avantajları ve Dezavantajları.....	35
2.2.3	Prolipozomal İlaç Taşıyıcı Sistemler	38
2.2.3.1	Taşıyıcı madde üzerinde film oluşturma	39
2.2.3.2	Püskürterek kurutma yöntemi	40
2.2.3.3	Akışkan yatak yöntemi	40
2.2.3.4	Süper kritik anti-solvent yöntemi.....	41
2.2.3.5	Dondurarak kurutma (Liyofilizasyon) yöntemi	41
2.3	DOKSORUBİSİN HİDROKLORÜR.....	42
2.3.1	Farmakokinetik özellikleri	43
2.3.2	Etki Mekanizması	44
2.3.3	Uygulama	44
2.3.4	Yan etkiler	45
2.4	GLİSİRRETİNİK ASİT.....	45
2.4.1	Kimyasal yapısı	45
2.4.2	Hepatoselüler Karsinoma'da Aktif Hedefleyici Ajan Olarak Kullanımı.....	46
3	GEREÇ ve YÖNTEM.....	48
3.1	Kullanılan Kimyasal Madde, Araç ve Gereçler	48
3.1.1	Kullanılan Kimyasal Maddeler	48
3.1.2	Kullanılan Araç ve Gereçler	50
3.2	Yöntem.....	52
3.2.1	Etkin madde Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	52

3.2.1.1	Etkin maddenin Ultraviyole (UV) Spektrumunun İncelenmesi	52
3.2.1.2	Etkin maddenin İnfrared (FTIR) Spektrumunun İncelenmesi.....	52
3.2.1.3	Etkin madde Analitik Yöntem Validasyonu	52
3.2.1.3.1	Çözücü Ortamlarının Hazırlanışı.....	52
3.2.1.3.2	Standart ve Numune Çözeltilerinin Hazırlanışları	54
3.2.1.3.3	Yöntem ve Hesaplamalar	55
3.2.1.3.4	Özgünlük ve Seçicilik	56
3.2.1.3.5	Çalışma Aralığı ve Doğrusallık	57
3.2.1.3.6	Doğruluk.....	60
3.2.1.3.7	Keskinlik	62
3.2.1.3.8	Dayanıklılık	63
3.2.1.3.9	Çözelti Stabilitesi.....	64
3.2.1.3.10	Sistem Uygunluk	64
3.2.1.4	Etkin madde Çözünürlük Çalışması	65
3.2.2	Formülasyon Geliştirme Çalışmaları	65
3.2.2.1	DSPE-PEG 2000-Glisirretinik asit konjugasyonu Sentezi	65
3.2.2.1.1	Nükleer Manyetik Rezonans Analizi.....	67
3.2.2.2	Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesi	68
3.2.2.3	Lipozom Formülasyonu In vitro Karakterizasyon Çalışmaları	71
3.2.2.3.1	Lipozom Formülasyonu Partikül Boyutu ve Polidispersite İndeksi Ölçümü	71
3.2.2.3.2	Lipozom Formülasyonu Zeta Potansiyel Değerlerinin Ölçümü.....	71
3.2.2.3.3	Lipozom Formülasyonu pH Değerinin Saptanması	72
3.2.2.3.4	Lipozom Formülasyonu Viskozite Değerinin Ölçümü	72
3.2.2.3.5	Lipozom Formülasyonu Enkapsülasyon Kapasitesi Ölçümü	72
3.2.2.3.6	Lipozom Formülasyonu İlaç Yükleme Kapasitesi Ölçümü.....	72
3.2.2.4	Prolipozomal İlaç Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesi.....	73
3.2.2.5	Prolipozom Formülasyonlarının In Vitro Karakterizasyon Çalışmaları.....	76
3.2.2.5.1	Prolipozom Formülasyonlarının Partikül Boyutu ve Polidispersite İndeksi Ölçümü.....	76
3.2.2.5.2	Prolipozom Formülasyonlarının Zeta Potansiyel Değerlerinin Ölçümü	77
3.2.2.5.3	Prolipozom Formülasyonlarının pH Değerinin Saptanması	77
3.2.2.5.4	Prolipozom Formülasyonlarının Viskozite Değerinin Ölçümü	77
3.2.2.5.5	Prolipozom Formülasyonlarının Enkapsülasyon Kapasitesi Ölçümü ...	77
3.2.2.5.6	Prolipozom Formülasyonlarının İlaç Yükleme Kapasitesi Ölçümü	77
3.2.2.5.7	Prolipozom Formülasyonu Yeniden Dağılılabılme Zamanı Tayini.....	78

3.2.2.5.8	Prolipozom Formülasyonu Nem Miktarı Tayini	78
3.2.2.5.9	Prolipozom Formülasyonu X-Işını Kırınım Tayini	78
3.2.3	Lipozom ve Prolipozom Formülasyonlarının Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi	79
3.2.4	Lipozom ve Prolipozom Formülasyonlarının Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analizleri	79
3.2.5	Lipozom ve Prolipozom Formülasyonunun Osmolarite Analizleri	80
3.2.6	Lipozom ve Prolipozom Formülasyonunda Doks-HCl'ün Bitmiş Ürün Analitik Yöntem Validasyonu	80
3.2.6.1	Standart ve Numune Çözeltilerinin Hazırlanışları	81
3.2.6.2	Yöntem ve Hesaplamalar	81
3.2.6.3	Özgünlük ve Seçicilik	82
3.2.6.4	Doğruluk.....	83
3.2.2.1.	Kesinlik	84
3.2.6.4.1	Sistem Kesinliği	84
3.2.6.4.2	Tekrarlanabilirlik	84
3.2.6.4.3	Laboratuvar İçi Kesinlik	84
3.2.6.5	Dayanıklılık	84
3.2.6.6	Çözelti Stabilesi	85
3.2.6.7	Sistem Uygunluk.....	85
3.2.7	Lipozom ve Prolipozom Formülasyonunda Vitamin E Asetat'ın Bitmiş Ürün Analitik Validasyonu.....	85
3.2.8	Lipozom ve Prolipozom Formülasyonlarında Fosfolipit Miktarının Tespiti....	93
3.2.9	<i>In vitro</i> Salım Çalışması.....	95
3.2.10	<i>In vitro</i> Sızıntı Testi.....	96
3.2.10.1	Plazma Ortamında <i>In Vitro</i> Sızıntı Testi.....	97
3.2.10.2	37 °C pH 5.5. pH 6.5. pH 7.4 Ortamlarında <i>In Vitro</i> Sızıntı Testi	97
3.2.10.3	43 °C, 47 °C, 52 °C ve 57 °C pH 6.5 Ortamında <i>In Vitro</i> Sızıntı Testi	98
3.2.10.4	Ultrasonik Enerji Etkisi ile <i>In Vitro</i> Sızıntı Testi.....	98
3.2.11	Stabilite Çalışmaları.....	98
3.2.12	<i>In vitro</i> Sitotoksite Çalışmaları	99
3.2.12.1	Hücre Kültürü Besi Yeri Ortamı Hazırlanışı.....	100
3.2.12.2	Hücre Kültürü Pasajlama Çalışması	101
3.2.12.3	Hücre Sayımı Çalışması.....	101
3.2.12.4	MTT Analizi.....	101
3.2.13	<i>In vitro</i> Permeabilite Çalışmaları	102
3.2.13.1	Hücre Çözme Çalışmaları.....	103

3.2.13.2	Hep G2, Mahlavu, Huh-7 Hücrelerinin Kültür Filtrelerinin Üzerine Ekimi	103
3.2.13.3	Transepitelyal Elektrik Rezistans (TEER) Değerinin Ölçülmesi	105
3.2.14	<i>In vivo</i> Çalışmalar	106
3.2.14.1	Biyodağılım Çalışması	106
3.2.14.2	Etkinlik Çalışması	107
3.2.15	Organlarda Bulunan Doks-HCl Tayini için Metot Geliştirme Çalışması	109
3.2.15.1	Standart, İç Standart ve Matriks Çözeltilerinin Hazırlanışları	110
3.2.15.2	Özgünlük ve Seçicilik	111
3.2.15.3	Çalışma Aralığı ve Doğrusallık	111
3.2.15.3.1	LOD ve LOQ Değerinin Hesaplanması	112
3.2.15.4	Organlarda Bulunan Doks-HCl'ün Miktar Tayini Çalışması	113
3.2.15.5	Patolojik Çalışmalar	113
3.2.16	İstatistiksel Değerlendirme	114
4	BULGULAR	115
4.1	Etkin madde Üzerine Yapılan Çalışma Bulguları	115
4.1.1	Etkin maddenin Ultraviyole (UV) Spektrumu Bulgusu	115
4.1.2	Etkin maddenin İnfrared (FTIR) Spektrumu Bulgusu	115
4.1.3	Etkin madde Validasyon Bulguları	116
4.1.3.1	Özgünlük ve Seçicilik Parametresine ait Bulgular	116
4.1.3.2	Çalışma Aralığı ve Doğrusallık Parametrelerine ait Bulgular	117
4.1.3.2.1	Duyarlılık ve Saptama Sınırına ait Bulgular	122
4.1.3.3	Doğruluk Parametresine ait Bulgular	122
4.1.3.4	Kesinlik Parametresine ait Bulgular	125
4.1.3.4.1	Sistem Kesinliği Parametresine ait Bulgular	125
4.1.3.4.2	Tekrarlanabilirlik Parametresine ait Bulgular	126
4.1.3.4.3	Laboratuvar içi Kesinlik Parametresine ait Bulgular	129
4.1.3.5	Dayanıklılık Parametresine ait Bulgular	135
4.1.3.6	Çözelti Stabilitesi Parametresine ait Bulgular	138
4.1.3.7	Sistem Uygunluğu Parametresine ait Bulgular	139
4.1.4	Etkin madde Çözünürlük Çalışmasına ait Bulgular	141
4.2	Formülasyon Geliştirme Çalışmalarına ait Bulgular	141
4.2.1	DSPE PEG2000-Glisirretinik asit Konjugasyonu Sentezi Bulguları	141
4.2.1.1	Nükleer Manyetik Rezonans Analizi Bulguları	141
4.2.2	Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesine ait Bulgular	143

4.2.2.1	Lipozom Formülasyonu In Vitro Karakterizasyon Çalışmalarına ait Bulgular	144
4.2.2.1.1	Lipozom Formülasyonu Partikül Boyutu ve Polidispersite İndeksi Ölçümüne ait Bulgular	144
4.2.2.1.2	Lipozom Formülasyonu Zetapotansiyel Değerinin Ölçümüne ait Bulgular	144
4.2.2.1.3	Lipozom Formülasyonu pH Değerinin Saptanmasına ait Bulgular	144
4.2.2.1.4	Lipozom Formülasyonu Viskozite Değerine ait Bulgular	144
4.2.2.1.5	Lipozom Formülasyonu Enkapsülasyon Kapasitesi Ölçümüne ait Bulgular	145
4.2.2.1.6	Lipozom formülasyonu İlaç Yükleme Kapasitesine ait Bulgular	145
4.2.3	Prolipozomal İlaç Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesine ait Bulgular	149
4.2.3.1	Prolipozom Formülasyonu In Vitro Karakterizasyon Çalışmalarına ait Bulgular	151
4.2.3.1.1	Prolipozom Formülasyonu Partikül Boyutu ve Polidispersite İndeksi Ölçümüne ait Bulgular	151
4.2.3.1.2	Prolipozom Formülasyonu Zeta Potansiyel Değerlerinin Ölçümüne ait Bulgular	151
4.2.3.1.3	Prolipozom Formülasyonunun pH Değerinin Saptanmasına ait Bulgular	151
4.2.3.1.4	Prolipozom Formülasyonunun Viskozite Değerinin Ölçümüne ait Bulgular	151
4.2.3.1.5	Prolipozom Formülasyonu Enkapsülasyon Kapasitesi Ölçümüne ait Bulgular	151
4.2.3.1.6	Prolipozom Formülasyonu İlaç Yükleme Kapasitesine ait Bulgular ...	152
4.2.3.1.7	Prolipozom Formülasyonu Yeniden Dağılılabılme Zamanına ait Bulgular	152
4.2.3.1.8	Prolipozom Formülasyonu Nem Miktarına ait Bulgular	152
4.2.3.1.9	Prolipozom Formülasyonu X-Işını Kırınım Tayini Bulguları	154
4.2.4	Lipozom ve Prolipozom Formülasyonlarının Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi	155
4.2.5	Lipozom ve Prolipozom Formülasyonlarının Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analizleri	156
4.2.6	Lipozom ve Prolipozom Formülasyonunun Osmolarite Analizlerine ait Bulgular	156
4.2.7	Lipozom ve Prolipozom Formülasyonunda Doks-HCl'ün Bitmiş Ürün Analitik Validasyonuna ait Bulgular	157
4.2.7.1	Özgünlük ve Seçicilik Parametresine ait Bulgular	157
4.2.7.2	Doğruluk Parametresine ait Bulgular	159
4.2.7.3	Kesinlik Parametresine ait Bulgular	160

4.2.7.3.1	Sistem Kesinliği Parametresine ait Bulgular.....	160
4.2.7.3.2	Tekrarlanabilirlik Parametresine ait Bulgular	161
4.2.7.3.3	Laboratuvarıçı Kesinlik Parametresine ait Bulgular	161
4.2.7.4	Dayanıklılık Parametresine ait Bulgular	163
4.2.7.5	Çözelti Stabilesi Parametresine ait Bulgular	165
4.2.7.6	Sistem Uygunluk Parametresine ait Bulgular.....	166
4.2.8	Lipozom ve Prolipozom Formülasyonunda Vitamin E Asetat'ın Bitmiş Ürün Analitik Validasyonu Bulguları.....	166
4.2.8.1	Özgünlük ve Seçicilik Parametresine ait Bulgular	166
4.2.8.2	Çalışma Aralığı ve Doğrusallık Parametresine ait Bulgular	168
4.2.8.2.1	Duyarlılık ve Saptama Sınırına ait Bulgular	169
4.2.8.3	Doğruluk Parametresine ait Bulgular	169
4.2.8.4	Kesinlik Parametresine ait Bulgular	170
4.2.8.4.1	Sistem kesinliği Parametresine ait Bulgular.....	170
4.2.8.4.2	Tekrarlanabilirlik Parametresine ait Bulgular	171
4.2.8.4.3	Laboratuvarıçı Kesinlik Parametresine ait Bulgular	172
4.2.8.5	Dayanıklılık Parametresine ait Bulgular	174
4.2.8.6	Sistem Uygunluk Parametresine ait Bulgular.....	175
4.2.8.7	Çözelti Stabilesi	176
4.2.9	Lipozom ve Prolipozom Formülasyonlarında Fosfolipit Miktarına ait Bulgular	176
4.3	<i>In vitro</i> Salım Çalışmasına ait Bulgular	178
4.4	<i>In vitro</i> Sızıntı Testine ait Bulgular.....	185
4.4.1	Plazma Ortamında <i>In vitro</i> Sızıntı Testi Bulguları.....	185
4.4.2	37 °C'de pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 Ortamlarında <i>In vitro</i> Sızıntı Testi Bulguları	186
4.4.3	43 °C, 47 °C, 52 °C ve 57 °C' de pH 6.5 Ortamlarında <i>In vitro</i> Sızıntı Testi Bulguları	188
4.4.4	Ultrasonik Enerji Etkisi <i>In vitro</i> Sızıntı Testi Bulguları.....	190
4.5	Stabilite Çalışmalarına ait Bulgular	191
4.6	<i>In vitro</i> Sitotoksisite Çalışmalarına ait Bulgular.....	195
4.6.1	Hep G2 Hücre Hattı için Bulunan Sitotoksisite Sonuçları	195
4.6.2	Mahlavu Hücre Hattı için Bulunan Sitotoksisite Sonuçları.....	197
4.6.3	Huh- 7 Hücre Hattı için Bulunan Sitotoksisite Sonuçları	199
4.6.4	AML 12 Hücre Hattı için Bulunan Sitotoksisite Sonuçları.....	201
4.7	<i>In vitro</i> Permeabilite Çalışmalarına ait Bulgular	203
4.7.1	Hep G2 Hücre Hattı ile Yapılan <i>In vitro</i> Permeabilite Çalışmasına ait Bulgular	203

4.7.2	Mahlavu Hücre Hattı ile Yapılan In vitro Permeabilite Çalışmasına ait Bulgular	208
4.7.3	Huh-7 Hücre Hattı ile Yapılan In vitro Permeabilite Çalışmasına ait Bulgular	213
4.7.3.1	Transepitelyal Elektrik Rezistans (TEER) Değerlerine ait Bulgular	218
4.8	<i>In vivo</i> Çalışmalara ait Bulgular	228
4.8.1	Biyodağılım Çalışmasına ait Bulgular	228
4.8.2	Etkinlik Çalışmasına ait Bulgular	239
4.8.3	Patolojik Çalışmalara ait Bulgular	244
4.8.4	Organlarda Bulunan Doks-HCl Tayini için Metot Geliştirme Çalışması	246
4.8.4.1	Özgünlük ve Seçicilik Parametresine ait Bulgular	246
4.8.4.2	Çalışma Aralığı ve Doğrusallık Parametresine ait Bulgular	247
4.8.4.2.1	LOD ve LOQ Değerine ait Bulgular	248
4.8.4.3	Organlarda Bulunan Doks-HCl'ün Miktar Tayini Çalışmasına ait Bulgular	249
5	Tartışma	250
5.1	Etkin madde Üzerine Yapılan Çalışmaların Değerlendirilmesi	250
5.2	Formülasyon Geliştirme Çalışmalarının Değerlendirilmesi	252
5.2.1	DSPE PEG 2000-Glisirretinik asit Konjugasyonu Sentezi Çalışmalarının Değerlendirilmesi	252
5.2.1.1.1	Nükleer Manyetik Rezonans Analizi Çalışmalarının Değerlendirilmesi	253
5.2.2	Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistem Geliştirme Çalışmalarının Değerlendirilmesi	253
5.2.3	Prolipozomal İlaç Taşıyıcı Sistem Geliştirilme Çalışmalarının Değerlendirilmesi	255
5.3	Lipozom ve Prolipozom Formülasyonlarının Morfolojik Özelliklerinin Değerlendirilmesi	257
5.4	Lipozom ve Prolipozom Formülasyonlarının Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analizlerinin Değerlendirilmesi	258
5.5	Lipozom ve Prolipozom Formülasyonunun Osmolarite Analizlerinin Değerlendirilmesi	259
5.6	Lipozom ve Prolipozom Formülasyonunda Doks-HCl'ün Bitmiş Ürün Analitik Validasyonunun Değerlendirilmesi	259
5.7	Lipozom ve Prolipozom Formülasyonunda Vitamin E Asetat'ın Bitmiş Ürün Analitik Validasyonunun Değerlendirilmesi	261
5.8	Lipozom ve Prolipozom Formülasyonlarında Fosfolipit Miktarının Değerlendirilmesi	263
5.9	<i>In vitro</i> Salım Çalışmasının Değerlendirilmesi	263
5.10	<i>In vitro</i> Sızıntı Testinin Değerlendirilmesi	267
5.11	Stabilite Çalışmalarının Değerlendirilmesi	269

5.12	In vitro Sitotoksosite Çalışmalarının Değerlendirilmesi	275
5.13	In vitro Permeabilite Çalışmalarının Değerlendirilmesi	278
5.14	In vivo Çalışmaların Değerlendirilmesi.....	281
5.14.1	Biyodağılım Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi	281
5.14.2	Etkinlik Çalışmasına ait Sonuçlarının Değerlendirilmesi	282
5.14.3	Patolojik Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	284
5.14.4	Organlarda Bulunan Doks-HCl Tayini için Metot Geliştirme Çalışmasının Değerlendirilmesi	285
Sonuç ve Öneriler		287
Kaynaklar.....		288
Ekler		322
Tezden Yapılan Yayın ve Bildiriler		323
Teşekkür		324
Özgeçmiş		325

Tablolar Listesi

Tablo 1. Klinik kullanım için onaylanmış lipozomal ilaç formülasyonları (Bulbake et al., 2017; Fungizone, Clemons, Stevens, Clemons, & Stevens, 2004)(Bulbake et al., 2017)	32
Tablo 2. Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Avantajları ve Dezavantajları	36
Tablo 3. Doks-HCl'in Farmakokinetik özellikleri	44
Tablo 4. Doks-HCl için HPLC cihaz parametreleri	54
Tablo 5. Özgünlük ve Seçicilik Parametresi için Kabul Kriterleri.....	57
Tablo 6. Lipozomal önformülasyon çalışmalarında formülasyon terkipleri	71
Tablo 7. Prolipozom önformülasyon terkipleri	74
Tablo 8. Liyofilizasyon sonrası prolipozom formülünde bulunan katı içeriklerin birim formül yüzdeleri.....	75
Tablo 9. Liyofilizasyon parametreleri	76
Tablo 10. Vitamin E Asetat için HPLC parametereleri.....	86
Tablo 11. FDA tarafından önerilen in vitro sızıntı test koşulları (Food and Drug Administration (FDA), 2018)	97
Tablo 12. MTT analizinde uygulanan formülasyon ve çözeltiler (n=4)	102
Tablo 13. HPLC-FLD Yöntem Parametreleri	110
Tablo 14. Farklı çözücü ortamlarında elde edilen çalışma aralığı sonuçları	118
Tablo 15. MF, pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.4 çözücü ortamlarında Doks-HCl standardının doğrusalılık parametresine ait alan değerleri	119
Tablo 16. HBSS çözücü ortamında Doks-HCl standardının doğrusalılık parametresine ait alan değerleri.....	120
Tablo 17. Doks-HCl'ün MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ve HBSS ortamlarında LOD ve LOQ değerleri	122
Tablo 18. Doks-HCl Mobil Faz Ortamında Bulunan Doğruluk Verileri	123
Tablo 19. Doks-HCl pH 5.5 Ortamında Bulunan Doğruluk Verileri	123
Tablo 20. Doks-HCl pH 6.5 Ortamında Bulunan Doğruluk Verileri	124
Tablo 21. Doks-HCl pH 7.4 Ortamında Bulunan Doğruluk Verileri	124
Tablo 22. Doks-HCl HBSS Ortamında Bulunan Doğruluk Verileri.....	125
Tablo 23. Doks-HCl'ün MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ve HBSS Ortamlarında Sistem Kesinliği Verileri	126
Tablo 24. Doks-HCl'ün MF Ortamında Tekrarlanabilirlik Verileri.....	127
Tablo 25. Doks-HCl'ün pH 5.5 Ortamında Tekrarlanabilirlik Verileri	127
Tablo 26. Doks-HCl'ün pH 6.5 Ortamında Tekrarlanabilirlik Verileri	128
Tablo 27. Doks-HCl'ün pH 7.4 Ortamında Tekrarlanabilirlik Verileri	128
Tablo 28. Doks-HCl'ün HBSS Ortamında Tekrarlanabilirlik Verileri	129
Tablo 29. Doks-HCl'ün Tekrarlanabilirlik Çalışmasında Standart Tartım ve % Uyumları	129
Tablo 30. Doks-HCl MF çözücü ortamında Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-1	130
Tablo 31. Doks-HCl MF çözücü ortamında Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-2	131
Tablo 32. Doks-HCl pH 5.5 çözücü ortamında Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-1	131
Tablo 33. Doks-HCl pH 5.5 çözücü ortamında Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-2	132

Tablo 34. Doks-HCl pH 6.5 çözücü ortamında Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-1	132
Tablo 35. Doks-HCl pH 6.5 çözücü ortamında Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-2	133
Tablo 36. Doks-HCl pH 7.4 çözücü ortamında Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-1	133
Tablo 37. Doks-HCl pH 7.4 çözücü ortamında Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-2	134
Tablo 38. Doks-HCl HBSS çözücü ortamında Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-1	134
Tablo 39. Doks-HCl HBSS çözücü ortamında Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-2	135
Tablo 40. Standart tartımları ve % Uyumlar	135
Tablo 41. Dayanıklılık Parametresi Standart ve Numune tartımları	136
Tablo 42. Doks-HCl MF Ortamında Dayanıklılık Verileri	136
Tablo 43. Doks-HCl pH5.5 Ortamında Dayanıklılık Verileri	136
Tablo 44. Doks-HCl pH 6.5 Ortamında Dayanıklılık Verileri	137
Tablo 45. Doks-HCl pH 7.4 Ortamında Dayanıklılık Verileri	137
Tablo 46. Doks-HCl HBSS Ortamında Dayanıklılık Verileri	138
Tablo 47. Doks-HCl Standart Çözelti Stabilitesi	138
Tablo 48. Doks-HCl Hammadde Çözelti Stabilitesi	139
Tablo 49. Doks-HCl'ün MF Ortamında Sistem Uygunluk Verileri	139
Tablo 50. Doks-HCl'ün pH 5.5 Ortamında Sistem Uygunluk Verileri	140
Tablo 51. Doks-HCl'ün pH 6.5 Ortamında Sistem Uygunluk Verileri	140
Tablo 52. Doks-HCl'ün pH 7.4 Ortamında Sistem Uygunluk Verileri	140
Tablo 53. Doks-HCl 'ün HBSS Ortamında Sistem Uygunluk Verileri	141
Tablo 54. Çözünürlük çalışması sonuçları (n=3)	141
Tablo 55. Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin mikrofludisk sonrası PB, PDI, ZP sonuçları	146
Tablo 56. Farklı por çaplarındaki polikarbonat filtre sonrası PB, PDI ve ZP sonuçları	148
Tablo 57. Doks-HCl etkin maddesi yüklenmiş lipozom formülasyonları karakterizasyon çalışmalarına ait sonuçlar (n=3)	149
Tablo 58. Prolipozom Formülasyonlarına ait In Vitro Karakterizasyon Çalışması Bulguları	153
Tablo 59. Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Formülasyonu Doks-HCl Doğruluk Sonuçları	160
Tablo 60. Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Doks-HCl Doğruluk Sonuçları	160
Tablo 61. Doks-HCl standart çözeltisinin sistem kesinliği sonuçları	160
Tablo 62. Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Formülasyonu Numune Çözeltisi Tekrarlanabilirlik Sonuçları	161
Tablo 63. Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Numune Çözeltisi Tekrarlanabilirlik Sonuçları	161
Tablo 64. Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Formülasyonu Numune Çözeltisi Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-1	162
Tablo 65. Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Formülasyonu Numune Çözeltisi Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-2	162
Tablo 66. Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Numune Çözeltisi Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-1	163

Tablo 67. Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Numune Çözeltilisi Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-2	163
Tablo 68. Dayanıklılık çalışmasında kullanılan standart ve numunelerin tartım verileri....	164
Tablo 69. Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Formülasyonu Numune Çözeltilisi Dayanıklılık Parametresine ait Bulgular	164
Tablo 70. Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Numune Çözeltilisi Dayanıklılık Parametresine ait Bulgular	165
Tablo 71. Doks- HCl, Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Formülasyonu Numune Çözeltilisi ve Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Numune Çözeltili Stabilitesi Sonuçları	165
Tablo 72. Sistem uygunluk verileri	166
Tablo 73. Vit E Asetat Çalışma Aralığı Sonuçları	168
Tablo 74. Vit E Asetat Doğrusallık Sonuçları	169
Tablo 75. Vit E Asetat'a ait LOD ve LOQ değerleri	169
Tablo 76. Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Formülasyonu Numune Çözeltilisi Vit E Asetat Doğruluk Sonuçları	170
Tablo 77. Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Numune Çözeltilisi Vit E Asetat Doğruluk Sonuçları	170
Tablo 78. Vit E Asetat standart çözeltisinin sistem kesinliği sonuçları	171
Tablo 79. Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Formülasyonu Numune Çözeltilisi Vit E Asetat Tekrarlanabilirlik Sonuçları	171
Tablo 80. Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Numune Çözeltilisi Vit E Asetat Tekrarlanabilirlik Sonuçları	172
Tablo 81. Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Formülasyonu Numune Çözeltilisi Vit E Asetat Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-1	172
Tablo 82. Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Formülasyonu Numune Çözeltilisi Vit E Asetat Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-2	173
Tablo 83. Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Numune Çözeltilisi Vit E Asetat Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-1	173
Tablo 84. Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Numune Çözeltilisi Vit E Asetat Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-2	174
Tablo 85. Dayanıklılık çalışmasında kullanılan standart ve numunelerin tartım verileri....	174
Tablo 86. Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Formülasyonu Numune Çözeltilisi Vit E Asetat Dayanıklılık Parametresine ait Bulgular	175
Tablo 87. Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Numune Çözeltilisi Vit E Asetat Dayanıklılık Parametresine ait Bulgular	175
Tablo 88. Vit E Asetat Sistem uygunluk sonuçları	176
Tablo 89. Vit E Asetat Çözeltili Stabilitesi Sonuçları	176
Tablo 90. Fosfolipit konsantrasyonuna karşı okunan absorpsiyon değerleri	177
Tablo 91. Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom ve Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Numunlerinin Fosfolipit Miktarları	178
Tablo 92. pH 5.5 Tampon ortamında In vitro salım çalışması sonuçları (n=6)	179
Tablo 93. 24 saat sonunda pH 5.5 tampon ortamında diyaliz membran içi miktar tayini sonuçları	179
Tablo 94. pH 6.5 Tampon ortamında In vitro salım çalışması sonuçları (n=6)	180
Tablo 95. 24 saat sonunda pH 6.5 tampon ortamında diyaliz membran içi miktar tayini sonuçları	181
Tablo 96. pH 7.4 Tampon ortamında In vitro salım çalışması sonuçları (n=6)	182

Tablo 97. 24 saat sonunda pH 7.4 tampon ortamında diyaliz membran içi miktar tayini sonuçları	182
Tablo 98. pH 5.5 ortamında Salım Kinetik Modellerin İncelenmesi	184
Tablo 99. pH 6.5 ortamında Salım Kinetik Modellerin İncelenmesi	184
Tablo 100. pH 7.4 ortamında Salım Kinetik Modellerin İncelenmesi	185
Tablo 101. F2 Testi Bulguları	185
Tablo 102. Plazma ortamında in vitro sızıntı çalışması sonuçları (n=3)	186
Tablo 103. 37 °C pH 5.5. pH 6.5. pH 7.4 ortamlarında in vitro sızıntı testi sonuçları (n=3)	187
Tablo 104. 43 °C, 47 °C, 52 °C ve 57 °C' lerde pH 6.5 ortamlarında in vitro sızıntı testi (n=3).....	188
Tablo 105. Ultrasonik Enerji Etkisi In vitro Sızıntı Testi Bulguları (n=3)	191
Tablo 106. Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Formülasyonu Stabilite Çalışması Sonuçları	192
Tablo 107. Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Stabilite Çalışması Sonuçları	193
Tablo 108. Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu %5'lik Dekstroz Çözeltisinde Disperse Edildikten Sonra Stabilite Çalışması Sonuçları	194
Tablo 109. Hep G2 Hücre Hattı In vitro Permeabilite Çalışması Konsantrasyon Sonuçları (n=3).....	204
Tablo 110. Hep G2 Hücre hattı Permeabilite ve Effluks sonuçları	208
Tablo 111. Mahlavu Hücre Hattı In vitro Permeabilite Çalışması Konsantrasyon Sonuçları (n=3).....	209
Tablo 112. Mahlavu Hücre hattı Permeabilite ve Effluks sonuçları	213
Tablo 113. Huh-7 Hücre Hattı In vitro Permeabilite Çalışması Konsantrasyon Sonuçları (n=3).....	214
Tablo 114. Huh-7 Hücre hattı Permeabilite ve Effluks sonuçları	218
Tablo 115. Hep G2 Hücre Hattı % TEER Değişimi Sonuçları	228
Tablo 116. Mahlavu Hücre Hattı % TEER Değişimi Sonuçları.....	228
Tablo 117. Huh-7 Hücre Hattı % TEER Değişimi Sonuçları	228
Tablo 118. Nude CD 1 farelerin Ağırlık Verileri	229
Tablo 119. Etkinlik çalışması nude CD 1 fare %Ağırlık Değişimi	242
Tablo 120. Doks-HCl ve Dau Çalışma Aralığı Sonuçları	247
Tablo 121. Doks-HCl ve Dau Doğrusallık Sonuçları.....	248
Tablo 122. Organlarda biriken Doks-HCl Miktar Tayini Sonuçları (n=3)	249

Şekiller Listesi

Şekil 1. Karaciğer yüzeyinin alt görünümü (Kalra, Yetiskul, & Wehrle, 2022)	4
Şekil 2. Karaciğer Kesitleri (Smithuis, Robin, 2010)	5
Şekil 3. Portal venöz ve denge fazında kontrastın yıkanmasıyla birlikte arteriyel faz hipervaskülaritesinin gözlemlendiği tipik HSK görünümü.....	11
Şekil 4. Lipozomal ilaç taşıyıcı sistem tasarımları.	18
Şekil 5. Lipozomların bileşimi.....	24
Şekil 6. Kolesterol ve PEG içeren lipozomal ilaç taşıyıcı sistemin enkapsülasyon kapasitesi ve salım profiline etkileri (T. Yang et al., 2008). A. Kolesterol-% Enkapsülasyon kapasitesi ilişkisi. B. Etkin madde salım profili.	24
Şekil 7. Lipozom bileşiminin stabiliteye etkisi. (A) Kolesterol, lipozomal ilaç taşıyıcı sistemin yapısal stabilitesini artırarak lipozom boyutunun 10 hafta boyunca stabil kalmasını sağlamıştır. (B) DSPC ve DPPC gibi daha yüksek T _m 'ye sahip lipidler, daha düşük T _m lipitlerine göre lipozomal stabiliteyi artırmıştır (Anderson & Omri, 2004; Gregory Gregoriadis, 1979).	25
Şekil 8. İşlevsellik Yönünden Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistem Çeşitlerinin Şematik Gösterimi	30
Şekil 9. Lipozomların kimyasal kararsızlığı ile ilişkili fosfolipitlerin moleküler yapısı	37
Şekil 10. Lipozomların kararsızlığının olası nedenleri.	38
Şekil 11. Taşıyıcı madde üzerinde film oluşturma yoluyla prolipozom geliştirmek için kullanılan aparatlar.....	40
Şekil 12. Basınç-sıcaklık denge diyagramı. Üçlü noktada katı, sıvı ve buhar dinamik dengededir.....	42
Şekil 13. Doksorubisin Hidroklorür'ün Kimyasal Yapısı.....	43
Şekil 14. Glisirretinik asit'in Kimyasal yapısı.....	46
Şekil 15. Serbest sitotoksik bir ilaç ve HSK hücrelerine aktif hedefli bir ligant olarak kullanılan GA'in mekanizması.....	47
Şekil 16. Steglich esterifikasyon reaksiyon oluşumu	66
Şekil 17. DSPE-PEG 2000 Konjugat Sentezinde Steglich Esterifikasyon Reaksiyonu	67
Şekil 18. pH Gradient Metodu ile Doks-HCl'nin Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sisteme Yüklenmesi (L. Peng, Guiliang, & Jingchen, 2022)	69
Şekil 19. Hep G2, Mahlavu ve Huh-7 hücrelerinin tranwell görüntüleri	104
Şekil 20. İzofluran ile anestesi uygulama sırasında nude CD 1 fareler	107
Şekil 21. Nude CD 1 farelerin ex vivo IVIS ölçümü öncesi görselleri.....	107
Şekil 22. Nude CD 1 farelere Hep G2 hücrelerinin karaciğere enjeksiyonu.....	108
Şekil 23. Nude CD 1 farelere glikoz prob enjeksiyonu	109
Şekil 24. Nude CD 1 farelere tedavi enjeksiyonu.....	109
Şekil 25. Organların patolojik inceleme için kesitlere ayrılıp kodlanması	114
Şekil 26. Doks-HCl'ün distile su içerisindeki UV spektrumu	115
Şekil 27. Doks-HCl FTIR Analiz Spektrumu	116
Şekil 28. Doks-HCl etkin maddesinin HPLC validasyonunda özgünlük ve seçicilik parametresine ait kromatogramlar	117
Şekil 29. Doks-HCl Mobil faz ortamında kalibrasyon eğrisi grafiği.....	120
Şekil 30. Doks-HCl pH 5.5 ortamında kalibrasyon eğrisi grafiği.....	121
Şekil 31. Doks-HCl pH 6.5 ortamında kalibrasyon eğrisi grafiği.....	121
Şekil 32. Doks-HCl pH 7.4 ortamında kalibrasyon eğrisi grafiği.....	121

Şekil 33. Doks-HCl HBSS ortamında kalibrasyon eğrisi grafiği	122
Şekil 34. DSPE-PEG 2000-GA konjugatının H-NMR spektrumu	142
Şekil 35. DSPE-PEG 2000-GA konjugatının C-NMR spektrumu	142
Şekil 36. Organik çözücü uzaklaştırıldıktan sonra film tabakası oluşumu	143
Şekil 37. Etkin madde yükleme aşamasından sonra Lipozom Formülasyonu.....	144
Şekil 38. Aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonlarının liyofilizasyon aşamasındaki görüntüsü	150
Şekil 39. Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun görselleri.....	150
Şekil 40. Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun partiküler yapısının görseli	150
Şekil 41. Enkapsülasyon Kapasitesi Ölçümü için Santrifüj Sonrası Görünüm	151
Şekil 42. %5'lik Deskroz Çözeltilinde Disperse Edilen Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Görünümü.....	152
Şekil 43. F7-3 Prolipozom Formülasyonu Nem Miktarı Ölçümü Karl Fisher Cihazı Çıktısı Örneği	153
Şekil 44. XRD Analiz Bulguları	154
Şekil 45. Aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonuna ait KryoTEM görüntüsü. (a) skala 5000 nm, (b) skala 200 nm	155
Şekil 46. Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonuna ait KryoTEM görüntüsü. (a) skala 5000 nm, (b) skala 200 nm	155
Şekil 47. DSC analizi sonuçları	156
Şekil 48. Aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyon çözeltilerine ait pik saflığı kromatogram verileri.....	157
Şekil 49. Özgünlük ve Seçicilik Parametresine ait HPLC Kromatogramları	158
Şekil 50. MF, Doks-HCl standart çözeltisi, plasebo aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu numune çözeltisi, aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu numune çözeltisi karşılaştırılmış HPLC kromatogramı	159
Şekil 51. MF, Doks-HCl standart çözeltisi, plasebo aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu numune çözeltisi, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu numune çözeltisi karşılaştırılmış HPLC kromatogramı	159
Şekil 52. Vit E Asetat Özgünlük ve Seçicilik Parametresine ait HPLC Kromatogramları..	167
Şekil 53. Vit E Asetat kalibrasyon eğrisi grafiği	169
Şekil 54. Fosfolipit Kalibrasyon Eğrisi.....	177
Şekil 55. pH 5.5 Tampon ortamında In vitro salım grafiği.....	180
Şekil 56. pH 6.5 Tampon ortamında in vitro salım grafiği.....	181
Şekil 57. pH 7.4 Tampon ortamında in vitro salım grafiği	183
Şekil 58. Plazma ortamında In vitro Sızıntı Çalışması Grafiği.....	186
Şekil 59. 37 °C pH 5.5, pH 6.5. pH 7.4 Ortamlarında In vitro Sızıntı Testi Grafiği	187
Şekil 60. pH 6.5 43 °C In vitro Sızıntı Testi Grafiği	189
Şekil 61. pH 6.5 47 °C In vitro Sızıntı Testi Grafiği	189
Şekil 62. pH 6.5 52 °C In vitro Sızıntı Testi Grafiği	190
Şekil 63. pH 6.5 57 °C In vitro Sızıntı Testi Grafiği	190
Şekil 64. Ultrasonik Enerji Etkisi In vitro Sızıntı Testi Grafiği	191
Şekil 65. a. Doks-HCl 24. Saat Hücre canlılığı, b. Doks-HCl 48. Saat Hücre canlılığı, c. Doks-HCl 72. Saat Hücre canlılığı	196
Şekil 66. Doks-HCl 24., 48. ve 72. saat IC50 Logaritmik grafiği/Hep G2	196
Şekil 67. a. Plasebo formülasyon 24. Saat Hücre canlılığı, b. Plasebo formülasyon 48. Saat Hücre canlılığı, c. Plasebo formülasyon 72. Saat Hücre canlılığı.....	196

Şekil 68. a. Kontrol, b. Doks-HCl 48.saat IC50 dozunu içeren aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu, c. Doks-HCl 48.saat IC50 dozu (n=4)	197
Şekil 69. Hep G2 MTT testi 24., 48. ve 72. saat görselleri.....	197
Şekil 70.a. Doks-HCl 24. saat Hücre canlılığı, b. Doks-HCl 48. saat Hücre canlılığı, c. Doks-HCl 72. saat Hücre canlılığı	198
Şekil 71. Doks-HCl 24., 48. ve 72. saat IC50 Logoritmik grafiği	198
Şekil 72. a. Plasebo formülasyon 24. Saat Hücre canlılığı, b. Plasebo formülasyon 48. Saat Hücre canlılığı, c. Plasebo formülasyon 72. Saat Hücre canlılığı.....	199
Şekil 73. 1. a. Kontrol, b. Doks-HCl 48.saat IC50 dozunu içeren aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu, c. Doks-HCl 48.saat IC50 dozu (n=4)	199
Şekil 74. a. Doks-HCl 24. saat Hücre canlılığı/Huh-7, b. Doks-HCl 48. saat Hücre canlılığı/Huh-7, c. Doks-HCl 72. saat Hücre canlılığı/ Huh-7	200
Şekil 75. Doks-HCl 24., 48. ve 72.saat IC50 logoritmik grafiği/Huh-7	200
Şekil 76. a. Plasebo formülasyon 24. saat Hücre canlılığı, b. Plasebo formülasyon 48. saat Hücre canlılığı, c. Plasebo formülasyon 72. saat Hücre canlılığı	201
Şekil 77. a. Kontrol, b. Doks-HCl 48.saat IC50 dozunu içeren aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu, c. Doks-HCl 48.saat IC50 dozu (n=4)	201
Şekil 78. a. Doks-HCl 24. saat Hücre canlılığı/AML 12, b. Doks-HCl 48. saat Hücre canlılığı/ AML 12, c. Doks-HCl 72. saat Hücre canlılığı/ AML 12	202
Şekil 79. Doks-HCl 24., 48. ve 72. saat IC50 Logoritmik grafiği/AML 12	202
Şekil 80. a. Plasebo formülasyon 24. saat Hücre canlılığı/AML 12, b. Plasebo formülasyon 48. saat Hücre canlılığı/ AML 12, c. Plasebo formülasyon 72. saat Hücre canlılığı/ AML 12	202
Şekil 81. a. Kontrol, b. Doks-HCl 48.saat IC50 dozunu içeren aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu, c. Doks-HCl 48.saat IC50 dozu (n=4)	203
Şekil 82. Hep G2 Doks-HCl A→B Konstrasyon-zaman grafiği	205
Şekil 83. Hep G2 Doks-HCl B→A Konstrasyon-zaman grafiği	205
Şekil 84. Hep G2 Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu A→B Konstrasyon-zaman grafiği	206
Şekil 85. Hep G2 Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu B→A Konstrasyon-zaman grafiği	206
Şekil 86. Hep G2 Piyasa Preparatı A→B Konstrasyon-zaman grafiği.....	207
Şekil 87. Hep G2 Piyasa Preparatı B→A Konstrasyon-zaman grafiği.....	207
Şekil 88. Mahlavu Doks-HCl A→B Konstrasyon-zaman grafiği	210
Şekil 89. Mahlavu Doks-HCl B→A Konstrasyon-zaman grafiği	210
Şekil 90. Mahlavu Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu A→B Konstrasyon-zaman grafiği	211
Şekil 91. Mahlavu Aktif Hedefli F7-3 Prolipozom Formülasyonu B→A Konstrasyon-zaman grafiği.....	211
Şekil 92. Mahlavu Piyasa Preparatı A→B Konstrasyon-zaman grafiği	212
Şekil 93. Mahlavu Piyasa Preparatı B→A Konstrasyon-zaman grafiği	212
Şekil 94. Huh-7 Doks-HCl A→B Konstrasyon-zaman grafiği	215
Şekil 95. Huh-7 Doks-HCl B→A Konstrasyon-zaman grafiği	215
Şekil 96. Huh-7 Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu A→B Konstrasyon-zaman grafiği	216
Şekil 97. Huh-7 Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu B→A Konstrasyon-zaman grafiği	216
Şekil 98. Huh-7 Piyasa Preparatı A→B Konstrasyon-zaman grafiği	217
Şekil 99. Huh-7 Piyasa Preparatı B→A Konstrasyon-zaman grafiği	217

Şekil 100. Hep G2 hücre hattının A→B 'e Doks-HCl uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri	219
Şekil 101. Hep G2 hücre hattının B→A'e Doks-HCl uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri	219
Şekil 102. Hep G2 hücre hattının A→B 'e aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri	220
Şekil 103. Hep G2 hücre hattının B→A'e aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri	220
Şekil 104. Hep G2 hücre hattının A→B 'e piyasa preparatı uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri	221
Şekil 105. Hep G2 hücre hattının B→A'e piyasa preparatı uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri	221
Şekil 106. Mahlavu hücre hattının A→B 'e Doks-HCl uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri	222
Şekil 107. Mahlavu hücre hattının B→A'e Doks-HCl uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri	222
Şekil 108. Mahlavu hücre hattının A→B 'e aktif hedefli pegile F7-3prolipozom formülasyonu uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri	223
Şekil 109. Mahlavu hücre hattının B→A'e aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri	223
Şekil 110. Mahlavu hücre hattının A→B 'e piyasa preparatı uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri	224
Şekil 111. Mahlavu hücre hattının B→A'e piyasa preparatı uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri	224
Şekil 112. Huh-7 hücre hattının A→B 'e Doks-HCl uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri	225
Şekil 113. Huh-7 hücre hattının B→A'e Doks-HCl uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri	225
Şekil 114. Huh-7 hücre hattının A→B 'e aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri	226
Şekil 115. Huh-7 hücre hattının B→A'e aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri	226
Şekil 116. Huh-7 hücre hattının A→B 'e piyasa preparatı uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri	227
Şekil 117. Huh-7 hücre hattının B→A'e piyasa preparatı uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri	227
Şekil 118. 1. Grup 1. Saat sonunda IVIS görüntüsü	229
Şekil 119. 1. Grup 3. Saat sonunda IVIS görüntüsü	230
Şekil 120. 1. Grup 5. Saat sonunda IVIS görüntüsü	230
Şekil 121. 1. Grup 7. Saat sonunda IVIS görüntüsü	231
Şekil 122. 1. Grup 9. Saat sonunda IVIS görüntüsü	231
Şekil 123. 1. Grup 12. Saat sonunda IVIS görüntüsü	231
Şekil 124. 1. Grup 24. Saat sonunda IVIS görüntüsü	231
Şekil 125. 2. Grup 1. Saat sonunda IVIS görüntüsü	232
Şekil 126. 2. Grup 3. Saat sonunda IVIS görüntüsü	232
Şekil 127. 2. Grup 5. Saat sonunda IVIS görüntüsü	232
Şekil 128. 2. Grup 7. Saat sonunda IVIS görüntüsü	233
Şekil 129. 2. Grup 9. Saat sonunda IVIS görüntüsü	233
Şekil 130. 2. Grup 12. Saat sonunda IVIS görüntüsü	233

Şekil 131. 2. Grup 24. Saat sonunda IVIS görüntüsü	234
Şekil 132. 3. Grup 1. Saat sonunda IVIS görüntüsü	234
Şekil 133. 3. Grup 3. Saat sonunda IVIS görüntüsü	234
Şekil 134. 3. Grup 5. Saat sonunda IVIS görüntüsü	235
Şekil 135. 3. Grup 7. Saat sonunda IVIS görüntüsü	235
Şekil 136. 3. Grup 9. Saat sonunda IVIS görüntüsü	235
Şekil 137. 3. Grup 12. Saat sonunda IVIS görüntüsü	236
Şekil 138. 3. Grup 24. Saat sonunda IVIS görüntüsü	236
Şekil 139. 4. Grup 1. Saat sonunda IVIS görüntüsü	236
Şekil 140. 4. Grup 3. Saat sonunda IVIS görüntüsü	237
Şekil 141. 4. Grup 5. Saat sonunda IVIS görüntüsü	237
Şekil 142. 4. Grup 7. Saat sonunda IVIS görüntüsü	237
Şekil 143. 4. Grup 9. Saat sonunda IVIS görüntüsü	238
Şekil 144. 4. Grup 12. Saat sonunda IVIS görüntüsü	238
Şekil 145. 4. Grup 24. Saat sonunda IVIS görüntüsü	238
Şekil 146. 1. Grup ex vivo IVIS görüntüsü	238
Şekil 147. 2. Grup ex vivo IVIS görüntüsü	239
Şekil 148. 3. Grup ex vivo IVIS görüntüsü	239
Şekil 149. 4. Grup ex vivo IVIS görüntüsü.....	239
Şekil 150. Etkinlik çalışmasında; ağırlık, hücre enjeksiyonu, tedavi çizelgesi ve IVIS görüntüleme çizelgesi	241
Şekil 151. Etkinlik çalışması nude CD 1fare ağırlık değişimi grafiği	242
Şekil 152. Negatif kontrol (1. Grup) nude CD 1 fare karaciğer tümörü a. 1. ölçüm IVIS görüntüsü, b. 2. ölçüm IVIS görüntüsü, c. 3. ölçüm IVIS görüntüsü.....	242
Şekil 153. Pozitif kontrol (2. Grup) nude CD 1 fare karaciğer tümörü a. 1. ölçüm IVIS görüntüsü b. 2. ölçüm IVIS görüntüsü, c. 3. ölçüm IVIS görüntüsü.....	243
Şekil 154. Pozitif kontrol (3. Grup) nude CD 1 fare karaciğer tümörü a. 1. ölçüm IVIS görüntüsü b. 2. ölçüm IVIS görüntüsü, c. 3. ölçüm IVIS görüntüsü	243
Şekil 155. 1. Grup Karaciğer Dokusunun Patolojik İncelemesi	244
Şekil 156. 1. Grup Akciğer Dokusunun Patolojik İncelemesi	245
Şekil 157. 2. Grup Karaciğer Dokusunun Patolojik İncelemesi	245
Şekil 158. 2. Grup Akciğer Dokusunun Patolojik İncelemesi	245
Şekil 159. 3. Grup Karaciğer Dokusunun Patolojik İncelemesi	246
Şekil 160. 3. Grup Akciğer Dokusunun Patolojik İncelemesi	246
Şekil 161. Doks-HCl ve Dau Kalibrasyon Eğrisi Grafiği	248

Eşitlik Listesi

Eşitlik 1. Standart ve Kontrol Standart Uyumluları	56
Eşitlik 2: MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ve HBSS ortamları için % Doks-HCl hesaplama eşitliği.....	56
Eşitlik 3. Kesim noktası hesabı	59
Eşitlik 4. LOD Hesaplama Eşitliği	60
Eşitlik 5. LOQ Hesaplama Eşitliği	60
Eşitlik 6. Güven aralığı hesabı	62
Eşitlik 7. Standart çözelti için % Fark Hesabı	64
Eşitlik 8. Numune çözeltisi için % Fark Hesabı	64
Eşitlik 9. Enkapsülasyon etkinlik yüzdesi formülü	72
Eşitlik 10. F7 Lipozom Formülasyonu %Doks-HCl Miktar Hesabı	82
Eşitlik 11. F7-3 Prolipozom Formülasyonu %Doks-HCl Miktar Hesabı	82
Eşitlik 12. F7 Lipozom Formülasyonu %Vit E Asetat Miktar Hesabı	87
Eşitlik 13. F7-3 Prolipozom Formülasyonu %Vit E Asetat Miktar Hesabı	88
Eşitlik 14. Hücre sayısı hesabı	101
Eşitlik 15. % Canlılık Hesabı	102
Eşitlik 16. Etkili Permeabilite Hesabı	105
Eşitlik 17. Effluks Hesabı.....	105

Kısaltmalar Listesi

Kısaltma	Türkçe	İngilizce
A→B	Apikalden bazolaterale	
AASLD	Amerikan Karaciğer Hastalıkları Araştırmaları Derneği	American Association for the Study of Liver Diseases
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu	
ALIS	Amikasin Lipozom İnhalasyon Süspansiyonu	
Am	Membran yüzeyindeki miktar	
AOH	Membran içindeki miktar	
Au	Alan Değeri	
B→A	Bazolateralden apikale	
Daunorubicin	Dau	
Dimetilaminopiridin	DMAP	
Dipotasyum hidrojen fosfat	K ₂ HPO ₄	
Disikloheksilkarbodiimid	DCC	
DLS	Dinamik Işık Saçılımı	
DMEM		Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit	
Doks-HCl	Doks-HCl Hidroklörür	Doxorubicin Hydrochloride
DOPC	1,2-dioleoil-sn-glisero-3-fosfokolin	
DOPE	1,2-dioleoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin	
DOPG	Fosfatidilgliserol	
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfokolin	
DSPC	1,2-dioktadekanoil-sn-glisero-3-fosfokolin	

Kısaltma	Türkçe	İngilizce
DSPE-PEG-GA	DSPE-PEG 2000-Glisirretinik asit	
DSPG	Lipoid PG 18:0/18:0, 1,2-Distearoyl-sn-gliserol-3-fosfo-rac-gliserol, sodyum tuzu, DSPG-Na	
EMA	Avrupa İlaç Ajansı	European Medicines Agency
EPC	Yumurta Fosfatidilkolin	
EPG	Yumurta Fosfatidilgliserol	
EPR	Artırılmış Geçirgenlik ve Tutma	
FBS		Fetal Bovine Serum
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi	U.S. Food and Drug Administration
FLD	Floresan Dedektör	
FTIR	Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi	
FTIR	Fouirer Transform Infrared Spektrofotometre	
GUV	Büyük tek lamelli veziküller	Giant Unilamellar Vesicles
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution	
HBV	Hepatit B virüsü	Hepatitis B virus
HCV	Hepatit C virüsü	Hepatitis C virus
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansülfonik asit	
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi	High Performance Liquid Chromatography
HSK=HSK	Hepatoselüler karsinom	Hepatocellular carcinoma
HSPC	Hidrojene soya fosfatidilkolin	
HSPC	Lipoid S PC-3, Hidrojene Soya L- α -fosfatidilkolin	
IC50	%50 maksimum inhibitör konsantrasyon	The half maximal inhibitory concentration

Kısaltma	Türkçe	İngilizce
İntravenöz	i.v	
KryoTEM	Kriyojenik elektron mikroskopisi	
LOD	Saptama Derişimi	Limit of Detection
LOQ	Analiz Sınırı	Limit of Quantification
m	Eğim	
MDT	Mikrodalga tedavi	
MF	Mobil faz	
MLV	Multilameller Veziküller	Multilamellar Vesicles
MR	Manyetik Rezonans	
n	Kesim Noktası	
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid	
NIR	Yakın Kızılötesi Floresan	
NP	Nanopartükül	
Nükleer Manyetik Rezonans	NMR	
OLV	Oligolameller Veziküller	Oligolamellar Vesicles
Ort	Ortalama	
PALS	Faz Analizi Işık Saçılımı	
PB	Partikül boyutu	
PBS	Fosfat tampon tuzu	Phosphate Buffered Saline
PC	Fosfatidilkolin	
PDI	Polidispersite İndeksi	
PE	Polietilen	
PEG	Polietilen Glikol	
RES	Retiküloendotelial Sistem	
RFT	Radyofrekans tedavi	
RSS	Relatif standart sapma	Relative standard deviation
SS	Standart sapma	Standard deviation
SUV	Küçük tek lamelli veziküller	Small Unilamellar Vesicles
TAKE	Transarteryal Kemoembolizasyon	Transarterial Chemoembolization

Kısaltma	Türkçe	İngilizce
TEER	Transepitelyal Elektrik Rezistans	
T _m	Faz Geçiş Sıcaklığı	
ULV	Unilameller Veziküller	Unilamellar Vesicles
UV	Ultraviyole	
Vit E Asetat	Vitamin E Asetat	
ZP	Zeta potansiyel	
XRD	X-ışını kırınımı	X-ray diffraction



1 GİRİŞ

1.1 Araştırmanın Problemi

Vücudun en büyük organı olan karaciğerin 500'ün üzerinde hayati fonksiyonu vardır. Bu nedenle karaciğer vücut için olmazsa olmaz organlar arasındadır ve karaciğer sağlığını bozan hastalıklar ciddi hayati risk yaratmaktadır. Bunların başında ise karaciğer kanseri gelmektedir. İstatistiklere göre, dünyada her yıl yaklaşık 800 bin kişi karaciğer kanseri tanısı almaktadır. Bu tanıları incelendiğinde; karaciğer kanserinin erkeklerde en sık görülen beşinci, kadınlarda ise en sık görülen sekizinci kanser olduğu ve son beş yılda sağ kalım oranının %9' un altında olduğu ifade edilmiştir. Karaciğer kanseri tedavisinde kullanılan etkin maddelerden Doksorubisin Hidroklorür (Doks-HCl), DNA baz çiftleri arasına girerek DNA sentezinin inhibisyonuna ve DNA bağımlı RNA sentezi inhibisyonuna neden olacak şekilde hücreye etki eden antrasiklin bir antibiyotiktir. Yaygın olarak kullanılan bu etkin maddenin başta kardiyotoksisite olmak üzere myelosupresyon, nöropati, el-ayak sendromu, kusma, bulantı, saç dökülmesi gibi birçok yan etkisi olduğu bilinmektedir. Bu nedenle Doks-HCl'ün bu yan etkilerini ortadan kaldırabilecek ve aynı zamanda da karaciğer kanserine yönelik etkin bir tedavi sağlayabilecek ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesi oldukça önemlidir.

Bu anlamda, tezimizde Doks-HCl içeren aktif hedefli pegile lipozomal ve prolipozomal ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmiş, piyasa preparatı ve Doks-HCl hammaddesi ile karşılaştırılmalı *in vitro* çalışmalar yürütülmüştür. Ayrıca yapılan *in vivo* biyodağılım, etkinlik ve patoloji çalışmalarıyla Doks-HCl etkin maddesinin anti kanser etkinliği yenilikçi prolipozomal ilaç taşıyıcı sistemleri içerisinde değerlendirilmiştir.

1.2 Araştırmanın Sorusu

Tezimizde geliştirilen aktif hedefli pegile lipozomal ve prolipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerinin gerek karaciğer kanseri tedavisinde daha etkin, daha az doza ihtiyaç duyularak hasta uyuncunun iyileştirildiği ve toksisitenin azaltıldığı, gerekse fiziksel ve kimyasal stabilitenin artırıldığı ticari intravenöz (i.v) formülasyona kıyasla daha iyi bir alternatif olup olmadığı sorusuna cevap aranacaktır.

1.3 Araştırmanın Hipotezleri

Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemler hücre membranına benzeyen yapıları ile etkin maddeleri enkapsüle etmede ve hücresel alımı arttırmada başarılı sistemlerdir.

Özellikle sistemik toksisiteyi azaltırken enkapsüle edilmiş etkin maddeleri hedef bölgelere taşıyan veziküler sistemlerdir. Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin fiziksel ve kimyasal stabilite problemlerinin üstesinden gelen prolipozomal ilaç taşıyıcı sistemler de son dönemde üzerinde çalışılan ilaç taşıyıcı sistemler haline gelmektedir. Kanser tedavilerinde anti kanser etkin maddelerin yan etkilerini en aza indirmek amaçlı olarak hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmesi oldukça önemlidir. Bu amaçla tezimizde, karaciğer kanseri tedavisinde Doks-HCl etkin maddesinin toksisitesini azaltacak, uzun sirkülasyon süresine sahip aktif hedefli pegile lipozomal ve lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerde görülen stabilite problemlerinin önüne geçecek aktif hedefli pegile prolipozomal ilaç taşıyıcı sistem formülasyonları önerilmiştir.

Geliştirilen Doks-HCl içeren aktif hedefli pegile lipozomal ve prolipozomal ilaç taşıyıcı sistem formülasyonlarının *in vitro* karakterizasyon çalışmaları tamamlanmış ve optimal sonuçlar veren aktif hedefli pegile lipozom formülasyonu (F7) ve aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonu (F7-3) belirlenmiştir. Bu formülasyonlar ile *in vitro* salım ve *in vitro* sızıntı çalışmaları tamamlandıktan sonra stabilite sonuçları incelenmiş ve yapılacak diğer çalışmalar için aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonu (F7-3) seçilmiştir. Hep G2, Mahlavu ve Huh-7 hücre hatlarında sitotoksite çalışmaları gerçekleştirilmiş ve bu hücre hatlarında permeabilite çalışmaları karşılaştırmalı olarak sürdürülmüştür. Doks-HCl çözeltisi, aktif hedefsiz pegile prolipozom formülasyonu, aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonu (F7-3) ve piyasa preparatı ile biyodağılım çalışmaları yapılmıştır. Etkinlik çalışmaları için ise; aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonu (F7-3) ve piyasa preparatı karşılaştırmalı olarak çalışılmış ve IVIS görüntülemeleri yapılmıştır. Etkinlik çalışması sonucunda organlarda patolojik çalışma gerçekleştirilmiştir. Geliştirdiğimiz aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonunun piyasa preparatına göre kanser hücrelerine permeabilitesinin daha yüksek olduğu ve daha etkin olduğu görülmüştür.

1.4 Araştırmanın Varsayımları

Tezimizde karakterizasyon ve stabilite çalışmasında kullanılan parametreler istatistiksel olarak anlamlı sayıda olacak şekilde ilerletilmiştir. *In vivo* çalışmalardaki örneklem büyüklüğü ise etik kurulun izin verdiği ölçüde gerçekleştirilmiştir.

1.5 Araştırmanın Sınırlılıkları

Tez çalışmamızdaki en büyük sınırlamalardan biri, ülkemizi ve aynı zamanda tüm dünyayı etkisi altına alan ve pandemi ilan edilen COVID-19 nedeni ile yaşanan

olumsuz süreçlerin yarattığı aksaklıklardır. Bir diğer sınırlılık ise, maddi olanaklar olmuştur. Bu güçlükleri büyük ölçüde aşmamıza yardımcı olan Aliye Üster Vakfı'na ve Sedef İlaç ve Medikal Ürünleri Ltd. Şti'ye teşekkür ederiz.

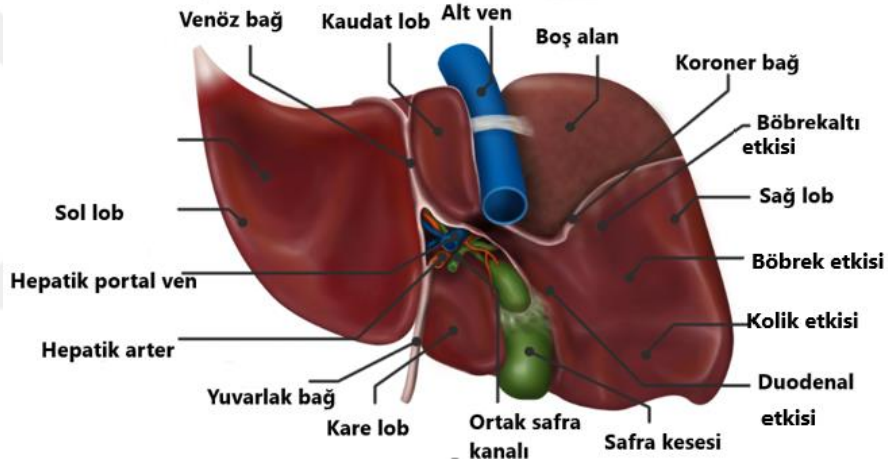
1.6 Araştırmanın Amacı

Bu tezin amacı, karaciğer kanseri tedavisinde kullanılmak üzere aktif hedefli pegile lipozomal ve prolipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerini geliştirmek, geliştirilen bu formülasyonları birbiri içinde *in vitro* çalışmalarla kıyaslamak ve etkinliğini ise *in vivo* olarak araştırmaktır. Bu tezde hedeflenen ölçütlere ulaşıldığında, geliştirilen aktif hedefli pegile lipozomal ve prolipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin karaciğer kanseri tedavisinde daha etkin ve güvenilir bir şekilde kullanılmasının sağlanması, ayrıca piyasa preparatına oranla raf ömrünün uzatılması amaçlanmıştır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 KARACİĞER YAPISI

Karaciğer; vücutta metabolizmayı, bağışıklığı, sindirimi, detoksifikasyonu, vitamin depolamayı desteklemeye yardımcı olan bir dizi işlevden sorumlu kritik bir organdır ve yetişkin bir insanın vücut ağırlığının yaklaşık %2'sini oluşturur. Karaciğerin kan ihtiyacı, portal venden (yaklaşık %75) ve hepatik arterden (yaklaşık %25) olmak üzere iki büyük kan damarından sağlanır. Karaciğer yüzeyinin alt görünümü Şekil 1'de gösterilmiştir. Karaciğer, komşu organların etkilerinden kaynaklanan düzensiz bir yapıya sahiptir. Karaciğer anatomisinde yaygın olarak kullanılan Couinaud sisteminde karaciğerin toplam sekiz ayrı kesite bölündüğü kesitler Şekil 2'de gösterilmiştir (Fahmy, Fong, Goyal, & Saltzman, 2005; M. K. Riaz et al., 2018).

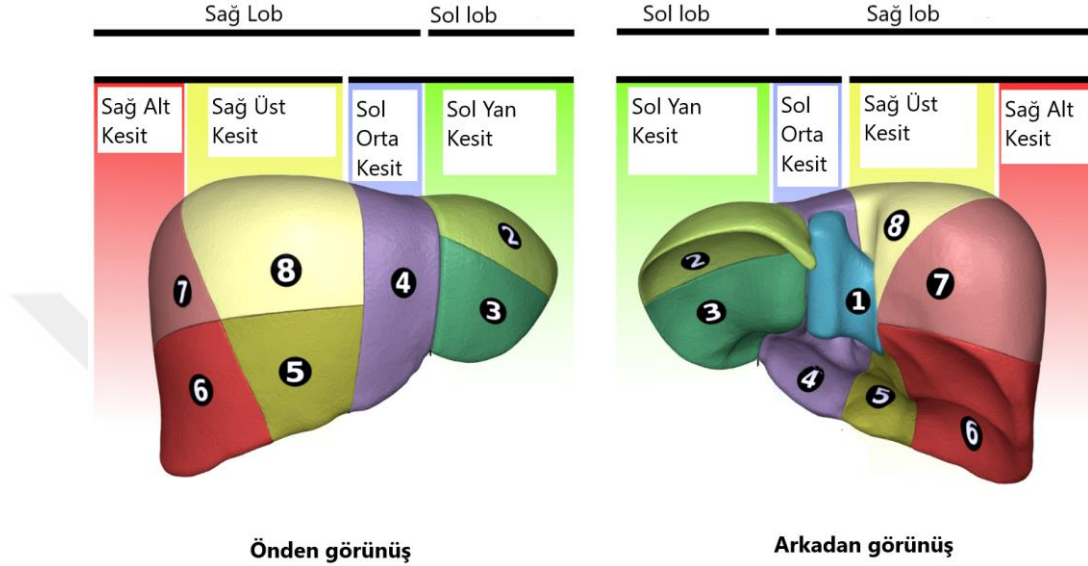


Şekil 1. Karaciğer yüzeyinin alt görünümü (Kalra, Yetiskul, & Wehrle, 2022)

Karaciğerin fonksiyonel birimi lobüllerdir. Her lobül altıgendir ve altıgenin her köşesinde bir portal triad (portal ven, hepatik arter, safra kanalı) bulunur. Lobüller fizyolojik olarak farklı apikal ve bazolateral membranlara sahip olan hepatositlerden oluşur. Fonksiyon ve perfüzyona göre hepatositler 3 bölgeye ayrılır.

1. Bölge 1: Hepatositlerin periportal bölgesi olarak kabul edilir. Oksijenli kana yakınlıklarından dolayı en iyi perfüze olan ve ilk yenilenen bölgedir. Yüksek perfüzyonu nedeniyle bu bölge; beta oksidasyonu, glukoneogenez, safra oluşumu, kolesterol oluşumu ve amino asit katabolizması gibi oksidatif metabolizmalarda büyük rol oynar.
2. Bölge 2: Hepatositlerin perisantral bölgesi olarak tanımlanır. Bölge 1 ve Bölge 3 arasında bulunur.

3. Bölge 3: Portal triaddan uzaklığı nedeniyle en düşük perfüzyona sahiptir. Bu bölge; detoksifikasyonda, ilaçların biyotransformasyonda, ketogenez, glikoliz, lipogenez, glikojen sentezi ve glutamin oluşumunda büyük rol oynar (Dillon, n.d.).



Şekil 2. Karaciğer Kesitleri (Smithuis, Robin, 2010)

Karaciğer vücuttaki hemen hemen her organ sisteminde rol oynar. Bunlar:

- Sindirim ve metabolizmaya yardımcı olmak adına endokrin ve gastrointestinal sistemlerle etkileşime girmesi,
- Yağda çözünen vitaminleri depolaması ve kolesterol homeostazını yönetmesi,
- Vücutta demiri ve bakırı depolaması,
- Pıhtılaşma faktörü ve protein sentezi ile hematolojide rol oynaması,
- Demirli bileşiklerin konjuge olmayan bilirubine parçalanmasında rol oynaması ve bu bileşikleri konjuge etmesi,
- Hormon metabolizmasında rol oynaması, üreme ve gelişmede önemli olan taşıyıcı proteinleri üretmesi,
- Yapısındaki Kupffer hücreleri ve Pit hücreleri ile vücudun immünolojik sisteminde önemli bir rol oynaması şeklindedir (Si-Tayeb, Lemaigre, & Duncan, 2010).

2.1.1 Karaciğer Fonksiyonları

2.1.1.1 Safra Üretimi

Safra, böbrekler tarafından atılmayan maddelerin atılmasına yardımcı olduğu, safra tuzları ve safra asitlerinin salgılanması yoluyla lipidlerin emilimine ve sindirimine yardımcı olduğu için vücuttaki önemli sıvılardan biridir. Safra; su, elektrolitler, safra tuzları, safra asitleri, kolesterol, safra pigmenti, bilirubin, fosfolipitlerden oluşur ve hepatositler tarafından üretilir. Safra sıvısı, hepatositlerden safra kanaliküllerine salgılanır. Buradan, ya on iki parmak bağırsağına ulaşır, ya da safra kesesinde depolanır. Safra sıvısı, on iki parmak bağırsağına salgılanmasını takiben, enterohepatik dolaşıma girer ve atılmayan safra bileşenleri, bağırsak bakterileri tarafından safra asitlerine dönüştürülerek ileumda emilerek yeniden kullanılmak üzere karaciğere geri taşınır (Ge, Du, & Mao, 2014).

2.1.1.2 Yağda Çözünür Vitaminlerin Depolanması ve/veya Metabolizması

Yağda çözünen vitaminlerin çoğu, şilomikronlar veya çok düşük yoğunluklu lipoprotein formunda bağırsak emilimi yoluyla karaciğere ulaşır. Karaciğer yağda çözünen vitaminleri depolar ve/veya metabolize eder. A vitamini, hepatik stellat hücrelerinde depolanır. D3 vitamini ise fonksiyonel formunu elde etmek için hepatik CYP-450 sistemi tarafından 25-hidroksilasyona tabi tutulur. E vitamininin alfa ve gama-tokoferol formları karaciğere uğrar. Alfa-tokoferol, karaciğerde çok düşük yoğunluklu lipoprotein veya yüksek yoğunluklu lipoprotein ile birleşir ve atılım için gama-tokoferol formunu metabolize ederken dolaşıma geri salgılanır. K vitamini ise karaciğerde depolanmaz veya metabolize edilmezken, karaciğer enzimi olarak gama-glutamil karboksilaz, pıhtılaşma faktörleri II, VII, IX, X ve protein C ve protein S'nin gama-karboksilasyonunda etkili olduğu için varlığı önemlidir (Abe et al., 2021).

2.1.1.3 İlaç Metabolizması

Karaciğerin diğer bir kritik işlevi, ksenobiyotiklerin metabolizması ve/veya detoksifikasyonudur. Karaciğer, bu maddelerin bazıları için lizozomları kullanır, ancak metabolizma ve detoksifikasyonun ana yolu biyotransformasyondur. Karaciğer, ksenobiyotikleri başlıca Faz I ve Faz II denilen iki reaksiyon yoluyla lipofilik formdan, hidrofilik forma dönüştürme işlevi görür. Bu reaksiyonlar, esas olarak hepatositlerin düz endoplazmik retikulumunda gerçekleşir. Faz I reaksiyonları, öncelikle sitokrom P450 (CYP450) enzim türevlerini kullanarak oksidasyon, indirgeme ve hidroliz yoluyla hidrofilik yapıya sahip çözünen bir molekül oluşturur. Faz II reaksiyonları,

Faz I'de oluşturulan metabolitleri kan veya safraya salgılanmak üzere daha hidrofilik hale getirmek için konjuge eder. Faz II reaksiyonlarında gerçekleştirilen konjugasyon için; glukuronat, glutatyon veya sülfata konjugasyon olmak üzere üç ana yol vardır. Bilirubin gibi glukuronata konjugasyon, düz endoplazmik retikulumda gerçekleşir. Bu reaksiyonlar sonucu üretilen metabolitlerin taşınması ise Faz III olarak tanımlanır (Si-Tayeb et al., 2010).

2.1.1.4 Bilirubin Metabolizması

Karaciğer, demirli bileşiklerin yıkımında önemli bir rol oynar. Demirli bileşikler, biliverdine parçalanır, ardından konjuge olmayan bilirubine indirgenir. Karaciğer dolaşımdan albumine bağlı konjuge olmayan bilirubini alır. Konjuge olmayan bilirubin, daha sonra hidrofilik hale gelmek için bir Faz II prosesi olan üridin difosfat glukuroniltransferaz (UGT) sistemi aracılığıyla konjugasyona uğrar. Yeni konjuge bilirubin, safra kanalikülleri yoluyla safraya salgılanır veya az miktarda kanda çözünerek daha sonra böbrekler tarafından atılmak üzere süzülür. Çoğu konjuge bilirubin safraya girer ve bağırsak duvarı tarafından emilemediği için safra ile dışkıyla atılır. Bazı bilirubinler ise, enterohepatik dolaşıma girmek üzere yeniden emilim için bağırsak bakterileri tarafından ürobilinojene veya konjuge olmayan bilirubine dönüştürülür (Benjamin D. Granta, Chelsey A. Smithb, Philip E. Castlec, Michael E. Scheurere, 2017; Stec et al., 2016).

2.1.1.5 Diğer fonksiyonlar

Karaciğer, T4'ten T3'e deiyodinasyon bölgesi olarak tiroid hormonu işlevinde rol oynar. Karaciğer; albümin, bağlayıcı globulinler, protein C, protein S gibi vücuttaki hemen hemen her plazma proteininin sentezini yönetir.

2.1.2 Karaciğer Hastalıkları

Karaciğer hastalıkları, karaciğerin herhangi bir nedenden dolayı hasarı sonucu meydana gelir ve sorunun seyri uzun sürerse kronikleşir. Karaciğer hastalığının bazı belirti ve semptomları; sarılık, hepatik ensefalopatini, trombositopeni ve koagülopati, gastrointestinal sistemde meydana gelen kanama şeklindedir (Beier & Arteel, 2021).

Yüzden fazla farklı karaciğer hastalığı türü vardır. Bunlar arasında en yaygınları:

- Fascioliasis; çoğunlukla Fasciola hepatica olarak bilinen, Fasciola cinsi bir karaciğer parazitinin neden olduğu paraziter karaciğer enfeksiyonu hastalığı,

- Çeşitli virüslerden (viral hepatit), bazı karaciğer toksinlerinden (örneğin alkolik hepatit), otoimmüniteden (otoimmün hepatit) veya kalıtsal koşullardan kaynaklanan ve karaciğer iltihabı olarak bilinen Hepatit hastalığı,
- Alkole bağlı karaciğer hastalığı, karaciğer yağlanması, alkolik hepatit ve siroz dahil olmak üzere aşırı alkol tüketiminin hepatik belirtisi olarak oraya çıkan karaciğer hastalığı,
- Karaciğer hücrelerinde büyük trigliserit yağ vakuollerinin biriktiği geri dönüşümlü hastalıklardan biri olan karaciğer yağlanması (hepatik steatoz) hastalığı,
- Karaciğere zarar veren kalıtsal hastalıklar arasında olan vücutta demir birikimini içeren hemokromatoz ve Wilson hastalığı,
- Karaciğerin ciddi nörodejeneratif veya kardiyopatik etkileri olan mutasyona uğramış bir transtiretin proteinini ürettiği ve karaciğer nakli ile tedavinin sağlanabileceği Transtiretine bağlı kalıtsal amiloidozis hastalığı,
- Hafif sarılığa neden olan ve nüfusun küçük bir yüzdesinde bulunan genetik bir bilirubin metabolizması bozukluğu olan Gilbert sendromu hastalığı,
- Viral hepatit, aşırı alkol tüketimi ve diğer karaciğer toksisitesi biçimleri dahil olmak üzere çeşitli nedenlerle ölen karaciğer hücrelerinin yerine fibröz doku (fibroz) oluşumunun gerçekleştiği ve kronik karaciğer yetmezliğine neden Siroz hastalığı,
- Safra kılcal damarlarındaki ciddi otoimmün hastalığı olan primer safra siroz hastalığı,
- Kökeninde otoimmün olduğuna inanılan safra kanalının ciddi kronik inflamatuvar hastalığı olan primer sklerozan kolanjit hastalığı,
- Hepatik venin tıkanmasının neden olduğu Budd-Chiari sendromu hastalığı,
- Birincil karaciğer kanseri en yaygın olarak hepatosellüler karsinom veya kolanjiokarsinom hastalığı (birçok karaciğer kanseri, gastrointestinal sistemdeki ve böbrekler, akciğerler gibi diğer organlardaki birincil kanserlerden metastaz yapmış ikincil lezyonlardır) şeklindedir.

2.1.2.1 Karaciğer Kanseri

Hepatosellüler karsinom (HCC=HSK), en yaygın birincil karaciğer malignitesidir ve dünya çapında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. Birincil karaciğer kanseri, karaciğer dokusunda başlayan kanserdir. Kolanjiokarsinom (safra kanalları

kanseri) ve HSK olmak üzere iki tip birincil karaciğer kanseri vardır. İkincil metastatik karaciğer kanseri ise, vücudun diğer bölgelerinden kanser hücrelerinin karaciğere metastazı ile ortaya çıkar (Balogh, 2016).

2.1.2.1.1 Kolanjiokarsinom

Kolanjiokarsinom, safra sıvısını karaciğerden ince bağırsağa boşaltan kanallarda meydana gelen karaciğer kanseridir. Birincil karaciğer kanserinin nadir görülen çeşididir.

2.1.2.1.2 Hepatoselüler Karsinoma

Karaciğer dokularında kanser hücrelerinin oluşumu olarak adlandırılan HSK, karaciğer kanserinin en yaygın türüdür ve dünya çapında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. Kronik karaciğer hastalığı, siroz, viral hepatit ve aşırı alkol alımı dünya çapında HSK oluşumu için önde gelen risk faktörleridir. Kronik viral hepatit, siroza ve/veya HSK'ya yol açabilmektedir. Kronik hepatit ölümünün dünyadaki en yaygın nedenleri ise; Hepatit B ve Hepatit C dir.

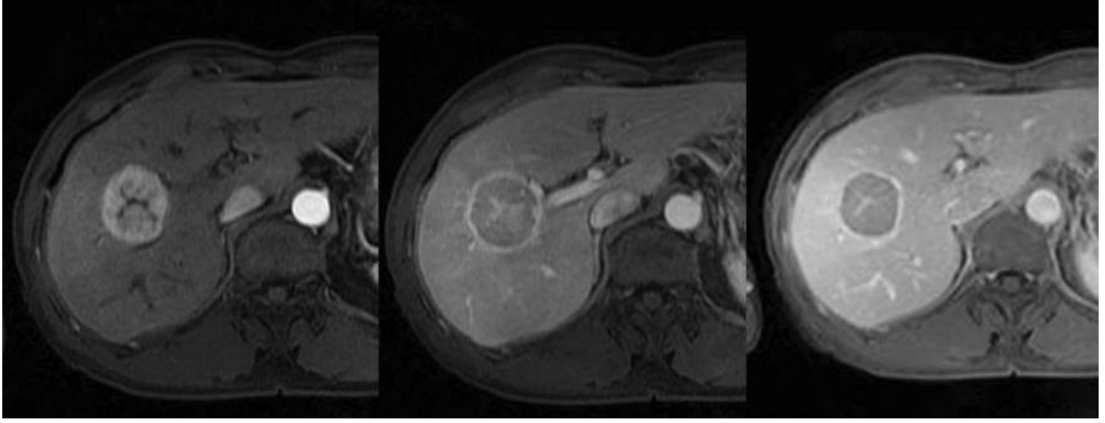
Hepatit B virüsü (HBV), çift sarmallı, sekiz genotipli (A'dan H'ye) dairesel DNA molekülüdür. A ve D genotipleri Avrupa ve Orta Doğu'da daha yayginken, B ve C genotipleri ise Asya'da daha yaygındır (Bruix & Sherman, 2011). Hepatit B, kontamine kan transfüzyonları, intravenöz enjeksiyonla yoluyla bulaşır ve dünya nüfusunun yüzde beşi hepatit B ile enfektidir. Anneden fetüse dikey geçiş, dünya çapında HBV enfeksiyonunun önde gelen nedenidir. Birkaç epidemiyolojik çalışma, kronik HBV enfeksiyonu ile önemli hepatokarsinojenite göstermiştir (International Agency for Research on Cancer (IARC), 1994). Hepatit B taşıyıcılarının HSK'ya yakalanma ihtimalleri, yaşam boyu %10-25 risk taşımaktadır (Naganuma, 2000). Genotip C; Genotip A, B ve D den daha yüksek HSK riski taşımaktadır. Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg), yalnızca hematolojik belirteç değil aynı zamanda HSK gelişimi için önemli bir risktir. HBsAg-negatif olan ve pozitif hepatit B çekirdek antikoru (anti-HBc) taşıyan hastaların HSK oluşumu riski bulunmaktadır. HBV hepatokarsinojenisitesi, hepatit B antiviral tedavisi ile önemli ölçüde azaltılabilmektedir (Hosaka, Tetsuya, Suzuki, Fumitaka, Kobayashi, 2013). HBV aşısının kullanılması ise, HBV'den kaynaklanan HSK vakasında önemli düşüşlerle sonuçlanmıştır (Chiang, Yang, You, Lai, & Chen, 2013).

Hepatit C virüsü (HCV), yüksek genetik değişkenlik gösteren küçük, tek sarmallı bir RNA virüsüdür. İzole edilen altı farklı HCV genotipi vardır (Choo et al., 1991). Batı ülkelerinde ve Uzak Doğu'da genotip I, II ve III, Orta Doğu'da ise tip IV baskındır. HCV ile enfekte olan hastaların %80'i kronik hepatit ile sonuçlanmaktadır ve ~%20'sinde siroz gelişir (Asham, Kaseb, & Ghobrial, 2013). Hepatit C hastalarında, HSK gelişimi yalnızca sirozlu karaciğerde meydana gelirken, %8'inde ise yalnızca ilerlemiş fibrozu olan hastalarda meydana gelmektedir. Sirotik bir hastada; tek başına hepatit C HSK riskini 17 kat, tek başına hepatit B 23 kat arttırmasına rağmen, hem HBV hem de HCV ikili enfeksiyon maruziyeti HSK olasılık oranı 165 kat arttırmıştır (Balogh, 2016; Gao, Fang, Zhao, Li, & Yao, 2013). HCV virüsü ile alkol kullanımında ise HSK riski 1.7 ila 2.9 kat artmaktadır (Puoti et al., 2004; Singal & Anand, 2007).

Aşırı alkol tüketimi, HSK gelişimi için önemli bir risk faktörü olmaya devam etmektedir ((IARC), 2010). Ayrıca diyabet ve obezite gibi kronik tıbbi durumlar da HSK riskini artırır. Diyabet, karaciğerin glikoz metabolizmasında oynadığı önemli rol nedeniyle karaciğeri doğrudan etkiler. Diyabetli hastalarda HSK riskinin 1.8 ila 4 kat arttığı yapılan çalışmalarda gösterilmektedir (R. J. Wong, Cheung, & Ahmed, 2014).

2.1.2.1.2.1 Hepatoselüler Karsinom Teşhis ve Tedavi Seçenekleri

HSK'da en iyi tedavi sonucunu elde etmek için erken teşhis ve teşhis yöntemleri oldukça kritiktir. Kronik hepatit, siroz gelişimine yol açar ve sirotik karaciğerler, hepatositlerin artan proliferasyonundan kaynaklanan rejeneratif nodüller sergiler. Bu rejeneratif nodüller ile HSK arasındaki ayırım, nodüllerin boyutuna göre değişebilmektedir. Saptanan ve tanımlanamayan <1 cm nodüller, 3-4 ay sonra tekrar takip edilmelidir. Saptanan >1 cm nodüller radyolojik incelemeye tabi tutulmalıdır. HSK tanısı, arteriyel fazdaki kontrast artışına ve ardından venöz fazdaki kontrastın kaybolmasına dayanır (Şekil 3).



Şekil 3. Portal venöz ve denge fazında kontrastın yıkanmasıyla birlikte arteriyel faz hipervaskülaritesinin gözlemlendiği tipik HSK görünümü

HSK tanısı; hastalarda semptomatik hale geldiğinde ve bir dereceye kadar karaciğer yetmezliği olduğunda konulabilir ve bu süreç sonunda hastalık ilerlemiş duruma gelir. Bu aşamada ise, sağkalımı arttıracak ve iyileşmeyi sağlayacak etkili bir tedavi neredeyse hiç yoktur. Şu anda, sağkalım üzerinde olumlu etkisi olabilecek hem cerrahi, hem de cerrahi olmayan çeşitli tedavi seçenekleri bulunmaktadır. En iyi sonuçlar, hastalar için uygun tedavi seçeneği dikkatlice seçildiğinde elde edilir (Forner, Reig, Rodriguez De Lope, & Bruix, 2010).

2.1.2.1.2.1.1 Cerrahi Yaklaşımlar

2.1.2.1.2.1.1.1 Ameliyat

Cerrahi parça alma (rezeksiyon), sirotik olmayan hastalar için kabul edilen tedavi seçeneğidir ve %41-74'lük 5 yıllık sağkalım ile en iyi iyileşme seçeneğini sunmaktadır (Allemann, Demartines, Bouzourene, Tempia, & Halkic, 2013). Tümörün cerrahi olarak çıkartılabilirliği; tümörün boyutuna, konumuna, altta yatan karaciğer fonksiyonuna ve kalan karaciğer hacminin morbidite ve mortaliteyi önemli ölçüde arttırmadan rezeksiyona izin verip vermeyeceğine bağlıdır. R0 rezeksiyon gerçekleştirilebildiği sürece bu tedavi, birinci basamak tedavi olarak kabul edilir (Ishizawa et al., 2008; L. L. Wong & Tsai, 2007). Geleneksel açık cerrahi ile karşılaştırıldığında, laparoskopik karaciğer rezeksiyonunun güvenli ve etkili olduğu görülmüştür ve HSK tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır (Fan et al., 1999; Torzilli et al., 1999). Rezeksiyon ayrıca ilerlemiş tümörler için birincil tedavidir ve karaciğer nakline alternatif veya köprü olarak kullanılabilir (Abdalla et al., 2008; Cha et al.,

2003). Tümörün boyutu, yeri ve karaciğer fonksiyonu ise laparoskopik ve açık rezeksiyon uygulamasındaki en büyük sınırlayıcı faktördür (Cherqui et al., 2006).

2.1.2.1.2.1.2 Karaciğer Nakli

Ortotopik karaciğer nakli, dekompanse sirozlu hastalar ve HSK için en iyi tedavi seçeneğidir. Mazzaferro ve arkadaşları, HSK tedavisi için karaciğer nakli yapılan ve Milan kriterleri olarak bilinen belirli kriterlere sahip yaklaşık 50 hastayla bir çalışma yayımlamıştır (Mazzaferro et al., 1996). Milan kriterleri, HSK tümörlerinin ≤ 5 cm veya her biri ≤ 3 cm olan üç tümörü içermekte ve çalışma sonunda %75'lik bir kısımda 4 yıllık sağkalım oranının olduğu gözlemlenen bir çalışmayı içermektedir. Kaliforniya San Francisco Üniversitesi ise; tek lezyon ≤ 6.5 cm, en büyük lezyon ≤ 4.5 cm ve toplam çapı ≤ 8 cm olan ve üç veya daha az nodül içeren HSK hastalarında yaptığı çalışmada Milan Kriterlerini kullanan hastalara benzer sağkalım ve nüks oranlarının görüldüğünü gözlemlemiştir (Gandini, Sara ;Botter, Edoardo, Iodice, Simona, Boniol, 2007). Her iki çalışmada da tümör biyolojisinden bağımsız olarak tümörün sayısı ve boyutu dikkate alınmıştır. Lokorejyonel tedaviler ise, nakil kriterlerini karşılamak için tümör yükünü azaltmak amacıyla mevcut nakil kriterlerini aşan HSK hastalarında tümörü küçültmek için kullanılmıştır (Francis, Y. Yao, Robert K., Kerlan Jr, Ryutaro Hirose, Timothy J. Davern, 2008; Llovet, Schwartz, & Fuster, 2006).

HSK'da bir tedavi seçeneği olan karaciğer naklinin en büyük dezavantajları, uzun bekleme süresi ve mevcut organların yetersizliğidir. Mevcut Birleşik Organ Paylaşım Ağı politikasına göre, HSK teşhisi konan ve Milan kriterlerine uyan hastalara *MELD puanı 22'dir. Bu durum ise >2 yıllık bir bekleme süresine neden olabilir. Ayrıca karaciğer nakli operasyonu büyük risk taşıdığı için, yalnızca mükemmellik merkezlerinde operasyonlar gerçekleştirilebilmektedir (Mancuso, 2013).

*MELD: Son Evre Karaciğer Hastalığı Modeli veya kronik karaciğer hastalığının şiddetini değerlendirmek için bir puanlama sistemidir. Başlangıçta, transjuguler intrahepatik portosistemik şant (TIPS) prosedürü geçirmiş hastalarda cerrahiden sonraki üç ay içinde sağkalım oranını tahmin etmek için geliştirilmiş fakat daha sonra karaciğer nakli ihtiyacında öncelik durumunu belirlemek için kullanılmıştır (Malinchoc et al., 2000).

- ≥ 40 : %71.3 ölüm oranı
- 30-39: %52.6 ölüm oranı

- 20-29: %19.6 ölüm oranı
- 10-19: %6.0 ölüm oranı
- <9: %1.9ölüm oranı

2.1.2.1.2.1.2 Cerrahi Olmayan Yaklaşımlar

2.1.2.1.2.1.2.1 Transarteriyel kemoembolizasyon

Lokorejyonel HSK için ve aynı zamanda kriterleri aşan tümörlerin evrelerini düşürmek için en sık kullanılan başlangıç tedavisi Transarteriyel kemoembolizasyondur (TAKE) (Takayasu et al., 2006).

TAKE'nin etkisi HSK'nın neoanjiyojenik özellikleri kullanılarak ve tümörü besleyen hepatik arteriyel beslenmesinin önüne geçilmesi ile sağlanır. Başlangıçta tümör, kan akışını portal sistemden alır. Tümörün boyutu arttıkça kan akışı arteriyelleşir ve akış çoğunlukla hepatik arteriyelden sağlanır. Hepatik arterin embolizasyonu, seçici tümör hipoksisine ve tümör nekrozuna yol açar. Kateter bazlı partikül infüzyonunun kullanılması yoluyla arteriyel kan akışında önemli bir azalma gerçekleştirilir (Lewandowski, Geschwind, Jean, Liapi, & Salem, 2011). Embolizasyon için; polivinil alkol boncukları, alkol, nişasta mikroküreleri, metalik halkalar, otolog kan pıhtıları ve jel köpüğü kullanılmıştır (Bruix & Sherman, 2011). Arteriyel embolizasyondan önce, Doks-HCl, sisplatin, mitomisin ve epirubisin gibi bir kemoterapötik ajan enjekte edilir (Naganuma, 2000). Yapılan çalışmalar TAKE ile tedavi edilen hastalarda 2 yılda %20-60 aralığında sağkalımda bir iyileşme olduğunu göstermiştir (Llovet & Bruix, 2003). Fakat, TAKE uygulaması, vasküler endotelial büyüme faktörünün salgısının artmasına yol açıp HSK'nın tekrarlama oranını yükseltebilmektedir.

2.1.2.1.2.1.2.2 Transarteriyel radyasyon

Transarteriyel radyasyon, radyoizotoplu küçük mikroküreleri kateterle doğrudan tümöre ileten bir iç radyasyon şeklidir. İtiryum-90 (Y-90) mikroküreler, iyot-131 etiketli lipiodol İtiryum-90 (Y-90) mikroküreler veya iyodin-131 etiketli lipiodol, TAKE'ye benzer bir prosedür ile uygulanır. Bu uygulamanın sirotik HSK hastalarında güvenli ve etkili olduğu gösterilmiştir (Raoul, Jean Luc, Guyader, 1997; Sangro, Carpanese, & Cianni, 2011). En sık görülen yan etkileri; yorgunluk, bulantı, kusma ve karın ağrısıdır. 2010 yılında American Association for the Study of Liver Diseases (Amerikan Karaciğer Hastalıkları Araştırmaları Derneği=AASLD) klinik uygulama kılavuzları, Y-90 cam boncuklarla radyoembolizasyon tedavisinin yaygın tümör nekrozunu indüklediğinin gösterildiğini belirtmesine rağmen, sağkalım üzerindeki

etkiyi gösteren çalışma henüz gerçekleştirilmemiştir (Bruix & Sherman, 2011; Kotsifa et al., 2022).

2.1.2.1.2.1.2.3 Perkütan Lokal Tedavi

Hem radyofrekans tedavi (RFT) hem de perkütan etanol enjeksiyonunu içeren perkütan lokal tedavi HSK'nın ameliyat için uygun olmadığı durumda uygulanan ve karaciğer tümörlerinin lokal yıkımı için tercih edilen tedavi yaklaşımıdır. Vakaların >%90'ında, <2 cm tümörlerde tam başarı göstermiştir (A. Riaz et al., 2009). Fakat bu tedavi seçeneğinin birkaç kısıtlaması vardır. Bunlar;

- >3 cm tümörler için tam nekroz başarısının düşük olması,
- büyük kan damarlarına komşu olan tümörlerin ablasyonunun oldukça zor olması,
- karaciğerin belirli bölümlerine perkütan yoldan ulaşmanın zor olması (Kesit 1),
- kesit 4'ün ablasyonu ile mesane yaralanmasının meydana gelme olasılığının yüksek olması,
- multinodüler siroza sahip karaciğerlerde, lezyonları ultrason ile hedeflemenin zor olması şeklindedir.

2.1.2.1.2.1.2.4 Mikrodalga Tedavi

Mikrodalga tedavi (MDT) hem perkütan, hem de cerrahi müdahale esnasında kullanılabilir potansiyel iyileştirici bir tedavi prosedürüdür (Lencioni et al., 2005). MDA tümör odaklarını ısıtmak ve yok etmek için >900 kHz frekanslı elektromanyetik dalgalar kullanması dışında, RFT'ya çok benzer bir yöntemdir (L. L. Wong & Tsai, 2007). Bu uygulama ile, MDT alanı içinde sıcaklıkların hızlı bir şekilde 100°C'nin üzerine çıkması sağlanır. RFT ile karşılaştırıldığında ise bitişik dokularda daha ciddi yaralanma yaratma riski taşımaktadır.

2.1.2.1.2.1.2.5 Sistemik Terapi

HSK tanısı konan hastalar çoğunlukla hastalıkta ileri evre safhasında bulunmaktadır ve tedavi protokolü olarak 2008 yılına kadar etkili bir sistemik tedavi seçeneği bulunmamaktadır. Gerçekleştirilen tedavi çalışmalarına bakıldığında ise, çoklu hedefli tirozin kinaz inhibitörlü sorafenib etkin maddesi içeren formülasyonun oral yoldan randomize iki kollu plasebo kontrollü Faz III çalışması uygulanması ile sağkalım 7.9 aydan 10.7 aya yükselerek ileri HSK için yeni tedavi profili oluşturmuştur (Bertot,

Sato, Tateishi, Yoshida, & Koike, 2011; Llovet et al., 2008). Halihazırda sorafenib, rezeksiyon veya karaciğer transplantasyonu uygulanamayan ve bölgesel tedavilere yanıt vermeyen ileri HSK hastalarına önerilmektedir (Bruix et al., 2012). Başlıca yan etkileri ise; iştahsızlık, bulantı, kusma, kilo kaybı, ses kaybı veya ses kısıklığı ve hipertansiyondur (Llovet et al., 2012). Yan etki profili nedeniyle sorafenib'i tolere etmek zor olmakta ve bu nedenle sıklıkla doz azaltılması (%54) veya tedaviye ara verilmesi (%40) gerekmektedir (Iavarone, Cabibbo, Piscaglia, & Zavaglia, 2011).

Geleneksel tedavilerde gözlenen yan etkilerin azaltılması için yenilikçi ilaç taşıyıcı sistemler ilgi çekici olmaktadır. Lipozomlar gibi nanotaşıyıcılar, hedef olmayan dokulara yönelik toksisiteyi azaltırken kemoterapötik etkisini artırma potansiyeline sahiptir. Ayrıca yüzey modifikasyonları ile hedefleyici özellik kazandırılabilme avantajları da lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerini ilgi çekici yapmaktadır (S. Yang et al., 2022).

2.2 NANOPARTİKÜLER İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER

Nanopartiküller (NP) boyutları, morfolojileri ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak sınıflandırılırlar (İbrahim Khan, Saeed, & Khan, 2019).

- Karbon Bazlı Nanopartiküller:

Fullerenler ve karbon nanotüpler (CNT'ler), karbon bazlı NP'lerin iki ana sınıfını temsil eder. Fullerenler, karbonun allotropik formları gibi küresel içi boş kafesten yapılmış nanoyapıyı içerir (Astefanei, Núñez, & Galceran, 2015).

- Metal Nanopartiküller:

Gelişmiş optik özellikleri nedeniyle metal NP'ler birçok araştırma alanında uygulama bulmaktadır. Altın NP kaplama, yüksek kaliteli SEM görüntüleri elde etmeye yardımcı olan elektronik akışı geliştirmek için SEM örneklemeinde yaygın olarak kullanılır.

- Seramik Nanopartiküller:

Seramik NP'ler; inorganik, metalik olmayan katılardır. Amorf halde bulunabilirler, polikristal, yoğun, gözenekli veya içi boş formlar halinde elde edilirler.

- Polimerik Nanopartiküller:

Organik yapıdadırlar. Çoğunlukla nanoküreler veya nanokapsüller şekillidirler (Mansha, Khan, Ullah, & Qurashi, 2017).

Lipit bazlı Nanopartiküller:

Polimerik NP'ler gibi, lipit NP'ler katı bir çekirdeğe sahiptir ve lipitten oluşan bu matris, çözünür lipofilik molekülleri içerir. Yüzey aktif maddeler veya emülgatörler ise NP'lerin dış çekirdeğini stabilize etmek için formülasyona dahil edilirler. Lipozomlar, Niozomlar ve Katı Lipit NP ler bu sınıfta yer almaktadır (García-Pinel et al., 2019).

NP'lere etkin maddelerin yüklenmesi ile, ilaçların terapötik etkinliğinin artması, yan etkilerin azalması ve hasta uyuncunun artması ile sonuçlanan bir çok çalışma yapılmıştır. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, ilaç etkinliğini en üst düzeye çıkarmaya ve sitotoksiteyi en aza indirmeye odaklanan ve son yıllarda ilgi çekici hale gelen ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, etkin maddelerin yarı ömrünü arttırarak, bazı hidrofobik etkin maddelerin çözünürlüğünü arttırarak ve etkin maddeleri kontrollü veya sürekli salarak etkinliğini arttırabilmektedir. Son on yıldır nanopartiküler sistemleri içeren nanoteknoloji; hastalık teşhisinde ve tedavisinde üzerinde oldukça çalışılan uygulamaları içermektedir. Özellikle kanser tedavisindeki tümör hedefleme uygulamaları ilgi çekici çalışmalar ve sonuçlarını içermektedir (Dang & Guan, 2020).

2.2.1 Kanser Tedavisinde Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerde spesifik boyutlar, şekiller ve yüzey özellikler nano-ilâç taşıyıcılık verimliliği üzerinde büyük bir etkiye sahiptir ve dolayısıyla terapötik etkinliği kontrol eder (Bahrami et al., 2017). 10 ilâ 100 nm çap aralığındaki nanopartiküller (NP), ilaçları etkili bir şekilde iletebildikleri ve artırılmış geçirgenlik ve tutma (EPR) etkisi sağlayabildikleri için genellikle kanser tedavisi için etkili kabul edilmektedir. Daha küçük partiküller normal damar sisteminden kolayca sızabilmekte (<1–2 nm) ve normal hücrelere zarar verebilmekte, ayrıca böbrekler tarafından filtrelenerek vücutta uzaklaştırılabilmektedirler (<10 nm). 100 nm'den büyük partiküllerin ise dolaşımdan fagositler tarafından temizlenmesi muhtemeldir (Venturoli & Rippe, 2005). Ayrıca, NP'lerin yüzey özellikleri biyoyararlanımlarını ve yarı ömürlerini etkileyebilir. Örneğin polietilen glikol (PEG) gibi hidrofilik moleküllerle kaplanmış NP'ler Retiküloendotelial Sistem (RES) organları tarafından uzaklaştırılmanın önüne geçer (R. Yang et al., 2018). Bu nedenle, NP'ler genellikle hidrofilik olacak şekilde modifiye edilir, böylece dolaşımdaki süre artar, tümörlerde

penetrasyon ve etkin madde birikimi artar. Kanser tedavisinde kullanılan nanopartiküller;

- 1.) Hibrit NP: Lipit-Polimer Hibrit NP, Organik-İnorganik Hibrit NP
- 2.) İnorganik NP: Altın NP, Karbon Nanotüp, Silika NP, Manyetik NP, Quantum dot
- 3.) Organik NP: Polimer Kaplı NP, Dendrimerler, Lipozom bazlı NP

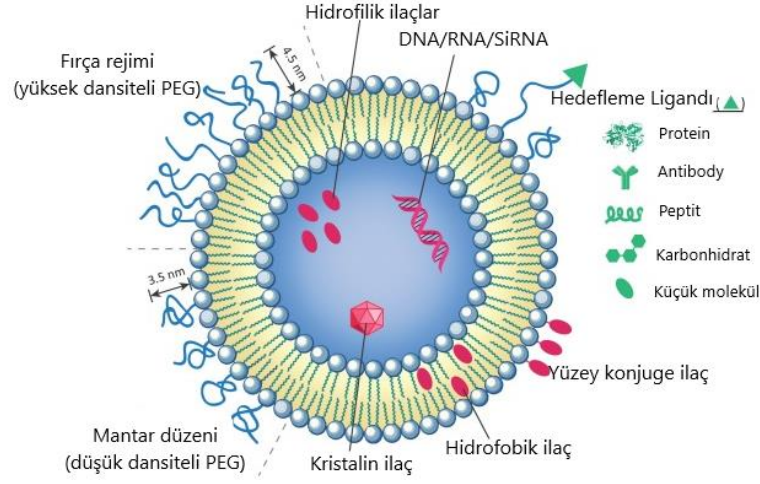
şeklinde sınıflandırılabilir (Z. Li, Tan, Li, Shen, & Wang, 2017; Yao, Zhou, & Liu, 2020).

Klinik uygulama için onaylanan ilk nano ölçekli ilaç taşıyıcı sistem ise, Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerdir (Yao et al., 2020; Zylberberg, Matosevic, Zylberberg, & Matosevic, 2016).

2.2.2 Lipozomal İlaç Taşıyıcı sistemler

Alec D. Bangham'ın 1965'te lipozomları keşfetmesinden bu yana; lipozomlar, ilaç moleküllerini enkapsüle ederek çeşitli hastalıkları tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan ilaç taşıyıcı sistem haline gelmiştir (Dua, 2012). Lipozomların birincil bileşeni olarak kabul edilen lipitler ve yağ asitleri; hücre zarlarının doğal yapılarında bulunmaları nedeniyle biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir olarak kabul edilen yapılardır (Scherphof, 1987). Yapısal olarak, lipozomlar, hidrofilik baş gruplarının sulu dış ortama yöneldiği, hidrokarbon zincirlerinin ise hidrofobik iç kısımda kendiliğinden bir araya geldiği iki katmanlı bir küre şeklindeki molekül olarak tanımlanır (Blomme, 2008). Lipozomların sahip olduğu bu karakter onları farklı polaritelerdeki moleküller için ideal ilaç taşıyıcı sistemler haline getirmiştir. Farklı türdeki moleküller için uygun taşıyıcılar oldukları için, lipozomlar çok yönlü ilaç taşıyıcı sistemler olarak ilgi çekmektedir (Şekil 4).

İlaç moleküllerinin lipozomal enkapsülasyonu; antikanser ilaçlar, antibakteriyel ve mantar önleyici ilaçlar için sistemik toksisiteyi azaltır ve tolere edilebilir doz rejimlerini iyileştirir. Lipit kimyası, lipozomların farmakokinetik, farmakodinamik özellikleri, salım kinetiği, stabilite ve ilaç enkapsülasyonunu optimize etmede oldukça kritik öneme sahiptir.



Şekil 4. Lipozomal ilaç taşıyıcı sistem tasarımları.

Lipozomların yüzeyleri Polietilen glikol (PEG) molekülleri ile pegile edilebilir, antikörler, peptitler, proteinler, karbonhidratlar gibi hedefleme ligantları kullanılarak reseptör aracılı endositoz yolu ile hedefleme amacı ile modifiye edilebilir. PEG dansitesi lipozom yüzeyinin yapısını belirler; dansitesi %9'un altında mantar benzeri küresel bir yapı gözlenirken ve %9'un üzerindeki daha sert ve fırçası bir yapı sergiler. Kemoterapötikler veya teşhis sağlayan ligantlar, sulu lümen içine kapsüllenebilir, lipit çift tabakasına dahil edilebilir veya lipozom yüzeyine konjuge edilebilir (Noble, Stefanick, Ashley, Kiziltepe, & Bilgicer, 2014).

2.2.2.1 Lipozomların Sentezi ve Karakterizasyon metodolojisi

2.2.2.1.1 Lipozomların Sınıflandırması

Lipozomal veziküllerin enkapsülasyon kapasitesini ve dolaşım süresini etkileyen iki önemli özelliği boyutları ve lipit çift tabaka sayılarıdır. Sentez yöntemi ise, elde edilen lipozomların çeşidini belirlemektedir. Lipozomlar, tek katmanlı membranlı unilameller veziküller (ULV'ler), 2-5 çift katmanlı membranlı oligolameller veziküller (OLV'ler) ve beş veya daha fazla çift katmanlı membranlı multilameller veziküller (MLV'lar) olarak sınıflandırılır. ULV'lar ise küçük tek lamelli veziküller (20–100 nm çapında, SUV'lar), büyük tek lamelli veziküller (100 nm-1 mm, LUV'lar) ve çok büyük tek lamelli veziküller (>1 mm, GUV'lar) olarak sınıflandırılmaktadırlar. SUV'lar, homojen ilaç enkapsülasyonu, vücutta daha uzun süren sirkülasyon süreleri ve uzatılmış salım kinetiği sergiledikleri için en yaygın olarak kullanılan ilaç taşıyıcı sistemlerdir (Akbarzadeh, Rezaei-sadabady, Davaran, Joo, & Zarghami, 2013; Vemuri & Rhodes, 1995).

2.2.2.1.2 Lipozomların Üretim Teknikleri

Lipozomların sentezi; ince film hidrasyon tekniği, ters faz evaporasyon tekniği, enjeksiyon tekniği, deterjan uzaklaştırma tekniği, dehidrasyon-rehidrasyon tekniği, pH yükseltme tekniği, kaplı kollaidal parçacık ile hidrasyon tekniği, donma çözem tekniği ile gerçekleştirilebilir (Akbarzadeh et al., 2013; Has & Sunthar, 2020).

2.2.2.1.2.1 İnce Film Hidrasyonu Tekniği

Lipozom sentezi için kullanılan en yaygın yöntem ince film hidrasyonudur. Bu yöntemde, lipitler ve amfifilik moleküller organik bir çözücü içinde karıştırılır ve çözündürülür. Karışım yuvarlak tabanlı cam balona aktarılır ve çözücü, döner bir buharlaştırıcı kullanılarak vakum altında buharlaştırılır ve geriye ince lipit filmi kalır. İnce film daha sonra, kapsüllenmesi istenen bir veya daha fazla hidrofilik ilacı içerebilen bir çözelti ile ıslatılır. Hidrasyon tamponunun sıcaklığı, lipitin jel-sıvı faz geçiş sıcaklığının (T_m) üzerinde olmalıdır. Lipit filminin ıslatılması için kullanılan sulu çözeltinin hacmi, oluşan lipozomların özelliklerini etkiler; büyük hacimler MLV'lerin oluşumuna yol açarken, hidrasyon hızı ilacın enkapsülasyon etkinliğini belirlemektedir. Hidrasyon hızı ne kadar yavaş olursa, enkapsülasyon verimliliği de o kadar yüksek olmaktadır (Šturm, 2021).

Lipozomların vezikül boyutu, dağılımı ve katmanlılığı, yapının; belirli gözenek boyutlarına sahip porlardan geçirilmesi ile ekstrüzyonla ya da ultrasonik dalgaların frekansına belirli bir süre maruz bırakılması optimize edilebilmektedir (Francisco & Francisco, 1979). Çözelti sıcaklığını lipitin T_m 'sinin üzerinde tutmak için ceketli bir ekstrüder veya su banyosu kullanılabilir. Sonikasyon, SUV'ler üretmek için daha kolay ve daha uygulanabilir olmasına rağmen, özellikle büyük hacimlere ihtiyaç duyulduğunda, ekstrüzyonla üretilenlere kıyasla daha düşük etkin madde enkapsülasyon verimliliğine sahip ve daha az üniform lipozomların oluşmasına neden olabilmektedir. Ayrıca sonikasyon sırasında açığa çıkan ısı veziküler yapının bozulmasına neden olup stabilitesi düşük ilaçların bozulmaya uğramasına neden olabilmektedir.

2.2.2.1.2.2 Ters Faz Evaporasyon Tekniği

Ters faz evaporasyon, proteinler ve nükleik asitler gibi büyük moleküllerin ve büyük sulu hacimlerin enkapsülasyonunu sağlayan, LUV ve MLV karışımı lipozomların üretilmesini sağlayan bir tekniktir. Bu yöntemde, lipitler ve amfifilik moleküller önce organik bir çözücü içinde karıştırılır, daha sonra karışıma sulu bir tampon içerisinde

ardından sonikasyon yoluyla yapılır, etkin madde sulu çözeltiye eklenebilir ve formüle edilmiş kesecikler ile karıştırılabilir (Shew & Deamer, 1985).

2.2.2.1.2.6 pH Yükseltme Tekniği

Bu yöntem, organik çözücülerin kullanımını engellemekle birlikte aynı zamanda hızlı bir lipozom hazırlama yöntemidir. Fosfatidik asit'in sulu çözeltisinin pH'sında kısa bir süre (<2 dakika) içerisinde 3.5 kat artış (3'ten 10.5-11'e) yapıldığında SUV'lar oluşmaktadır. Aynı yöntem fosfatidik asit ve fosfatidilkolin karışımına uygulandığında, fosfatidik asit : fosfatidil kolin oranı ne kadar yüksekse elde edilen SUV yüzdesi de o kadar yüksek bulunmaktadır (Hauser & Gains, 1982).

2.2.2.1.2.7 Kaplı Kolloidal Parçacık ile Hidrasyon Tekniği

Bu yöntem ile kaplı kolloid parçacıklar kullanılarak tek adımda SUV'lar (<100 nm çapında) üretilebilir. Organik bir çözücü içinde çözünen lipitler ve amfifilik moleküller, bir kapiler sistem içinde kaplanmış asimetrik alüminyum parçacıkları üzerinde kurutulur ve daha sonra sulu bir tamponla hidratlanır. Kapsüllenmesi istenen etkin madde ise, hidratlama tamponuna eklenebilmektedir (Sundar & Tirumkudulu, 2014).

2.2.2.1.2.8 Donma-Çözme Tekniği

Donma-çözme döngüleri veziküler yapıdaki katmanlı veziküllerin oluşumunu homojen hale getirmek için lipozom sentezine dahil edilebilecek bir adımdır. Bu teknik, herhangi bir lipozom hazırlama yöntemiyle kullanılabilir (Cruz et al., 2012). Örneğin, ince film hidrasyonundan sonra çözelti oda sıcaklığında sonikasyona tabi tutulabilir, sıvı nitrojen içinde -196°C'de dondurulabilir ve oda sıcaklığında ya da lipit faz dönüşüm sıcaklığında erime döngüsüne maruz bırakılabilir. Bu aşamalarda lipozomal dispersiyon eridikçe veziküller birleşerek LUV'ları oluşturur. Amaçlanan sonuçlara ulaşmak için 10'a kadar donma-çözülme döngüsü kullanılabilir. Eğer daha küçük veziküller partiküller amaçlanmışsa elde edilen dispersiyon tekrar oda sıcaklığında sonikasyona tabi tutulabilir. Bu teknik, yüksek konsantrasyonlarda lipit kullanıldığında optimal değildir. Bu teknik kullanarak, enkapsülasyon kapasitesinin %20-30 oranında arttırıldığı çalışmalarda gösterilmektedir (Biochemistry, 1981).

2.2.2.1.3 Lipozom Karakterizasyon Yöntemleri

Bir lipozom formülasyonunun etkinliğini tanımlayan temel karakterizasyon yöntemleri arasında; lipozomal ilaç taşıyıcı sistemin partikül boyutu, zeta potansiyeli,

enkapsülasyon kapasitesi etkinliği, etkin madde salım profili, stabilite bulguları ve farmakokinetiği gelmektedir. Lipozomların boyut ve zeta potansiyeli formülasyonun bileşimi ve hazırlanma tekniği ile yakından ilişkilidir. Lipozom formülasyonunun etkin madde enkapsülasyon kapasitesi ve stabilitesi, etkin maddenin vücut sirkülasyonu sırasında ilgili hücreye herhangi bir sızıntı olmadan ilerlemesini kanıtlamak açısından oldukça önemlidir. Örneğin; hedeflendirilmiş bölgede etkin madde salımı isteniyorsa; erken etkin madde salımı, istenmeyen “hedef dışı” etkilere neden olabilir. Lipozomun farmakokinetiği, etkin maddenin biyolojik dağılımı ve dolaşım süresi ile açıklanır. Özetlemek istenirse; lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerde etkin maddenin hedef bölgeye taşınması yeteneği; formülasyonun enkapsülasyon kapasitesi, stabilitesi, salım mekanizması, dolaşım süresi ve biyolojik dağılım ile birlikte karakterize edilir.

2.2.2.1.3.1 İlaç enkapsülleme derecesi ve salım

Enkapsülasyon kapasitesi, formülasyon sırasında lipozoma dahil edilen etkin madde miktarının bir ölçüsüdür. Toplam etkin madde miktarından, serbest etkin madde miktarının çıkarılıp başlangıçta eklenen toplam etkin madde miktarına bölünmesiyle tanımlanır. Enkapsülasyon kapasitesi, etkin maddenin kimyasına bağlı olarak farklı yöntemler kullanılarak belirlenebilir. Çözeltideki etkin maddenin konsantrasyonu; spektrofotometrik, kromatografik, florometrik veya radyolojik olarak belirlenebilir (Akbarzadeh et al., 2013).

Etkin madde salım karakterizasyonu genellikle bir diyaliz yöntemi kullanılarak *in vitro* olarak gerçekleştirilir. Bu çalışma için lipozomlar, etkin maddenin zardan geçmesine izin veren fakat lipozomal yapıları içeride tutacak moleküler ağırlığına (cut-off) sahip, önceden ıslatılmış diyaliz torbalarının içine yerleştirilir. Farklı zaman noktalarında etkin madde miktarı ölçülerek salım mekanizmaları gözlemlenir. Bu çalışma, etkin maddenin lipozom formülasyonlarından salınma hızının da bir göstergesidir. Fakat *in vivo* etkin madde salımında etkin maddenin, kan sirkülasyonundaki seyrelmeden, pH'dan, kan plazma proteinlerinden, hücre sıvılarından ve kan sirkülasyonun türbülanslı akışlardan etkilenebileceği de unutulmamalıdır.

2.2.2.1.3.2 Boyut, zeta potansiyeli ve stabilite

Lipozom formülasyonların stabilitesi, klinik kullanımdaki potansiyel etkinliğin önemli bir göstergesidir. Genellikle bir lipozom formülasyonun stabilitesi, lipozomların çeşitli

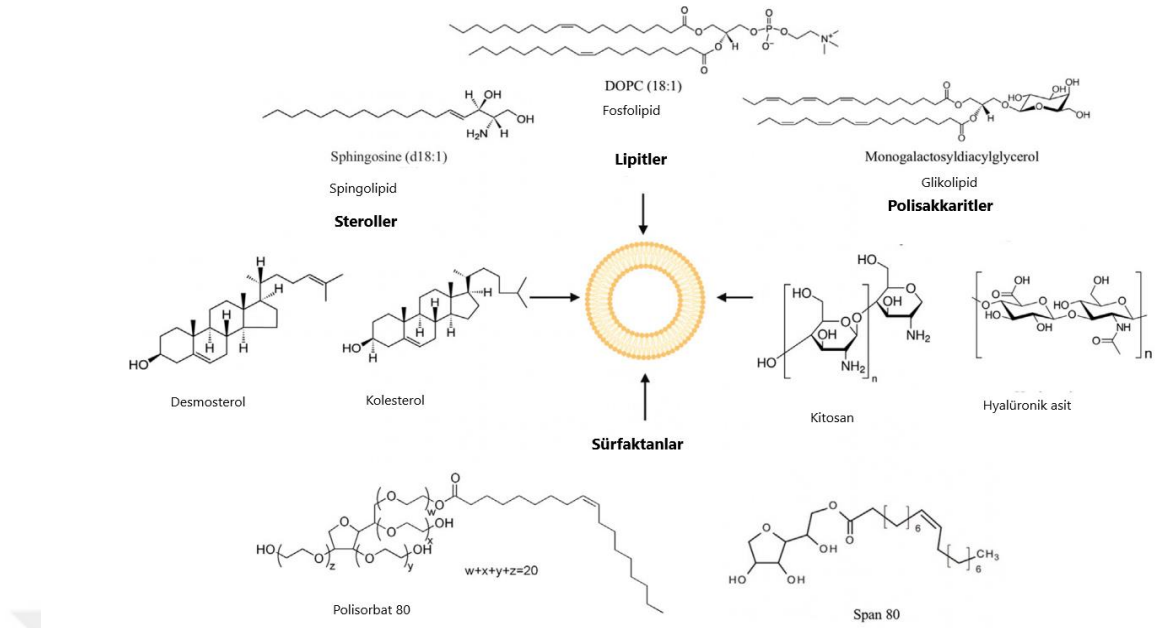
zaman noktalarında (örn., günler, haftalar veya aylar) fiziksel çalışmaları yapılarak, ilaç sızıntısı analizlenerek ve nanopartikül boyutu ölçülerek değerlendirilir.

Bir lipozom formülasyonunun fiziksel instabilitesi, zamanla partiküllerin agregasyonu ve lipid zarının fiziksel degradasyonunu içerir. Lipozomların çap ve yüzey yükü, sırasıyla dinamik ışık saçılımı (DLS) ve faz analizi ışık saçılımı (PALS) kullanılarak belirlenebilir (P. Singh et al., 2019).

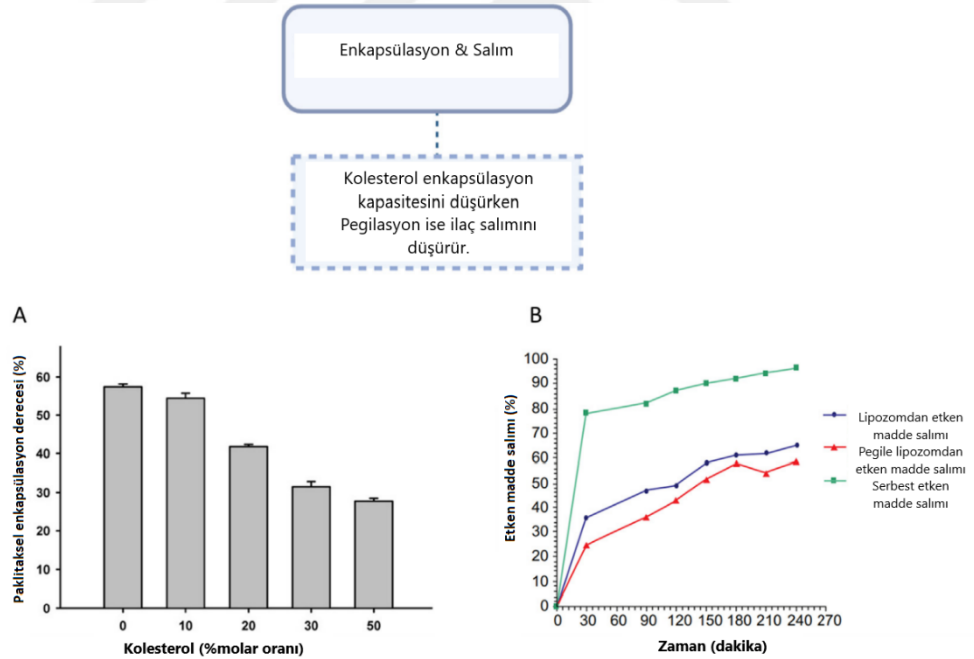
Lipozomların mekanik özelliklerini ölçmek ise Atomik kuvvet mikroskobu (AFM), Young modülü kullanılabilir. Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ise, lipid zarının yapısını analiz etmek ve degradasyonun gerçekleşmediğinden emin olmak adına kullanılır (Biochemistry, 1981). Liyofilizasyon, lipid oksidasyonunu azaltarak raf ömrünü uzatmak için kullanılır. Bu teknikler, lipozom formülasyonunun raf ömrü boyunca çeşitli zaman noktalarında uygulanabilir; ilk zaman noktalarındaki büyük sapmalar, formülasyonun instabilite problemleri oluşturacağını gösterebilmektedir.

2.2.2.2 Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistem Bileşenleri

Lipozomların bileşiminde doğal veya sentetik lipidler, polisakkarit, steroller veya yüzey aktif maddeler bulunmaktadır (Şekil 5). Lipozom formülasyonu yapılarında bulunan bileşenlerin de etkisi ile artmış enkapsülasyon kapasitesi, artmış doku hedefleme, uzun süreli kan sirkülasyonu, hedef olmayan dokularda azaltılmış ilaç toksisitesi ve stabilite artışı sağladığı yapılan çalışmalarca gösterilmiştir (Şekil 6, Şekil 7).



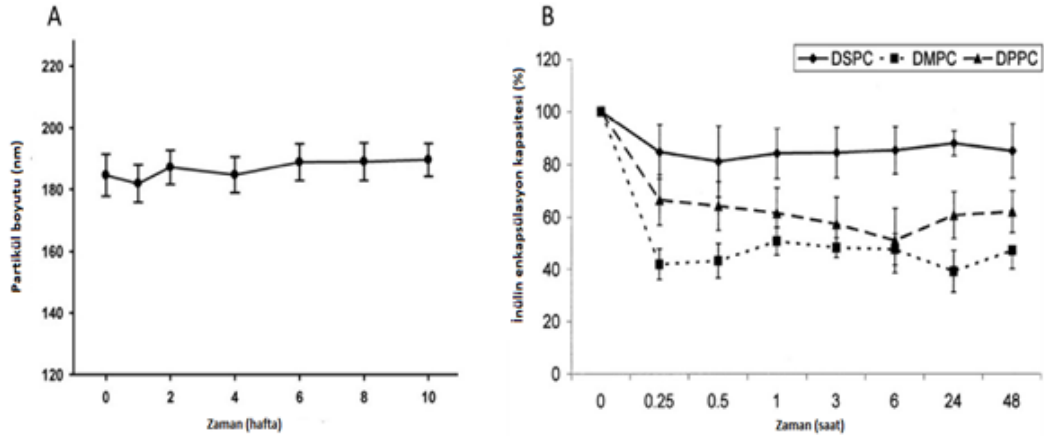
Şekil 5. Lipozomların bileşimi



Şekil 6. Kolesterol ve PEG içeren lipozomal ilaç taşıyıcı sistemin enkapsülasyon kapasitesi ve salım profiline etkileri (T. Yang et al., 2008). A. Kolesterol-% Enkapsülasyon kapasitesi ilişkisi. B. Etkin madde salım profili.



Yüksek T_m derecesine sahip lipitler ve kolesterol lipozom stabilitesini artırır.



Şekil 7. Lipozom bileşiminin stabiliteye etkisi. (A) Kolesterol, lipozomal ilaç taşıyıcı sistemin yapısal stabilitesini artırarak lipozom boyutunun 10 hafta boyunca stabil kalmasını sağlamıştır. (B) DSPC ve DPPC gibi daha yüksek T_m'ye sahip lipitler, daha düşük T_m lipitlerine göre lipozomal stabiliteyi arttırmıştır (Anderson & Omri, 2004; Gregory Gregoriadis, 1979).

2.2.2.2.1 Doğal Lipitler

Lipitler, hidrofilik bir baş grubu ve hidrofobik hidrokarbon kuyruğunu içeren bir yapıya sahiptir. Baş grup; negatif yüklü, pozitif yüklü veya zwitteriyonik (hem negatif hem de pozitif yüke sahip) özellikte olabilir. Baş gruplar diğer moleküllerle konjugasyona izin vermek için kimyasal olarak modifiye edilebilir. Örneğin, fosfatidiletanolamin, genellikle amin grubu aracılığıyla polietilen glikole konjuge edilir. Yüklü lipozomlar elektrostatik olarak birbirini ittiği için stabiliteyi arttırdığından baş grubun yükü önemlidir. Hidrofobik kuyruklar ise doymuş veya doymamış, kısa açıl zincir veya uzun açıl zincir, simetrik veya asimetrik olabilir. Lipitlerin iskelet yapısı genellikle bir fosfat, gliserol veya sfingosin grubundan oluşur. Bu ayırt edici kimyasal özellikler, lipit tabakası, pH değişimlerine gösterilecek tepki, stabilite, etkin madde enkapsülasyon kapasitesi, etkin madde salımı ve lipozomların diğer fiziksel davranışlarını değiştirmektedir.

2.2.2.2.1.1 Fosfolipitler

Fosfatidilkolin (PC) ve Polietilen (PE) gibi doğal lipitler, memelilerin hücre zarlarında bulunan en yaygın fosfolipitlerdir. Gliserofosfolipitler, yani bir gliserol iskeletine sahip lipitler, ökaryotik hücrelerde baskın fosfolipitlerdir. Yumurta fosfatidilkolini (EPC) ve yumurta fosfatidilgliserolü (EPG) canlı dokulardan elde edilir ve lipit bileşenlerinin bir karışımından oluşurlar. Diğer doğal lipitler ise canlı organizmalardan elde edilir ve ardından, saf bir lipit bileşimi oluşturacak şekilde saflaştırılır (Arun K. Katragadda, 1999).

Lipit bileşimi, açıl zincirinin doygunluk derecesi ile tanımlanabilir. Uzun, doymuş açıl zincirli (yüksek T_m) PC'lerden oluşan lipozomlar, kısa ve doymamış açıl zincirli (düşük T_m) PC'lere sahip formülasyonlara kıyasla *in vivo* ortamda daha yüksek stabilite göstermiştir (Amarnath Sharma, 1997). Endojen lipitlerden oluşan veziküllerin ise, yüksek biyoyumluluğu sayesinde hücre zarlarını taklit etme yetenekleri yüksektir ve terapötik uygulamalar için idealdir.

2.2.2.2.1.2 Sfingolipitler

Sfingolipitler, ağırlıklı olarak memeli hücre zarlarında bulunan diğer doğal lipit türüdür. Sfingolipitler hücre zarı yapısında düzenleyici sinyal molekülleri olarak kritik bir rol oynayan 18 karbonlu bir amino-alkol sfingosin iskeletinden oluşur. Yapılan çalışmada; sfingolipitlerden biri olan sfingomiyelin'in lipozomal formülasyonlara dahil edilmesi sonucunda, etkin maddenin kandaki dolaşım süresinin artması ile terapötik etkinliğin ve *in vivo* stabilitenin arttığı gözlemlenmiştir (Webb, Harasym, Masin, Bally, & Mayer, 1995). Seramidler ise bir sfingosin ve tek bir yağ asidinden oluşan bir tür sfingolipittir. Seramidlerin lipozomal formülasyonlara dahil edilmesi, dermal hücrelerle membran akışkanlığını ve füzyon yeteneklerini arttırmaktır (Tokudome et al., 2009).

2.2.2.2.1.3 Steroller

Steroller, neredeyse tüm canlı organizmalarda bulunan doğal lipit molekülleri sınıfıdır. Sterollerin üç alt türü vardır bunlar; bitkilerde bulunan fitosteroller, hayvanlarda bulunan zoosteroller ve mikroorganizmalarda bulunan mikosterollerdir. Kolesterol memeli hücre zarlarında bulunan endojen amfifilik özellikte bir zoosteroldür. Kolesterol, hücre zarı içinde lipit katmanlarının zar bütünlüğünü ve işlevselliğini düzenleme süreçlerinde önemli bir rol oynar.

Kolesterolün lipozomal formülasyonlara dahil edilmesi ile, in vivo stabilite artar, lipit çift tabakası boyunca etkin madde sızıntısını azalır ve kontrollü etkin madde salımı gerçekleşir. Lipozomal formülasyonlara %20-50 mol kolesterolün dahil edilmesi, kolesterol içermeyen formülasyonlara kıyasla in vivo stabilitenin artmasına neden olmuştur. Kolesterol içeren lipozomlar kan sirkülasyonunda 6 saatten fazla stabil kalırken, kolesterol içermeyen lipozomların sadece birkaç dakika stabil kaldığı gözlemlenmiştir (Briuglia, Maria-Lucia, Lamprou & A., 2015; Tokudome et al., 2009).

2.2.2.2.1.4 Polisakkaritler

Polisakaritler, glikozidik bağlarla bağlanmış monosakaritlerden oluşan uzun zincirli polimerik karbonhidratlardır. Hücresel iletişimde önemli bir rol oynarlar, hücre ve doku tanıma süreçlerine ve ayrıca hücre içine alım mekanizmalarına yardımcı olmak için hücre zarlarında bulunurlar. Lipit zarının oligosakkaritler veya polisakkaritler ile kaplanması, lipozomları hücre reseptörlerine hedefleyebilir veya dolaşımı uzatabilir. Polisakkaritler; biyouyumlu, antiviral, anti-bakteriyel ve anti-tümör özellikleri ile ilaç taşıyıcı sistemlere avantaj sağlayacak özelliklere sahiptirler. Vücudun mukozal yüzeyleri polisakkarit tanıma için iyi bir hedeftir, bu nedenle nazal, pulmoner, peroral ve gastrointestinal epitel yolları, polisakkarit kaplı lipozomlarla hedefleme üzerinde en çok çalışan bölgelerdir. Lipozomal formülasyonlarda kullanılan popüler polisakkaritler, kitosan ve hyaluronandır (Lemarchand, Gref, & Couvreur, 2004).

2.2.2.2.2 Sentetik Lipitler

Sentetik lipitler, doğal olarak oluşmayan, canlı kaynaklardan türetilen, ticari olarak sentezlenen lipozom bileşenleridir. Bu moleküller endojen olmasa da biyolojik ve yapısal olarak doğal lipitlere benzerler, yüksek biyouyumluluk sergilerler ve yüksek saflıkta sentezlenirler. Yaygın olarak kullanılan sentetik lipitler arasında; fosfatidilkolinler (Hidrojen soya fosfatidilkolin (HSPC)), 1,2-dioktadekanoil-sn-gliserol-3-fosfokolin (DSPC), fosfatidiletanolaminler, 1,2-dioleoil-sn-gliserol-3-fosfokolin (DOPC), 1,2-dioleoil-sn-gliserol-3-fosfoetanolamin (DOPE) fosfatidilgliserol (DOPG) ve dioleoil gibi fosfatidilgliseroller bulunur. Sentetik lipitler, saflıkları, ticari olarak tedarik edilebilirlikleri, kimyasal işlevleri ve maliyet nedeniyle genellikle doğal lipitler yerine tercih edilirler (Zylberberg et al., 2016).

2.2.2.2.3 Sürfaktanlar

Sürfaktanlar, içinde bulundukları sıvının yüzey gerilimini azaltan moleküller olarak sınıflandırılır. Fakat sürfaktanların, lipozomal nanopartiküllerin lipit çift tabakasını instabil haline getirebilme ve böylece veziküllerin deforme olabilirli ini arttırabilme özelliklerine de sahiptirler. Lipozomlarda sürfaktan kullanımının; anti-kanser (Paula et al., 2016), anti-fungal (Dorrani, Garbuzenko, Minko, & Michniak-kohn, 2016) ve transdermal uygulamalarda permabilit yi arttırdığı gözlenmiştir. Sık kullanılan sürfaktanlar; sodyum kolat, Span 60, Span 80, Tween 60 ve Tween 80 dir. Sürfaktanların yükü, terapötik etkinliği arttırmak için de kullanılabilir. Örneğin, pozitif zeta potansiyeline sahip sodyum kolat kullanmak, DNA gibi negatif yüklü bileşenlere elektrostatik olarak bağlanmayı sağlamaktadır. Sürfaktanın tipi ve konsantrasyonu da, lipozomal ilaç taşıyıcı sistemin terapötik etkinliğini arttırmak için kullanılabilir. Sürfaktanın tipi ve konsantrasyonu da, lipozomal ilaç taşıyıcı sistemin terapötik etkinliğini arttırmak için kullanılabilir.

2.2.2.3  şlevsellik yönünden Lipozomların  e itleri

2.2.2.3.1 Konvensiyonel Lipozomlar

Konvensiyonel lipozomlar, geliştirilmiş ilk nesil lipozomlardır. Katyonik, anyonik veya nötr (fosfo)lipitlerden ve kolesterolden oluşan lipit çift tabakası ve sulu kısmı içerirler ( ekil 8). Konvensiyonel lipozomların klinik potansiyeli üzerine araştırmalar 1980'lerde ba lamı  ve böylece lipozomal taşıyıcı sistemlerde Doks-HCl ve amfoterisin gibi enkapsüle edilmiş etkin maddelerin terapötik indeksini geliştirme çalışmaları hızlanmıştır (Sercombe, Veerati, Moheimani, & Wu, 2015).

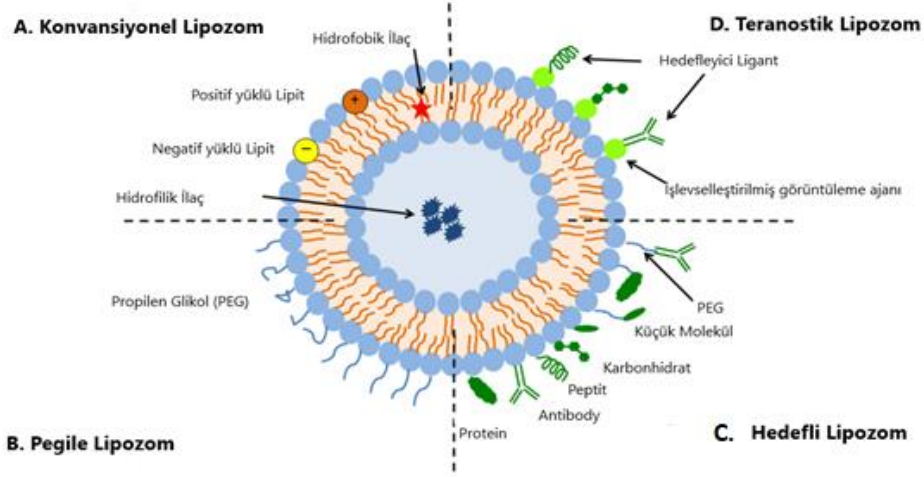
Konvensiyonel lipozomal ilaç taşıyıcı sistem formülasyonları ile farmakokinetik ve biyolojik dağılım değiştirilerek serbest ilaca kıyasla hedef dokuya ilaç taşınması artmış ve in vivo toksisite azalmıştır. Fakat lipozomal ilaç taşıyıcı sistemin kan dola ımından hızlı bir şekilde uzaklaştırılması terapötik etkinliğini sınırlamaktadır (A. Gabizon, Goren, Horowitz, & Tzemach, 1997). Bu hızlı klirens, plazma bileşenlerinin opsonizasyonundan ve retiküloendotelyal sistemin (RES) sabit makrofajları tarafından (başlıca karaciğer ve dalak) alıkonmasından kaynaklanmaktadır. Bu amaçla lipozom ilaç taşıyıcı sistemlerin stabilitesini arttırmak ve kandaki dolaşım sürelerini arttırmak için sterik olarak stabilize edilmiş lipozomlar geliştirilmiştir (Hua & Wu, 2013).

2.2.2.3.2 Pegile Lipozomlar

RES ile ilişkili birincil organlar arasında; karaciğer, dalak, böbrek, akciğerler, kemik iliği ve lenf düğümleri bulunur. Lipozomlar, fagositik hücrelerle doğrudan etkileşim yoluyla makrofajlar tarafından RES organelleri tarafından vücuttan uzaklaştırılır. RES organelleri tarafından hızlı tanınma ve in vivo opsonizasyon; pegilasyonun sterik bariyer oluşturması ile engellenerek enkapsülle edilmiş ajanların etkinliğinin artmasına neden olmaktadır. Sterik olarak stabilize edilmiş lipozomların geliştirilmesinde en çok kullanılan polimer hidrofilik polimerlerden polietilen glikoldür (PEG). Pegilasyon, plazma proteinleri ve/veya hücreler ile hem elektrostatik, hem de hidrofobik reaksiyonları sterik olarak inhibe eder ve böylece RES organelleri tarafından lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin uzaklaştırılmasını azaltır. Pegilasyon lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin sadece kan sirkülasyon süresini ve patolojik bölgelerde birikimini arttırmakla kalmaz, aynı zamanda etkin maddelerin olası yan etkilerini de azaltır. Sterik stabilizasyon, partikül boyutuna ve polimerin özelliklerine bağlı olarak lipozomların farmakokinetiğini de yüksek derece etkilemektedir (Sercombe et al., 2015).

2.2.2.3.3 Teranostik lipozomlar

Bir teşhis ya da görüntüleme için terapötik ajan içeren teranostik lipozomlar, hastalığın tedavisi ve izlenmesi için oldukça önemli lipozomlardır. Teranostik lipozomlar, manyetik rezonans (MR), yakın kızılötesi floresan (NIR) ve nükleer görüntüleme dahil olmak üzere çeşitli görüntüleme tekniklerine uygun olacak şekilde formüle edilebilirler.



Şekil 8. İşlevsellik Yönünden Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistem Çeşitlerinin Şematik Gösterimi

2.2.2.3.4 Hedefli Lipozomlar

Hedefli lipozomlar, *in vivo* ortamda ilaçların belirlenmiş hücre tiplerine veya organlara ulaşmasını sağlamaktadır. Antikorlar, peptitler/proteinler, karbonhidratlar, çeşitli moleküller gibi birçok hedefleyici ajan türü bulunmaktadır (Robson et al., 2018).

2.2.2.3.4.1 Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistemlerde Hedefleme Stratejileri

Özellikle antikanser ajanların hedefleme stratejileri, gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Kanser tedavisine yönelik geleneksel yaklaşımda, antikanser ajanların tümör bölgesinde düşük birikimi ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle, lipozomlar kullanılarak kanser tedavisinde en uygun yanıtı elde etmek için antikanser ajanlarının belirli bölgelere hedeflenmesi için çeşitli stratejiler geliştirilmiş ve kullanılmıştır.

Antikanser ajanlarının tümör bölgesine taşınması için ana stratejiler; pasif hedefleme (artmış geçirgenlik ve alıkonma etkisi ile) ve aktif hedeflemedir (Fahmy et al., 2005; M. K. Riaz et al., 2018).

2.2.2.3.4.1.1 Artmış Geçirgenlik ve Alıkonma (EPR) Etkisi ile Pasif Hedefleme

Kanser tedavisinde konvansiyonel ilaç taşıyıcı sistemler, RES ile önemli bir etkileşim gösterir. Pasif hedefleme fagositoz tarafından eliminasyonu önleyebilen taşıyıcı sistem veya nanotaşıyıcı formülasyonunu içerir. Sirkülasyon süresini arttırmanın bir yolu, PEGillenmiş lipozomlar hazırlamaktır. Bu stratejiye pasif hedefleme denir. Kanser hücrelerinde geçirgenlik veya sızıntı artmaktadır. Ayrıca bloklanmış lenfatik drenaj da

makromoleküllerin birikmesine neden olur. Pasif hedefleme gelişmiş geçirgenlik ve tutma (EPR) etkisi olarak da adlandırılır. Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemin partikül boyutunun tasarlanabilmesi ile EPR'nin etkisi en üst düzeye çıkartılabilmektedir (Fahmy et al., 2005; Zylberberg et al., 2016).

2.2.2.3.4.1.2 Hedefleme Ligantı ile Aktif Hedefleme

Aktif hedefleme de mevcut strateji, antikanser ajanları tümörlü doku bölgesine iletirken, hedeflenmemiş dokularda minimum birikim oluşturmaktır (Fahmy et al., 2005; Subramanian, 2021)(Subramanian, 2021). Bu yaklaşım aktif hedefleme veya ligant bazlı hedefleme olarak adlandırılır. Aktif hedeflemede ligantlar, doğrudan lipitlere veya PEG zincirlerinin uçlarına bağlanabilmektedir . Aktif hedefli lipozomal ilaç taşıyıcı sistemi tasarlanmanın en önemli aşaması yüzeyindeki ligant yoğunluğunun optimizasyonudur (Patel, O'Carra, Jones, Woodward, & Mumper, 2007).

2.2.2.4 Klinik ve preklinik kullanımda lipozomal ilaçlar

ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) veya Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından onaylanmış klinik kullanımda olan veya klinik denemeler aşamasında olan lipozomal ilaç taşıyıcı sistem formülasyonlar bulunmaktadır. Hali hazırda klinik kullanım için onaylanmış tüm lipozomal taşıyıcı formülasyonlar Tablo 1'de listelenmiştir

Lipozomlar;

- morfin ve fentanil gibi analjezik ilaçlar
- ropivakain gibi anestezikler
- amfoterisin B ve nistatin gibi mantar önleyiciler
- amikasin ve doksisisiklin gibi bakteriyel ilaçlar
- kamptotesin, sisplatin, daunorubisin, dosetaksel, Doks-HCl, gemsitabin, oksaliplatin, paklitaksel ve vinkristin gibi kemoterapötiklerin tedavisinde kullanılmaktadır (Bozzuto, 2015; Bulbake, Doppalapudi, Kommineni, & Khan, 2017; Chang, 2012).

Tablo 1. Klinik kullanım için onaylanmış lipozomal ilaç formülasyonları (Bulbake et al., 2017; Fungizone, Clemons, Stevens, Clemons, & Stevens, 2004)(Bulbake et al., 2017)

Ürün İsmi	Firma	Lipozom içeriği	Etkin madde	İlaç tipi	Uygulama yolu	Klinik Onaylanma yılı
Abelcet	Leadiant Biosciences, Inc.	DMPC:DMPG (2.3:1)	Amfoterisin B	Antifungal	I.V.	1995
Ambisome	Fujisawa Healthcare, Inc. and Gilead Sciences, Inc.	HSPC:DSPG:Kolesterol: Amfoterisin B (5 : 2 : 2.5 : 1)	Amfoterisin B	Antifungal	I.V.	1997
Amphocil	Zeneca Pharmaceuticals	Kolesterol sülfat:Amfoterisin B (1 : 1)	Amfoterisin B	Antifungal	I.V.	1993
Amphotec	Sequus Pharmaceuticals Inc	Kolesterol sülfat:Amfoterisin B (1 : 1)	Amfoterisin B	Antifungal	I.V.	1996
Arikayce	Insmad, Inc. Of Bridgewater, NJ.	DPPC ve Kolesterol: Amfoterisin B (0.6–0.79:1)	Amikasin	Antibakteriyel	Oral inhalasyon	2018
DaunoXome	Galen US, Inc.	DSPC:Kolesterol (2 : 1)	Daunorubisin	Kemoterapötik	I.V.	1996
DepoDur	Pacira Pharmaceuticals, Inc	DOPC:DPPG: Cholesterol: Tricaplin ve Triolin (507:11:76:6: 1)	Morfin sülfat	Analjezik	Epidural	2004
Doxil	Johnson& Johnson	HSPC:Kolesterol:DSP E:PEG2000 (11.2:7.8:1)	Doks-HCl	Kemoterapötik	I.V.	1995
Epaxal	Johnson& Johnson	DOPC:DOPE (3 : 1)	Hepatitis A virüs antijen suşu RG-SB	Aşı	I.M	1993
Exparel	Pacira Pharmaceuticals, Inc.	DEPC:DPPG: Kolesterol: Trikaplin (7.6 : 1 : 10 : 3.5)	Bupivakain	Anestezik	I.V	2011
Evacet	Liposome Company Inc	(Hidrojen soya PC, Kolesterol ve DSPE-PEG) : Doks-HCl (8 : 1)	Doks-HCl	Kemoterapötik	I.V.	1995
Inflexal V	Johnson & Johnson	70% Lesitin, 20% Sefalin ve 10% Fosfolipit (DOPC : DOPE	İnfluenza virüsü antijeni, A	Aşı	I.M.	1997

Ürün İsmi	Firma	Lipozom içeriği	Etkin madde	İlaç tipi	Uygulama yolu	Klinik Onaylanma yılı
		(3 : 1)	ve B suşları			
Lipodox	Sun Pharmaceutical Industries Ltd.	DSPC: Kolesterol:DSPE:PEG2000 (10.9 : 7.3 : 1)	Doks-HCl	Kemoterapötik	I.V.	1995
Marqibo	Acrotech Biopharma, LLC	Spingomiyelin: Kolesterol (1.5 : 1)	Vinkristin	Kemoterapötik	I.V.	2012
Mepact	Takeda Pharmaceutical Limited	DOPS : POPC (1 : 2.3)	Mifamurtid	İmmünomodülatör/Antitümör	I.V.	2004
Myocet	Myocet	EPG: Kolesterol (1.2 : 1)	Doks-HCl	Kemoterapötik	I.V.	2000
Onivyde	Merrimack Pharmaceuticals, Inc.	DSPC:MPEG2000 : DSPE (200:133.3 : 1)	İrinotecan	Kemoterapötik	I.V.	2015
Visudyne	Novartis International AG	Verteporfin : DMPC ve EPG (1 : 8)	Verteporfin	Fotosensitizer	I.V.	2000

2.2.2.4.1 Analjezik olarak lipozomal ilaç taşıyıcı sistemler

DepoDur®, morfin sülfat etkin maddesinin lipozomal ilaç taşıyıcı sistem olarak tasarlanması ile uzatılmış salım sağlamış ve şiddetli ağrı tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır. DepoDur®; Morfin sülfat etkin maddesi içeren DOPC, DPPG, kolesterol, trikapril ve trioleinlerin 42:9:33:3:1 mol kütle oranlarındaki bileşimlerinden oluşan ve MLV tipinde lipozomal ilaç taşıyıcı sistemdir. Bu formülasyonda Morfin sülfat, merkezi sinir sisteminin G protein-bağlı opioid reseptörlerine bağlanır ve şiddetli ağrıyı hafifletir. Morfin kapsüllü lipozomların klinik deneylerde kullanımı, enjeksiyondan 48 saat sonrasına kadar etkin maddenin salımını başarılı bir şekilde göstermiştir (Profile, 2008).

2.2.2.4.2 Antibakteriyel

2018 yılında Arıkayce tarafından geliştirilen Amikasin Lipozom İnhalasyon Süspansiyonu (ALIS), FDA tarafından akciğer enfeksiyonunun tedavisi için onay alan ilk ilaç olmasının yanında inhalasyon yoluyla uygulanan da ilk lipozom formülasyonudur. Bu formülasyonda lipozomal ilaç taşıyıcı formülasyon 1,2-dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfokolin (DPPC) ve 2:1 oranında kolesterolden oluşur ayrıca formülasyondaki amikasin ve toplam lipid konsantrasyonları sırasıyla 70 mg/ml

ve 47 mg/mL'dir (Chang, 2012; J. Zhang et al., 2018). Amikasin etkin maddesinin lipozomal ilaç taşıyıcı sistem ile vücuda verilmesinin avantajı, lipozomal ilaç taşıyıcı sistemin akciğerlerde makrofajlar doğrudan hücre içi bakteriyel enfeksiyonu tedavi etmenin zorluğunun üstesinden gelmesidir. Sıçanlarda yapılan in vivo çalışmalar 2., 6. ve 24. saat sonra pulmoner makrofajlardaki amikasin konsantrasyonunun, etkin maddenin serbest halde uygulanmasına göre lipozomal uygulama ile 5 ila 8 kat oranında arttığını göstermiştir (O. Khan & Chaudary, 2020).

2.2.2.4.3 Aşı

İnaktive edilmiş grip aşısı olan Inflexal V, yüzeyinde viral antijenleri olan 150 nm partikül boyutuna sahip tek katmanlı virozomlardan (lipozomlardan) oluşur. Formülasyon; %70 lesitin, %20 sefalin ve %10 fosfolipitlerden oluşur (DOPC:DOPE, 75:25 molar oranı). Formülasyon bileşenlerinden sefalin; yapısal bir bileşen ve B lenfositleri için bir uyarıcı olarak işlev görmektedir. Inflexal V, diğer konvansiyonel influenza aşıları türlerine göre önemli ölçüde geliştirilmiş immünojenisite ve tolere edilebilirlik göstermiştir. Aşı formülasyonunda lipit vezikülleri, genetik materyalleri enzimler tarafından parçalanmaktan koruyarak hücre içine alımını sağlamaktır (Glück & Metcalfe, 2002).

2.2.2.4.4 Antikanser

Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin kanser tedavisinde kullanımı, üzerinde oldukça fazla araştırma yapılan alandır. Antikanser tedavi için klinik onay almış birçok ilaç taşıyıcı sistem olmakla birlikte üzerinde çalışmalar yapılan aday ilaç taşıyıcı sistemler de oldukça fazladır. Antikanser ilaçların kullanımlarındaki en büyük sınırlamalarından biri, düşük terapötik indekse sahip olmalarıdır. Bu durum anti-tümör etki sağlamak için gereken dozun normal dokular için toksik etki yaratmasına sebep olmaktadır. Düşük terapötik indeksi, spesifik hedef bölgelerde, tümörlerde terapötik konsantrasyonlara ulaşamamasından kaynaklanmaktadır (Amarnath Sharma, 1997).

Çeşitli antikanser ajanların enkapsüle edildiği lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin, serbest ilaca göre daha az toksik olduğu gösterilmiştir, bu nedenle klinik öncesi aşamaya ulaşan lipozomların ilaç taşıyıcı sistemlerin sayısı oldukça fazladır (Chelliah et al., 2021; Uster, 1989).

Bu ilaçların lipozomlara enkapsülasyonu, vücutta sirkülasyon süresinin uzamasına, hedef dokularda etkin maddenin daha fazla birikmesine, etkin maddenin metabolik

bozulmalara karşı korunmasına, mononükleer fagositik hücrelerce zengin olan organlarda (karaciğer, dalak ve kemik iliği) artan birikime ve böbrek, kalp kası ve beyinde azaltılmış birikim ile ilacın doku dağılımının değişmesini neden olmaktadır.

Tümörleri hedeflemek için lipozomlar, kandan ayrılabilmesi ve tümöre erişebilmelidir. Bununla birlikte, normalde boyutları nedeniyle lipozomlar transkapiller geçişe giremezler. Fakat çeşitli çalışmalar, belirli tümörlerde normal dokularda bulunandan daha yüksek konsantrasyonda lipozom birikimini göstermiştir (Gregoriadis, 1991; Gregoriadis & Florence, 1993)

Antikanser ilaçlardan antrasiklinler, DNA'ya ulaşarak bölünen hücrelerin büyümesini durduran ve hücreleri öldüren ilaçlardır. Antrasiklinler vücuda uygulandığında sadece tümörlerde değil, saç, mide-bağırsak mukozası ve kan hücrelerinde de büyüme durmasına ve ölüme neden olur bu nedenle bu ilaç grubu oldukça toksiktir. Bu ilaçların lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlere kapsüllenmesi, serbest ilaca kıyasla deney hayvanlarının kardiyotoksitesini, dermal toksitesini azaltmış ve hayatta kalma oranını arttırmıştır (Gregoriadis, 1991).

2.2.2.5 Lipozomların Avantajları ve Dezavantajları

Lipozomlar, hem hidrofilik hem de hidrofobik maddelerin enkapsülasyonu için çok yönlü ilaç taşıyıcı sistemler olduklarından son yıllarda oldukça ilgi çekici hale gelmiştir. Ayrıca, bu veziküler yapılar hem iyon boyutundaki küçük moleküllerin hem de birkaç yüz bin Daltonluk büyük moleküllerin kapsüllenmesine olanak tanımaktadır (Shaji & Bhatia, 2013). Lipozomların, geleneksel ilaç taşıyıcı sistemlere göre birçok üstünlüğü bulunmaktadır (Tablo 2). Lipozom vezikülleri ilaç deposu görevi görerek ilaçları enzim ve inhibitörler gibi ortam etkilerinden korurlar. Etkin maddelerin enkapsülasyonunu sağladıkları için hızlı bozulmanın önüne geçerek stabilitelerini artırabilirler (Dua, 2012). Ayrıca lipozom formülasyonları, vücut sirkülasyonunda nispeten sabit ve etkili ilaç konsantrasyonunu koruyarak biyolojik sıvıların varlığında ilaç salım hızını kontrol etme kabiliyetine sahiptir. Bu nedenle istenmeyen yan etkileri önleyebilir ve ilaç toksitesini azaltabilirler (Annakula, Errabelli, Jukanti, Bandari, & Reddy Veerareddy, 2010).

Tablo 2. Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Avantajları ve Dezavantajları

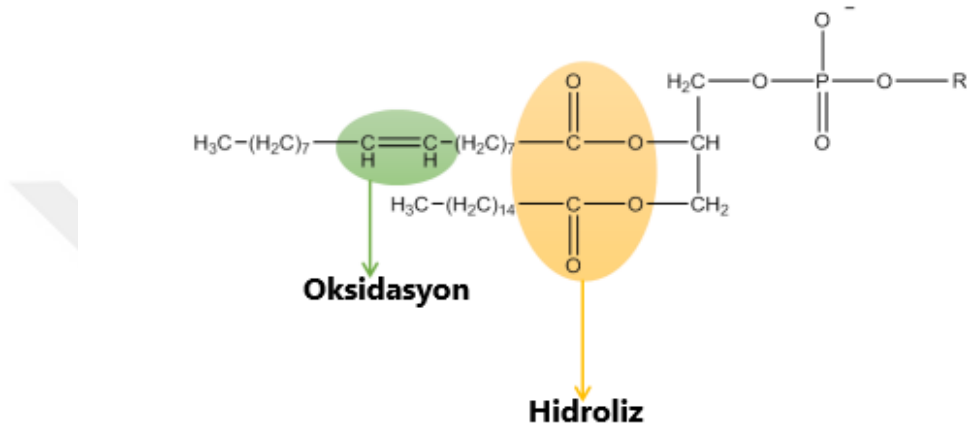
Avantajlar	Dezavantajlar
• Çok çeşitli boyutlarda hidrofilik ve hidrofobik ilaçların enkapsülasyonuna olanak verir. • Toksik olmayan, biyolojik olarak parçalanabilir, biyolojik olarak uyumlu, zayıf immünojenik özellik içerir. • Etkin maddenin stabilitesini artırır. • Etkin maddenin kontrollü salımını sağlar. • Hedeflenen bölgeye yüksek miktarda etkin madde iletimini sağlar. • Azaltılmış etkin madde toksisitesi ve azaltılmış yan etki sağlar.	• Düşük kimyasal stabiliteye sahiptir. • Düşük fiziksel stabiliteye sahiptir. • Plazmada yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ile lipozom ve arasında lipit değişimine uğrayabilir. • Düşük yarı ömüre sahiptir.

Lipozomların belirli bir hücre veya organa hedeflenmesi olasılığı, biyolojik dağılımın değişmesi nedeniyle etkinliğinin ve terapötik indeksinin artmasına yol açar. Lipozomları hedefleyici formülasyon şeklinde tasarlanmış olmak, minimum ilaç dağılımı nedeniyle ilaç toksisitesini ve yan etkileri azaltmanın başka bir yoludur. Ayrıca lipozomal ilaç taşıyıcı sistemler, daha yüksek ilaç konsantrasyonlarının istenilen hedefe ulaştırılmasını sağlar.

Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemler tüm bu avantajlarına rağmen, büyük ölçekli üretimlerde bazı dezavantajlar içermektedir (Tablo 2). Büyük ölçekli üretimlerde tekrarlanabilir fizikokimyasal özelliklere sahip ürün elde etmek ve saklama sırasında ve uygulamadan önce uygun stabiliteyi göstermek bir zorunluluktur. Bununla birlikte, lipozomlar, raf ömrünü kısıtlayan zayıf kimyasal ve fiziksel stabilite sergiler (Iftikhar Khan, Elhissi, Shah, Alhnan, & Ahmed, 2013; Payne, Timmins, Ambrose, Ward, & Ridgway, 1986).

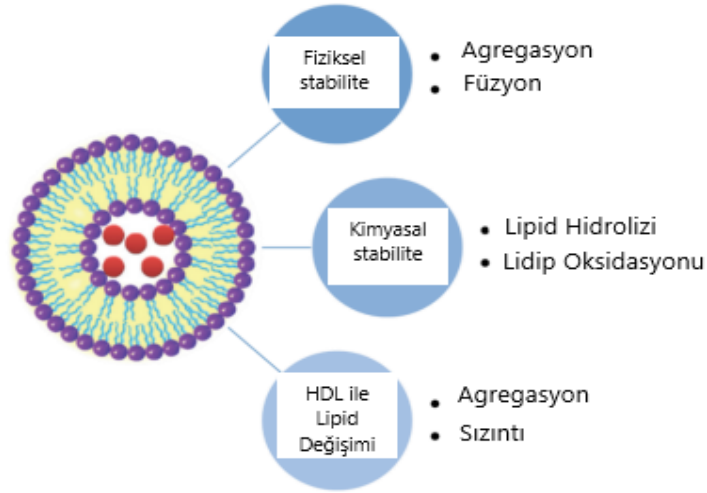
Lipozomların vezikül agregasyonu ve füzyonu nedeniyle sulu dispersiyonunun fiziksel kararsızlığı gerçekleşir, bu durum da vezikül boyutunda değişikliğe ve etkin maddenin sızıntısına yol açar. Lipozomların görünümü, boyutu ve boyut dağılımı analiz edilirken, lipozomların fiziksel stabilitesi ile ilgili problemlerin dikkate alınması önemlidir (C. S. Kumar et al., 2009). Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin kimyasal kararsızlığına, lipozomdaki kristallerin oluşumu neden olur, bu da çift tabakaların

kararsızlaşmasına yol açarak ilaç sızıntısına neden olur. Kimyasal kararsızlık, lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerindeki fosfolipitlerin hidroliz ve oksidasyona uğrama eğilimi ile ilişkilidir (Şekil 9). Gliserol yapısında yağ asitlerine bağlı ester bağlarında hidroliz meydana gelebilir ve bu da hidroforik zincirlerin ayrılmasına yol açar. Fosfatidilkolin'in hidrolize uğraması durumunda, lizofosfatidilkolin oluşumu gerçekleşebilmektedir.



Şekil 9. Lipozomların kimyasal kararsızlığı ile ilişkili fosfolipitlerin moleküler yapısı

Lipozomların yapısında açıl zincirlerinin varlığı durumunda oksidasyon meydana gelebilir ve bu durum lipozomların raf ömrünü değiştirebilir. Fosfolipitlerin oksidasyonu, ışık etkisi yok edilerek veya lipozomlara antioksidanların eklenmesiyle en aza indirilebilir (Chelliah et al., 2021; Vemuri & Rhodes, 1995). Lipitlerin oksidasyonu ve hidrolizi, kısa zincirli lipitlerin oluşumuna yol açabilir ve daha sonra çift katmanlarda daha az hidroforik türevler ortaya çıkar ve bu durum fizikokimyasal özelliği değişmiş lipozomların oluşmasına veya lipozom yapısının bozulmasına neden olur. Ayrıca stabilite sorunları, lipozom yapısının bozulmasına ve ilaç salım profilinin değişmesine neden olur (Sheth, Jadhav, Jain, & Meshram, 2019). Ayrıca plazmada, lipozomlar ve HDL'ler arasındaki lipit değişimi nedeniyle lipozomlar kararsız hale gelir ve bu da agregasyona ve etkin maddenin sızıntısına neden olur (Umadevi, Sasidharan, Nithyapriya, & Venkatanarayanan, 2012). Lipozomal formülasyonların belirtilen dezavantajları (Şekil 10), klinik uygulamalarını sınırlar. Bu nedenle, lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin özelliklerini geliştirmek ve sonuç olarak uygulamalarını genişletmek için stratejiler geliştirmek ihtiyacı sürmektedir.



Şekil 10. Lipozomların kararsızlığının olası nedenleri.

2.2.3 Prolipozomal İlaç Taşıyıcı Sistemler

Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin fiziksel ve kimyasal stabilite düşüklüklerinden dolayı raf ömrü sınırlı olabilmektedir. Lipozomlarla ilgili stabilite sorunlarının üstesinden gelebilmek için, prolipozomal ilaç taşıyıcı sistem formülasyonları geliştirilmiştir (Hiremath et al., 2016). Prolipozomlar, hidrasyon veya vücuttaki biyolojik sıvılarla temas halinde lipozomal dispersiyon oluşturan kuru, serbest akışlı granüler ürünlerdir ve 1986 yılında keşfedilmişlerdir. Suda çözünen veya dağılan gözenekli toz ve fosfolipitlerden oluşurlar (Hiremath et al., 2016; Muneer, Masood, & Ahmad, 2017). Prolipozomlar, ticari lipozom ürünleri üretmek için en yaygın kullanılan ve uygun maliyetli yöntemlerden biridir. Kuru toz halinde oldukları için saklanması kolay ilaç taşıyıcı sistemlerini oluştururlar. Vücuttaki biyolojik sıvıların etkisiyle in vivo ortamda veya uygulamadan önce uygun bir hidratlama sıvısı kullanılarak in vitro koşullarla lipozomal ilaç taşıyıcı sistem formülasyonunu oluştururlar. Prolipozomal ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilerek birçok ilacın çözünürlük ve biyoyararlanım sorunlarının üstesinden gelinebilir (Janga et al., 2012).

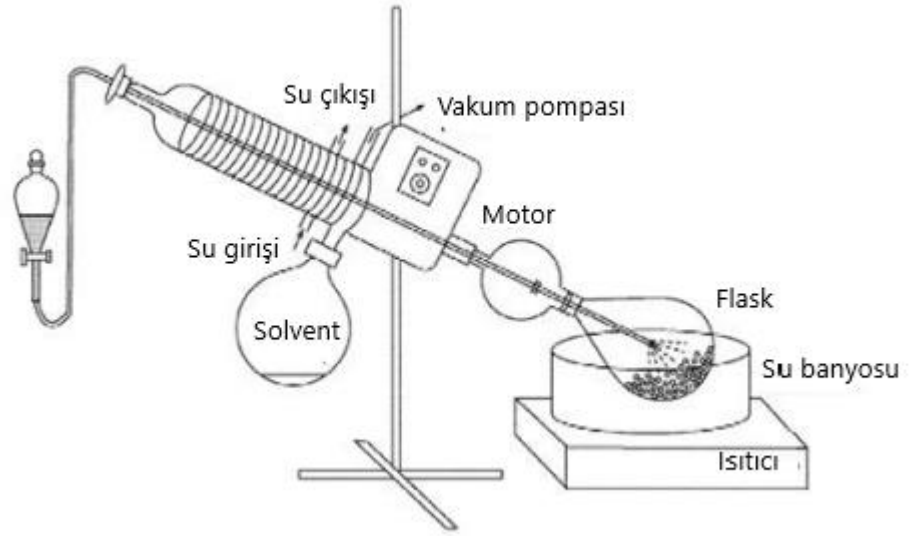
Hazırlama yöntemleri:

- taşıyıcı madde üzerinde film oluşturma yöntemi
- püskürterek kurutma yöntemi
- akışkan yatak yöntemi

- süper kritik anti-solvent yöntemi
- dondurarak kutuma (Liyofilizasyon) yöntemi şeklindedir.

2.2.3.1 Taşıyıcı madde üzerinde film oluşturma

Prolipozomların oluşumu için taşıyıcı üzerine film biriktirme yöntemi kullanılır. Döner buharlaştırıcı kullanılan bu yöntem prolipozom geliştirmek için ilk kez Payne ve arkadaşları tarafından kullanılan orijinal yöntemdir (Nalla, Bagam, Eedara, & Dhurke, 2015). Gözenekli, suda çözünür bir taşıyıcı madde üzerinde oluşturulan etkin madde ve fosfolipit filmi içerir (Kulkarni, Betageri, & Singh, 1995). Bu nedenle taşıyıcı maddenin özellikleri oldukça önemlidir ve taşıyıcı madde; çözünürlük, gözeneklilik ve yüzeyinde fosfolipitleri barındırabilme kabiliyeti dikkate alınarak seçilmelidir. Taşıyıcı maddenin partikül boyutu, üretilen lipozomların boyutunu ve polidispersitesini etkiler (Xia, Jin, Zhao, & Guo, 2011). Süreç iki ana adımı içerir (Şekil 11). İlk olarak, seçilen taşıyıcı yuvarlak tabanlı bir balona yerleştirilir, döner bir buharlaştırıcıya bağlanır ve indirgenmiş basınç altında kurutulur (Patil-Gadhe & Pokharkar, 2014; Rojanarat et al., 2011). İkinci adımda ise, uçucu organik çözücü içindeki etkin madde ve fosfolipit çözeltisi, besleme borusu yoluyla bir ayırma hunisinden taşıyıcı malzeme yatağına damla damla püskürtülür (D. J. S. Singh et al., 2010; Zeng, Martin, & Marriott, 1995). Böylece, taşıyıcı yüzey üzerine ince bir fosfolipit filmi kaplanır ve kuru granüler yapı elde etmek için organik çözücü buharlaştırılır (Katare, Vyas, & Dixit, 1991; Kulkarni et al., 1995). Taşıyıcı madde üzerinde film oluşturma yöntemi kullanılarak prolipozomların hazırlanması, büyük ölçekte lipozomlar üretmek için uygun maliyetli stratejilerden biridir.



Şekil 11. Taşıyıcı madde üzerinde film oluşturma yoluyla prolipozom geliştirmek için kullanılan aparatlar

2.2.3.2 Püskürterek kurutma yöntemi

Püskürterek kurutma ilaç endüstrisinde katı dispersiyonların üretiminde oldukça kullanılan bir yöntemdir (Allawadi, Singh, Singh, & Arora, 2014; Sharma & Jain, 2011). Püskürterek kurutma ile bir çözelti, emülsiyon veya süspansiyon olabilen sıvı form, kuru bir toza dönüştürülebilir (Omer, 2014). Püskürterek kurutma, taşıyıcı materyalin, genellikle bir şekerin, ilaç ve lipidleri içeren organik bir çözeltiye eklenmesini ve ardından solventi uzaklaştırmak için ısıtılmış hava akımına püskürtülmesini içerir. Bu süreç dört aşamadan oluşur.

1. Aşama: ürünün püskürtme ucuna atomizasyonu
2. Aşama: püskürtme hava teması
3. Aşama: sprey damlacıklarının kurutulması
4. Aşama: katı ürün eldesi şeklindedir.

2.2.3.3 Akışkan yatak yöntemi

Prensibi partikül kaplama teknolojisine dayanmaktadır ve prolipozomların büyük ölçekli üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntemde taşıyıcı maddeye organik çözücü çözeltisi ve etkin madde çözeltisi uçlardan püskürtülür ve aynı anda vakum uygulanarak akışkan yataklı organik çözücü uzaklaştırılır. Eser miktarda kalan çözücü ise, uzun süreli vakum altında bekletilerek uzaklaştırılır.

2.2.3.4 Süper kritik anti-solvent yöntemi

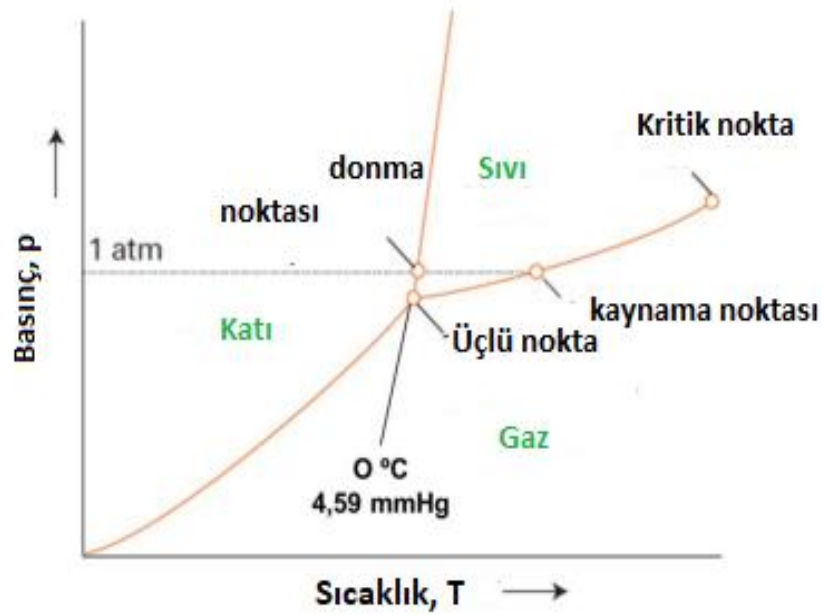
Süper kritik anti-solvent yönteminde, sistem kritik sıcaklık ve basıncının üzerinde bir seviyede tutulduğunda karbondioksitin sıvı hali olan Süper Kritik Karbondioksit elde edilmektedir. Bu metot sistemi; bir numune dağıtım ünitesi, bir çöktürme birimi ve bir ayırma birimi olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. İlaçların çözülmesinde CO₂ ile tamamen karışabilen çözücüler kullanılmalıdır. CO₂ dış borudan püskürtülürken, çözelti iç borudan püskürtülür. Cihazın ikinci kısmı hava ile ısıtılan kaptan, son kısmı ise gaz sayacı ve seperatörden oluşmaktadır. Süper Kritik Karbondioksit son kısımdaki seperatördeki düşük basıncı nedeniyle organik çözücünden ayrılır. Önceden ayarlanan sıcaklık ve basınç değerine ulaştıktan sonra, bir vana CO₂ girişi için hemen açılır, ardından diğer vana ilaç solüsyonunun nozüle girmesine izin verir. Çözününen maddelerin organik çözücü içerisindeki çözünürlüğü azaldıkça polipozomlar çökelerek oluşur (Xia et al., 2011).

2.2.3.5 Dondurarak kurutma (Liyofilizasyon) yöntemi

Liyofilizasyon olarak da adlandırılan dondurarak kurutma, üründen ısı ve kütle transferini içerir. Bu proses, üç aşamadan oluşmaktadır: çözeltinin donma noktasına kadar soğutulmasını içeren dondurma aşaması; donmuş çözücünün vakum muamelesiyle süblimasyon yoluyla uzaklaştırıldığı bir birincil kurutma aşaması; ve donmayan solventi uzaklaştırmak için ikinci kurutma aşamasıdır (Garjani, 2016).

Süblimasyon adımının başarısı için buz füzyonunun oluşmaması gerekmektedir. Bu nedenle 0 °C dereceye yakın sıcaklıkta ve 4.59 mm Hg mutlak basınçta meydana gelen suyun basınç-sıcaklık dengesinin üçlü noktasının altında çalışmak çok önemlidir (Şekil 12). Üçlü noktada, su aynı anda katı, sıvı ve gaz halinde bir arada bulunur. Üçlü noktanın altında, yalnızca katı ve gaz halleri bir arada bulunur ve suyun sıvı hali atlanarak donmuş parçacıkların doğrudan buharlaşmasına izin verilen koşullar sağlanır (Pradesh, 2013).

Dondurarak kurutma işlemi düşük sıcaklıklarda gerçekleştiği için ısıdan etkilenebilecek maddelerin kimyasal özelliklerinin uzun süre korunmasını sağlar. Ayrıca, dondurarak kurutma kullanıldığında etkin madde, katı partikül oluşumu sırasında minimum termal strese maruz kalır ve çözeltide faz ayrılması riskini en aza indirir. Ayrıca liyofilize ürünler, hızlı çözünmelerini/dağılmalarını sağlayan sünger yapısına sahiptir (Sharma & Jain, 2011).



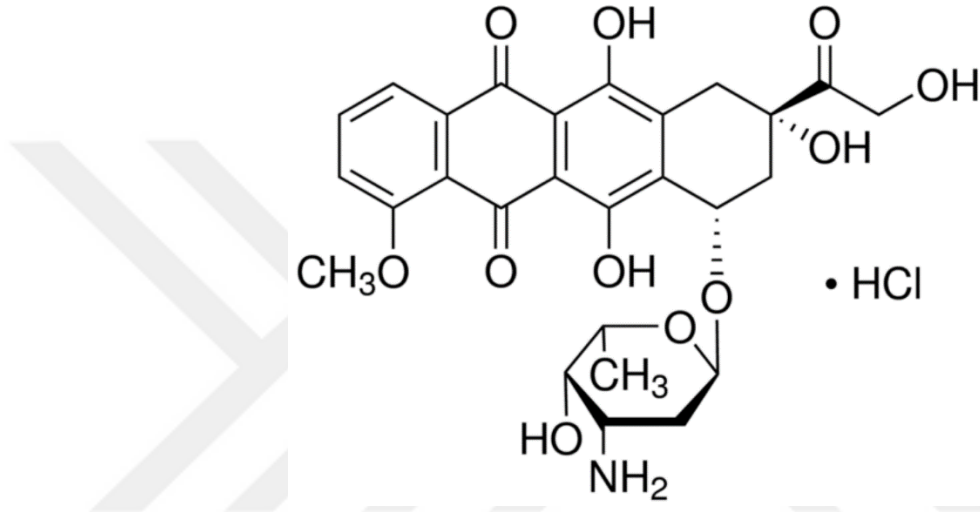
Şekil 12. Basınç-sıcaklık denge diyagramı. Üçlü noktada katı, sıvı ve buhar dinamik dengededir.

Dondurarak kurutma işleminde sıvı lipozom formülasyonlarının kurutulması sırasında stabiliteyi arttırmak için, genellikle bir karbonhidrat molekülü olan bir kriyoprotektan kullanılmaktadır. Yapı içerisindeki su miktarlarının en aza indirilmesi ile liyofilize lipozomların raf ömrünü arttırılabilir ve dehidrasyon sırasında vezikül boyutunun büyümesinin önüne geçilebilmektedir (Allemann et al., 2013; Van Winden & Crommelin, 1997). Liyofilizasyon yöntemi prolipozomal ilaç taşıyıcı sistem geliştirmek için tek başına kullanılabilir gibi, taşıyıcı madde üzerinde film oluşturma yönteminde kalıntı organik çözücüler uzaklaştırmak ve toz ürünün tam anlamıyla kurutulmasını sağlamak adına da kullanılabilir (İbrahim, Sammour, Hammad, & Megrab, 2008; Song, Chung, & Shim, 2005).

2.3 DOKSORUBİSİN HİDROKLORÜR

Doks-HCl Hidroklorür (Doks-HCl), Doks-HCl'in hidroklorür tuzudur. Doks-HCl, *Streptomyces peucetius* bakterisinden elde edilen bir antibiyotiktir. 1960'lardan beri yaygın olarak kemoterapötik bir ajan olarak kullanılmaktadır. Kimyasal açılımı (8S,10S)-10-(4-amino-5-hidroksi-6-metil-tetrahidro-2H-piran-2-yloxy)-6,8,11-trihidroksi-8-(2-hidroksiasetil)-1 metoksi-7,8,9,10-tetrahidrotetrasen 5,12-dion hidroklorür, kimyasal formülü ise $C_{27}H_{29}NO_{11}HCl$ şeklindedir (Şekil 13). Moleküler

ağırlığı 579.98 g/mol'dür. Doks-HCl suda pH ya bağımlı olarak kolayca çözünür alkolde ise az çözünür. Sulandırıldıktan sonra çözelti, nötr pH'da turuncu-kırmızı renklidir ve bu çözelti 5°C'de 1 ay stabildir. Doks-HCl çözeltisi, yüksek sıcaklıklarda ve çözeltinin renginin sarı-turuncu renge dönüşeceği düşük asit veya mor-maviye dönüşeceği yüksek alkali pH'da kararsızdır (Chabner, Allegra, & Curt, 2001; Piver, Marchetti, Parthasarathy, Bakshi, & Reese, 1985)



Şekil 13. Doksorubisin Hidroklorür'ün Kimyasal Yapısı

Doks-HCl, kemoterapötik ajanların antrasiklin grubunun bir parçasıdır, diğer antrasiklinler arasında ise daunorubisin, idarubisin ve epirubisin bulunur. Genellikle yetişkin ve pediatrik hastalarda tümörlerin tedavisinde kullanılan bir ajandır. Doks-HCl'in lipozomal formülasyonu, AIDS ile ilişkili Kaposi sarkomu ve multipl miyelomda başarısız olan hastalarda, yumurtalık kanseri tedavisi için kullanılmak üzere FDA onayına sahiptir (W. Jiang, Lionberger, & Yu, 2011; Koleini et al., 2019; Soiza, Donaldson, & Myint, 2018; Tantari et al., 2019)

2.3.1 Farmakokinetik özellikleri

İntravenöz uygulamayı takiben Doks-HCl plazmadan hızla dokulara iletilir. Plazma yarı ömrü, 10 dakikalık bir başlangıç fazı, 1-3 saatlik bir ikinci faz ve yaklaşık 30 saatlik bir üçüncü faz ile üç fazlıdır. Uygulanan dozun sadece %5-6'sı 5 gün sonra idrarda atılır (Tablo 3).

Tablo 3. Doks-HCl'in Farmakokinetik özellikleri

	Değer	Birim	Uygulama yolu	Referans
Biyoyararlanım	5	%	p.o.	(Chabner et al., 2001)
Dağılım hacmi	682	I/m^2	i.v.	
Plazma proteini bağlama	76	%		
Plazma yarı ömrü	10, 1-3, 30	dakika, saat, saat	i.v.	(Agrawal, 2007)
Biolojik yarı ömrü	666	mL/dakika/ m^2	i.v.	(Chabner et al., 2001)
Uygulanan dozun yaklaşık %40'ı 5 gün içinde safrayla, %5-12'si idrarla atılır.				

2.3.2 Etki Mekanizması

Doks-HCl, DNA baz çiftleri içinde araya girerek DNA'nın kırılmasına neden olması, hem DNA hem de RNA sentezinin inhibisyonunu sağlaması birincil etki mekanizmasıdır. Doks-HCl, topoizomerez II enzimini inhibe ederek DNA hasarına ve apoptoz indüksiyonuna neden olur. Demir ile birleştirildiğinde, ayrıca DNA'da serbest radikal aracılı oksidatif hasara neden olur ve DNA sentezini daha da sınırlar. Doks-HCl ayrıca demir ile birleştirildiğinde, DNA'da serbest radikal aracılı oksidatif hasara neden olur ve DNA sentezini daha da kısıtlar. Dekstrazoksan gibi demir şelatörleri, Doks-HCl'ün demir ile bağlanmasını sınırlayarak serbest radikal oluşumunu önleyebilir (Agrawal, 2007).

2.3.3 Uygulama

Doks-HCl genellikle 21 günlük aralıklarla intravenöz olarak uygulanır. Heparin ve fluorourasil ile geçimsizdir ve bu ilaçlarla karıştırıldığında çökelmeye neden olabilir. Doks-HCl çözeltisi hızlı bir şekilde uygulanabilse de, infüzyon reaksiyonları riskini azaltmak için lipozomal formülasyonun yavaş uygulanması önerilir. Buzdolabında saklanmalı ve ışıktan korunmalıdır. Doks-HCl dokulara hızlı dağılmaktadır ve 48 saate kadar eliminasyon yarı ömrüne sahiptir (Agrawal, 2007).

Tümör tedavisinde monoterapi olarak uygulandığında 21 günlük bir döngünün ilk gününde bir kez $60\text{-}75 \text{ mg/m}^2$ olacak şekilde uygulanır. Tümör tedavisinde kombinasyon tedavisi olarak uygulandığında ise 21 günlük veya 29 günlük bir döngünün ilk gününde bir kez $40\text{-}75 \text{ mg/m}^2$ olacak şekilde uygulanır. Her iki tedavide de maksimum kümülatif doz 550 mg/m^2 'dir.

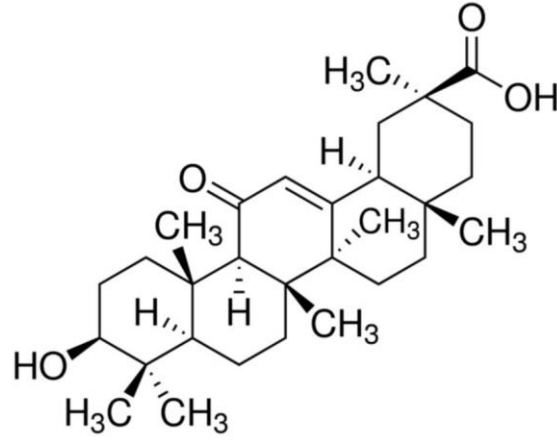
2.3.4 Yan etkiler

Doks-HCl uygulamasından sonra yorgunluk, saç dökülmesi, mide bulantısı, kusma ve ağızda yara gibi yan etkiler yaygındır. İntravenöz uygulama sırasında Doks-HCl ekstrevasyonu zamanla kötüleşen ciddi doku ülserasyonu ve nekrozu ile sonuçlanabilir. Doks-HCl ayrıca önemli kardiyak toksisite ile ilişkilidir, bu da ilacın uzun süreli kullanımını sınırlar. Doks-HCl kaynaklı kardiyak toksisitenin etki mekanizması, ilacın antitümör mekanizmasından farklıdır. Artmış oksidatif stres, kardiyak spesifik genlerin aşağı regülasyonunu ve Doks-HCl tarafından kardiyak miyosit apoptozunun indüklenmesini içerir. Doks-HCl akut kardiyak toksisitesi, ilacın uygulanmasından sonraki günler içinde ortaya çıkar ve ilacı alan hastaların yaklaşık %11'inde görülür. Akut kardiyak toksisite kendini geri dönüşümlü miyoperikardit, sol ventrikül disfonksiyonu veya aritmiler olarak gösterir. Doks-HCl ile ilişkili aritmiler (sinüs taşikardisini, erken atriyal ve ventriküler kasılmaları ve supraventriküler taşikardi), tedaviyi alan hastaların %26'sında meydana gelmiştir. Kronik, geç kardiyak toksisite, Doks-HCl uygulamasından sonra da ortaya çıkabilir tedavi ile ilişkili en ciddi ve potansiyel olarak ölümcül yan etkidir. Kronik Doks-HCl kardiyak toksisitesinin insidansı yaklaşık %1.7'dir. Doks-HCl'e bağlı geri dönüşü olmayan kardiyomiyopati, tedavinin bitiminden birkaç ay sonra ortaya çıkar, ancak tedavi sonlandırıldıktan sonra yirmi yıla kadar da ortaya çıktığı bildirilmiştir. Ayrıca konjestif kalp yetmezliğinin oluşabildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Luu et al., 2018; Pipicz, Demján, Sárközy, & Csont, 2018).

2.4 GLİSİRRETİNİK ASİT

2.4.1 Kimyasal yapısı

Meyan kökünden ekstrakte edilen, pentasiklik triterpeneglikozit ile glisirizin hidroliz ürünü olan Glisirretinik asit (GA) (Fabaceae familyası); Afrika, Avrupa ve Asya'nın akdeniz bölgesinde yaygın olarak bilinmekte ve tıbbi amaçlar için oldukça sık kullanılmaktadır. GA, 18 β -glisirizinden türetilerek alkali koşullar altında 18 α -GA formu elde edilebilir. GA'nın kimyasal yapısı Şekil 14'de verilmiştir.

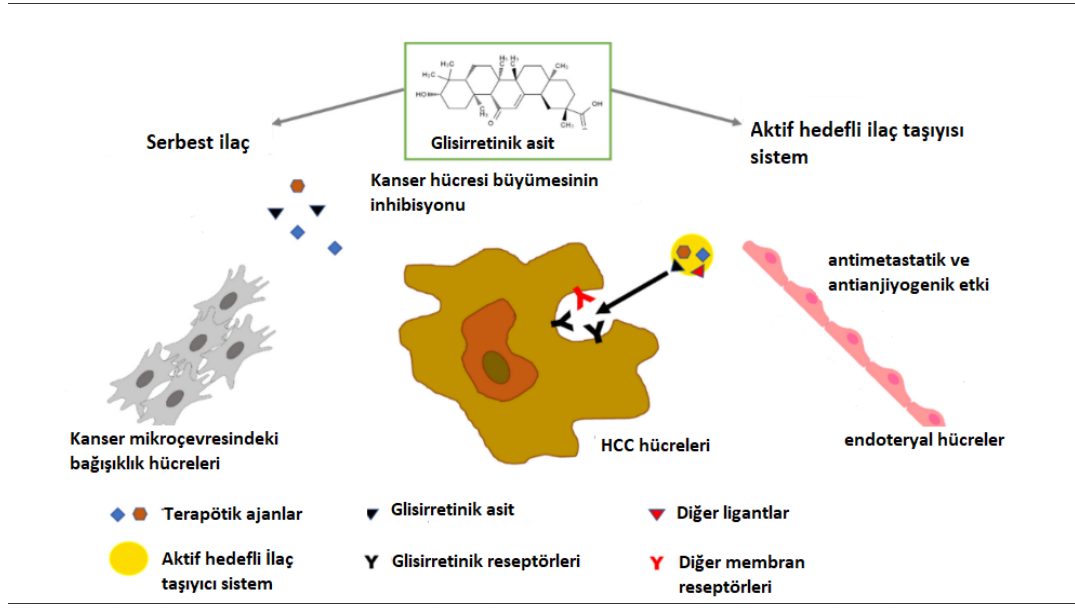


Şekil 14. Glisirretinik asit'in Kimyasal yapısı

2.4.2 Hepatoselüler Karsinoma'da Aktif Hedefleyici Ajan Olarak Kullanımı

Hepatoprotektif aktiviteye sahip olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir. Aynı zamanda hücre proliferasyonunu, metastazın inhibisyonu, hücre döngüsü durması, otofaji ve apoptoz indüksiyonu ve immünosupresyonun azaltılması dahil olmak üzere birçok mekanizma ile HSK'ye karşı antikanser yeteneği gösterdiği bilinmektedir. Yapısal özelliklerle ilgili olarak çok sayıda GA türevinin antikanser aktivitesini analiz eden Xu ve ark. halka iskeletinin, C3-hidroksil grubunun ve C30-karboksil grubunun GA'nın antitümör aktivitesi için kritik olduğunu öne sürmüşlerdir (Xu et al., 2017).

GA hücresel düzeyde metastazı ve hücrelerin proliferasyonunu inhibe eder, otofaji ve hücre döngüsünü de durdurur. GA, tümör mikroçevresindeki hepatik stellat hücrelere (HSC'ler) bağlı immünosupresyonu tersine çevirebilir ve invazivliklerini ortadan kaldırabilir, böylece tümörlerde immün mikroçevreyi güçlendirir. Ayrıca karaciğer tümör dokusu, normal dokulardan 1.5 ila 5 kat daha fazla GA reseptörüne sahiptir, bu nedenle GA ağırlıklı olarak karaciğerde eksprese edilir (Juan C. Stockert, Richard W. Horobin, Lucas L. Colombo, 2018; Unit, 1991). GA'nın HSK'deki antianjiyogenik ve antimetastatik etkisi; vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), lenfatik damar endotelial hyaluronan ekspresyonunun reseptör 1 (LYVE-1) (lenfatik metastaz için bir belirteç) ve matris metalloproteinaz-2 (MMP-2) proteinine olan reseptör mekanizması ile Şekil 15' deki gibi işlediği söylenmektedir (Xu et al., 2017).



Şekil 15. Serbest sitotoksik bir ilaç ve HSK hücrelerine aktif hedefli bir ligant olarak kullanılan GA'in mekanizması

GA'ı ilaç taşıyıcı sistemlerden lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerle birlikte kullanım son dönemde üzerinde oldukça çalışılan konulardan biri olmuştur (Sun et al., 2017; J. Tian, Wang, Wang, & Ke, 2014b). Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin yüzeyleri, karaciğer kanseri hücrelerini hedeflemek için GA ile aktif hedeflenebilir. Lipozomları polimerlerle kaplamanın çok yaygın bir yolu, polimerleri fosfolipitlerin polar başına kovalent olarak bağlamaktır. PEG gibi bir hidrofilik polimer ile lipitik veziküler yapıyı kaplamak, fizikokimyasal stabilitesini, gizlilik özelliklerini ve mukopene etme kabiliyetini iyileştirirken, ona hedefleme amaçlarına uygun fonksiyonları kazandırma imkanı da sunmaktadır.

Sun ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada DSPE-PEG yüzeyine GA'ın konjugasyonu ile lipozomal ilaç taşıyıcı sistem geliştirilerek in vitro ve in vivo tümör hedeflemeyi değerlendirdiler. DSPE-PEG-GA lipozomal ilaç taşıyıcı sistem aktif hedefsiz lipozomlarla karşılaştırıldığında, kısa sürede farelerin Hep G2 hücreleri çevresinde daha fazla biriktiği yapılan çalışmada gösterildi (Yuqi et al., 2018).

3 GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Kullanılan Kimyasal Madde, Araç ve Gereçler

3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Madde Adı	Firma, Ülke
Amonyum molibdat	Supelco, Kanada
Artificial Plazma Sıvısı	Biochemazone, Amerika Birleşik Devletleri
Asetonitril	Scharlau, İspanya
Askorbik asit	Sigma Aldrich, Almanya
Caelyx® (Piyasa Preparatı)	Schering-Ploughi, Amerika Birleşik Devletleri
Daunorubisin	Sigma Aldrich, Almanya
DCC	Merck, Almanya
Dekzometazon	Sigma Aldrich, Almanya
Dipotasyum Hidrojen Fosfat	Merck, Almanya
Disodyum hidrojen fosfat	Merck, Almanya
DMAP	Merck, Almanya
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Sigma Aldrich, Almanya
DMSO	Sigma Aldrich, Almanya
Doks-HCl	Deva Holding, Türkiye
DSPE-PEG 2000	Avanti, Amerika Birleşik Devletleri
DSPG-Na	Lipoid, İsviçre
Fetal Sığır Serum	Gibco, İngiltere
Glisirretinik asit	Sigma Aldrich, Almanya
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)	Sigma Aldrich, Almanya
HEPES	Sigma Aldrich, Almanya
HSPC	Lipoid, İsviçre
ITS (İnsülin 5 µg/mL, Transferin 5 µg/mL, Selenyum 5 ng/mL)	Corning, Amerika Birleşik Devletleri
Kloroform	Merck, Almanya
Kolesterol	Lipoid, İsviçre

L-Glutamin	Gibco, İngiltere
Mannitol	Roquette, Fransa
Metanol	Scharlau, İspanya
Tetrazolyum MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür	Sigma Aldrich, Almanya
Orto-fosforik asit	Merck, Almanya
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck, Almanya
RediJect 2-DG Probe, Glikoz prob	PelkinElmer, Amerika Birleşik Devletleri
Sodyum bikarbonat	Merck, Almanya
Sodyum hidroksit	Merck, Almanya
Sodyum Lauril Sülfat	AFG Bioscience, Amerika Birleşik Devletleri
Streptomisin	Sigma Aldrich, Almanya
Tripsin-EDTA	Gibco, İngiltere
Vitamin E Asetat	DSM Nutritional Products, Hollanda

3.1.2 Kullanılan Araç ve Gereçler

Araç ve Gereç	Marka, Model, Ülke
Çalkalayıcı inkübatör	Zhiceng ZWY-240, Çin
Diyaliz membran 14kDa	Sigma Aldrich, 14kDa, Almanya
DSC	Shimadzu, DSC-60, Japonya
Ekstrüder	Avanti, Amerika Birleşik Devletleri
FTIR	Shimadzu, IR Tracer -100 Japonya
Hassas Terazı	Mettler Toledo, ML204/01, Amerika Birleşik Devletleri
HPLC	Shimadzu, LC 20 AT, Japonya
HPLC-FLD	Shimadzu, LC-20ADXR
HPLC Kolon	Agilent, Zorbax Eclipse Plus C18 5µm 4.6 x 250 mm , Amerika Birleşik Devletleri
Hücre Sayım cihazı	Nexcelom, Amerika Birleşik Devletleri
IVIS Spektrum	Caliper, Amerika Birleşik Devletleri
Karl Fisher	SI Analytics, 7500 Almanya
KryoTEM	Hitachi HT, Japonya
Laminer hava akımlı kabin	Esco, Kore
Liyofilizatör	Telstar, LyoQuest, İspanya
Mikrofludisk	Microfluidisc Newton, M-110P, Amerika Birleşik Devletleri

Mikroplate Okuyucu (MTT) cihazı	Beckmann Couter, Amerika Birleşik Devletleri
Mikroskop	Olympus, SPJ, Japonya
NMR	Agilent, MERCURYplusAS 400
Osmometre	Knauer, K-7400, Almanya
pH metre	Mettler Toledo, Seven Multi, Amerika Birleşik Devletleri
Rotary Evaporatör	Heidolph, Laborota 4000, Almanya
Stabilite Kabini (25 ± 2 °C % 60 ± 5)	Nüve, TK-600, Türkiye
Stabilite Kabini (30 ± 2 °C % 65 ± 5)	Nüve, TK-600, Türkiye
Stabilite Kabini (40 ± 2 °C % 75 ± 5)	Nüve, TK-600, Türkiye
TEER cihazı	Word precision instruments, İngiltere
Transwell plate	Corning, 0.4 µm polikarbonat, Amerika Birleşik Devletleri
Ultrasonik banyo	Hydroultrasonic, US-10, Türkiye
UV spektrofotometre	Shimadzu, UV 2600, Japonya
Viskozimetre	Brookfield, Rv dv-II+PRO, Kanada
Well plate, 96'lı	Corning, Amerika Birleşik Devletleri
XRD	Shimadzu, XRD-6100, Japonya
Zetasizer	Malvern, ULTRA Ref Ünıt, İngiltere

3.2 Yöntem

3.2.1 Etkin madde Üzerine Yapılan Çalışmalar

3.2.1.1 Etkin maddenin Ultraviyole (UV) Spektrumunun İncelenmesi

10 mg Doks-HCl balonjojeye hassas bir şekilde tartıldı ve 100 mL'ye distile su ile tamamlandı ($C_{\text{Doks-HCl}}=0.1 \text{ mg/mL}$). Bu çözelti kuvarz küvete alındı, etkin maddeye ait ultraviyole spektrumları 300-800 nm aralığında alındı ve maksimum absorbands verdiği dalga boyu değeri saptandı.

3.2.1.2 Etkin maddenin İnfrared (FTIR) Spektrumunun İncelenmesi

Doks-HCl'ün FTIR spektrumu için, FTIR cihazı kullanılarak $750\text{-}3400 \text{ cm}^{-1}$ dalga boyları arasında çalışıldı. Gözlemlenen pikler kimyasal yapının aydınlatılması adına yorumlandı.

3.2.1.3 Etkin madde Analitik Yöntem Validasyonu

Ham madde kaynağını doğrulamak ve etkin maddenin miktar tayini için metot geliştirmek adına validasyon çalışmaları gerçekleştirildi. European Pharmacopeia'da verilen yöntem parametreleri denendi ve yapılan çalışmalar da göz önüne alınarak Tablo 4'de yöntem parametreleri verilen metot geliştirildi (Pharmacopoeia, 2008a). Doks-HCl etkin maddesinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography= HPLC) validasyonunda hem European Pharmacopeia'da verilen çözücü (Sodyum Lauril Sülfat Tamponu (SLS):Asetonitril (% 50:% 50) (Mobil faz=MF)), hem de *in vitro* salım çalışmaları ve permeabilite çalışmalarında kullanılacak çözücüler; (Fosfat Tamponu (pH 5.5), Fosfat Tamponu (pH 6.5), Fosfat Tamponu (pH 7.5)), Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) kullanılarak metot validasyonu gerçekleştirildi (Pharmacopoeia, 2008a). Metot validasyonu süresince yapılan analizlerde "ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures" kriterleri baz alınmıştır (ICH, 1995)

3.2.1.3.1 Çözücü Ortamlarının Hazırlanışı

- a. **Mobil Faz Hazırlanışı:** 2.88 gram Sodyum Lauril Sülfat hassas bir şekilde tartıldı ve ~990 mL saf su eklenerek çözündürme işlemi gerçekleştirildi. 2.25 g orto-fosforik asit ilave edilerek pH kontrolü yapılarak (pH 2.5) 1000 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 500 mL alındı ve 500 mL Asetonitril ilave edilerek,

ultrasonik banyoda 10 dk. degaze edildi. Çözelti 0.2 µm mebran filtreden süzüldü.

- b. Fosfat Tamponu (pH 5.5) Hazırlanışı:** 13.61 g potasyum dihidrojen fosfat tartıldı ve 1000 mL distile su eklenerek çözündürme işlemi gerçekleştirildi (1.çözelti). 35.81 g disodyum hidrojen fosfat tartıldı ve 1000 mL distile su eklenerek çözündürme işlemi gerçekleştirildi (2.çözelti). 1. çözeltiden 96.4 mL, 2. çözeltiden ise 3.6 mL karıştırılarak pH kontrolü yapıldı, gerekli ise pH ayarlaması yapıldı (Pharmacopoeia, 2008).
- c. Fosfat Tamponu (pH 6.5) Hazırlanışı:** 6.804 g potasyum dihidrojen fosfat 250 mL'lik distile su ile çözündürüldü (çözelti 1=0.2 M). 0.8 g sodyum hidroksit tartılarak 100 mL distile su ile çözündürüldü (çözelti 2=0.2 M). 1. çözeltiden 250 mL, 2. çözeltiden 89.0 mL alındı ve 1000 mL'ye distile su ile tamamlandı ve pH kontrolü yapıldı, gerekli ise pH ayarlaması yapıldı (Pharmacopoeia, 2008).
- d. Fosfat Tamponu (pH 7.4) Hazırlanışı:** 0.6 g potasyum dihidrojen fosfat, 6.4 g disodyum hidrojen fosfat ve 5.85 g sodyum klorür tartıldı ve 1000 mL'ye distile su ile tamamlandı ve pH kontrolü yapıldı, gerekli ise pH ayarlaması yapıldı (Pharmacopoeia, 2008).

Tablo 4. Doks-HCl için HPLC cihaz parametreleri

Cihaz	HPLC
Dedektör	UV/PDA
Kolon	Zorbax Eclipse Plus C18 5µm 4.6 x 250 mm
Dalga Boyu	254 nm
Akış Hızı	1.0 mL/dk.
Enjeksiyon Hacmi	5.0 µL
Analiz Süresi	20 dk.
Kolon Sıcaklığı	25°C
Tray sıcaklığı	25 °C
Mobil Faz	Sodyum Lauril Sülfat Tamponu:Asetonitril (% 50:% 50)
Çalışma Türü	İzokretik
Çözücüler	Stok ve Seyreltme: Sodyum Lauril Sülfat Tamponu:Asetonitril (% 50:% 50) (MF) Stok: Sodyum Lauril Sülfat Tamponu:Asetonitril (% 50:% 50) (MF), Seyreltme: Fosfat Tamponu (pH 5.5) Stok: Sodyum Lauril Sülfat Tamponu:Asetonitril (% 50:% 50) (MF), Seyreltme: Fosfat Tamponu (pH 6.5) Stok: Sodyum Lauril Sülfat Tamponu:Asetonitril (% 50:% 50) (MF), Seyreltme: Fosfat Tamponu (pH 7.4) Stok: Sodyum Lauril Sülfat Tamponu:Asetonitril (% 50:% 50) (MF), Seyreltme: HBSS

3.2.1.3.2 Standart ve Numune Çözeltilerinin Hazırlanışları

a. MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ortamları için standart çözeltisi hazırlanışı:

20 mg Doks-HCl çalışma standardı hassas bir şekilde tartıldı, MF ile 100 mL'ye tamamlandı ve çalkalanarak karıştırıldı (Ana stok çözelti). ($C_{\text{Doks-HCl Ana stok}} = 0.20 \text{ mg/mL}$). Bu çözeltiden 2.5 mL'şer alındı MF, pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.4 çözücülerine ile ayrı ayrı 10 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl standart}} = 0.05 \text{ mg/mL}$).

b. MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ortamları için numune (hammadde) çözeltisi hazırlanışı:

20 mg Doks-HCl hammadde hassas bir şekilde tartıldı, 100 mL'ye MF ile tamamlandı ve çalkalanarak karıştırıldı. Bu çözeltiden 2.5 mL alınarak MF, pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.4 çözücüleri ile ayrı ayrı 10 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl standart}} = 0.05 \text{ mg/mL}$).

c. HBSS ortamı için standart çözelti hazırlanışı:

4 mg Doks-HCl çalışma standardı hassas bir şekilde tartıldı, MF çözücü ile 100 mL'ye tamamlandı ve çalkalanarak karıştırıldı (**Ana stok çözelti**). ($C_{\text{Doks-HCl Ana stok}} = 0.04 \text{ mg/mL}$).

Bu çözeltiden 2.5 mL alındı ve 10.0 mL'ye HBSS ile tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl standart}} = 0.01 \text{ mg/mL}$).

d. HBSS ortamı için numune (hammadde) çözeltisi hazırlanışı:

4 mg Doks-HCl hammadde hassas bir şekilde tartıldı, 100 mL'ye MF ile tamamlandı ve çalkalanarak karıştırıldı. Bu çözeltiden 2.5 mL alındı HBSS ile 10 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl standart}} = 0.01 \text{ mg/mL}$).

Permeabilite çalışmalarında HBBS ortamında tayin edilecek Doks-HCl derişimi baz alınarak daha düşük derişimlerde metot validasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.3.3 Yöntem ve Hesaplamalar

Doks-HCl standart çözeltisinden en az 6 kez enjeksiyon verilerek öncelikle sistem uygunluk parametreleri olan; Doks-HCl'e ait pik alanları arasındaki % RSS, teorik plaka sayısı ve kuyruklanma faktörü değerlendirildi. Sistem uygunluk parametreleri, HPLC yöntem validasyonundaki her bir parametrede ve yapılacak olan her analizde kontrol edildi. Her bir analiz için, standart çözeltiye benzer şekilde hazırlanmış kontrol standart çözeltisi de enjekte edilerek alan uyumları Eşitlik 1'de gösterildiği şekilde hesaplandı. Numune miktar tayinleri için ise sistem uygunluk enjeksiyonlarını takiben

ikişer adet numune çözeltisinden ikişer adet enjeksiyon yapılarak %Doks-HCl miktarları MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ve HBSS ortamları için Eşitlik 2’de gösterildiği şekilde hesaplandı.

Eşitlik 1. Standart ve Kontrol Standart Uyumluları

$$\% \text{ Uyum} = \frac{\text{Standart Alanı(ortalama)}}{\text{Kontrol Standart Alanı}} \times \frac{\text{Kontrol Standart Tartımı}}{\text{Standart Tartımı}} \times 100$$

Eşitlik 2: MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ve HBSS ortamları için % Doks-HCl hesaplama eşitliği

$$\% \text{ Doks} - \text{HCl} = \frac{AT}{AS} \times \left(\frac{W_S}{100 \text{ mL}} \times \frac{2.5}{10 \text{ mL}} \times P_1 \right) \times \left(\frac{100 \text{ mL}}{W_T} \times \frac{2.5}{10 \text{ mL}} \times P_2 \right) \times 100$$

AT : Hammadde çözeltisi enjeksiyonundan elde edilen kromatogramdaki Doks-HCl pik alanı

AS : Standart çözeltisi enjeksiyonundan elde edilen kromatogramdaki Doks-HCl pik alanı

WT : Doks-HCl Hammadde tartımı (mg)

WS : Doks-HCl Çalışma Standardının tartımı (mg)

P1 : Doks-HCl Çalışma Standardının potensi

P2 : Doks-HCl Hammadde potensi

3.2.1.3.4 Özgünlük ve Seçicilik

Bir analitik metodun seçicilik tanımı, analiz edilen madde veya maddeleri, numune içerisindeki safsızlıklar, yardımcı maddeler ya da bozunma ürünleri varlığında doğru bir şekilde saptanması şeklindedir. Bu amaçla Doks-HCl standart çözeltisi ve çözücülerin enjeksiyonu yapıldı ve elde edilen HPLC kromatogramları incelendi. Kabul kriterleri Tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 5. Özgülük ve Seçicilik Parametresi için Kabul Kriterleri

Analizlenecek çözelti	Kriter
Çözücüden, plasebo çözeltilerinden gelen pikler	Analizlenecek maddenin altında pik vermemelidir.
Analizlenecek standart maddenin pik saflığı	990'dan düşük olmamalıdır.
Numunede bulunan analizlenecek maddenin pik saflığı	990'dan düşük olmamalıdır.

3.2.1.3.5 Çalışma Aralığı ve Doğrusallık

Kullanılan analitik yöntemde çalışılan konsantrasyonların doğru, kesin ve lineer sonuç verdiği alt ve üst konsantrasyon aralığıdır. Çalışma aralığı parametresi için, Doks-HCl standartlarının pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.4 çözücüleri içinde %20 ve %150 konsantrasyonlarında altışar enjeksiyon verildi ve relatif standart sapma değerleri hesaplandı.

Doks-HCl standartlarının HBSS çözücüsü içinde ise %5 ve %150 konsantrasyonlarında altışar enjeksiyon verildi ve relatif standart sapma değerleri hesaplandı.

a. pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ortamlarında çalışma aralığı çözeltilerinin hazırlanışı:

% 20 Konsantrasyonda Standart Çözelti: Hazırlanan ana stok çalışma standardı çözeltisinden 0.5 mL alındı ve MF, pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.5 çözücüleri ile ayrı ayrı 10 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl}} = 0.010 \text{ mg/mL}$).

% 50 Konsantrasyonda Standart Çözelti: Hazırlanan ana stok çalışma standardı çözeltisinden 1.25 mL alındı ve MF, pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.5 çözücüleri ile ayrı ayrı 10 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl}} = 0.025 \text{ mg/mL}$).

% 60 Konsantrasyonda Standart Çözelti: Hazırlanan ana stok çalışma standardı çözeltisinden 1.5 mL alındı ve MF, pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.5 çözücüleri ile ayrı ayrı 10 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl}} = 0.030 \text{ mg/mL}$).

% 80 Konsantrasyonda Standart Çözelti: Hazırlanan ana stok çalışma standardı çözeltisinden 2.0 mL alındı ve MF, pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.5 çözücüleri ile ayrı ayrı

10 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl}} = 0.040 \text{ mg/mL}$).

% 100 Konsantrasyonda Standart Çözelti: Hazırlanan ana stok çalışma standardı çözeltisinden 2.5 mL alındı ve MF, pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.5 çözücüleri ile ayrı ayrı 10 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl}} = 0.050 \text{ mg/mL}$).

% 120 Konsantrasyonda Standart Çözelti: Hazırlanan ana stok çalışma standardı çözeltisinden 3.0 mL alındı ve MF, pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.5 çözücüleri ile ayrı ayrı 10 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl}} = 0.060 \text{ mg/mL}$).

% 150 Konsantrasyonda Standart Çözelti: Hazırlanan ana stok çalışma standardı çözeltisinden 3.75 mL alındı ve MF, pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.5 çözücüleri ile ayrı ayrı 10 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl}} = 0.075 \text{ mg/mL}$).

b. HBSS ortamında çalışma aralığı çözeltilerinin hazırlanışı:

% 0.5 Konsantrasyonda Standart Çözelti: Hazırlanan ana stok çalışma standardı çözeltisinden 0.025 mL alındı ve HBSS ile 20 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl}} = 0.00005 \text{ mg/mL}$).

% 5 Konsantrasyonda Standart Çözelti: Hazırlanan ana stok çalışma standardı çözeltisinden 0.25 mL alındı ve HBSS ile 20 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl}} = 0.0005 \text{ mg/mL}$).

% 20 Konsantrasyonda Standart Çözelti: Hazırlanan ana stok çalışma standardı çözeltisinden 1.0 mL alındı ve HBSS ile 20 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl}} = 0.002 \text{ mg/mL}$).

% 50 Konsantrasyonda Standart Çözelti: Hazırlanan ana stok çalışma standardı çözeltisinden 2.5 mL alındı ve HBSS ile 20 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl}} = 0.005 \text{ mg/mL}$).

% 80 Konsantrasyonda Standart Çözelti: Hazırlanan ana stok çalışma standardı çözeltisinden 4.0 mL alındı ve HBSS ile 20 mL'ye tamamlandı çalkalanarak

karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl}} = 0.008 \text{ mg/mL}$).

% 100 Konsantrasyonda Standart Çözelti: Hazırlanan ana stok çalışma standardı çözeltisinden 5.0 mL alındı ve HBSS ile 20 mL'ye tamamlandı çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl}} = 0.010 \text{ mg/mL}$).

% 120 Konsantrasyonda Standart Çözelti: Hazırlanan ana stok çalışma standardı çözeltisinden 6.0 mL alındı ve HBSS ile 20 mL'ye tamamlandı çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl}} = 0.012 \text{ mg/mL}$).

% 150 Konsantrasyonda Standart Çözelti: Hazırlanan ana stok çalışma standardı çözeltisinden 7.5 mL alındı ve HBSS ile 20 mL'ye tamamlandı çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl}} = 0.015 \text{ mg/mL}$).

Çalışma Aralığı Kabul Kriterleri:

pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.4 çözücüler için; % 20 seviyesinde ve %150 konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerin ard arda yapılan 6 enjeksiyonu, HBSS çözücüsü için ise %0.5 seviyesinde ve %150 konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerin ard arda yapılan 6 enjeksiyonu sonucu elde edilen Doks-HCl pik alanları arasındaki RSS % 2.0'den fazla olmamalıdır.

Doğrusallık Kabul Kriterleri:

- Doks-HCl konsantrasyonları için pik alanlarına karşı konsantrasyonların grafiği çizilerek en küçük kareler metodu ile regresyon doğrusu ($y=mx+n$) hesaplandı; korelasyon katsayısı. y-kesişim noktası ve eğim değerleri değerlendirildi.
- Regresyon doğrusunun korelasyon katsayısı ($r \geq 0.999$) olmalıdır.
- Kesim Noktası (n): % 100 standart alanının $\leq \pm \% 2.0$ aralığında olmalıdır.

Eşitlik 3. Kesim noktası hesabı

$$\frac{n}{\%100 \text{ seviyedeki alan}} \times 100 \leq \pm \%2$$

y : Standart çözeltiden elde edilen ilgili pikin alanı (mAU)

x : Standart çözeltinin konsantrasyonu (mg/mL)

m : Regresyon doğrusunun eğimi (alan / konsantrasyon)

n : y doğrusunun kesim noktası (alan)

r : Regresyon doğrusunun korelasyon katsayısı

3.2.1.3.5.1 Duyarlılık ve Saptama Sınırı

Doks-HCl'ün MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ve HBSS ortamlarında ayrı ayrı beklenen derişimleri kolaylıkla ve doğrulukla analiz edebilmelidir. Bu yöntemin saptayabildiği en düşük derişime saptama derişimi (Limit of Detection, LOD) denir (Eşitlik 4). Bu derişim çok güvenli olmayıp, gürültü içerebilir. Gürültünün daha üzerinde olup, güvenilebilecek durumda olan derişime de duyarlılık veya analiz sınırı (Limit of Quantification, LOQ) denir (Eşitlik 5). Bu amaçla stok çözeltiden MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4, HBSS çözüsü ile doğrusallık parametresinde en düşük derişim enjekte edilerek cihaza sinyal/gürültü hesabı yaptırıldı. Sinyal/gürültü ortalaması alınarak LOD ve LOQ değerleri herbir çözücü sistemi için bulundu.

$$LOD = \left(\frac{S}{N} \right) \times 3.3$$

Eşitlik 4. LOD Hesaplama Eşitliği

$$LOQ = \left(\frac{S}{N} \right) \times 10$$

Eşitlik 5. LOQ Hesaplama Eşitliği

S: Standart çözeltiden elde edilen etkin madde pikine ait sinyal

N: Gürültü

3.2.1.3.6 Doğruluk

Doğruluk, geliştirilen HPLC metodu ile test edilen analiz sonuçlarının gerçek sonuçlara olan yakınlığıdır. Miktar tayini test konsantrasyonunun % 80, % 100 ve % 120 seviyelerinde etkin madde numuneleri hazırlandı; her seviye için 3'er toplam da 9 adet numune hazırlandı.

pH5.5, pH6.5, pH 7.4 Ortamlarında Çalışma Numunelerinin Hazırlıkları:

% 80 Konsantrasyonda Hammadde Çözeltisi: 16 mg Doks-HCl hammadde hassas bir şekilde tartıldı ve MF çözücüsü ile 100 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak

karıştırıldı. Bu çözeltiden 2.5 mL alınarak MF, pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.5 çözücüleri ile ayrı ayrı 10 mL'ye tamamlandı ve çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl hammadde}} = 0.04 \text{ mg/mL}$).

% 100 Konsantrasyonda Hammadde Çözeltisi: 20 mg Doks-HCl hammadde hassas bir şekilde tartıldı ve MF çözücüsü ile 100 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. Bu çözeltiden 2.5 alınarak MF, pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.5 çözücüleri ile ayrı ayrı 10 mL'ye tamamlandı ve çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl hammadde}} = 0.05 \text{ mg/mL}$).

% 120 Konsantrasyonda Hammadde Çözeltisi: 24 mg Doks-HCl hammadde hassas bir şekilde tartıldı ve MF çözücüsü ile 100 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. Bu çözeltiden 2.5 alınarak MF, pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.5 çözücüleri ile ayrı ayrı 10 mL'ye tamamlandı ve çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl hammadde}} = 0.06 \text{ mg/mL}$).

HBSS Ortamında Çalışma Numunelerinin Hazırlıkları:

% 80 Konsantrasyonda Hammadde Çözeltisi: 3.2 mg Doks-HCl hammadde hassas bir şekilde tartıldı ve MF çözücüsü ile 100 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. Bu çözeltiden 2.5 mL alındı ve HBSS ile 10 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl hammadde}} = 0.008 \text{ mg/mL}$).

% 100 Konsantrasyonda Hammadde Çözeltisi: 4.0 mg Doks-HCl hammadde hassas bir şekilde tartıldı ve MF çözücüsü ile 100 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. Bu çözeltiden 2.5 mL alındı ve HBSS ile 10 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl hammadde}} = 0.010 \text{ mg/mL}$).

% 120 Konsantrasyonda Hammadde Çözeltisi: 4.8 mg Doks-HCl hammadde hassas bir şekilde tartıldı ve MF çözücüsü ile 100 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. Bu çözeltiden 2.5 mL alındı ve HBSS ile 10 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl hammadde}} = 0.012 \text{ mg/mL}$).

Kabul kriterleri:

- Aynı anda hazırlanmış standart çözeltiye karşı Numune çözelti derişimleri hesaplandı.
- Her konsantrasyon için tek tek ve ortalama yüzde geri kazanım hesaplandı.
- Doks-HCl'ün her bir seviyedeki geri kazanım kontrol edildi.
- Her bir konsantrasyon için %RSS hesaplandı.

3.2.1.3.7 Kesinlik

Analitik metodun kesinliğinin göstergesi için (hassasiyeti) çok sayıdaki numune belirlenen koşullarda çalışılır ve sonuçlar birbirleriyle uygunluk içerisinde olmalıdır. Bu uygunluk derecesi seri ölçümlerin; korelasyon katsayısı, relatif standart sapması, standart sapması veya güven aralığı ile ifade edilir. Bu metotta;

- Sistem Kesinliği
- Tekrarlanabilirlik (Metot Kesinliği)
- Laboratuvar İçi Kesinlik (Ara Kesinlik) parametreleri çalışıldı.

3.2.1.3.7.1 Sistem Kesinliği

Sistem kesinliği numune hazırlama aşamalarından gelebilecek hatalardan bağımsız olarak kromatografik sistem performansının ölçülmesine dayanır. Bu amaçla ana stok çözeltisi MF çözüsü ile hazırlanıp seyreltmeleri MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ve HBSS ile yapıp ayrı ayrı hazırlanan Standart Çözeltiden 6 enjeksiyon verildi. Standart Çözeltinin ard arda yapılan 6 enjeksiyon sonunda elde edilen Doks-HCl pik alanları arasındaki RSS değerlendirildi.

3.2.1.3.7.2 Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, metodun aynı laboratuvarında, aynı analist ve cihaz ile aynı seriden ard arda 6 farklı numunenin çalışması ile elde edilen sonuçların birbirlerine yakınlık derecesinin ölçülmesi prensibine dayanır. 6 adet numune stok hazırlanması sonrası MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ve HBSS çözücüsü ile ayrı ayrı seyreltmeleri yapıldı. Her numuneden 2' şer enjeksiyon verildi. Numune çözeltileri aynı anda her bir çözücü ile ayrı ayrı hazırlanmış Standart Çözeltiye karşı çalışıldı ve her numunedeki Doks-HCl miktarı % olarak hesaplandı. 6 numunenin hesaplanan % etkin madde miktarının ortalaması ve SS değeri hesaplandı. Ayrıca Eşitlik 6'da verildiği şekilde %95 güven aralığı hesaplandı.

Eşitlik 6. Güven aralığı hesabı

$$\text{Güven aralığı} = \bar{X} \pm t_{n-1} \times \frac{SS}{\sqrt{n}}$$

X : Ortalama değer

n : Hesaplanacak data sayısı; n=6

SS: Standart sapma

t n-1 : Güvenirlilik katsayısı 95%; t n-1 =2.571

3.2.1.3.7.3 Laboratuvar İçi Kesinlik (Ara Kesinlik)

Analitik prosedür üzerinde değişen şartların etkisinin ölçülmesi için Laboratuvar içi kesinlik çalışması yapılır. Laboratuvar varyasyonlarının aynı çalışma numunesi ve standardı üzerindeki etkisini denemek amacıyla 6 adet numune ana stok hazırlanması sonrası MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ve HBSS çözücüsü ile ayrı ayrı hazırlandı her bir numuneden aynı analitik koşullar altında farklı günlerde, farklı cihazlarda 2'şer enjeksiyon yapılarak elde edilen sonuçların birbirine yakınlık derecesi değerlendirildi. İki farklı günde yapılan çalışmaların ayrı ayrı ortalamaları arasındaki fark değerlendirildi. Ayrıca her bir gün için çalışılan 6 numunenin SS değerleri, RSS ve Eşitlik 6'da gösterildiği şekilde % 95 güven aralığı hesaplandı.

3.2.1.3.8 Dayanıklılık

Bir analitik metodun dayanıklılığı, analitik yöntem parametrelerinde belirlenerek yapılan küçük değişikliklerden etkilenmeden kalabilme özelliğini gösterir. Ayrıca normal kullanımı esnasındaki güvenilirliğinin göstergesidir. Analitik yöntem parametrelerinde yapılan bu değişiklikler sonucu elde edilen sonuçların normal çalışma şartlarındaki değerlerine yakınlık derecesinin ölçülmesi prensibine dayanır.

Standart ve numune stok çözletileri MF çözücüsü ile hazırlandı ardından her bir örnek MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ve HBSS çözücüleri ile ayrı ayrı 1 adet standart ve 2 numune çözeltisi hazırlandı. Değişen her bir şart için standart çözeltiden 6 ve numune çözeltiilerinden birer enjeksiyon verildi. Sistem uygunluk parametreleri kontrol edilerek değerlendirildi.

Uygulanan değişiklik parametreleri;

- a. Normal çalışma koşulları
- b. Akış hızı 0.9 mL/dk
- c. Akış hızı 1.1 mL/dk
- d. Kolon Sıcaklığı 20°C
- e. Kolon Sıcaklığı 30°C

f. Tampon pH'ı 2.3

g. Tampon pH'ı 2.7

Pik alanları arasındaki % RSS, teorik plaka sayısı, kuyruklanma faktörü her bir koşul için değerlendirildi. Ayrıca çalışılan her bir parametreye ait numunelerin ortalama sonucuyla, normal çalışma şartlarındaki numunelerin ortalama sonucu arasındaki % RSS değerlendirildi.

3.2.1.3.9 Çözelti Stabilitesi

Bir analitik metodun çözelti stabilitesi çalışması yapılırken amaç, hazırlanan numune ve standartların bozunmaya uğramadan kullanılabileceğimiz süreyi tespit etmektir. Her bir çözücü ile ayrı ayrı standart ve numune çözeltileri taze bir şekilde hazırlandı ve hazırlanır hazırlanmaz ikişer kez enjekte edildi. Standart ve numunenin analizi aynı gün hazırlanmış standart çözeltiye karşı çalışıldı ve bu standart çözeltiden 6 enjeksiyon verildi. Belli periyotlarla standart ve numune çözeltilerinden ikişer enjeksiyon yapılarak 48 saat kontrol edildi. Standart çözeltilerin % fark hesabı için Eşitlik 7, numune çözeltilerinin % fark hesabı için ise Eşitlik 8 kullanıldı.

% Fark, % 2.0' dan fazla olmamalıdır.

Eşitlik 7. Standart çözelti için % Fark Hesabı

$$\% \text{ Fark} = \frac{|Std_i - Std_s|}{Std_i} \times 100$$

Eşitlik 8. Numune çözeltisi için % Fark Hesabı

$$\% \text{ Fark} = \frac{|Nm_i - Nm_s|}{Nm_i} \times 100$$

Std_i: Standart çözeltinin 0. dakikadaki etkin madde % miktarı

Std_s: Standart çözeltinin sonuncu dakikadaki etkin madde % miktarı

Nm_i: Numune çözeltisinin 0. dakikadaki etkin madde % miktarı

Nm_s: Numune çözeltisinin sonuncu dakikadaki etkin madde % miktarı

3.2.1.3.10 Sistem Uygunluk

Sistem uygunluk testinde; ekipmanın, uygulanan test prosedürünün ve analiz edilecek maddenin uygunluğu değerlendirilir. Her bir çözücü ile ayrı ayrı hazırlanan Standart Çözeltiden 6 enjeksiyon verildi. Standart çözeltisinden yapılan 6 ardışık

enjeksiyondan elde edilen Doks-HCl'e ait pik alanları arasındaki %RSS, teorik plaka sayısı, kuyruklanma faktörü değerlendirildi.

3.2.1.4 Etkin madde Çözünürlük Çalışması

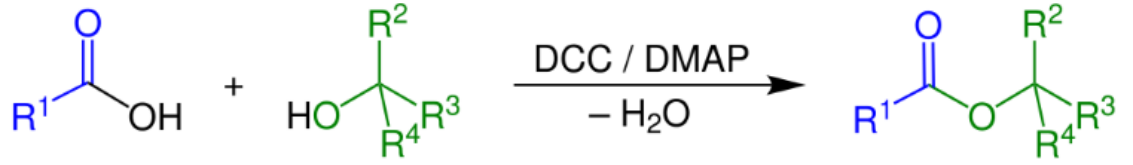
Çözünürlük çalışması sonuçları gerek lipozom ve prolipozom formülasyonlarının formülasyon tasarımı, gerekse geliştirilmiş formülasyonların salım çalışmalarında Sink koşulu sağlamak adına oldukça önemlidir (Scherphof, 1987). Doks-HCl'ün fizikokimyasal karakterizasyonunu gerçekleştirmek adına distile suda, formülasyon terkinde kullanılmak üzere; %0.9 NaCl, HEPES

0.5 mol/L Sodyum karbonat (pH 11), Sitrik asit-Sodyum sitrat (pH 4.0) ortamlarında ve salım çalışmalarında sink koşulu sağlamak adına; pH 5.5 (Fosfat tamponu), pH 6.5 (Fosfat tamponu), pH 7.4 (Fosfat tamponu), HBSS ortamlarında gerçekleştirildi. Bunun için çözünürlük çalışması yapılacak olan çözeltilerden 2 mL bir beherin içerisine alındı, üzerine Doks-HCl etkin maddesinin aşırı miktarları eklendi ve 37 °C'de manyetik karıştırıcılı su banyosuna koyularak 24., 48. ve 72. saatlerde örnek alındı, santrifüj edildi ve HPLC ile analiz edildi.

3.2.2 Formülasyon Geliştirme Çalışmaları

3.2.2.1 DSPE-PEG 2000-Glisirretinik asit konjugasyonu Sentezi

DSPE-PEG 2000-GA konjugasyonu sentezi için, kimyasal yapıda bulunan karboksilik asitler ile esterleşme reaksiyonu ve konjugasyonu sağlayan Steglich esterifikasyon reaksiyonu kullanıldı. Reaksiyon ilk olarak Wolfgang Steglich tarafından 1978'de tanımlanmıştır ve endüstride uzun yıllardır kullanılan bir teknik olmuştur (Jordan, Whymark, Sydenham, & Sneddon, 2021; Steglich & Neises, 1978). Yöntem; disikloheksilkarbodiimid (DCC)/dimetilaminopiridin (DMAP) katalizörler varlığında esterleşme reaksiyonunu içermektedir. Bu reaksiyonun gerçekleşmesi için reaksiyona giren maddelerden birinin karboksilik asit grubu, diğerinin ise hidroksil grubu içermesi gerekmektedir (Şekil 16) (Jordan et al., 2021). Bu nedenle DSPE-PEG 2000 molekülünün karboksilik asit içeren yapısı temin edildi ve GA molekülünde bulunan hidroksilik asit ile DCC/DMAP katalizörleri varlığında esterleşme reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon mekanizması Şekil 17'de gösterilmiştir.

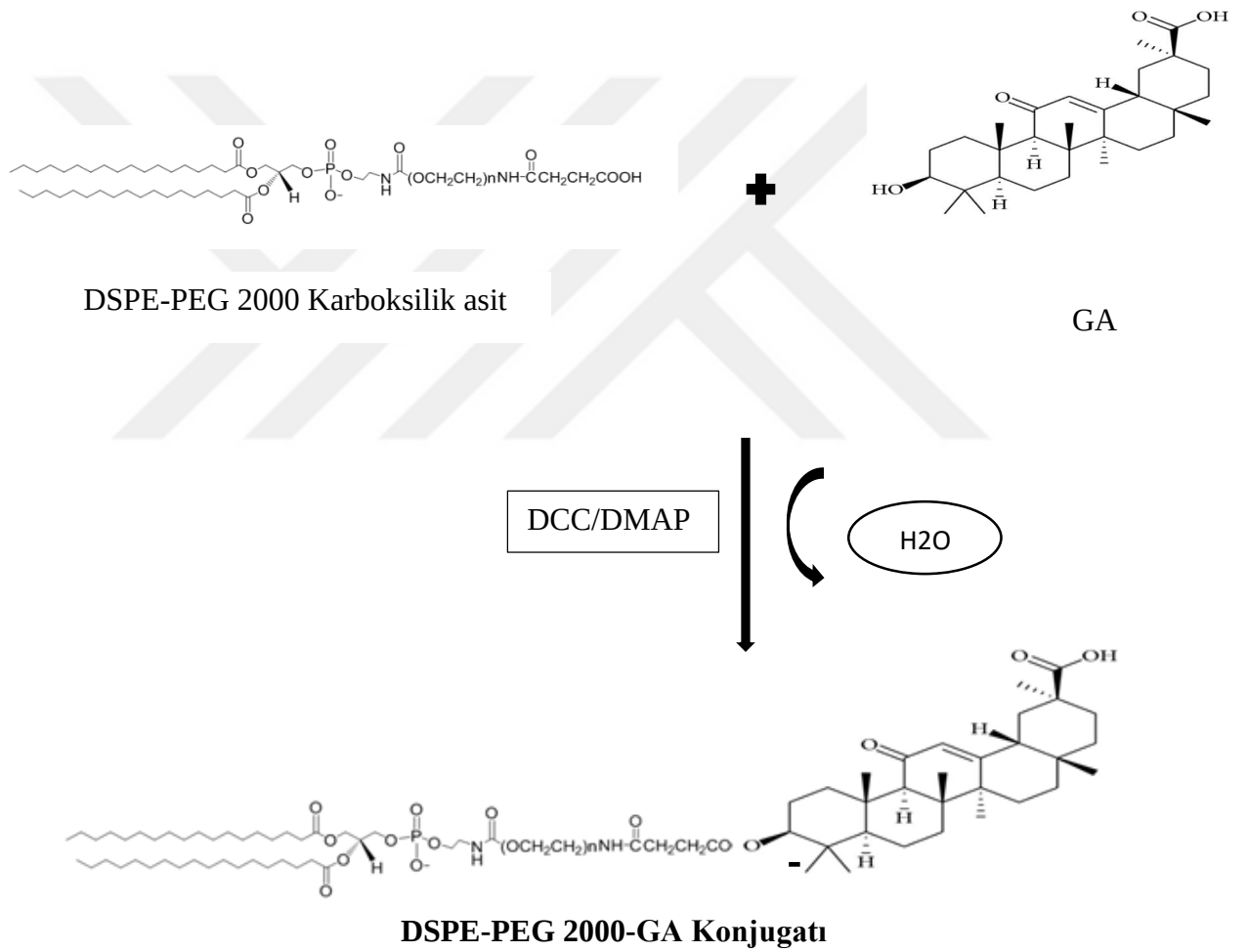


Karboksilik asit grubu Hidroksil grubu içeren
içeren molekül molekül

Steglich esterifikasyonu

Şekil 16. Steglich esterifikasyon reaksiyon oluşumu

Deney boyunca farklı mol oranlarında GA ile DSPE-PEG 2000 karboksilik asit aşağıda anlatıldığı şekilde reaksiyona sokuldu ve en yüksek verimin elde edildiği mol oranları (0.2 mmol GA ve 0.22 mmol DSPE-PEG 2000 karboksilik asit) belirlendi. Bu amaçla 2 mL diklorometan (DCM) içerisine 0.2 mmol GA ve 0.22 mmol DSPE-PEG 2000 karboksilik asit molekülleri ilave edilerek oda sıcaklığında tamamen çözünene kadar karıştırıldı. Daha sonra reaksiyon balonu tuz/buz banyosu içine alındı ve 0.25 mmol DCC 0.25 mL DCM içerisinde çözülüp damla damla yavaş şekilde reaksiyon balonuna eklendi. Her katım arasında yaklaşık 4-5 dakika beklenerek reaksiyon balonun ısınması engellendi. Son katımdan sonra 15 dk boyunca soğukta bekletilen reaksiyon balonu geri soğutucu düzeneğine bağlanarak 48 saat boyunca 25 °C'da karıştırıldı. Bu süre sonunda elde edilen ürün DCM ile 5 mL'ye seyreltildi. Bu çözelti sırasıyla, 0,5 M HCl, NaHCO₃ ve NaCl ile ekstrakte edildi ve kalan organik faz MgSO₄ ile kurutuldu ve DSPE-PEG 2000-Glisirretinik asit (DSPE-PEG 2000-GA) konjugatı başarı ile elde edildi (Martínez-Edo, Fornaguera, Borrós, & Sánchez-García, 2020).



Şekil 17. DSPE-PEG 2000 Konjugat Sentezinde Steglich Esterifikasyon Reaksiyonu

3.2.2.1.1 Nükleer Manyetik Rezonans Analizi

Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi, manyetik alan içerisine yerleştirilen molekülde bulunan bazı atom çekirdeklerinin radyo frekansı alanındaki elektromanyetik ışınları absorblaması ile tasarlanmış bir yapı aydınlatma yöntemidir. Molekül çekirdeğinin manyetik özelliğine bağlı olarak molekül iskeleti hakkında bilgi

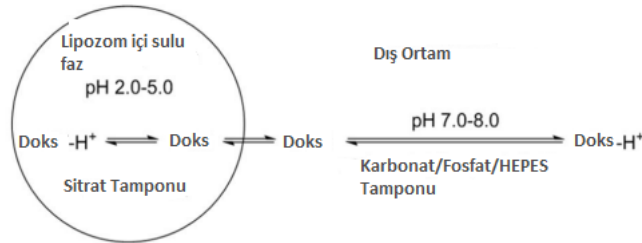
vermektedir. Diğer spektroskopik yöntemler elektronlar hakkında bilgi verirken NMR Spektroskopisi çekirdek ile ilgili detaylı bilgi vermektedir. Atom çekirdekleri pozitif (+) yük içermektedir ve kendi eksenleri etrafında dairesel spin hareketini geliş güzel yapmaktadır. Moleküllere manyetik alan uygulandığında farklı enerji seviyelerinde yarılmalar gözlenir ve yapı aydınlatılır (K. C. Wong, 2014). Bu amaçla sentezlenen DSPE-PEG 2000-GA konjugatının ^1H , ^{13}C NMR analizleri gerçekleştirildi.

3.2.2.2 Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesi

Lipozom formülasyonları ince film hidrasyon yöntemi kullanılarak hazırlandı (F1-F10) (Akbarzadeh et al., 2013; Primo, 2020). Fosfolipit olarak HSPC (Lipoid S PC-3, Hidrojene Soya L- α -fosfatidilkolin) (F1, F2, F3, F4, F5, F7, F8, F9, F10) ve DSPG (Lipoid PG 18:0/18:0, 1,2-Distearoyl-sn-glisero-3-fosfo-rac-gliserol, sodyum tuzu, DSPG-Na) (F6, F7, F8, F9, F10) kullanıldı. Formülasyon terkipleri Tablo 6'da verilmiştir. Stabil bir lipozomal ilaç taşıyıcı sistem formülasyonu tasarlamak için en önemli etmenlerden biri formülasyonda bulunan lipidler, kolesterol ve pegilasyon ajanının oranıdır. Yapılan çalışmalar kolesterol miktarının lipid oranının maksimum %50 si olabileceğini göstermekle birlikte, yüksek miktarda kolesterol miktarının ise enkapsülasyon kapasitesini düşürdüğünü ve etkin madde salımını yavaşlattığını göstermiştir (Nakhaei et al., 2021). Aynı şekilde formülasyon terkibinde bulunan pegilasyon ajanının miktarının fazla olması etkin madde salımını yavaşlatmaktadır (T. Yang et al., 2008). Bu nedenle lipozomal ilaç taşıyıcı sistemler tasarlanırken formülasyon terkibindeki lipid, kolesterol, pegilasyon ajanı oranlarının etkin maddeye özgü tasarlanması gerekmektedir. Bu amaçla molar oran olarak Doks-HCl etkin maddesinin pegile lipozomal piyasa preparatında kullanılan oran dikkate alınarak ön formülasyon çalışmaları tasarlandı. Piyasa preparatında fosfolipit:kolesterol:pegilasyon ajanı mol oranı 56: 38:5 şeklindedir ve ön formülasyon terkipleri de bu mol oranına göre planlanmıştır (Bulbake et al., 2017).

Pegile aktif hedefli lipozomal ilaç taşıyıcı sistem formülasyonunun geliştirilmesi için Yöntem 3.2.2.1’de anlatıldığı şekilde sentezlenen DSPE-PEG 2000-GA konjugasyon molekülü lipit olarak formülasyona eklendi. Sterol olarak ise Kolesterol kullanıldı. Formülasyonlar tasarlanırken lipit miktarı sabit tutuldu (HSPC, DSPC, DSPE-PEG 2000-GA, Kolesterol) farklı etkin madde:lipit oranlarının enkapsülasyon kapasitesi üzerine etkisinin gözlenmesi adına etkin madde oranları değiştirilerek on farklı formülasyon hazırlandı. Doks-HCl etkin maddesinin lipozomal ilaç taşıyıcı sisteme

yüklenmesinde, pH gradient metodu kullanıldı. pH gradient, lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerde etkin maddenin enkapsülasyon kapasitesini arttırmayı sağlayan ve uzun yıllardır kullanılan bir metottur (Hope, 1991). Doks-HCl birçok anti kanser özellik gösteren etkin maddeler gibi zayıf baz özellik göstermektedir ($pK_a=8.3$) (Alfarouk et al., 2015). pH gradient metodu ile zayıf bazik özellik gösteren etkin maddeler nötral/bazik ortamda deiyonize hale getirilir. Bu yaklaşımda veziküler yapılar pH değeri asidik (yaklaşık 4) olan tampon çözelti ile hidrate edilerek lipozomal sistemler oluşturulur. Asidik tampon çözeltisi olarak genelde sitrik asit-sodyum sitrat kullanılır. Lipozomal yapılar oluştuktan sonra ise nötral/düşük bazik özellikte tamponlar içerisinde disperse edilir ve pH gradient metodu oluşturulur. Bu metot ile deiyonize hale gelmiş olan molekülün permeabilitesi, iyonize halin permeabilitesinden oldukça yüksek olduğu için bu molekül lipozom vezikülü içerisinde sızar ve buradaki asidik ortamda protonlanır (H^+) (Xingong Li, Hirsh, Cabral-lilly, & Zirkel, 1998). Böylece iyonize hale gelmiş olan molekül lipozom vezikülünde enkapsüle olur. Doks-HCl'in lipozomal ilaç taşıyıcı sisteme pH gradient metodu ile yüklenme mekanizması Şekil 18'de gösterilmiştir.



Şekil 18. pH Gradient Metodu ile Doks-HCl'nin Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sisteme Yüklenmesi (L. Peng, Guiliang, & Jingchen, 2022)

pH gradient metodu için sitrik asit-sodyum sitrat/sodyum karbonat ve sitrik asit-sodyum sitrat/HEPES tampon sistemleri kullanıldı. Ön formülasyon terkipleri Tablo 6'de verilmiştir.

Lipozomal ilaç taşıyıcı sistem formülasyonlarının geliştirilmesinde; HSPC, DSPC, DSPE-PEG 2000-GA, Kolesterol ve Vitamin E Asetat 10 mL kloroformda çözündürüldü, bu çözelti rotari balonuna konuldu. Organik madde olan kloroform rotari evaporatör kullanılarak 200 rpm ve 65 °C'de iki saat süreyle uçuruldu. Kloroform atıklarının uzaklaşması için balon bir saat rotari evaporatörde bekletildi. Rotari sistemde evaporatör kapatılarak, balonunun çevresini kaplayan ince film

üzerine sitrit asit-sodyum sitrat (pH 4.0) eklendi. Bu çözelti 3 saat rotari sistemde 200 rpm de 65 °C 'de bekletildi. Oluşan lipozomal yapı 5 döngü şeklinde dondurma (-20 °C), çözmeye (65 °C) maruz bırakılarak multilameller veziküllerin varlığı azaltıldı (Guoqin, Brian, & Jeffrey, 2010). Ardından 30000 psi basınçla Microfluidics M-110P cihazından 10 döngü şeklinde geçirildi. Her döngü sonrası partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyel değerleri Zetasizer Ultra cihazı (Malvern Panalytical) ile ölçüldü. Avanti polar Lipits Ekstrüder ile 65 °C'de sırası ile 1000 µm, 800 µm, 400 µm, 200 µm ve 100 µm lik por çaplarındaki polikarbonat (PC) membranlardan geçirildi ve elde edilen lipozom çözeltisinin partikül boyutları, PDI ve zetapotansiyel değerleri ölçüldü ve optimize edildi (Gim, Ong, Chitneni, Lee, & Ming, 2016). pH gradient metodunu oluşturmak için sitrik asit-sodyum sitrat/sodyum karbonat (Guoqin et al., 2010) ve sitrik asit-sodyum sitrat/HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansülfonik asit) tamponları kullanıldı (Barenholz & Haran, 1994).

Bu lipozomal formülasyonlardan F1 formülasyonu üzerine Sodyum karbonat tamponu, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10 formülasyonları üzerine HEPES tamponu eklendi. %0.9 luk NaCl çözeltisi içerisinde çözündürülmüş Doks-HCl etkin maddesi ise bu lipozomal süspansiyon içerisine eklenerek 40 °C'de 3 saat rötari balonunda etkin madde yüklemesi sağlandı.

Formülasyonların tasarımı yapılırken lipit miktarları sabit tutularak etkin madde oranları değiştirildi. Etkin maddenin lipit faza oranları; 1.0:1.0; 0.8:1.0; 0.6:1.0; 0.4:1.0; 0.3:1.0; 0.2:1.0; 0.1:1.0 olacak şekilde formülasyon terkipleri oluşturuldu. Terkibi verilen her formülasyonun karakterizasyon çalışmaları (pH, partikül boyutu, PDI, viskozite, zeta potansiyel, enkapsülasyon kapasitesi ve ilaç yükleme kapasitesi) yapıldı.

Kullanılan Tampon çözeltilerinin hazırlanışları:

Sitrik asit- Sodyum sitrat (pH4.0): 18.8 gram sodyum sitrat ve 45.32 gram sitrik asit tartıldı ve 1000 mL'ye distile su ile tamamlanmadan pH kontrolü yapıldı. pH 4.0'den düşük pH bulunur ise NaOH ile yüksek pH bulunur ise HCl ile pH 4'e ayarlandı. Ardından tamamlama yapıldı (Guoqin et al., 2010).

0.5 mol/L Sodyum karbonat: 52.995 g gram sodyum karbonat balonjoje içerisine tartıldı, 1000'ye distile su ile tamamlandı (pH 11) (Guoqin et al., 2010).

%0.9 NaCl: İzotonik sodyum klorür çözeltisi kullanıldı.

HEPES çözeltisi: 1M Hepes çözeltisi kullanıldı (Sigma-Aldrich).

Tablo 6. Lipozomal önformülasyon çalışmalarında formülasyon terkipleri

Kod	HSPC (mg)	DSPC (mg)	DSPE-PEG 2000-GA (mg)	Kolesterol (mg)	Vit E Asetat (g)	Sitrik asit-Sodyum sitrat (g)	Sodyum karbonat (g)	HEPES (g)	% 0.9 NaCl	Doks-HCl (mg)	İlaç:lipit oranı
F1	300.0	-	100.0	100.0	0.012	10	78.988	-	10	500.0	1.0:1.0
F2	300.0	-	100.0	100.0	0.012	10	-	78.988	10	500.0	1.0:1.0
F3	300.0	-	100.0	100.0	0.012	10	-	79.088	10	400.0	0.8:1.0
F4	300.0	-	100.0	100.0	0.012	10	-	79.188	10	300.0	0.6:1.0
F5	300.0	-	100.0	100.0	0.012	10	-	79.288	10	200.0	0.4:1.0
F6	-	300.0	100.0	100.0	0.012	10	-	79.288	10	200.0	0.4: 1.0
F7	200.0	100.0	100.0	100.0	0.012	10	-	79.288	10	200.0	0.4: 1.0
F8	200.0	100.0	100.0	100.0	0.012	10	-	79.338	10	150.0	0.3: 1.0
F9	200.0	100.0	100.0	100.0	0.012	10	-	78.388	10	100.0	0.2: 1.0
F10	200.0	100.0	100.0	100.0	0.012	10	-	79.438	10	50.0	0.1: 1.0

3.2.2.3 Lipozom Formülasyonu In vitro Karakterizasyon Çalışmaları

3.2.2.3.1 Lipozom Formülasyonu Partikül Boyutu ve Polidispersite İndeksi Ölçümü

Lipozom formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi (PDI) HBSS ile seyreltilerek dinamik ışık saçılımı yöntemi ile Zetasizer cihazı kullanılarak belirlendi ve ölçümler 25°C’de yapıldı (n=3).

3.2.2.3.2 Lipozom Formülasyonu Zeta Potansiyel Değerlerinin Ölçümü

Zeta potansiyel ölçümleri Zetasizer cihazı kullanılarak yapıldı. Lipozom formülasyonları zetasizer kuvvetlerine alındı ve ölçümler 25 °C’de yapıldı (n=3).

3.2.2.3.3 Lipozom Formülasyonu pH Değerinin Saptanması

Lipozom formülasyonlarının pH değeri, pH metre kullanılarak belirlendi. Çalışmalar 25 ± 1 °C’de gerçekleştirildi (n=3).

3.2.2.3.4 Lipozom Formülasyonu Viskozite Değerinin Ölçümü

Lipozom formülasyonları Viskozimetre cihazının ULA başlığı kullanılarak ölçüldü. Çalışmalar 25 ± 1 °C’de gerçekleştirildi (n=3).

3.2.2.3.5 Lipozom Formülasyonu Enkapsülasyon Kapasitesi Ölçümü

Lipozom formülasyonunun enkapsülasyon kapasitesi ölçümü için, formülasyonlar Amicon Ultra 100 kDa EMD-Millipore (Billerica, MA) ile 5000 rpm de 40 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtre üzerinde kalan ve filtre altında bulunan sıvalardan miktar tayini yapıldı. Enkapsülasyon etkinlik yüzdesi (EE %) Eşitlik 9 kullanılarak belirlendi (Rocío, López-Cabeza, Melanie Kah, Renato Grillo, Zuzana Bílková and Hofman, 2021). Ayrıca santrifüj sonrası filtre üzerinde kalan formülasyonda lipozom veziküllerinin dış kısmında tutunmuş Doks-HCl olup olmadığının tespiti için lipital yapıları çözmeyen fakat Doks-HCl’ü çözen sıvı olarak distile su kullanıldı. 0.5 gram filtre üzerinde kalan formülasyondan alınıp 10 mL distile su ile yıkandı ve 30 dakika santrifül edildi. Üst sıvıdan alınıp Doks-HCl miktar tayini yapıldı (n=3).

Eşitlik 9. Enkapsülasyon etkinlik yüzdesi formülü

$$\% EE = \frac{\text{Toplam etkin madde miktarı} - \text{Enkapsüle olmamış serbest etkin madde miktarı}}{\text{Toplam etkin madde miktarı}} \times 100$$

3.2.2.3.6 Lipozom Formülasyonu İlaç Yükleme Kapasitesi Ölçümü

Nihai formülasyona karar verilmeden önce yapılan Doks-HCl miktar tayininde hammadde için verilen ve valide edilen HPLC validasyonu metodu kullanıldı. Bunun için Doks-HCl standart derişimi olan 0.05 mg/mL derişime denk gelecek miktarda lipozom formülasyonu MF ile 10 mL’ye tamamlandı. 10 dakika ultrasonik banyoda bekletildi. 0.22 µm lik filtreden süzülerek HPLC cihazına enjekte edildi (n=3).

Gerçekleştirilen in vitro karakterizasyon çalışmalarında optimal sonuçları veren aktif hedefli pegile F5, F6 ve F7 lipozom formülasyonları prolipozom formülasyonu geliştirme çalışmalarına devam edildi.

3.2.2.4 Prolipozomal İlaç Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesi

Geliştirilen lipozomal ilaç taşıyıcı sistem formülasyonlarının karakterizasyon çalışmalarının yapılmasının ardından elde edilen formülasyonlardan optimal formülasyonlar seçilerek prolipozomal ilaç taşıyıcı sistem geliştirme çalışmaları yapıldı. F5, F6 ve F7 lipozomal formülasyonları kullanılarak farklı miktarlarda mannitol kullanılarak prolipozom formülasyonları geliştirildi. Prolipozomal ilaç taşıyıcı sistem elde etmek için Telstar LyoQuest Liyofilizatör cihazı kullanıldı.

Etkin maddeler ve lipozom yapıları dondurarak kurutma işlemi sırasında yaşanan stres koşullarından etkilenebilmektedirler. Bu amaçla şekerler (sakaroz, trehaloz), şeker-alkoller (mannitol, sorbitol) ve yüzey aktif maddeler (polisorbat 20, 80) gibi yardımcı maddeler, stabiliteyi arttırmak için formülasyon terkibine eklenmektedir. Bir yardımcı madde; dondurma aşaması sırasında formülasyonu stres koşullardan koruyor ise kriyoprotektan, hem dondurma hem de kurutma aşamasında stres koşullardan koruyor ise liyoprotektan olarak adlandırılır (Sonje, 2019). Liyoprotektan molekülleri fosfolipit baş grupları arasındaki yanıl boşluğu korumaya yardımcı oldukları için membran stabilizatörleri olarak işlev görürler. Ayrıca rekonstitüsyon sırasında, lipozomal yapılar birbirleriyle doğrudan temasta olmadığından agregasyonun önüne geçilir (Stark, Pabst, & Prassl, 2010).

Prolipozom formülasyonu geliştirmek için liyoprotektan olarak Mannitol kullanıldı. Formülasyon terkipleri Tablo 7’de verilmiştir. Etkin kurutma sağlanması adına birincil ve ikincil kurutma adımlarında farklı sıcaklık ve sürelerde liyofilizasyon denemesi yapıldı. En etkin kurutmanın sağlandığı liyofilizasyon parametreleri ise Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 7. Prolipozom önformülasyon terkipleri

Kod	HSPC (mg)	DSPC (mg)	DSPE-PEG 2000-GA (mg)	Kolesterol (mg)	Vit E Asetat (g)	Sitrik asit-Sodyum sitrat çözeltisi	1M HEPES çözeltisi (g)	%0.9 NaCl çözeltisi	Doks-HCl (mg)	Mannitol (g)	Mannitol: Lipit oranı
						Katı içerik (0.0578 g/g)	Katı içerik (0.2383 g/g)	Katı içerik (0.009 g/g)			
F5-1	300.0	-	100.0	100.0	0.012	10	74.288	10	200.0	5.0	10:1
F5-2	300.0	-	100.0	100.0	0.012	10	73.288	10	200.0	6.0	12:1
F5-3	300.0	-	100.0	100.0	0.012	10	72.288	10	200.0	7.0	14:1
F6-1	-	300.0	100.0	100.0	0.012	10	74.288	10	200.0	5.0	10:1
F6-2	-	300.0	100.0	100.0	0.012	10	73.288	10	200.0	6.0	12:1
F6-3	-	300.0	100.0	100.0	0.012	10	72.288	10	200.0	7.0	14:1
F7-1	200.0	100.0	100.0	100.0	0.012	10	74.288	10	200.0	5.0	10:1
F7-2	200.0	100.0	100.0	100.0	0.012	10	73.288	10	200.0	6.0	12:1
F7-3	200.0	100.0	100.0	100.0	0.012	10	72.288	10	200.0	7.0	14:1
F7-4	200.0	100.0	100.0	100.0	0.012	10	71.288	10	200.0	8.0	16:1

Etkin bir kurutma yapılması halinde teorik olarak prolipozom formülasyonlarının terkiplerinde bulunan katı içerik hesabı yapılarak birim formüldeki % miktarları hesaplandı (Tablo 8).

Tablo 8. Liyofilizasyon sonrası prolipozom formülünde bulunan katı içeriklerin birim formül yüzdeleri

Kod	HSPC (%)	DSPC (%)	DSPE-PEG 2000-GA (%)	Kolesterol (%)	Vit E Asetat (%)	Sitrik asit (%)	Sodyum sitrat (%)	HEPES (%)	NaCl (%)	Doks-HCl (%)	Mannitol (%)
F5-1	1.24	-	0.41	0.41	0.05	0.78	1.88	73.31	0.37	0.83	20.71
F5-2	1.20	-	0.40	0.40	0.05	0.75	1.82	70.11	0.36	0.80	24.09
F5-3	1.17	-	0.39	0.39	0.05	0.73	1.77	67.10	0.35	0.78	27.28
F6-1	-	1.24	0.41	0.41	0.05	0.78	1.88	73.31	0.37	0.83	20.71
F6-2	-	1.20	0.40	0.40	0.05	0.75	1.82	70.11	0.36	0.80	24.09
F6-3	-	1.17	0.39	0.39	0.05	0.73	1.77	67.10	0.35	0.78	27.28
F7-1	0.83	0.41	0.41	0.41	0.05	0.78	1.88	73.31	0.37	0.83	20.71
F7-2	0.80	0.40	0.40	0.40	0.05	0.75	1.82	70.11	0.36	0.80	24.09
F7-3	0.78	0.39	0.39	0.39	0.05	0.73	1.77	67.10	0.35	0.78	27.28
F7-4	0.76	0.38	0.38	0.38	0.05	0.71	1.72	64.26	0.34	0.76	30.28

Liyofilizasyon çalışmalarına başlamadan önce kurutmanın tam olması için lipozomal formülasyonlar -20 °C’de tamamen donduruldu. Tablo 9’de verilen kurutma parametreleri uygulanarak elde edilen prolipozom formülasyonları ve % 5 lik dekstroz çözeltisi içerisinde dispersiyon sonrası formülasyonlar karakterize edildi.

Tablo 9. Liyofilizasyon parametreleri

	Proses adı	Basınç	Sıcaklık	Zaman (Saat)
Liyofilizasyon Parametreleri	Dondurma	-	-65°C	3:00
	Soğutma + Vakum (Birincil Kurutma)	0.01 mbar	-65°C - -20°C	8:00
	Soğutma + Vakum (Birincil Kurutma)	0.01 mbar	-20°C - 0°C	5:00
	Soğutma + Vakum (Birincil Kurutma)	0.01 mbar	0°C - 20°C	5:00
	Isıtma (İkincil Kurutma)	0.01 mbar	25°C	3:00

3.2.2.5 Prolipozom Formülasyonlarının In Vitro Karakterizasyon Çalışmaları

Prolipozom formülasyonunun in vitro karakterizasyon çalışmalarından; pH, partikül boyutu (PB), PDI, zeta potansiyel (ZP) ve viskozite ölçümlerinde uygulama dozu olan Doks-HCl derişimi 2 mg/mL olacak şekilde (F5-1, F6-1 ve F7-1 prolipozom formülasyonları 0.241 g; F5-2, F6-2 ve F7-2 prolipozom formülasyonları için 0.250 g; F5-3, F6-3 ve F7-3 prolipozom formülasyonları için 0.256 g; F7-4 prolipozom formülasyonları için ise 0.263 g) %5’lik dekstroz içerisinde seyreltilerek çalışmalar gerçekleştirildi (Doks-HCl içeren Pegile Lipozomal piyasa preparatı Caelyx® (2mg/mL) baz alınarak çalışma tasarımı yapıldı).

3.2.2.5.1 Prolipozom Formülasyonlarının Partikül Boyutu ve Polidispersite İndeksi Ölçümü

Prolipozom formülasyonları, PB ve PDI ölçümü için %5’lik Dekstroz çözeltisi içerisinde dağıtıldı ve dinamik ışık saçılımı yöntemi ile Zetasizer cihazı kullanılarak belirlendi ve ölçümler 25°C’de yapıldı (n=3).

3.2.2.5.2 Prolipozom Formülasyonlarının Zeta Potansiyel Değerlerinin Ölçümü

Prolipozom formülasyonları, ZP ölçümleri için %5'lik Dekstroz çözeltisi içerisinde dağıtıldı. Ölçümler Zetasizer cihazı kullanılarak yapıldı. Formülasyonlar zetasizer kuvvetlerine alındı ve ölçümler 25 °C'de yapıldı (n=3).

3.2.2.5.3 Prolipozom Formülasyonlarının pH Değerinin Saptanması

%5'lik Dekstroz çözeltisi içerisinde dağıtılan prolipozom formülasyonlarının pH ölçümleri, pH metre kullanılarak belirlendi. Çalışmalar 25±1 °C'de gerçekleştirildi (n=3).

3.2.2.5.4 Prolipozom Formülasyonlarının Viskozite Değerinin Ölçümü

%5'lik Dekstroz çözeltisi içerisinde dağıtılan prolipozom formülasyonlarının viskozite değerleri Viskozimetre cihazının ile ULA başlığı kullanılarak ölçüldü. Çalışmalar 25±1°C'de gerçekleştirildi (n=3).

3.2.2.5.5 Prolipozom Formülasyonlarının Enkapsülasyon Kapasitesi Ölçümü

%5'lik Dekstroz çözeltisi içerisinde dağıtılan prolipozom formülasyonları Amicon Ultra 100 kDa EMD-Millipore (Billerica, MA) ile 5000 rpm de 40 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtre üzerinde kalan ve filtre altında bulunan sıvalardan miktar tayini yapıldı. Enkapsülasyon etkinlik yüzdesi (EE %) Eşitlik 9 kullanılarak belirlendi.

Ayrıca santrifüj sonrası filtre üzerinde kalan formülasyonda lipozom veziküllerinin dış kısmında tutunmuş Doks-HCl olup olmadığının tespiti için lipital yapıları çözmeyen fakat Doks-HCl'yi çözen sıvı olarak distile su kullanıldı. Filtre üzerinde kalan formülasyondan 0.5 gram alınıp 10 mL distile su ile yıkandı ve 30 dakika santrifül edildi. Üst sıvıdan alınıp Doks-HCl miktar tayini yapıldı (n=3).

3.2.2.5.6 Prolipozom Formülasyonlarının İlaç Yükleme Kapasitesi Ölçümü

Nihai formülasyona karar verilmeden önce yapılan Doks-HCl miktar tayininde hammadde için verilen ve valide edilen HPLC validasyonu metodu kullanıldı. Bunun için Doks-HCl standart derişimi olan 0.05 mg/mL derişime denk gelecek (F5-1, F6-1 ve F7-1 prolipozom formülasyonları 0.06 g; F5-2, F6-2 ve F7-2 prolipozom formülasyonları için 0.0625 g; F5-3, F6-3 ve F7-3 prolipozom formülasyonları için 0.064 g; F7-4 prolipozom formülasyonları için ise 0.066 g) prolipozom formülasyonları MF ile 10 mL'ye tamamlandı ve 10 dakika ultrasonik banyoda bekletildi. 0.22 µm lik filtreden süzülerek HPLC cihazına enjekte edildi (n=3).

3.2.2.5.7 Prolipozom Formülasyonu Yeniden Dağılılabilme Zamanı Tayini

Liyofilizasyon sonrası oluşan kek yapısının morfolojisi, spesifik yüzey alanı yeniden dağılılabilme zamanını önemli ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle, yeniden dağılılabilme zamanı ve davranışının ölçümü, liyofilize ürünlerin üretim süreçlerini değerlendirme ve karakterizasyon çalışmalarında oldukça önemlidir (Werk, Huwyler, Hafner, Luemkemann, & Mahler, 2015). Bu amaçla geliştirilen prolipozom formülasyonları Doks-HCl derişimi 2 mg/mL olacak şekilde %5 lik dekstroz çözeltisi içerisinde tamamen dağıldığı zaman kaydedilmiştir (n=3).

3.2.2.5.8 Prolipozom Formülasyonu Nem Miktarı Tayini

Prolipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerde etkin bir kurutma prosesinin gerçekleştirildiğinin en büyük kanıtlarından biri nem miktarı ölçümüdür (Matejtschuk et al., 2016). Bu amaçla Karl Fisher cihazı kullanılarak prolipozom formülasyonlarının nem miktarları ölçüldü (n=3).

Yapılan in vitro karakterizasyon çalışmaları ile optimal in vitro sonuçları veren aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu ile çalışmalara devam edilmiştir. Lipozom ve prolipozom formülasyonlarının karşılaştırmalı sonuçlarını gözlemlemek adına aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu ile in vitro çalışmalar sürdürüldü.

3.2.2.5.9 Prolipozom Formülasyonu X-Işını Kırınım Tayini

X-ışını kırınımı (XRD) analizi, katı numunelerin kristallliğini ve yapısını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte, her bir kristalin fazın kendine özgü atomik dizilimlerine bağlı olarak, X-ışınlarını karakteristik bir düzen içerisinde kırması esasına dayanır. (Sherwood, 2001). Prolipozom ilaç taşıyıcı sistem formülasyonu geliştirme aşamasında formülasyona uygulanan pH gradient metodu ve liyofilizasyon yöntemi sonrası Doks-HCl etkin maddesi yapısındaki kristal özelliklerin değerlendirilmesi, DSC analizi ile destekleyici sonuçların görülmesi adına; Doks-HCl etkin maddesinin, formülasyon bileşenlerinin fiziksel karışımları ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun XRD analizleri gerçekleştirildi. Bu amaçla XRD panına Doks-HCl etkin maddesi, F7-3 prolipozom formülasyon bileşenlerinin fiziksel karışımları ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu ayrı ayrı eklenerek 0-50° arasında 2 theta (2 Θ) açısı taraması yapılarak analiz gerçekleştirildi (Rojanarat, 2012).

3.2.3 Lipozom ve Prolipozom Formülasyonlarının Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi

Geliştirilen lipozomal ve prolipozomal formülasyonlardan; aktif hedefli pegile F7 lipozomal ilaç taşıyıcı sistem formülasyonunun en küçük PB'na, en düşük PDI değerine ve en yüksek enkapsülasyon kapasitesine sahip olması, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozomal ilaç taşıyıcı sistem formülasyonunun ise en küçük PB'na, en düşük PDI değerine, en yüksek enkapsülasyon kapasitesine, en düşük nem ve en düşük yeniden dağılım zamanına sahip olması nedeniyle çalışmalara bu formülasyonlar ile devam edildi.

Optimal lipozom ve prolipozom formülasyonlarının morfolojik özelliklerinin incelenmesi için Kriyojenik elektron mikroskopisi (KryoTEM) analizi gerçekleştirildi. İnce camsı sulu filmlerin sıvı nitrojenin sıcaklığında tutularak transmisyon elektron mikroskopisi analizi yapılması, KryoTEM analizi olarak adlandırılmaktadır. KryoTEM yönteminde çözelti, çok ince bir sulu film oluşturulacak şekilde bir mikroskopi ızgarasına uygulanır, daha sonra etan gibi donma noktasının hemen üzerindeki bir soğutma ortamına daldırılır, burada film yapısı kristalleşme olmadan çok hızlı bir şekilde camlaşır. Daha sonra, örneği içeren ızgara mikroskoba aktarılır ve sıvı nitrojen sıcaklığında incelenir. Bu işlem dehidrasyona veya yapılar arasında yeniden düzenlenmeye izin vermeyecek kadar hızlı bir şekilde gerçekleşir. Bu şekilde hızla camlaştırılmış filmde yakalanan yapılar, dehidrasyon olmadan gözlenir. Yöntem, özellikle lipozomların morfolojik özelliklerinin belirlenmesinde önemli ve kritik bir yere sahiptir (Almgren, Edwards, & Karlsson, 2000).

Bu amaçla aktif hedefli pegile lipozom formülasyonu (F7) ve aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonunun (F7-3) (% 5'lik Dekstroz çözeltisinde seyreltildikten sonra) KryoTEM analizi gerçekleştirildi. Örneklerin hazırlanmasında GP Plunge vitrifikasyon robotu kullanıldı. 200 meshlik TEM gridi üzerine 10 µL çalışma numunesi uygulandı. Örnekler Hitachi HT 7800 marka TEM mikroskopta -178 °C'de incelendi (Lee, Morrison, Zhang, & McCormick, 2016).

3.2.4 Lipozom ve Prolipozom Formülasyonlarının Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analizleri

Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC), bir numunenin ve referansın sıcaklığını artırmak için gereken ısı miktarındaki farkın sıcaklığın bir fonksiyonu olarak ölçüldüğü termoanalitik bir tekniktir. Numune ve referansın üzerindeki ısı akışı farkına

dayanan bu teknikte DSC ölçümü sonunda ısı akışına karşı sıcaklık grafikleri elde edilir. DSC; membran davranışının karakterizasyonunda, geçiş sıcaklıkları/ erime noktalarının belirlenmesinde önemli bir tekniktir (Bastos & Aguas, 2016).

Bu amaçla öncelikle formülasyonda bulunan her yardımcı madde ve etkin maddenin (HSPC, DSPC, Kolesterol, DSPE-PEG2000-GA, Doks-HCl) DSC ölçümleri alındı ve camsı geçiş sıcaklıkları/ erime noktaları değerlendirildi. Ardından plasebo aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu, aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu, plasebo aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun DSC ölçümleri alındı. Ölçümü alınacak örnek DSC ölçüm kabına yaklaşık 5 mg olacak şekilde eklendi, dakikada 10 °C’de artış ile azot gazı altında referans panına karşılık ölçümler alındı.

3.2.5 Lipozom ve Prolipozom Formülasyonunun Osmolarite Analizleri

Enjekte edilebilir bir ürünün osmolaritesi vücut sıvıları ile aynı veya benzer olmalıdır. Osmolarite, bir çözeltinin yarı geçirgen zar boyunca uyguladığı, suyun serbest geçişine izin veren ve çözünen maddelerin hareketini tamamen engelleyen ozmotik basıncın bir ölçüsüdür. Donma noktası alçalması ve buharlaşma noktası azalması osmolariteyi ölçmek için kullanılan iki yaygın yöntemdir (W. Wang, 2015). Donma noktası alçalması yöntemi, her türlü çözünen maddeye duyarlı olması ve basit ölçüm içermesinden dolayı en çok kullanılan yöntemdir (Schmelzer, Vivian, & Miller, 2000). Bu amaçla lipozom formülasyonu direkt, prolipozom formülasyonu ise 2 mg/mL Doks-HCl içerecek şekilde %5’lik Deskroz çözeltisi içerisinde disperse edildikten sonra yaklaşık 200 µL ölçüm ünitesine koyulduktan sonra osmolarite değerleri ölçüldü (n=3).

3.2.6 Lipozom ve Prolipozom Formülasyonunda Doks-HCl’ün Bitmiş Ürün Analitik Yöntem Validasyonu

Doks-HCl etkin maddesinin MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ve HBSS ortamlarında metot geliştirme ve analitik yöntem validasyonu Yöntem 3.2.1.3’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi ve HPLC yöntem parametreleri birebir uygulandı. Bitmiş ürün aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonun içerisinde bulunan Doks-HCl miktar tayininin, etkin madde validasyonu ile aynı duyarlılık ve doğruluk ile gerçekleştirilebilmesi adına formülasyonlardan Doks-HCl etkin maddesinin ekstraksiyon parametreleri belirlendi ve sistem uygunluk parametreleri sağlandıktan sonra özgünlük ve seçicilik, doğruluk, kesinlik (sistem

kesinliği, tekraralanabilirlik, laboratuvarıçı kesinlik), dayanıklılık, sistem uygunluğu ve çözelti stabilitesi parametreleri gerçekleştirildi. Metot validasyonu süresince yapılan analizlerde ICH kriterleri baz alındı (ICH, 1995).

Çözücü: Sodyum Lauril Sülfat Tamponu: Asetonitril (% 50:% 50) (MF)

3.2.6.1 Standart ve Numune Çözeltilerinin Hazırlanışları

a. Standart Çözelti Hazırlanışı:

20 mg Doks-HCl çalışma standardı hassas bir şekilde tartıldı, 100 mL'ye çözücü ile tamamlandı ve çalkalanarak karıştırıldı (Ana stok çözelti). Bu çözeltiden 2.5 mL alındı 10 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl standart}} = 0.05 \text{ mg/mL}$).

b. Plasebo numune çözeltisi hazırlanışı:

Doks-HCl içermeyen 0.25 g aktif hedefli pegile F7 lipozom ve 0.064 g aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonları hassas bir şekilde 10 mL lik balonjojeye ayrı ayrı tartıldı ve çözücü eklendi, çalkalanarak karıştırıldı. 10 dakika ultrasonik banyoda bekletildi. Çözücü 10 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC cihazına enjekte edildi.

c. Numune (Lipozom ve Prolipozom) çözeltisi hazırlanışı:

0.5 mg Doks-HCl içeren lipozom formülasyonu için 0.25 gram aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu hassas bir şekilde tartıldı ve 10 mL lik balonjojeye çözücü eklenerek çalkalayarak karıştırıldı. 0.5 mg'a eşdeğer miktarda Doks-HCl içerdiği düşünölen 0.064 g aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu hassas bir şekilde tartıldı 10 mL lik balonjojeye çözücü eklenerek çalkalayarak karıştırıldı. Numuneler 10 dakika ultrasonik banyoda bekletildi. Çözücü ile 10 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl}} = 0.05 \text{ mg/mL}$). Her iki numune de iki paralel hazırlanarak cihaza enjekte edildi.

3.2.6.2 Yöntem ve Hesaplamalar

Standart çözelti ile yapılan sistem uygunluk parametresindeki standart enjeksiyonlar, Doks-HCl'e ait pikin değerlendirilecek pik özellikleri ve kabul kriterleri Yöntem 3.2.1.3.3'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Ayrıca standart ve kontrol standart uyumlarının değerlendirilmesinde Eşitlik 1 kullanıldı. Aktif hedefli pegile F7 lipozom

formülasyonunda bulunan %Doks-HCl miktarına dair hesaplama Eşitlik 10'da, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunda bulunan %Doks-HCl miktarına dair hesaplama Eşitlik 11'de verilmiştir.

Eşitlik 10. F7 Lipozom Formülasyonu %Doks-HCl Miktar Hesabı

F7 Lipozom % Doks – HCl

$$= \frac{AT}{AS} \times \left(\frac{W_S}{100 \text{ mL}} \times \frac{2.5}{10 \text{ mL}} \times P_1 \right) \times \left(\frac{10 \text{ mL}}{W_T} \times \frac{1 \text{ g}}{2 \text{ mg}} \right) \times 100$$

AT-Lipozom : Aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu çözeltisi enjeksiyonundan elde edilen kromatogramdaki Doks-HCl pik alanı

AS : Standart çözeltisi enjeksiyonundan elde edilen kromatogramdaki Doks-HCl pik alanı

WT : Aktif hedefli pegile F7 lipozom numune tartımı (g)

WS : Doks-HCl Standardının tartımı (mg)

P1 : Doks-HCl Standardının potensi

Eşitlik 11. F7-3 Prolipozom Formülasyonu %Doks-HCl Miktar Hesabı

F7 – 3 Prolipozom % Doks – HCl

$$= \frac{AT}{AS} \times \left(\frac{W_S}{100 \text{ mL}} \times \frac{2.5}{10 \text{ mL}} \times P_1 \right) \times \left(\frac{10 \text{ mL}}{W_T} \times \frac{1 \text{ g}}{7.8 \text{ mg}} \right) \times 100$$

AT-Prolipozom: Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu çözeltisi enjeksiyonundan elde edilen kromatogramdaki Doks-HCl pik alanı

AS : Standart çözeltisi enjeksiyonundan elde edilen kromatogramdaki Doks-HCl pik alanı

WT : Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom numune tartımı (g)

WS : Doks-HCl Standardının tartımı (mg)

P1 : Doks-HCl Standardının potensi

Limit : % Doks-HCl; % 90.0 – % 115.0 (prolipozom ve lipozom) (USP, 2017).

3.2.6.3 Özgünlük ve Seçicilik

Analiz edilen Doks-HCl etkin maddesinin, numune matriksinde olması muhtemel maddelerin varlığında tespit edilebilme yeteneğinin ölçülmesi adına çözücü, Doks-HCl standart çözelti, plasebo aktif hedefli pegile F7 lipozom ve plasebo aktif hedefli

pegile F7-3 prolipozom numune çözeltileri, aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom numune çözeltileri hazırlanarak enjekte edildi. Doks-HCl etkin maddesine olası girişim olup olmadığı kontrol edildi. Kabul kriterleri ise 3.2.1.3.4’de verildiği şekildedir.

3.2.6.4 Doğruluk

Miktar tayini test konsantrasyonunun %80, %100 ve %120 seviyelerinde aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyon numuneleri hazırlandı ve her seviye için 3’er toplam da 9 adet numune hazırlandı. Standart Çözeltiden 6 enjeksiyon, Kontrol Standart Çözeltisinden 2 enjeksiyon verildi ve standart uyumları kontrol edildi. Her bir Numune Çözeltilerinden 2’şer enjeksiyon yapıldı. Kontrol Standart Çözeltisinden 2 enjeksiyon verildi.

Doğruluk Çalışma Numunelerinin Hazırlıkları:

% 80 Konsantrasyonda Numune Çözeltisi: Hassas olarak 0.4 mg Doks-HCl etkin madde ve 0.1996 gram plasebo aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu hassas bir şekilde tartıldı ve 10 mL lik balonjojeye aktarıldı. Prolipozom formülasyonu için ise 0.4 mg Doks-HCl etkin madde ve 0.0506 g plasebo aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu 10.0 mL’ lik balon jojeye içerisine tartıldı. Numuneler çözücü ile 10 mL’ye tamamlandı ve çalkalanarak karıştırıldı. 10 dakika ultrasonik banyoda bekletildi. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek enjekte edildi ($C_{Lip-Doks-HCl} = 0.04 \text{ mg/mL}$, $C_{Prolip-Doks-HCl} = 0.04 \text{ mg/mL}$).

% 100 Konsantrasyonda Numune Çözeltisi: Hassas olarak 0.5 mg Doks-HCl etkin madde ve 0.2495 gram plasebo aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu hassas bir şekilde tartıldı ve 10 mL lik balonjojeye aktarıldı. Prolipozom formülasyonu için 0.5 mg Doks-HCl etkin madde ve 0.063 g plasebo aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu 10.0 mL’lik balon jojeye içerisine tartıldı. Numuneler çözücü ile 10 mL’ye tamamlandı ve çalkalanarak karıştırıldı. 10 dakika ultrasonik banyoda bekletildi. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek enjekte edildi ($C_{Lip-Doks-HCl} = 0.05 \text{ mg/mL}$, $C_{Prolip-Doks-HCl} = 0.05 \text{ mg/mL}$).

% 120 Konsantrasyonda Numune Çözeltisi: Hassas olarak 0.6 mg Doks-HCl etkin madde ve 0.2994 gram plasebo aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu hassas bir şekilde tartıldı ve 10 mL lik balonjojeye aktarıldı. Prolipozom formülasyonu için 0.6 mg Doks-HCl etkin madde ve 0.0764 g plasebo aktif hedefli pegile F7-3

prolipozom formülasyonu 10.0 mL’lik balon jojeye içerisine tartıldı. Numuneler çözücü ile 10 mL’ye tamamlandı ve çalkalanarak karıştırıldı. 10 dakika ultrasonik banyoda bekletildi. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek enjekte edildi ($C_{Lip-Doks-HCl} = 0.06 \text{ mg/mL}$, $C_{Prolip-Doks-HCl} = 0.06 \text{ mg/mL}$).

Kabul kriterleri:

Yöntem 3.2.1.3.6’de gösterildiği gibidir.

3.2.2.1.Kesinlik

3.2.6.4.1 Sistem Kesinliği

Standart Çözeltiden 6 enjeksiyon verildi. Standart Çözeltinin ard arda yapılan 6 enjeksiyon sonunda elde edilen Doks-HCl pik alanları arasındaki RSS değerlendirildi.

3.2.6.4.2 Tekrarlanabilirlik

6 adet aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom numune çözeltisi hazırlandı. Her numuneden 2’şer enjeksiyon verildi. Numune çözeltileri aynı anda her bir çözücü ile ayrı ayrı hazırlanmış Standart Çözeltiye karşı çalışıldı ve her numunedeki Doks-HCl miktarı % olarak hesaplandı. Standart çözeltiden 2 adet hazırlandı ve standart uyumları kontrol edildi.

Kabul kriterleri:

Yöntem 3.2.1.3.7.2’de gösterildiği gibidir.

3.2.6.4.3 Laboratuvar İçi Kesinlik

6 adet aktif hedefli pegile F7 lipozom ve 6 adet aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom numune çözeltisi hazırlandı, her bir numuneden aynı analitik koşullar altında farklı günlerde ve farklı cihazlarda 2’şer enjeksiyon yapılarak elde edilen sonuçların birbirine yakınlık derecesi değerlendirildi.

Kabul Kriterleri:

Yöntem 3.2.1.3.7.3’de gösterildiği gibidir.

3.2.6.5 Dayanıklılık

1 adet standart ve 2’şer adet aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom numune çözeltisi hazırlandı. Değişen her bir şart için standart çözeltiden 6 ve numune çözeltilerinden birer enjeksiyon verildi. Sistem uygunluk parametreleri kontrol edildi.

Uygulanan değişiklik parametreleri;

- a. Normal alışma koşulları
- b. Akış hızı 0.9 mL/dk
- c. Akış hızı 1.1 mL/dk
- d. Kolon Sıcaklığı 20°C
- e. Kolon Sıcaklığı 30°C
- f. Tampon pH 2.3
- g. Tampon pH 2.7

Pik alanları arasındaki % RSS, teorik plaka sayısı, kuyruklanma faktörü değerlendirildi. Çalışılan her bir parametreye ait numunelerin ortalama sonucuyla, normal çalışma şartlarındaki numunelerin ortalama sonucu arasındaki % RSS değerlendirildi.

3.2.6.6 Çözelti Stabilesi

Standart, aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom numunelerinin analizi aynı gün hazırlanmış standart çözeltiye karşı çalışıldı ve bu standart çözeltiden 6 enjeksiyon verildi. Belli periyodlarla Standart ve Numune çözeltilerinden ikişer enjeksiyon yapılarak 48 saat enjeksiyon alanları kontrol edildi. Hesaplama Yöntem 3.2.1.3.9’de anlatıldığı şekilde yapıldı.

3.2.6.7 Sistem Uygunluk

Standart özeltiden 6 enjeksiyon verildi ve bu enjeksiyonlardan elde edilen Doks-HCl’e ait pik alanları arasındaki %RSS, teorik plaka sayısı, kuyruklanma faktörü değerlendirildi.

3.2.7 Lipozom ve Prolipozom Formölasyonunda Vitamin E Asetat’ın Bitmiş Ürün Analitik Validasyonu

Geliştirilen lipozom ve prolipozom formölasyonlarının terkinde koruyucu madde olarak Vitamin E Asetat (Vit E Asetat) kullanıldı. Bu amaçla aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formölasyonlarında bulunan Vit E Asetat miktarının tayini için HPLC’de miktar tayini metodu geliştirildi. Miktar tayini sonuçları değerlendirilirken ICH kılavuzunda koruyucu maddeler için verilen sınır değerler dikkate alındı (ICH, 1995). Miktar tayini yöntemi geliştirilip validasyonunun

tamamlanmasının ardından, hem bitmiş ürünlerde Vitamin E Asetat miktarı tayin edilirken, hem de stabilite takibindeki Vit E Asetat miktar tayini analizlerinde bu yöntem kullanıldı. HPLC’de gerçekleştirilen validasyon için kullanılan parametreler Tablo 10’da verilmiştir.

Tablo 10. Vitamin E Asetat için HPLC parametereleri

Cihaz	HPLC
Dedektör	UV/PDA
Kolon	Zorbax Eclipse Plus C18 5µm 4.6 x 250 mm
Dalga Boyu	285 nm
Akış Hızı	1.2 mL/dk.
Enjeksiyon Hacmi	20.0 µL
Analiz Süresi	30 dk.
Kolon Sıcaklığı	25°C
Tray sıcaklığı	25 °C
Mobil Faz	Asetonitril : Metanol (% 75:% 25)
Çalışma Türü	İzokretik
Çözücü	Asetonitril : Metanol (% 75:% 25)

Mobil Faz Hazırlanışı: 750 mL Asetonitril üzerine 250 mL Metanol ilave edildi, ultrasonik banyoda 10 dakika degaze edildi. Çözelti 0.2 µm membran filtreden süzüldü.

3.2.7.1 Standart ve Numune Çözelti Hazırlanışları

a. Standart çözelti hazırlanışı:

50 mg Vit E Asetat çalışma standardı hassas bir şekilde tartıldı ve çözücü ile 50 mL’ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı ($C_{\text{Ana stok çözelti Vit E Asetat}} = 1.00 \text{ mg/mL}$). Bu çözeltiden 0.5 mL alındı ve 10 mL’ye çözücü ile tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Vit E Asetat}} = 0.05 \text{ mg/mL}$).

b. Plasebo çözeltisi hazırlanışı:

Vit E Asetat içermeyen 2.08 gram plasebo aktif hedefli pegile F7 lipozom hassas bir şekilde tartıldı ve 5 mL lik balonjojeye aktarılarak çözücü eklendi ve çalkalanarak

karıştırıldı. Vit E Asetat içermeyen 0.50 gram plasebo aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom hassas bir şekilde tartıldı ve 5 mL lik balonjojeye aktararak çözücü eklendi ve çalkalanarak karıştırıldı. Numuneler 10 dakika ultrasonik banyoda bekletildi ve çözücü ile 10 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC cihazına enjekte edildi.

c. Numune (Lipozom ve Prolipozom) çözeltisi hazırlanışı:

0.25 mg Vit E Asetat içeren aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonundan 2.08 gram hassas bir şekilde tartıldı ve çözücü ile eklenerek çalkalanarak karıştırıldı. Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu için ise 0.25 mg Vit E Asetat içeren 0.50 gram prolipozom formülasyonu hassas bir şekilde tartıldı ve çözücü eklenerek çalkalanarak karıştırıldı. Numuneler 10 dakika ultrasonik banyoda bekletildi ve çözücü ile 10 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC cihazına enjekte edildi. ($C_{\text{Vit E Asetat}} = 0.05 \text{ mg/mL}$). Paralel iki numune çalışıldı.

3.2.7.2 Yöntem ve Hesaplamalar

Standart çözelti ile yapılan sistem uygunluk parametresindeki standart enjeksiyonlar, Vit E Asetat'a ait pikin değerlendirilecek pik özellikleri ve kabul kriterleri Yöntem 3.2.1.3.3'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Ayrıca standart ve kontrol standart uyumlarının değerlendirilmesinde Eşitlik 1 kullanıldı. Aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonunda bulunan %Vit E Asetat miktarına dair hesaplama Eşitlik 10'da, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunda bulunan %Vit E Asetat miktarına dair hesaplama Eşitlik 11'de verilmiştir.

Eşitlik 12. F7 Lipozom Formülasyonu %Vit E Asetat Miktar Hesabı

F7 Lipozom % Vit E Asetat

$$= \frac{AT}{AS} \times \left(\frac{W_S}{50 \text{ mL}} \times \frac{0.5}{10 \text{ mL}} \times P_1 \right) \times \left(\frac{5 \text{ mL}}{W_T} \times \frac{1 \text{ g}}{0.12 \text{ mg}} \right) \times 100$$

AT-Lipozom : Aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu çözeltisi enjeksiyonundan elde edilen kromatogramdaki Vit E Asetat pik alanı

AS : Standart çözeltisi enjeksiyonundan elde edilen kromatogramdaki Vit E Asetat pik alanı

WT : Aktif hedefli pegile F7 lipozom numune tartımı (g)
WS : Vit E Asetat Standardının tartımı (mg)
P1 : Vit E Asetat Standardının potensi

Eşitlik 13. F7-3 Prolipozom Formülasyonu %Vit E Asetat Miktar Hesabı

F7 – 3 Prolipozom % Vit E Asetat

$$= \frac{AT}{AS} \times \left(\frac{W_S}{50 \text{ mL}} \times \frac{0.5}{10 \text{ mL}} \times P_1 \right) \times \left(\frac{5 \text{ mL}}{W_T} \times \frac{1 \text{ g}}{0.5 \text{ mg}} \right) \times 100$$

AT-Prolipozom: Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu çözeltisi enjeksiyonundan elde edilen kromatogramdaki Vit E Asetat pik alanı

AS : Standart çözeltisi enjeksiyonundan elde edilen kromatogramdaki Vit E Asetat pik alanı

WT : Aktif hedefli pegile F7-3 Prolipozom numune tartımı (g)

WS : Vit E Asetat Standardının tartımı (mg)

P1 : Vit E Asetat Standardının potensi

3.2.7.3 Özgünlük ve Seçicilik

Çözücü, Vit E Asetat standart çözeltisi, plasebo aktif hedefli pegile F7 lipozom ve plasebo aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom numune çözeltileri, aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom numune çözeltileri enjeksiyonları yapıldı ve elde edilen HPLC kromatogramları incelendi. Vit E Asetat pikine olası girişim olup olmadığı kontrol edildi. Kabul kriterleri ise 3.2.1.3.4’de verildiği şekildedir.

3.2.7.4 Çalışma Aralığı ve Doğrusallık

Çalışma aralığı parametresi için, Vit E Asetat standartlarının %20 ve %140 konsantrasyonlarında altışar enjeksiyon verildi ve relatif standart sapma değerleri hesaplandı. Doğrusallık parametresi için ise % 20, % 40, % 80, % 100, % 120 ve % 140 konsantrasyonlarında Vit E Asetat çözeltileri hazırlandı ve her bir değer için 3’er enjeksiyon HPLC cihazına enjekte edildi.

% 20 Konsantrasyonda Standart Çözelti: Hazırlanan ana stok çalışma standardı çözeltisinden 0.1 mL alındı ve çözücü ile 100 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek enjekte edildi ($C_{\text{Vit E Asetat}} = 0.01 \text{ mg/mL}$).

% 40 Konsantrasyonda Standart Çözelti: Hazırlanan ana stok çalışma standardı çözeltisinden 0.2 mL alındı ve çözücü ile 100 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek enjekte edildi ($C_{\text{Vit E Asetat}} = 0.02 \text{ mg/mL}$).

% 80 Konsantrasyonda Standart Çözelti: Hazırlanan ana stok çalışma standardı çözeltisinden 0.4 mL alındı ve çözücü ile 100 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek enjekte edildi ($C_{\text{Vit E Asetat}} = 0.04 \text{ mg/mL}$).

% 100 Konsantrasyonda Standart Çözelti: Hazırlanan ana stok çalışma standardı çözeltisinden 0.5 mL alındı ve çözücü ile 100 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek enjekte edildi ($C_{\text{Vit E Asetat}} = 0.05 \text{ mg/mL}$).

% 120 Konsantrasyonda Standart Çözelti: Hazırlanan ana stok çalışma standardı çözeltisinden 0.6 mL alındı ve çözücü ile 100 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek enjekte edildi ($C_{\text{Vit E Asetat}} = 0.06 \text{ mg/mL}$).

% 140 Konsantrasyonda Standart Çözelti: Hazırlanan ana stok çalışma standardı çözeltisinden 0.7 mL alındı ve çözücü ile 100 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek enjekte edildi ($C_{\text{Vit E Asetat}} = 0.07 \text{ mg/mL}$).

Çalışma Aralığı Kabul Kriterleri:

% 20 seviyesinde ve %140 konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerin ard arda yapılan 6 enjeksiyonu sonunda elde edilen Vit E Asetat pik alanları arasındaki RSS % 5.0'dan fazla olmamalıdır.

Doğrusallık Kabul Kriterleri:

Vit E Asetat konsantrasyonları için pik alanlarına karşı konsantrasyonların grafiği çizilerek en küçük kareler metodu ile regresyon doğrusu ($y=mx+n$) hesaplandı;

korelasyon katsayısı, y-kesişim noktası ve eğim değerleri değerlendirildi. Kabul kriterleri Yöntem 3.2.1.3.6'de verildiği gibidir.

3.2.7.4.1 Duyarlılık ve Saptama Sınırı

Vitamin E Asetat'ın Asetonitril: Metanol (% 75:% 25) ortamında LOD ve LOQ değerleri bulundu. Hesaplama Eşitlik 4 ve Eşitlik 5'de verildiği şekilde yapılmıştır.

3.2.7.5 Doğruluk

Miktar tayini test konsantrasyonunun % 80, % 100 ve % 120 seviyelerinde Vit E Asetat içeren madde numuneleri hazırlandı; her seviye için 3' er toplam da 9 adet numune hazırlandı.

Çalışma Numunelerinin Hazırlıkları:

% 80 Konsantrasyonda Numune Çözeltilisi: 0.2 mg Vit E Asetat hammadde ve 1.6638 gram plasebo aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu hassas bir şekilde tartıldı ve balonjojeye aktararak çözücü ile 5 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.2 mg Vit E Asetat hammadde ve 0.3998 gram plasebo aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu hassas bir şekilde tartıldı ve balonjojeye aktararak 5 mL'ye çözücüsü ile tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. Her iki numune çözeltisi de 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC cihazına enjekte edildi. ($C_{\text{Vit E Asetat}} = 0.04 \text{ mg/mL}$).

% 100 Konsantrasyonda Numune Çözeltilisi: 0.25 mg Vit E Asetat hammadde ve 2.0798 gram plasebo aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu hassas bir şekilde tartıldı ve balonjojeye aktararak çözücü ile 5 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.25 mg Vit E Asetat hammadde ve 0.4998 gram plasebo aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu hassas bir şekilde tartıldı ve balonjojeye aktararak çözücü ile 5 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC cihazına enjekte edildi. ($C_{\text{Vit E Asetat}} = 0.05 \text{ mg/mL}$).

% 120 Konsantrasyonda Numune Çözeltilisi: 0.3 mg Vit E Asetat hammadde ve 2.4957 gram plasebo aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu hassas bir şekilde tartıldı ve balonjojeye aktararak çözücü ile 5 mL'ye tamamlandı, çalkalanarak karıştırıldı. 0.3 mg Vit E Asetat hammadde ve 0.5997 gram plasebo aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu hassas bir şekilde tartıldı ve balonjojeye aktararak çözücü ile 5 mL'ye tamamlandı ve çalkalanarak karıştırıldı. Her iki numune 0.22 µm

Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC cihazına enjekte edildi. ($C_{\text{Vit E Asetat}} = 0.06$ mg/mL).

Kabul kriterleri:

Her konsantrasyon için tek tek ve ortalama yüzde geri kazanım hesaplandı.

- Vit E Asetat'ın her bir seviyedeki geri kazanım % 90.0 - % 110.0 arasında olmalıdır.
- Her bir konsantrasyon için RSS % 5.0'den fazla olmamalıdır.

3.2.7.6 Kesinlik

Bu metotta hem aktif hedefli pegile F7 lipozom, hem de aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu numune çözeltilerine

- Sistem Kesinliği
- Tekrarlanabilirlik (Metot Kesinliği)
- Laboratuvar İçi Kesinlik (Ara Kesinlik) parametreleri uygulandı.

3.2.7.6.1 Sistem Kesinliği

Standart Çözeltiden 6 enjeksiyon verildi. Standart Çözeltinin ard arda yapılan 6 enjeksiyon sonunda elde edilen Vit E Asetat pik alanları arasındaki RSS değerlendirildi.

Kabul kriterleri:

Standart Çözelti'nin ard arda yapılan 6 enjeksiyon sonunda elde edilen Vit E Asetat pik alanları arasındaki RSS % 5.0' dan fazla olmamalıdır.

3.2.7.6.2 Tekrarlanabilirlik

6 adet aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom numune çözeltisi hazırlandı. Her numuneden 2'şer enjeksiyon verildi. Numune çözeltileri, standart çözeltiye karşı çalışıldı ve her numunedeki Vit E Asetat miktarı % olarak hesaplandı. Standart çözeltiden 2 adet hazırlandı ve standart uyumları kontrol edildi.

Kabul kriterleri:

- İki standart çözelti arasındaki uyum % 95.0 - % 105.0 arasında olmalıdır.
- $RSS \leq \%5.0$ olmalıdır.
- % 95 güven aralığı Eşitlik 6'da ki gibi hesaplanıp raporlandırılmalıdır.

3.2.7.6.3 Laboratuvar İçi Kesinlik (Ara Kesinlik)

6 adet aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom numune çözeltisi hazırlandı. Her bir numuneden aynı analitik koşullar altında farklı günlerde, farklı cihazlarda 2'şer enjeksiyon yapılarak elde edilen sonuçların birbirine yakınlık derecesi değerlendirildi.

Kabul kriterleri:

- İki standart çözelti arasındaki uyum % 95.0 - % 105.0 arasında olmalıdır.
- İki farklı günde yapılan çalışmaların ayrı ayrı ortalamaları arasındaki fark % 5.0' den fazla olmamalıdır.
- Her bir gün için hesaplanan 6 numunenin RSS $\leq$ % 5.0 olmalıdır.
- Her bir gün için % 95 güven aralığı Eşitlik 6'da ki gibi hesaplanıp raporlandırılmalıdır.

3.2.7.7 Dayanıklılık

1 adet standart ve 2 adet aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom numune çözeltisi hazırlandı. Değişen her bir şart için standart çözeltiden altı ve numune çözeltilerinden birer enjeksiyon verildi. Sistem uygunluk parametreleri kontrol edildi.

Uygulanan değişiklik parametreleri;

- h. Normal çalışma koşulları
- i. Akış hızı 1.1 mL/dk
- j. Akış hızı 1.3 mL/dk
- k. Kolon Sıcaklığı 20°C
- l. Kolon Sıcaklığı 30°C

Pik alanları arasındaki % RSS, teorik plaka sayısı, kuyruklanma faktörü değerlendirildi. Ayrıca çalışılan her bir parametreye ait numunelerin ortalama sonucuyla, normal çalışma şartlarındaki numunelerin ortalama sonucu arasındaki % RSS değerlendirildi.

Kabul kriterleri:

- Standart çözeltisi enjeksiyonlarından elde edilen alanlar arasındaki relatif standart sapma % 5.0' dan fazla olmamalıdır.

- Çalışılan her bir numunenin miktarlarının ortalama sonucuyla normal çalışma şartlarındaki numunelerin miktarlarının ortalama sonucu arasındaki % RSS, % 5.0'den fazla olmamalıdır.
- Değişen koşullardaki numune sonuçları ile normal çalışma koşulu arasındaki % fark % 5.0' dan fazla olmamalıdır. Standart çözelti %fark değerleri Eşitlik 7'de, numune çözeltileri %fark değerleri Eşitlik 8'de verildiği gibi hesaplandı.

3.2.7.8 Sistem Uygunluk

Vit E Asetat standart çözeltisinden 6 enjeksiyon verildi. 6 ardışık enjeksiyondan elde edilen Vit E Asetat'a ait pik alanları arasındaki %RSS, teorik plaka sayısı, kuyruklanma faktörü değerlendirildi.

3.2.7.9 Çözelti Stabilitesi

Standart, lipozom ve prolipozom numunelerinin analizi aynı gün hazırlanmış standart çözeltiye karşı çalışıldı ve bu standart çözeltiden altı enjeksiyon verildi. Belirli periyotlarla standart ve numune çözeltilerinden ikişer enjeksiyon yapılarak 48 saat enjeksiyon alanları kontrol edildi. Hesaplama Yöntem 3.2.1.3.9'da anlatıldığı şekilde yapıldı. Kabul kriterlerine göre alanlar arasındaki % Fark % 5.0' den fazla olmamalıdır.

3.2.8 Lipozom ve Prolipozom Formülasyonlarında Fosfolipit Miktarının Tespiti

Lipozomlarda bulunan fosfolipit miktarı tayininde; UV spekturum ölçümüne dayanan Bartlett yöntemi kullanılmaktadır (Shyla, Mahadevaiah, & Nagendrappa, 2011). Bu yöntem fosfolipit yapılarında bulunan fosfat miktarının analizini içermektedir. Bu amaçla, lipozom ve prolipozom içerisinde bulunan fosfolipit miktarını tayin etmek adına UV-2600 UV-Vis Spektrofotometre cihazı kullanıldı. Çalışmada kullanılmak üzere aşağıdaki çözeltiler hazırlandı.

- Dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4) standart stok çözeltisi: 18.418 mg potasyum dihidrojen fosfat (K_2HPO_4) balonjoje içerisine tartıldı ve 25 mL'ye distile su ile tamamlandı. (Bu çözeltinin 10 μ L sinde 1 μ g fosfolipit miktarına denk gelmektedir) (Stok Fosfolipit Miktarı: 0.1 mg/mL)
- Perklorik asit (%70 h/h)
- %2.5 Amonyum molibdat: 2.5 gram Amonyum molibdat balonjoje içerisine tartıldı ve 100 mL'ye distile su ile tamamlandı.

- %10 Askorbik asit: 10 gram Askorbik asit molibdat balonjoje içerisine tartıldı ve 100 mL'ye distile su ile tamamlandı.

15 mL lik tüplere ayrı ayrı 0, 0.001, 0.002, 0.003, 0.004 ve 0.005 mL K_2HPO_4 standart çözeltisinden eklendi ardından toplam hacim her bir tüpte 0.05 mL olacak şekilde distile su eklendi. 0.5 mL perklorik asit eklenerek 130 °C'de 4.5 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Bu saatin sonunda oda sıcaklığına kadar soğutulan örnekler 3.0 mL distile su, 1.0 mL %2.5 amonyum molibdat ve 0.5 mL %10 askorbik asit eklenerek karıştırıldı. 1.5 saat 37°C'de çalkalandı ve oda sıcaklığına geldiğinde 822 nm de UV-Vis Spektrofotometre cihazının verdiği absorbans değerleri ile kalibrasyon eğrisi çizildi (n=3).

Aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu numune hazırlanışı: mL'inde 3 mg fosfolipit içeren aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonundan 0.025 µg örnek alındı ve toplam hacim 0.05 mL olacak şekilde distile su eklendi. 0.5 mL perklorik asit eklenerek 130 °C'de 4.5 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Bu saatin sonunda oda sıcaklığına kadar soğutulan örneğe 3.0 mL distile su, 1.0 mL %2.5 amonyum molibdat ve 0.5 mL %10 askorbik asit eklenerek karıştırıldı. 1.5 saat 37 °C'de çalkalandı ve oda sıcaklığına gelince 822 nm de UV-Vis Spektrofotometre cihazında verdiği absorbans değerleri standart çözelti için çizilen kalibrasyon eğrisi ile değerlendirilip fosfolipit miktarı hesaplandı (Fosfolipit miktarı: 4.95×10^{-5} mg/mL).

Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu numune hazırlanışı: Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonundan 0.256 g tartıldı (2 mg Doks-HCl içerir) 1 mL %5'lik dekstroz çözeltisi içinde disperse edildi. mL'inde 0.768 mg fosfolipit bulunan bu çözeltiden 0.326 µL örnek alındı. 0.5 mL perklorik asit eklenerek 130 °C'de 4.5 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Bu saatin sonunda oda sıcaklığına kadar soğutulan örneğe 3.0 mL distile su, 1.0 mL %2.5 amonyum molibdat ve 0.5 mL %10 askorbik asit eklenerek karıştırıldı. 1.5 saat 37°C'de çalkalandı ve oda sıcaklığına gelince 822 nm de UV-Vis Spektrofotometre cihazının verdiği absorbans değerleri standart çözelti için çizilen kalibrasyon eğrisi ile değerlendirilip fosfolipit miktarı hesaplandı (Fosfolipit miktarı: 4.95×10^{-5} mg/mL).

Numuneler 3'er paralel hazırlandı.

3.2.9 *In vitro* Salım Çalışması

In vitro salımı karakterize etmek adına FDA tarafından yayımlanan dissolüsyon metotlarını içeren bilgilerde lipozomal Doks-HCl için; $47^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 'de pH 6.00 ± 0.05 koşullarından başlayarak yöntem geliştirilmesi önerilmiştir (Food and Drug Administration (FDA), 2018). Bununla birlikte kanser hücre içi (endozom ve lizozom) yaklaşık pH 5-6 olduğundan (Food and Drug Administration (FDA), 2018) pH 6.5, pH 7.4 tampon ortamlarına ek olarak pH 5.5 tampon ortamında da *in vitro* salım çalışması gerçekleştirildi. pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.4 tampon ortamlarının hazırlanışı Yöntem 3.2.1.3'de anlatıldığı şekildedir. Bu amaçla Doks-HCl'ün, piyasa preparatının (Caelyx®, 2mg/mL Doks-HCl), geliştirilen aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonlarının, pegilasyonun salım üzerine etkisinin incelenmesi adına Doks-HCl içeren aktif hedefli pegile olmayan F7 lipozom ve pegile olmayan aktif hedefli F7-3 prolipozom formülasyonlarının 47°C de pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.4 ortamlarında *in vitro* salım çalışmaları yapıldı. Doks-HCl etkin maddesi tüm formülasyonlarda 2.0 mg/mL olacak şekilde diyaliz membran içerisine koyuldu (14 kDa). Doks-HCl etkin maddesi ve prolipozomal ilaç taşıyıcı sistem %5 lik dekstroz içinde disperse edilerek diyaliz membran içerisinde koyuldu (Fazel et al., 2018). Beher içerisine 100 mL pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.4 ortamları eklendi ve sıcaklık 47°C 'ye ulaşınca önceden ısıtılmış ve salımı yapılacak çözeltiyi içeren diyaliz membranlar tamponlar içerisine bırakıldı, manyetik karıştırıcı ile 100 rpm de karıştırılırken 0.5. saat, 1.saat, 2.saat, 3.saat, 6.saat, 8.saat, 12.saat, 20.saat ve 24.saat zamanlarında örnek alındı ve bu örnekler HPLC cihazına enjekte edildi. Alınan örnek hacmi kadar tampon ortamı alınan kısma ilave edildi. Bulunan alan değerleri pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.4 tampon ortamları için valide edilen kalibrasyon eğrileri ile değerlendirildi. Çalışma sonunda diyaliz membran içerisindeki örneklerin de miktar tayini yapıldı.

In vitro salım değerleri ile kinetik modellemeler matematiksel olarak yapıldı. Sıfırıncı derece, Birinci derece, Higuchi, Peppas ve Hixon Crowel kinetiklere uyumları regresyon doğrusu ve artık kareler toplam değeri incelenerek değerlendirildi.

Formülasyon geliştirme aşamasında, geliştirilen formülasyonların *in vitro* salım sonuçlarının orijinal ürünün *in vitro* salım sonuçlarına benzerliliğin değerlendirilmesi oldukça önemlidir (Muselík, Komersová, Kubová, Matzick, & Skalická, 2021). *In vitro* salım profillerinin benzerlik değerlendirmesinde F2 testi kullanılır. Bu amaçla

pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.4 ortamlarında *in vitro* salım değerleri kullanılarak; piyasa preparatı ile aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonunun, piyasa preparatı ile ve aktif hedefli F7-3 prolipozom formülasyonunun, aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonunun aktif hedefli F7-3 prolipozom formülasyonu ile ayrı ayrı F2 testi gerçekleştirdi.

3.2.10 *In vitro* Sızıntı Testi

Çeşitli fizyolojik koşullar altında lipit çift tabakasının ve enkapsüle edilmiş Doks-HCl'ün fiziksel durumunu karakterize etmek için *in vitro* ilaç sızıntısı testinin yapılması önerilmektedir. Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemler için FDA tarafından önerilen *in vitro* sızıntı test koşulları Tablo 11'de verilmiştir (Food and Drug Administration (FDA), 2018). *In vitro* sızıntı testi aktif hedefli pegile F7 lipozom, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonları ve piyasa preparatı için gerçekleştirilerek sonuçları karşılaştırıldı. Doks-HCl etkin maddesi tüm formülasyonlarda 2.0 mg/mL olacak şekilde diyaliz membran içerisine koyuldu (14 kDa). F7-3 prolipozomal ilaç taşıyıcı sistem %5 lik dekstroze içinde disperse edilerek diyaliz membran içerisinde koyuldu.

Tablo 11. FDA tarafından önerilen *in vitro* sızıntı test koşulları (Food and Drug Administration (FDA), 2018)

Koşullar	Amaç	Gerekçe
1. 37 °C %50 insan plazması içeren ortamda 24 saat	Kan sirkülasyonunda lipozom stabilitesinin gözlenmesi	Plazma kan ortamını taklit etmeli
2. 37 °C pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ortamlarında 24 saat	İlaç salımında sağlıklı hücre ortamı, kanser hücre çevresi ortamı ve kanser hücresi ortamının taklit edilmesi	Sağlıklı Hücreler: yaklaşık pH 7.4 Kanser Hücreleri: yaklaşık pH 6.5 Kanser Hücre İçi (Endozom ve Lizozom) yaklaşık pH 5-6 Kanser hücrelerinin endozom ve lizozomları lipozomları içine alıp ilaç salımını etkileyebilir.
3. 43 °C, 47 °C, 52 °C, 57 °C pH 6.5 ortamında 12 saat ya da salım tamamlana kadar	Lipit katman bütünlüğünün gözlenmesi	Lipitlerin faz geçiş sıcaklığı sertlik kimyasal bileşim gibi lipit çift tabaka özellikleri ile belirlenir. Sıcaklığın bir fonksiyonu olarak salımdaki farklılıklar lipit özelliğindeki farklılığı yansıtır.
4. 37 °C' de 20 kHz den düşük ultrasonik enerjide 2 saat ya da salım tamamlanana kadar	Lipozom içinde enkapsüle edilmiş ilaç miktarının hesaplanması	20 kHz ultrasonik enerji lipit tabakasını bozar (porların iritasyonu ile) ve Doks-HCl'ün lipozom içinden salımını sağlar.

3.2.10.1 Plazma Ortamında *In Vitro* Sızıntı Testi

Beher içerisine 50 mL pH 7.4 ortamı, 50 mL ise plazma eklendi ve sıcaklık 37 °C'ye ulaşınca önceden ısıtılmış ve salımı yapılacak çözeltiyi içeren diyaliz membranlar tampon plazma karışımı içerisine bırakıldı, manyetik karıştırıcı ile 100 rpm de karıştırılırken 24 saat boyunca belirli zaman aralıklarında örnek alındı ve bu örnekler HPLC cihazına enjekte edildi. Bulunan alan değerleri pH 7.4 tampon ortamları için valide edilen kalibrasyon eğrileri ile Doks-HCl % salım miktarları açısından değerlendirildi.

3.2.10.2 37 °C pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 Ortamlarında *In Vitro* Sızıntı Testi

Beher içerisine ayrı ayrı 100'er mL pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.4 ortamları eklendi ve sıcaklık 37 °C'ye ulaşınca önceden ısıtılmış ve salımı yapılacak çözeltiyi içeren diyaliz membranlar tampon ortamları içerisine bırakıldı, manyetik karıştırıcı ile 100

rpm de karıştırılırken 24 saat boyunca belirli zaman aralıklarında örnek alındı ve bu örnekler HPLC cihazına enjekte edildi. Bulunan alan değerleri pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.4 tampon ortamları için valide edilen kalibrasyon eğrileri ile Doks-HCl % salım miktarları açısından değerlendirildi.

3.2.10.3 43 °C, 47 °C, 52 °C ve 57 °C pH 6.5 Ortamında *In Vitro* Sızıntı Testi

Beher içerisine ayrı ayrı 100'er mL pH 6.5 ortamları eklendi ve her bir beherde ayrı ayrı sıcaklık 43 °C, 47 °C, 52 °C ve 57 °C'ye aralandı. Sıcaklık değerleri istenilen dereceye ulaştığında, önceden ıslatılmış ve salımı yapılacak çözeltiyi içeren diyaliz membranlar tampon ortamları içerisine bırakıldı, manyetik karıştırıcı ile 100 rpm de karıştırılırken belirli zaman aralıklarında örnek alındı ve Doks-HCl etkin maddesinin salımı %100'e ulaşmaya dek çalışma sürdürüldü. Alınan örnekler HPLC cihazına enjekte edildi. Bulunan alan değerleri pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.4 tampon ortamları için valide edilen kalibrasyon eğrileri ile Doks-HCl % salım miktarları açısından değerlendirildi.

3.2.10.4 Ultrasonik Enerji Etkisi ile *In Vitro* Sızıntı Testi

Beher içerisine ayrı ayrı 100'er mL pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.4 ortamları eklendi. Önceden ıslatılmış ve salımı yapılacak çözeltiyi içeren diyaliz membranlar tampon ortamları içerisine bırakıldı. Örnekleri içeren beherler ultrasonik banyoya bırakıldı, 2 saat boyunca belirli zaman aralıklarında örnek alındı ve bu örnekler HPLC cihazına enjekte edildi. Bulunan alan değerleri pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.4 tampon ortamları için valide edilen kalibrasyon eğrileri ile Doks-HCl % salım miktarları açısından değerlendirildi.

3.2.11 Stabilite Çalışmaları

Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin stabilitesi, birbiriyle ilişkili olan fiziksel ve kimyasal stabilite ile açıklanabilmektedir. Genel olarak, kimyasal (fosfolipit yapılarının bozulması) ve fiziksel (boyut dağılımının tek düzeliği ve enkapsülasyon kapasitesi) stabilite, lipozomların raf ömrünü belirler. Yağ asitlerini gliserol omurgasına bağlayan ester bağlarının hidrolizi ve varsa doymamış açil zincirlerinin oksidasyonu fosfolipit çift katmanlarının performansını etkileyebilmektedir. Kimyasal stabilite ile ilişkili olan fosfolipit çift katmanlarının yapılarının bozulması fiziksel stabilite ile ilişkili olan boyut dağılımı ve etkin maddenin veziküllerden sızarak enkapsülasyon kapasitesini düşürmesine neden olmaktadır (Buckner et al., 2016).

Optimal olarak belirlenen aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonlarının stabilite tayin için formülasyonlar buzdolabında 5 ± 1 °C’de, 25 ± 2 °C % 60 ± 5 relatif rutubet koşullarında, 30 ± 2 °C % 65 ± 5 relatif rutubet koşullarında ve 40 ± 2 °C % 75 ± 5 relatif rutubet koşullarında takip edildi. Başlangıçta, 1. ay sonunda, 3. ay sonunda, 6. ay sonunda, 9. ay sonunda ve 12. ay sonunda F7 lipozom formülasyonu için; görünüş, pH, partikül boyutu, zeta potansiyel, viskozite, ilaç yükleme kapasitesi tayini, koruyucu madde miktar tayini, enkapsülasyon kapasitesi tayini (sızan etkin maddenin miktarının belirlenmesi) çalışmaları yapıldı (Kanásová & Nesměrák, 2017). Başlangıçta, 6. ay sonunda ve 12. ay sonunda fosfolipit miktar tayini çalışmaları gerçekleştirildi.

Prolipozom formülasyonu için ise; görünüş, ilaç yükleme kapasitesi tayini, nem miktarı tayini prolipozom formülasyonun %5 dekstroz çözeltisinde seyreltildikten sonra ise; görünüş, pH, partikül boyutu, zeta potansiyel, viskozite, ilaç yükleme kapasitesi tayini, koruyucu madde miktar tayini, enkapsülasyon kapasitesi (sızan etkin maddenin miktarının belirlenmesi), yeniden dağılılabılme zamanı analizi çalışmaları yapıldı (Alves, 2017). Başlangıçta, 6. ay ve 12. ay sonunda fosfolipit miktar tayini çalışmaları yapıldı.

3.2.12 *In vitro* Sitotoksosite Çalışmaları

In vitro sitotoksosite çalışmalarını gerçekleştirmek için HSK hücre hatlarından; Hep G2, Mahlavu ve Huh 7, sağlıklı karaciğer hücre hattından ise; AML 12 hücre hattı kullanıldı.

HSK’nın *in vitro* araştırmaları için 1970’lerden beri toksikolojik ve farmakolojik araştırmalarda en yaygın olarak kullanılan hücre dizisi Hep G2’dir. Bu hücre hattı, karaciğer kanseri hastalığına sahip 15 yaşındaki erkek ve beyaz ırka ait bir gencin HSK’undan izole edilen epitel benzeri morfoloji sergileyen bir hücre dizisidir (Blidisel et al., 2021). Bununla birlikte Mahlavu ve Huh 7 hücre dizileri de HSK’nın *in vitro* çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Mahlavu, Güney Afrika’lı HSK’ya sahip bir kadın karaciğerinden izole edilmiştir. Huh 7 ise, 1982 yılında 57 yaşındaki Japon bir erkeğin HSK dokusundan cerrahi olarak çıkarılan hücre dizisidir (Nakabayashi, Miyano, Sato, Yamane, & Taketa, 1982). Huh 7 ve türevleri, birincil HSK’nın deneysel çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Kawamoto et al., 2020). Çalışma tasarımı sağlıklı karaciğer hücre hattı olarak ise AML12 (alfa fare karaciğer 12)

hücreleri kullanılmıştır. AML 12 hücre hattı, 3 aylık bir farenin sağlıklı karaciğerinden izole edilen hepatositlerdir. Bu amaçla, *in vitro* sitotoksikite çalışmaları için farklı orijinlere sahip HSK hücre hatları ile (Hep G2, Huh 7 ve Mahlavu) ve sağlıklı karaciğer hücre hattı olan AML 12 ile sitotoksikite çalışmaları gerçekleştirildi.

Etkin maddelerin hücre hatları üzerindeki IC₅₀ (The half maximal inhibitory concentration= %50 maksimum inhibitör konsantrasyon) değerlerini belirlemek ve formülasyonun sitotoksik etkisinin gözlemlene adına MTT testleri gerçekleştirilir. 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2-5-difeniltetrazolyum bromür analizi (MTT), hücre metabolik aktivitesini değerlendirmek için Nikotinamid Adenin Dinükleotid (NADH)'e bağlı hücresel oksidoredüktaz enzimleri ile tanımlanan koşullar altında mevcut canlı hücrelerin sayısını yansıtabilen kolorimetrik bir analizdir. Bu enzimler, sarı renkli tetrazolyum MTT halkasını parçalayarak, mor renkli suda çözünmeyen formazan kristallerine indirgeme yeteneğine sahiptir. Oluşan renk değişiminin absorbans ölçümü de canlı hücre hakkında bilgi vermektedir (Juan C. Stockert, Richard W. Horobin, Lucas L. Colombo, 2018). Bu amaçla Doks-HCl etkin maddesinin HSK hücre dizileri ve sağlıklı karaciğer hücre dizisi üzerine sitotoksik etkisi 24., 48. ve 72. saat IC₅₀ değerleri hesaplanarak değerlendirildi. Doks-HCl etkin maddesini içermeyen plasebo aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun herhangi bir sitotoksik etkisinin olup olmadığının gözlenmesi için tüm hücre hatlarında sitotoksikite çalışması gerçekleştirildi. Ardından IC₅₀ dozlarında Doks-HCl etkin maddesi aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonuna ayrı ayrı en kapsüle edilerek, Doks-HCl etkin maddesinin IC₅₀ değerleri ile karşılaştırıldı. Ayrıca aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonunun, HSK hücre dizileri ve sağlıklı karaciğer hücre dizisi üzerine sitotoksik etki farklanması gözlemlendi.

MTT analizi öncesi hücre hatları için besi yeri hazırlama çalışması, hücre kültürlerinin pasajlanma çalışmaları, hücre sayımı çalışmaları yapıldı. MTT analizi ve analizin istatistiksel değerlendirilmesi gerçekleştirildi.

3.2.12.1 Hücre Kültürü Besi Yeri Ortamı Hazırlanışı

HSK hücre dizileri (Hep G2, Mahlavu, Huh 7); %10 FBS (Fetal Bovine Serum), 2mM L-Glutamin ve %1 MEM-Eagle Non-esansiyal amino asit solüsyonu içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ortamı içerisinde 37°C'de, %5 CO₂'li inkübatörde kültüre edildi.

AML 12 hücre dizisi ise %10 FBS, 5.5 µg/ml transferin, 5 ng/ml selenyum, 40 ng/ml deksametazon içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) medyumunu içerisinde 37°C'de, %5 CO₂'li inkübatörde kültüre edildi.

3.2.12.2 Hücre Kültürü Pasajlama Çalışması

Kültüre edilen, kültür kabı yüzeyini kaplayan hücreler pasajlama aşamasına tabii tutuldu. Bu amaçla öncelikle hücrelerin besiyeri çekildi ve hücreler iki defa steril fosfat tampon tuzu (PBS=Phosphate Buffered Saline) ile yıkandı. Hücrelerin üzerini kaplayacak kadar Tripsin/EDTA solüsyonu eklendi. 1-2 dakika 37°C'de, %5 CO₂'li inkübatörde kültüre edildi. Hücreler besiyeri ile süspansiyon edildi. Süspansiyonda hücreler 1500 RPM'de 5 dakika santrifüj edilerek tripsin ortamından uzaklaştırıldı ve kültür kaplarına hücrelerin ekimi yapıldı.

3.2.12.3 Hücre Sayımı Çalışması

Kültüre edilen hücreler Tripsin/EDTA solüsyonu ile süspansiyon edildi. Yüzeyden ayrılan süspansiyonda hücrelerin süspansiyonundan 10 µl alındı ve üzerine 90 µl Tripan mavisi eklendi. Bu karışım süspansiyon edildi ve Neubauer lamına 10 µl yüklenerek 9 büyük kare sayıldı. Hücre miktarı Eşitlik 14 kullanılarak hesaplandı.

Eşitlik 14. Hücre sayısı hesabı

$$\text{mL' deki hücre sayısı} = \frac{\text{sayılan hücre} \times \text{seyrelme faktörü}}{\text{sayılan büyük kare miktarı} \times 10000}$$

3.2.12.4 MTT Analizi

Kültür kaplarında bulunan HSK hücre dizileri Tripsin çözeltisi kullanılarak süspansiyon edildi. Süspansiyonda edilen hücrelerin hücre sayımı Yöntem 3.2.12.3'de anlatıldığı şekilde yapıldı ve 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde disperse edildi ve bu dispersiyondan 190 µL kuyulara ekildi, yüzeyde tutunmaları için 24 saat inkübe edildi. Doks-HCl'ün Dimetil sülfoksit (DMSO) ile stok çözeltisi hazırlandı. Kuyucuklardaki derişimi; 8, 4, 2, 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 ve 0.1 µM olacak şekilde besiyeri ile seyreltilerek kuyucuklara 4'er paralel eklendi (Pascale, Bedouet, Baylatry, Namur, & Laurent, 2015). Aynı plate üzerinde Doks-HCl içermeyen plasebo aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonu 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanarak 4'er paralel kuyucuklara eklendi ve formülasyonda Doks-HCl etkin maddesi dışında herhangi bir bileşenin sitotoksik etkisi olup olmadığı araştırıldı (Quagliariello,

2018). 24, 48 ve 72. saatlerde her bir kuyucuğa 5mg/mL MTT stok solüsyonundan 15'er µL eklendi. 4 saat %5 CO₂ 'li inkübatörde inkübe edildi. Bu saatin sonunda kuyulardaki besi yeri çekilerek 100 µL DMSO eklendi. 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okumalar yapılarak absorbanslar elde edildi. Hücre canlılığı Eşitlik 15'de verilen formüle göre hesaplandı.

Eşitlik 15. % Canlılık Hesabı

$$\% \text{ Canlılık: } \left(\frac{\text{Doks-HCl uygulanmış kuyucuk absorbansı} - \text{Blank absorbansı}}{\text{Doks-HCl uygulanmamış kuyucuk absorbansı} - \text{Blank absorbansı}} \right) \times 100$$

Her bir hücre hattında Doks-HCl için 24. 48. ve 72. Saat IC50 değerlerleri ve optimal plasebo aktif hedefli pegile prolipozom formülasyon dozu belirlendi. Bu optimal plasebo dozunda, Doks-HCl etkin maddesinin her bir hücre hattının 48. saat IC50 dozunun içeren Doks-HCl etkin maddesi enkapsüle edilerek yeni prolipozomal formülasyonlar yapıldı. Çalışmada formülasyonların hücreler üzerinde sitotoksik etkisinin en etkin olduğu, kuyucuklar arasındaki SS'nin en az olduğu ve proliferasyonun gözlenmediği 48.saat dozları kullanıldı.

Gerçekleştirilen yeni çalışma dizaynında MTT analizi için kuyucuklara hücrelere uygulanan çözelti ve formülasyonlar Tablo 12'de gösterilmiştir.

Tablo 12. MTT analizinde uygulanan formülasyon ve çözeltiler (n=4)

Hep G2	Mahlavu	Huh 7	AML 12
Hücre içermeyen besi yeri	Hücre içermeyen besi yeri	Hücre içermeyen besi yeri	Hücre içermeyen besi yeri
DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
Besi yeri ve DMSO içeren hücreler	Besi yeri ve DMSO içeren hücreler	Besi yeri ve DMSO içeren hücreler	Besi yeri ve DMSO içeren hücreler
Doks-HCl'ün Hep G2 hücreleri üzerindeki 48. Saat IC50 dozu	Doks-HCl'ün Mahlavu hücreleri üzerindeki 48. Saat IC50 dozu	Doks-HCl'ün Huh 7 hücreleri üzerindeki 48. Saat IC50 dozu	Doks-HCl'ün AML hücreleri üzerindeki 48. Saat IC50 dozu
Doks-HCl'ün Hep G2 hücreleri üzerindeki 48. Saat IC50 dozu içeren aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonu	Doks-HCl'ün Mahlavu hücreleri üzerindeki 48. Saat IC50 dozu içeren aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonu	Doks-HCl'ün Huh 7 hücreleri üzerindeki 48. Saat IC50 dozu içeren aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonu	Doks-HCl'ün AML hücreleri üzerindeki 48. Saat IC50 dozu içeren aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonu

3.2.13 *In vitro* Permeabilite Çalışmaları

Karaciğerde, hepatositlerin kanaliküler membranında eksprese edilen dışarı atım (eflüks) taşıyıcısı P-glikoproteinleri (P-gp), kan dolaşımına geçen ilaçların idrar ve safra ile atılmalarını hızlandırarak ilaç eliminasyonunu artırır, bu nedenle P-gp nin etkisinin gözlenebilmesi önemlidir. P-gp pompa etkisi ise *in vitro* permeabilite

çalışmalarıyla tahminlenebilmektedir (Berginc & Kristl, 2010). Bu amaçla; Doks-HCl etkin maddesinin, geliştirilen aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun ve piyasa preparatının HSK hücre dizileri ile permeabilite çalışması dizayn edildi.

3.2.13.1 Hücre Çözme Çalışmaları

Azot tankında kryo tüplerde dondurularak saklanmış olan HSK hücre dizileri (Hep G2, Mahlavu, Huh 7) hızla 37 ± 0.5 °C'lik su banyosunda çözündürüldü. Çözündürülmüş bu hücre hatları 5 mL besi yeri ortamında dağıtıldı. Besi yeri hazırlanışı sitotoksosite çalışması Yöntem 3.2.12'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Hücreler dondurulma aşamasında içinde bulunduğu Dimetil sülfoksit (DMSO) etkisini yok etmek adına 1500 rpm de 10 dakika santrifüj edildi, üstte kalan besi yeri hızla uzaklaştırıldı ve tekrar 5 mL besi yeri ortamında pipetaj yöntemi ile homojen olarak dağıtıldı. Her bir hücre hattı için hücreli besi yerinden 1 mL alınarak 4 mL besi yeri içeren hücre kültür kaplarına ayrı ayrı eklendi. Bu kültür kapları hücrelerin üremesi için 37 ± 0.5 °C'de % 95 hava-% 5 karbondioksit içeren etüvde inkübasyona bırakılarak 48 saatte bir besiyeri ortamı değiştirildi ve hücreler mikroskopik olarak incelendi. Kültür kaplarında bulunan Hep G2, Mahlavu, Huh-7 hücreleri pasajlama işlemi sitotoksosite çalışması Yöntem 3.2.12' da anlatıldığı şekilde yapıldı.

3.2.13.2 Hep G2, Mahlavu, Huh-7 Hücrelerinin Kültür Filtrelerinin Üzerine Ekimi

Kültür kaplarında bulunan hücreler belirli yoğunluğa ulaştığında, kültür kabı içi 2 defa 10 mL PBS ile yıkandı ve 0.5 mL tripsin-EDTA çözeltisi ilave edildi. Tripsin-EDTA çözeltisinin etkin olabilmesi adına kültür kapları inkübatöre alınarak 3 dakika bekletildi ve kültür kabı yüzeyine tutunmuş haldeki hücrelerin tabakasından ayrılması sağlandı. Ardında her bir kültür kabı içine 5'er mL besi yeri eklenerek hücreler santrifüj tüpüne alındı ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek üst sıvı kısım atılıp hücreler 5 mL besi yeri ortamı ile tekrar süspande edildi. Hücre sayımı Yöntem 3.2.12'da anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Herbir kuyucuk içerisinde 200.000 hücre olacak şekilde, 0.4 µm por çapına sahip polikarbonat filtre özelliğindeki transwell ler üzerine ekildi. Hep G2, Mahlavu ve Huh-7 hücrelerinin plate üzerine ekildikten sonraki görselleri Şekil 19'da gösterilmiştir. Hücreler filtre üzerini kaplayana dek iki günde bir besi yeri ortamları değiştirildi (Berginc & Kristl, 2010).



Şekil 19. Hep G2, Mahlavu ve Huh-7 hücrelerinin tranwell görüntüleri

HSK hücre dizileri transwell yüzeyini kapadıktan sonra permeabilite çalışmasına başlandı. Permeabilite çalışmaları apikalden bazolateral yöne (A→B) ve bazolateral yönden apikal yöne (B→A) doğru yapıldı. Öncelikle transwell apikal ve bazolateral kısımdaki besiyeri ortamları boşaltıldı ve tüm kuyucuklar PBS çözeltisi ile yıkandı. Permeabilite çalışmalarında Hep G2, Mahlavu ve Huh-7 hücre hatlarına Doks-HCl etkin maddesinin HBSS içindeki çözeltisi, %5 Dekstroz çözeltisi içerisinde disperse edilmiş aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun HBSS içindeki çözeltisi ve piyasa preparatının HBSS içindeki çözeltisi her bir hücre hattında Doks-HCl'ün 24. saat IC50 dozu dikkate alınarak hem apikal yöne hem de basolateral yöne uygulandı (Pangeni et al., 2020) (n=3). Apikal yönden bazolateral yöne doğru yapılan geçiş çalışmaları için 1.5 mL Doks-HCl içeren çözelti apikal kısma konuldu, bazolateral kısma ise sink koşulu sağlamak adına 2.0 mL HBSS konuldu. Bazolateral yönden apikal yöne doğru olan çalışmalar için 1.5 mL Doks-HCl içeren çözelti bazolateral kısma konuldu; 2.0 mL HBSS çözeltisi apikal kısma ilave edildi. Tüm transwell plateleri $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 50 rpm'deki yatay çalkalayıcıya koyuldu. 0, 15, 30, 45, 60 ve 75. dakika zamanlarında uygulamanın apikal kısma yapıldığı kuyucuklara basolateral yönden, uygulamanın basolateral kısma yapıldığı kuyucuklarda apikal yönden 200 μL örnek alındı. İlk alınan örnekten sonra alınan diğer örneklerde ortam hacmini sabit tutmak için her bir örnek zamanında örnek alındıktan sonra ortama 200 μL HBSS ilave edildi. 0. dakikada ve 75. dakikada örnek ilaç uygulamasının yapıldığı kısımdan da örnek alınarak hesaplama ve ilaç uygulama dozları doğrulandı. Çalışma boyunca alınan tüm örnekler 10 dakika 1500 rpm'de (devir/dakika) santrifüj edildi. Daha sonra plate membranları bir pens yardımıyla çıkartılıp, serum fizyolojik ile 2 ayrı beherde 3 defa yıkandı ve ependorfların içinde koyuldu üzerine 500 μL HBSS konuldu. Bu ependorflardan 500 μL örnek alındı ve alınan bu örnek membran üzerinde tutulmuş Doks-HCl miktarını (A_m) oluşturdu. Membran bulunan HBSS'li ependorfun üzerine 500 μL metanol eklendi ve 10 dakika 1500 rpm'de tekrar santrifüj edildi. Bu

çözültiden 500 µL örnek alınıp, A_{OH} (hücre içindeki miktar) örneği olarak etiketlendi. Örnekler miktar tayini açısından HPLC’de analiz edilene kadar -80°C’de saklandı. Deneylerin sonunda zamana karşı kümülatif Doks-HCl miktarları grafiğe geçirildi ve etkili permeabilite değeri hem apikalden bazolaterale (P_{A→B}) geçiş için hemde bazolateralden apikale (P_{B→A}) geçiş için hesaplandı. Etkili permeabilite hesabı Eşitlik 16’da, Effluks hesabı ise Eşitlik 17’de verilmiştir.

Eşitlik 16. Etkili Permeabilite Hesabı

$$P_{app} (Permeabilite) = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{C_o \times A \times t}$$

- Her bir plate için (A→B ’ ye ve B→A’ ya) alınan örneklerin konsantrasyonları yapılan tüm seyreltmeler dikkate alınarak miktar tayini için oluşturulan yöntem ile tayin edilerek derişime karşı zaman grafikleri P_{A→B} ve P_{B→A} için ayrı ayrı oluşturuldu.
- Bu grafiğin verdiği denklemde eğim değeri *permeabilite hızı (dQ/dt) olarak hesaplandı (mg/mLxdak).
- Papp denkleminde Co yerine başlangıç derişimi yazıldı (mg/mL).
- Papp denkleminde A yerine transwell alanı (4.67 cm²) yazıldı (cm²).
- Papp denkleminde t yerine dakikadan saniyeye çevirme faktörü (60) yazıldı.

P_{AppA→B} ve P_{AppB→A} hesaplandıktan sonra effluks değerleri her bir uygulama için hesaplandı (Fong, 2021) .

Eşitlik 17. Effluks Hesabı

$$Effluks = \frac{P_{appB-A}}{P_{appA-B}}$$

3.2.13.3 Transepitelyal Elektrik Rezistans (TEER) Değerinin Ölçülmesi

Hücrelerin bütünlüğü ve hücre canlılığı tespitinde kullanılan önemli yöntemlerden biri de elektriksel direncin ölçülmesidir. Hep G2, Mahlavu ve Huh-7 hücre hatları ile yapılan ilaç permeabilite çalışmalarında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri

ölçülerek deneysel bütünlük tespit edildi (Srinivasan, Shuler, & Hickman, 2015). Bu amaçla deneye başlamadan önce kültür kaplarının içindeki ortamlar boşaltıldı ve kuyucuk içine 1.5 mL dışına ise 2.0 mL HBSS eklendi. Her bir kültür kabındaki her bir kuyucuk için 3 farklı yönden TEER değeri ölçülüp sonuç ohm cinsinden kaydedildi. Deney sonunda da aynı noktalardan ölçülen TEER değerlerindeki değişim değerlendirildi (Meindl et al., 2015).

3.2.14 *In vivo* Çalışmalar

Geliştirilen Doks-HCl içeren aktif hedefli pegile lipozomal ve aktif hedefli pegile prolipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerinde yapılan karakterizasyon, stabilite, *in vitro* salım, sitotoksosite ve permeabilite çalışmaları sonucu ideal olarak tespit edilen aktif hedefli pegile F7-3 prolipozomal ilaç taşıyıcı sistem formülasyonu ile *in vivo* çalışmalara geçilmiştir (Bu çalışma için E.Ü. Deney Hayvanları Etik Kuruluna ait 24.02.2021 tarih ve 2021-009 sayılı izin belgesi alınmıştır.). *In vivo* çalışmaların tümünde uygulanacak olan formülasyonlar steriliteyi sağlamak adına Laminer hava akımlı kabinlerde 0.22 µm'lik steril filtrelerden geçirilmiştir.

3.2.14.1 Biyodağılım Çalışması

Aktif hedefli ve aktif hedefsiz pegile F7-3 prolipozom formülasyonlarının i.v yolla verildiğinde vücutta hangi organlarda biriktiğini tespit etmek amacıyla sağlıklı dişi/erkek Nude CD 1 fareler ile ön çalışma yapıldı. Doks-HCl etkin maddesinin IVIS görüntülemesinde Doks-HCl'ün floresans özelliğinden yararlanıldı (Melinda, K. Kauffman et al., 2016). IVIS, özellikle prelinik aşamada çok çeşitli uygulamaları olan ve hızla genişleyen bir teknolojidir. IVIS, bir numuneden yayılan fotonların sayısını sayarak, floresans özellikli maddelerin konumunu ve tümör büyümesi gibi biyolojik süreçlerin izlenmesini sağlamaktadır.

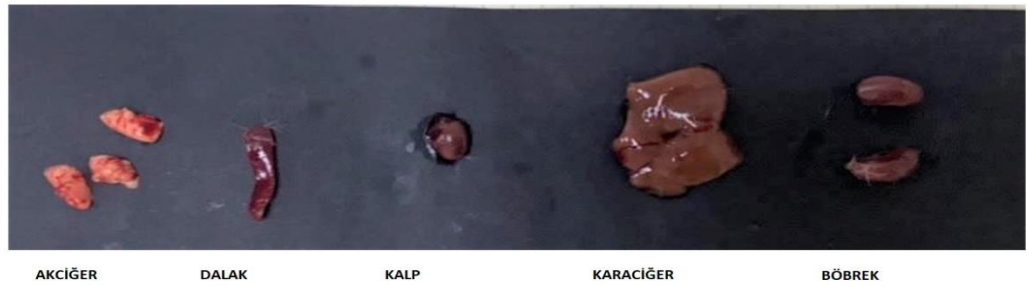
Nude CD 1 fareler 4'er li dört gruba ayrıldı, polipropilen kafeslerde laboratuvar diyetine ve suya erişimi serbest olan, 25±2°C sıcaklık ve %55±5 rölatif neme sahip standart laboratuvar koşullarında tutuldu. Nude CD 1 farelerin ağırlıkları deney öncesi ve sonrasına kaydedildi.

Aktif hedeflemenin biyodağılımda etkisi ve karaciğerlerdeki tutunumu gözlemlemek adına aktif hedef molekülünü içermeyen pegile F7-3 prolipozom formülasyonu tasarlandı. Bu amaçla, Doks-HCl'ün %5 lik Dekstroz çözeltisinin (2 mg/ mL), piyasa preparatının (2 mg/mL), Doks-HCl içeren aktif hedefli F7-3 prolipozom

formülasyonunun (2 mg/ mL) ve glisirretinik asit içermeyen aktif hedefsiz pegile prolipozom formülasyonunun (2 mg/ mL) 16 adet dişi CD1 farelerdeki biyodağılım çalışmaları gerçekleştirildi. Her grupta bulunan nude CD 1 farelere kuyruk veninden 100'er mikrolitre enjeksiyonu ile Doks-HCl derişimi 10 mg/kg ı aşmayacak şekilde uygulandı (Niu et al., 2014). Enjeksiyon sonrasında 1., 3., 5., 7., 9., 12. ve 24. saatlerde izofuluran ile anestezi altında IVIS ölçümleri alındı (Şekil 20) , ardından fareler sakrifiye edilerek organları çıkartıldı. Karaciğer, dalak, akciğer, kalp ve böbreklerde ex vivo IVIS görüntülemeleri yapıldı (Şekil 21). Biyodağılım ve ex vivo çalışmalarında eksitasyon 465 nm, emisyon 600 nm dalga boyunda görüntülemeler yapıldı.



Şekil 20. İzofuluran ile anestezi uygulama sırasında nude CD 1 fareler



Şekil 21. Nude CD 1 farelerin ex vivo IVIS ölçümü öncesi görselleri

3.2.14.2 Etkinlik Çalışması

Etkinlik çalışmasında 9 adet dişi nude CD 1 fare kullanıldı. Çalışma başlangıcından önce fareler 5 günlük karantina sürecine tabii tutuldu ve sağlıkları kontrol edildi.

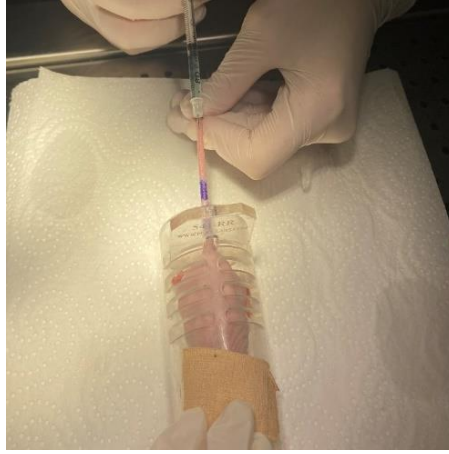
Karaciğer kanseri oluşturma sürecinde ve tedavi sürecinde ağırlıkları kontrol altında tutuldu. Nude CD 1 farelerde ortotopik ksenograft modeli ile karaciğer kanseri oluşturulmuştur (Y. Lu et al., 2007). Nude CD 1 farelerde karaciğer bölgesinde tümör oluşturulması için 100 µL PBS içerisinde 1×10^6 Hep G2 hücresi karaciğerin sağ üst lobuna yavaşça enjekte edildi. Çalışmanın 1., 5. ve 10. gününde hücre enjeksiyonları tekrarlandı. 10. günün sonunda 9 adet nude CD 1 fareye kuyruk venlerinde 100'er µL glikoz prob enjeksiyonu yapıldı. Glikoz prob olarak IVISense 2-DG 750 Fluorescent Probe kullanıldı. Bu prob diğer dokulara oranla yüksek glikoz ihtiyacı ve alımı olan tümör dokularına in vivo hedeflemeyi sağlayarak bu dokularda yapısındaki floresans özelliği nedeniyle ışıma verir. Öylece tümör dokularının kolaylıkla tanınmasını sağlar (Qiu et al., 2014). Glikoz probun tümör dokusunda birikmesi için 3 saat beklendi ve ardından izofluran ile anestezi altında tüm farelerin IVIS ölçümleri gerçekleştirildi.

1. Grup: Negatif Kontrol Grubu (Karaciğer Kanseri Oluşturulmuş Grup) (n=3)
2. Grup: Pozitif Kontrol Grubu (F7-3 Prolipozom Formülasyonu Tedavisi Uygulanacak Grup, %5 lik Deskroz çözeltisi içinde) (n=3)
3. Grup: Pozitif Kontrol Grubu (Piyasa Preparatı Tedavisi Uygulanacak Grup) (n=3)

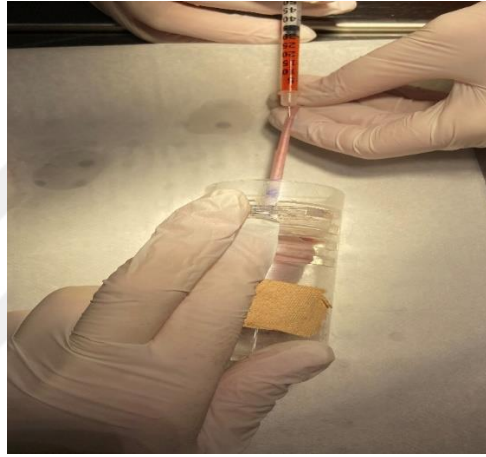
2. Grup ve 3. Grup nude fareye 4 günde bir kuyruk veninden tedavi enjeksiyonu yapıldı (Şekil 24) (Guoliang, Wangi, & Li, 2021). Tedavi enjeksiyonlarını takip eden günlerde deneyde bulunan tüm nude CD 1 farelere glikoz prob enjeksiyonu yapıldı, 3 saat sonra tüm farelerin izofluran anestezi altında IVIS ölçümleri alınarak karaciğer tümörlerinin durumu gözlemlendi. Hücre enjeksiyonu, tedavi ve IVIS görüntülemelerin yapıldığı gün çizelgeleri Şekil 150'de verilmiştir.



Şekil 22. Nude CD 1 farelere Hep G2 hücresinin karaciğere enjeksiyonu



Şekil 23. Nude CD 1 farelere glikoz prob enjeksiyonu



Şekil 24. Nude CD 1 farelere tedavi enjeksiyonu

3.2.15 Organlarda Bulunan Doks-HCl Tayini için Metot Geliştirme Çalışması

Etkinlik çalışması sonrası fareler sakrifiye edilerek; akciğer, dalak, kalp, karaciğer ve böbreklerde biriken Dok-HCl'ün tayini için HPLC-Floresan Dedektör (HPLC-FLD) cihazında miktar tayini yöntemi geliştirildi. HPLC-FLD dedektörleri, diğer HPLC dedektör türlerine göre yüksek hassasiyet ve seçiciliğe sahiptir. Özellikle doku matriks çalışmalarında düşük konsantrasyonlarda, yüksek hassasiyetle çalışılabilme özelliğinden dolayı floresans özellik gösteren maddelerin tayininde sıklıkla kullanılır (G. L. Li, Chen, Liu, Jing, & You, 2012). Bu amaçla tedavi uygulaması yapılmayan negatif kontrol grubundaki nude CD 1 farelerin, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu tedavisi uygulanan gruptaki nude CD 1 farelerin ve piyasa preparatı uygulaması yapılan gruptaki nude CD 1 farelerin; karaciğer, dalak, akciğer, kalp ve böbreklerinde miktar tayini çalışması gerçekleştirildi.

Doks-HCl'ün doku matrikslerindeki miktar tayini için HPLC-FLD'de geliştiren yöntem parametreleri Tablo 13'de verilmiştir (Han, Zhang, Zhao, Li, & Chen, 2016).

Tablo 13. HPLC-FLD Yöntem Parametreleri

Cihaz	HPLC		
Dedektör	FLD		
Kolon	Zorbax Eclipse Plus C18 5µm 4.6 x 250 mm		
Dalga Boyu	Uyarım: 490 nm Emisyon: 550 nm		
Akış Hızı	1.0 mL/dk.		
Enjeksiyon Hacmi	20.0 µL		
Analiz Süresi	30 dk.		
Kolon Sıcaklığı	30°C		
Tray sıcaklığı	25 °C		
Mobil Faz	A Hattı: %0.1 Formik Asit içeren Su B Hattı: %0.1 Formik Asit içeren Asetonitril		
Çalışma Türü	Gradient, Program:		
	Zaman (dk)	A Hattı (%)	B Hattı (%)
	0.0	95	5
	20.0	35	65
	30.0	98	5
Çözücü	Metanol		

3.2.15.1 Standart, İç Standart ve Matriks Çözeltilerinin Hazırlanışları

a. Doks- HCl Standart çözeltisi hazırlanışı:

1 mg Doks-HCl çalışma standardı hassas bir şekilde tartıldı, çözücü ile 10 mL'ye tamamlandı ve çalkalanarak karıştırıldı (Ana stok çözelti). ($C_{\text{Doks-HCl Ana stok}} = 0.10 \text{ mg/mL}$). Bu çözeltiden 1 mL alındı 100 mL'ye çözücü ile tamamlandı ve çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC-FLD cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl standart Ara stok-1}} = 1 \text{ µg/mL}$). Ara stok-1 çözeltisinden 1 mL alınarak 10 mL'ye çözücü ile tamamlandı ($C_{\text{Doks-HCl standart Ara stok-2}} = 0.1 \text{ µg/mL}$)

b. Daunorubisin Standart çözeltisi hazırlanışı:

Çalışmada Daunorubisin (Dau) iç standart olarak kullanıldı. 1 mg Dau çalışma standardı hassas bir şekilde tartıldı, çözücü ile 10 mL'ye tamamlandı ve çalkalanarak karıştırıldı (Ana stok çözelti) ($C_{\text{Dau Ana stok}} = 0.10 \text{ mg/mL}$). Bu çözeltiden 1 mL alındı 100 mL'ye çözücü ile tamamlandı ve çalkalanarak karıştırıldı. 0.22 μm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC-FLD cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Dau Ara stok}} = 1 \mu\text{g/mL}$).

c. Matriks çözeltisinin hazırlanışı:

Doks-HCl tedavi uygulaması yapılmamış (negatif kontrol grubu) karaciğer, dalak, akciğer, kalp ve böbrekler, 1 mL %0.9'luk NaCl çözeltisinde bu banyosu ile prob sonikasyonla 15 dakika parçalandı. Bu çözeltiden 250 μL alınarak 245 μL metanol eklendi ve 5 dakika vortekslendi. Numunelerdeki proteinlerin çöktürülmesi için %70'lik perklorik asit çözeltisinden 5 μL eklendi ve 5 dakika vortekslendi. Ardından protein çöktürülmesi için 14000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvılar matriks çözeltisi olarak kullanıldı (Daeihamed, Haeri, & Dadashzadeh, 2015).

3.2.15.2 Özgünlük ve Seçicilik

Çalışmada analizlenecek Doks-HCl etkin maddesine ve Dau iç standart maddesine, organların matrikslerinden gelecek herhangi bir girişimin olup olmadığını gözlemlemek adına her bir organ için 500 μL matriks çözeltisi, 500 üzerine μL metanol ile vortekslenip, 0.22 μm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC-FLD cihazına enjekte edildi. Ayrıca Doks-HCl ara stok-2 çözeltisinden 500 μL , Dau ara stok çözeltisinden 100 μL , her bir organ için 200 μL matriks çözeltisi, 200 üzerine μL metanol ile vortekslenip, 0.22 μm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC-FLD cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl}} = 50 \text{ ng/mL}$, $C_{\text{Dau}} = 100 \text{ ng/mL}$). Ardından kromatogramlar karşılaştırılarak Doks-HCl ve Dau maddesinin alıkonma zamanlarında matriksten gelebilecek olası pikler değerlendirildi.

3.2.15.3 Çalışma Aralığı ve Doğrusallık

Yöntemin derişim aralığını ve bu aralıktaki doğrusallığını belirlemek için çalışma aralığı ve doğrusallık analizleri gerçekleştirildi. Doks-HCl tedavi uygulaması yapılmamış (negatif kontrol grubu) nude farelerin karaciğer, dalak, akciğer, kalp ve böbrek matrikslerinin Doks-HCl etkin maddesine ve Dau iç standardına olası girişimlerinin gözlenmesi için numuneler üzerine farklı derişimlerde Dok-HCl ve aynı derişimde Dau ekimi yapılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.

% 20 Konsantrasyonda Standart Çözeltisi Hazırlanışı: Doks-HCl ara stok-2 çözeltisinden 1000 µL, Dau ara stok çözeltisinden 1 mL alınarak 10 mL ye çözücü ile tamamlandı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC-FLD cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl}} = 10 \text{ ng/mL}$, $C_{\text{Dau}} = 100 \text{ ng/mL}$).

% 50 Konsantrasyonda Standart Çözeltisi Hazırlanışı: Doks-HCl ara stok-1 çözeltisinden 250 µL, Dau ara stok çözeltisinden 1 mL alınarak 10 mL ye çözücü ile tamamlandı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC-FLD cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl}} = 25 \text{ ng/mL}$, $C_{\text{Dau}} = 100 \text{ ng/mL}$).

% 100 Konsantrasyonda Standart Çözeltisi Hazırlanışı: Doks-HCl ara stok-1 çözeltisinden 500 µL, Dau ara stok çözeltisinden 1 mL alınarak 10 mL ye çözücü ile tamamlandı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC-FLD cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl}} = 50 \text{ ng/mL}$, $C_{\text{Dau}} = 100 \text{ ng/mL}$).

% 150 Konsantrasyonda Standart Çözeltisi Hazırlanışı: Doks-HCl ara stok-1 çözeltisinden 750 µL, Dau ara stok çözeltisinden 1 mL alınarak 10 mL ye çözücü ile tamamlandı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC-FLD cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl}} = 75 \text{ ng/mL}$, $C_{\text{Dau}} = 100 \text{ ng/mL}$).

% 200 Konsantrasyonda Standart Çözeltisi Hazırlanışı: Doks-HCl ara stok-1 çözeltisinden 1000 µL, Dau ara stok çözeltisinden 1 mL alınarak 10 mL ye çözücü ile tamamlandı. 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC-FLD cihazına enjekte edildi ($C_{\text{Doks-HCl}} = 100 \text{ ng/mL}$, $C_{\text{Dau}} = 100 \text{ ng/mL}$).

Çalışma aralığı çalışması için %20 ve %200 konsantrasyondaki çözelti-lerden 6'şar enjeksiyon verilip Doks-HCl standart ile Dau iç standart alan oranları arasındaki %RSS değerlendirildi.

Doğrusallık çalışması için 100 ng/mL Dau iç standart içeren %20, %50, %100, %150, %200 Doks-HCl derişimdeki çözelti-lerden 3'er enjeksiyon verildi. Doks-HCl standart ile Dau iç standart alan oranları ile kalibrasyon eğrisi çizilerek, r^2 değeri değerlendirildi. Ayrıca %100 derişim çözeltisinden 6 enjeksiyon verilip sistem uygunluk kontrol edildi.

3.2.15.3.1 LOD ve LOQ Değerinin Hesaplanması

Çalışma aralığı ve doğrusallık parametresinde en düşük derişimdeki çözelti HPLC-FLD cihazına enjekte edilmiş ve cihaz programı üzerinden sinyal/gürültü hesaplanmıştır. LOD değeri için Eşitlik 4 ve LOQ değeri için Eşitlik 5 kullanılmıştır.

Kalibrasyon eğrisi denkleminde yararlanarak numune matrisi içindeki Doks-HCl miktarı hesaplandı. Bu amaçla aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu tedavisi uygulanan grup ve piyasa preparatı uygulaması yapılan gruptaki karaciğer, dalak, akciğer, kalp ve böbreklerde bulunan Doks-HCl miktarı hesaplandı.

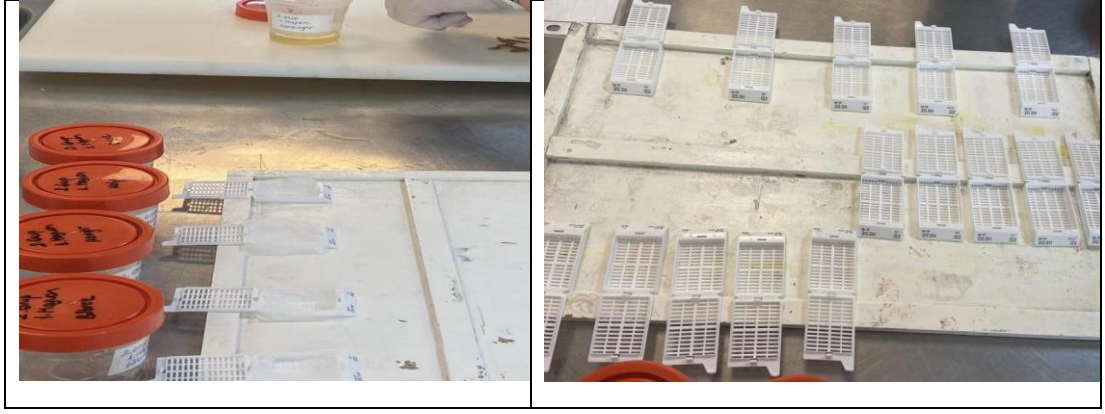
3.2.15.4 Organlarda Bulunan Doks-HCl'ün Miktar Tayini Çalışması

Karaciğer, dalak, akciğer, kalp ve böbrekler, 1 mL %0.9'luk NaCl çözeltisi içerisinde prob sonikasyonla parçalandı. Bu çözeltiden 250 µL alınarak 245 µL metanol eklendi ve 5 dakika vortekslendi. Numunelerdeki proteinlerin çöktürülmesi için %70'lik perklorik asit çözeltisinden 5 µL eklendi ve 5 dakika vortekslendi. Ardından protein çöktürülmesi için 14000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvıdan 250 µL alınarak, 100 µL Dau ara stok çözeltisi iç standart olarak eklendi, 150 µL metanol ile seyreltildi ve 0.22 µm Hidrofilik PTFE filtreden süzülerek HPLC-FLD cihazına enjekte edildi. Doğrusallık parametresinde elde edilen lineerite eğrisi denklemi yardımıyla Doks-HCl miktarları her organ için ng/g cinsinden bulundu.

3.2.15.5 Patolojik Çalışmalar

Etkinlik çalışması sonrası fareler sakrifiye edilerek akciğer, dalak, kalp, karaciğer ve böbrekler çıkartıldı ve patolojik çalışma için PBS çözeltisinde daldırılıp çıkartılarak yıkandı. Ardından ayrı ayrı formaldehit çözeltisi içeren kaplara alındı. Herbir organ kodlanarak, küçük kesitlere ayrıldı, doku takibi işlemlerinden geçirilerek parafinize edildi. Hazırlanan parafin bloklardan 3 mikron kalınlıkta kesitler alınarak histopatolojik inceleme için hematoksilin ve eozin (H&E) boyaması yapıldı. Işık mikroskobu altında değerlendirildi (Şekil 25) (Xiaocheng Li et al., 2020).

1. Grup: Negatif Kontrol Grubu (Karaciğer Kanseri Oluşturulmuş Grup) (n=3)
2. Grup: Pozitif Kontrol Grubu (Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Tedavisi Uygulanacak Grup, 2 mg/ mL %5 lik Deskroz çözeltisi içinde) (n=3)
3. Grup: Pozitif Kontrol Grubu (Piyasa Preparatı Tedavisi Uygulanacak Grup, 2 mg/ mL) (n=3)



Şekil 25. Organların patolojik inceleme için kesitlere ayrılıp kodlanması

3.2.16 İstatiksel Değerlendirme

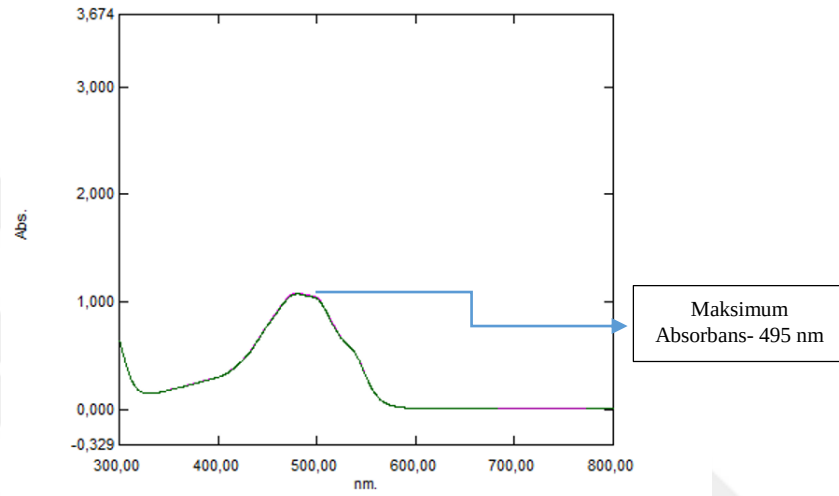
Elde edilen verilerde in vitro sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Parametrik testler için Student t test veya ANOVA varyans analizi, non parametrik testler için Krusger Wallis analizi tercih edilmiştir. Sitotoksisite sonuçları arasındaki farklılık ya da benzerlik GraphPad Prism 8.0 istatistik programına aktararak analiz edilmiş ve gruplar arasındaki farkın anlamlılık düzeyinin belirlenmesi için One-Way ANOVA analizi (Post-Hoc, Dunnett's), $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4 BULGULAR

4.1 Etkin madde Üzerine Yapılan Çalışma Bulguları

4.1.1 Etkin maddenin Ultraviyole (UV) Spektrumu Bulgusu

Doks-HCl'ün spektrofotometrik analizi Yöntem 3.2.1.1'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Doks-HCl'ün distile su içerisindeki çözeltisi 450–550 nm arasında maksimum absorbands vermiştir (Şekil 26). Sonuçlar literatür bilgileri ile uyumlu bulunmuştur (Coluccini, Ng, Reyes, Chen, & Khung, 2020).



Şekil 26. Doks-HCl'ün distile su içerisindeki UV spektrumu

4.1.2 Etkin maddenin İnfrared (FTIR) Spektrumu Bulgusu

FTIR spektrumunda elde edilen pik değerleri Doks-HCl'in yapısında bulunan keton, eter, alkol gruplarının varlığını göstermiştir. 3560 ve 3160 cm^{-1} O-H bağ gerilmesini, 3160 ve 2300 cm^{-1} NH_3 bağ ve O-H oksijen ile hidrojen arasındaki bağ gerilmesini, 1724 cm^{-1} keton bağ gerilmesini, 1613 ve 1580 $\text{C}=\text{O}$ çift bağ gerilme bandını, 1282 cm^{-1} C-O-C eter gerilme bandını, 1115 cm^{-1} üçüncül alkol bağ gerilmesini, 1071 cm^{-1} ikincil alkol bağ gerilmesini, 1008 cm^{-1} birincil alkol bağ gerilmesini ifade etmektedir (Şekil 27). Sonuçta elde edilen bulguların literatür kayıtlarına uygun olduğu görülmüştür (Bansal, Singh, & Kaur, 2021).

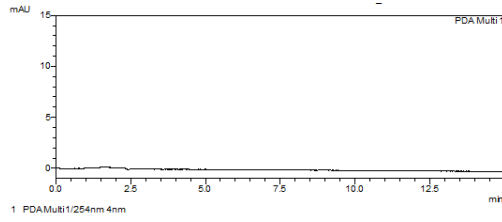


Şekil 27. Doks-HCl FTIR Analiz Spektrumu

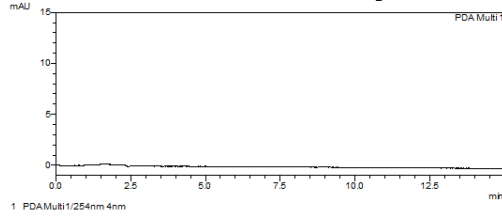
4.1.3 Etkin madde Validasyon Bulguları

4.1.3.1 Özgünlük ve Seçicilik Parametresine ait Bulgular

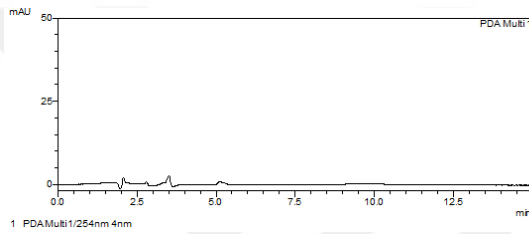
Özgünlük ve seçicilik çalışmasında Yöntem 3.2.1.3.4’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Enjekte edilen Doks-HCl standart çözeltisi, hammadde çözeltisi ve çözücülerin (MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4, HBSS) HPLC kromatogramları incelenmiştir. Etkin madde piki ve pik saflığı değerlendirilmiştir, etkin madde piki altında herhangi bir girişim elde edilmemiştir. Doks-HCl standart çözelti ve çözücülerin enjeksiyonundan elde edilen HPLC kromatogramları Şekil 28’de verilmiştir.



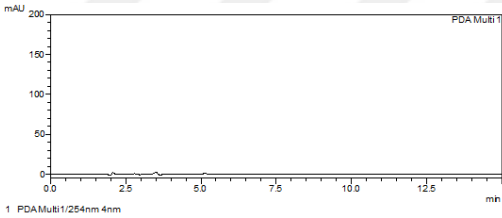
MF kromatogramı



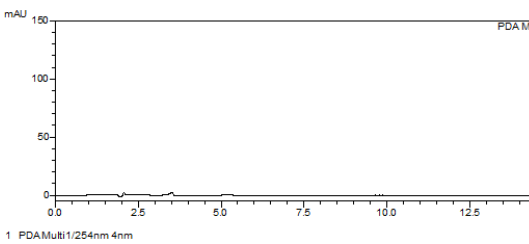
pH 5.5 kromatogramı



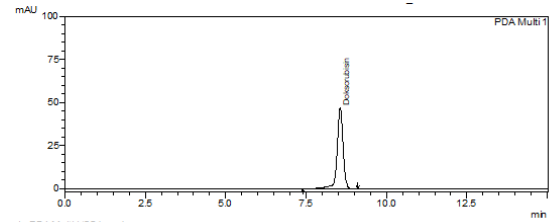
pH 6.5 kromatogramı



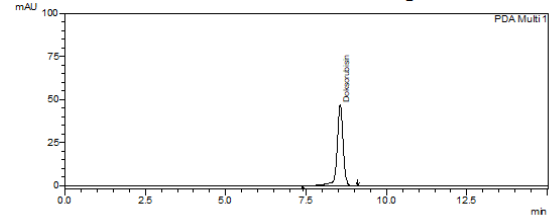
pH 7.4 kromatogramı



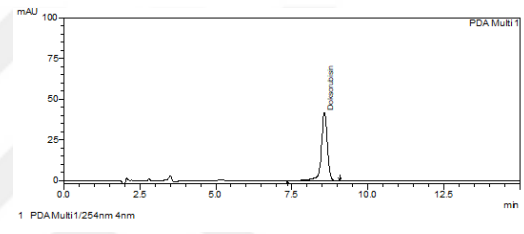
HBSS kromatogramı



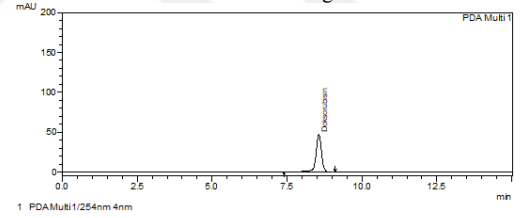
MF ile hazırlanmış Doks-HCl standart kromatogramı



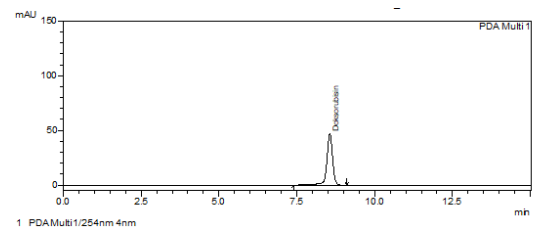
MF ile hazırlanmış, pH 5.5 ile seyreltilmiş Doks-HCl standart kromatogramı



MF ile hazırlanmış, pH 6.5 ile seyreltilmiş Doks-HCl standart kromatogramı



MF ile hazırlanmış, pH 7.4 ile seyreltilmiş Doks-HCl standart kromatogramı



MF ile hazırlanmış, HBSS ile seyreltilmiş Doks-HCl standart kromatogramı

Şekil 28. Doks-HCl etkin maddesinin HPLC validasyonunda özgünlük ve seçicilik parametresine ait kromatogramlar

4.1.3.2 Çalışma Aralığı ve Doğrusallık Parametrelerine ait Bulgular

Yöntem 3.2.1.3.5’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Çalışma aralığı parametresi için çözücü olarak MF kullanılarak hazırlanan stok çözeltilerin seyreltemelerininin MF, pH

5.5, pH 6.5, pH7.4 için %20 ve %150 konsantrasyonlarında, HBSS için ise %0.5 ve %150 konsantrasyonlarında yapılan altışar enjeksiyon alanı ve bu alanlar arasındaki RSS değerleri sırası ile Tablo 14’de verilmiştir.

Doğrusallık parametresinde MF, pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.4 çözücülerini için MF kullanılarak hazırlanan stok çözeltilerin seyreltemelerinin; MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 kullanılarak %20 ve %150 arasında değişen 7 farklı konsantrasyondaki standart çözeltilerinin 3’er enjeksiyonu sonucu alanlar ortalaması ile kalibrasyon eğrisi çizilip korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Bulunan değerler Tablo 15’de, doğrusallık parametresine ait kalibrasyon grafikleri ise Şekil 29, Şekil 30, Şekil 31, Şekil 32’de verilmiştir.

Benzer şekilde HBSS çözücüsü için MF kullanılarak hazırlanan stok çözeltilerin seyreltemelerininin HBSS kullanılarak %5 ve %150 arasında değişen 7 farklı konsantrasyondaki Standart Çözeltilerinin 3’er enjeksiyonu sonucu alanlar ortalaması ile kalibrasyon eğrisi çizilip korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Bulunan değerler Tablo 16’de, doğrusallık parametresine ait kalibrasyon grafiği ise Şekil 33’de verilmiştir.

Tablo 14. Farklı çözücü ortamlarında elde edilen çalışma aralığı sonuçları

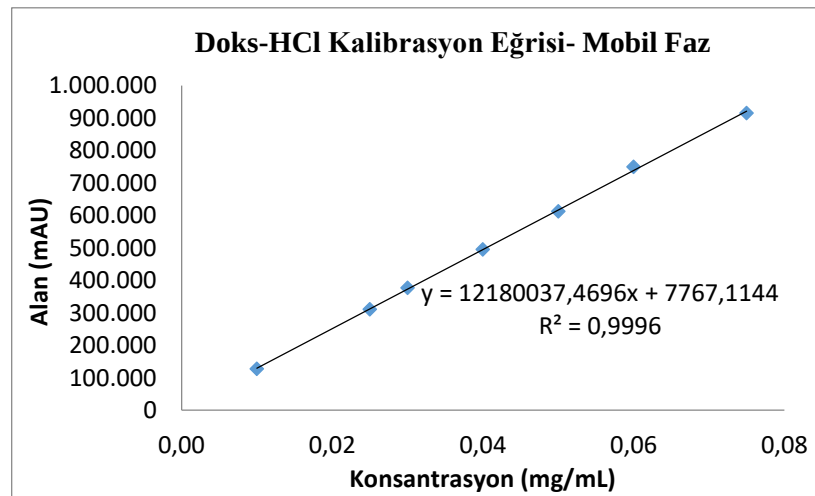
	%20 (0.01 mg/mL)- MF	%150 (0.075 mg/mL)- MF	%20 (0.01 mg/mL)- pH 5.5	%150 (0.075 mg/mL)- pH 5.5	%20 (0.01 mg/mL)- pH6.5	%150 (0.075 mg/mL)- pH 6.5	%20 (0.01 mg/mL)- pH7.4	%150 (0.075 mg/mL)- pH 7.4	%5 (0.00005 mg/mL)- HBSS	%150 (0.015 mg/mL)- HBSS
1.enjeksiyon	129430	915066	120152	910252	120770	896252	84709	851090	239	182134
2.enjeksiyon	130717	916273	121252	912545	120152	897451	83102	850959	236	183321
3.enjeksiyon	128519	915066	122122	912545	120652	896252	84792	858960	238	185423
4.enjeksiyon	128204	916273	120254	913652	120452	896542	84184	848283	237	185398
5.enjeksiyon	129425	917317	120215	914785	120652	897852	84773	846739	243	183523
6.enjeksiyon	128860	918636	120215	915658	120658	899595	84979	847567	265	186352
ort	129192.5	916438.5	120701. 7	913239. 5	120556. 0	897324	84423.2	850599. 7	243	184358, 5
SS	891.7	1372.8	812.0	1913.0	223.0	1293.2	700.3	4466.2	11.0	1606,9
%RSS	0.7	0.1	0.7	0.2	0.2	0.1	0.8	0.5	4.5	0,9

Tablo 15. MF, pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.4 çözücü ortamlarında Doks-HCl standardının doğrusallık parametresine ait alan değerleri

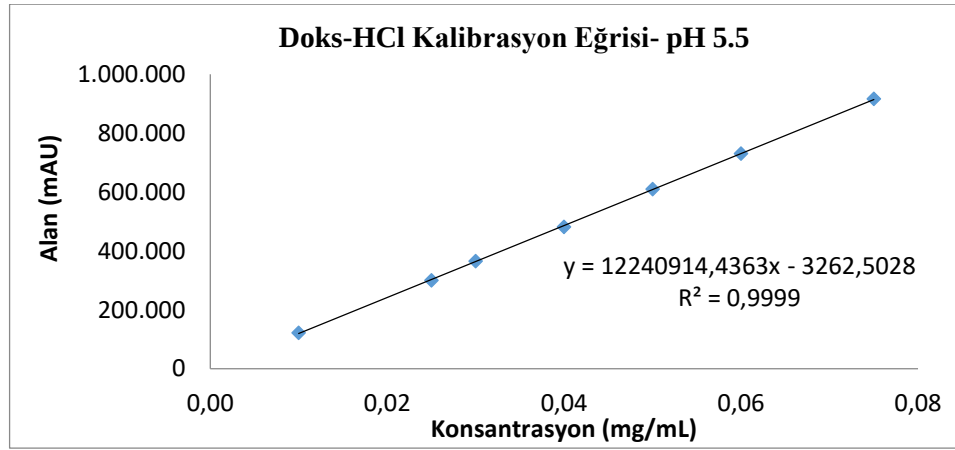
Derişimler (mg/mL)	Alan değerleri- MF	Ortama Alan değerleri- MF	Alan değerleri- pH5.5	Ortama Alan değerleri- pH 5.5	Alan değerleri- pH6.5	Ortama Alan değerleri- pH6.5	Alan değerleri- pH7.4	Ortama Alan değerleri- pH7.4
0.010	127611	127711	122118	122142	120151	120766	84184	84645
	128111		122123		120625		84773	
	127410		122184		121522		84979	
0.025	311304	311074	300252	300210	299858	298618	237029	236207
	310044		300252		298545		236654	
	311873		300125		297452		234938	
0.030	376453	376587	365454	365164	362545	366180	283652	284622
	376487		367454		36454		285652	
	376821		362584		368542		284562	
0.040	494304	494650	482544	481781	470524	470454	380254	381441
	494544		480254		470254		381525	
	495103		482545		470584		382545	
0.050	612269	611911	610254	610478	608151	608407	480256	481441
	611476		610856		608524		481522	
	611989		610325		608545		482545	
0.060	743867	745329	730254	731011	728545	728527	572154	573451
	749389		731525		729584		572548	
	742731		731254		727452		575652	
0.075	915066	915468	915654	916242	901254	896351	720522	723496
	916273		916548		895254		724515	
	915066		916524		892545		725452	

Tablo 16. HBSS çözücü ortamında Doks-HCl standardının doğrusallık parametresine ait alan değerleri

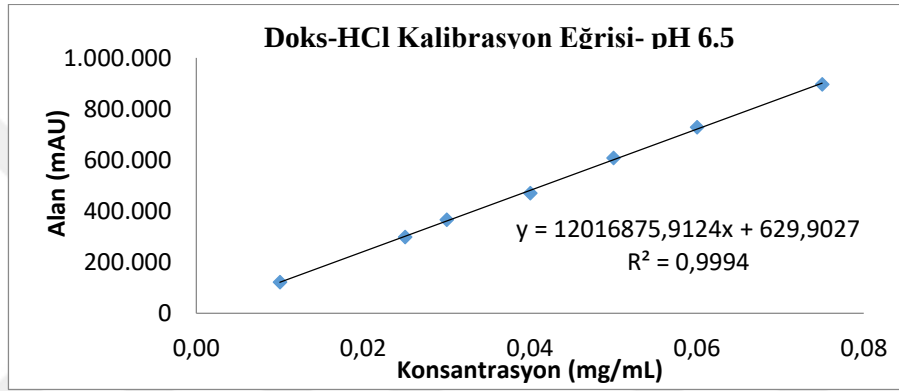
Derişimler (mg/mL)	Alan değerleri	Ortama Alan değerleri
0.00005	239	238
	236	
	238	
0.0005	6121	6124
	6126	
	6125	
0.002	24445	24745
	24853	
	24937	
0.005	61982	61887
	61838	
	61842	
0.008	99588	99707
	99899	
	99634	
0.010	124201	124236
	124205	
	124301	
0.012	149763	149519
	149452	
	149342	
0.015	186343	186587
	186874	
	186543	



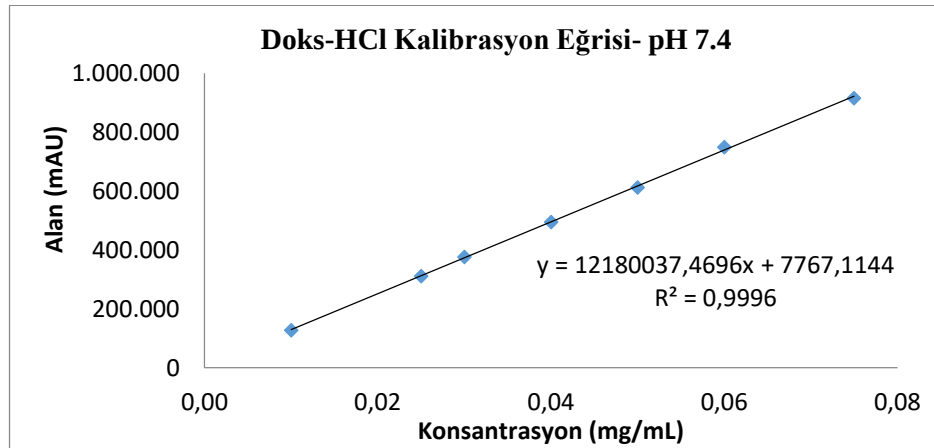
Şekil 29. Doks-HCl Mobil faz ortamında kalibrasyon eğrisi grafiği



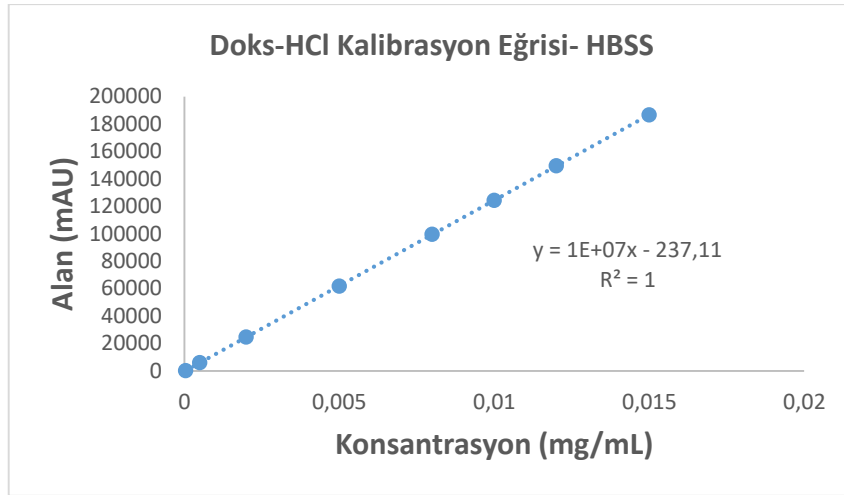
Şekil 30. Doks-HCl pH 5.5 ortamında kalibrasyon eğrisi grafiği



Şekil 31. Doks-HCl pH 6.5 ortamında kalibrasyon eğrisi grafiği



Şekil 32. Doks-HCl pH 7.4 ortamında kalibrasyon eğrisi grafiği



Şekil 33. Doks-HCl HBSS ortamında kalibrasyon eğrisi grafiği

4.1.3.2.1 Duyarlılık ve Saptama Sınırına ait Bulgular

Yöntem 3.2.1.3.5.1’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Doks-HCl’ün; MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ve HBSS ortamlarında yapılan analizleri sonucu bulunan LOD ve LOQ değerleri Tablo 17’de verilmiştir.

Tablo 17. Doks-HCl’ün MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ve HBSS ortamlarında LOD ve LOQ değerleri

	Mobil Faz	pH 5.5	pH 6.5	pH 7.4	HBSS
LOD (mg/mL)	15×10^{-4}	7×10^{-5}	19×10^{-4}	8×10^{-5}	4×10^{-5}
LOQ (mg/mL)	46×10^{-4}	22×10^{-5}	56×10^{-4}	23×10^{-5}	12×10^{-5}

4.1.3.3 Doğruluk Parametresine ait Bulgular

Yöntem 3.2.1.3.6’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Herbir çözücü ortamı için %80, %100 ve %120 seviyelerinde bulunan doğruluk parametresi sonuçları Tablo 18, Tablo 19, Tablo 20, Tablo 21 ve Tablo 22’de verilmiştir.

Tablo 18. Doks-HCl Mobil Faz Ortamında Bulunan Doğruluk Verileri

% Seviye	Tartım miktarları (mg)	Teorik Konsantrasyon (mg/mL)	DeneySEL Konsantrasyon (mg/mL)	Geri kazanım (%)	Ortalama (%)	RSS (%)
80	16.00	0.04000	0.03991	99.8	99.8	0.20
	16.01	0.04003	0.03999	99.9		
	16.02	0.04005	0.04012	100.2		
100	20.10	0.05050	0.05086	101.2	101.0	0.22
	20.20	0.05100	0.05090	100.8		
	20.20	0.05100	0.05095	100.9		
120	24.00	0.06000	0.06030	100.5	100.7	0.82
	24.10	0.06025	0.06023	100.0		
	24.20	0.06050	0.06146	101.6		

Tablo 19. Doks-HCl pH 5.5 Ortamında Bulunan Doğruluk Verileri

% Seviye	Tartım miktarları (mg)	Teorik Konsantrasyon (mg/mL)	DeneySEL Konsantrasyon (mg/mL)	Geri kazanım (%)	Ortalama (%)	RSS (%)
80	16.02	0.04005	0.03995	99.8	100.1	0.35
	16.01	0.04003	0.04001	100.0		
	16.01	0.04003	0.04020	100.4		
100	20.10	0.05025	0.05012	99.7	100.5	0.88
	20.10	0.05025	0.05034	100.2		
	20.20	0.05050	0.05123	101.4		
120	24.20	0.06050	0.06063	100.2	99.8	0.38
	24.20	0.06050	0.06023	99.6		
	24.20	0.06050	0.06023	99.6		

Tablo 20. Doks-HCl pH 6.5 Ortamında Bulunan Doğruluk Verileri

% Seviye	Tartım miktarları (mg)	Teorik Konsantrasyon (mg/mL)	Deneyisel Konsantrasyon (mg/mL)	Geri kazanım (%)	Ortalama (%)	RSS (%)
80	16.01	0.04003	0.03990	99.7	100.0	0.52
	16.01	0.04003	0.03993	99.8		
	16.02	0.04005	0.04030	100.6		
100	20.00	0.05000	0.04931	98.6	100.1	1.27
	20.10	0.05025	0.05075	101.0		
	20.20	0.05050	0.05081	100.6		
120	24.20	0.06050	0.06036	99.8	100.3	0.45
	24.10	0.06025	0.06063	100.6		
	24.20	0.06050	0.06076	100.4		

Tablo 21. Doks-HCl pH 7.4 Ortamında Bulunan Doğruluk Verileri

% Seviye	Tartım miktarları (mg)	Teorik Konsantrasyon (mg/mL)	Deneyisel Konsantrasyon (mg/mL)	Geri kazanım (%)	Ortalama (%)	RSS (%)
80	16.00	0.04000	0.03991	99.8	99.7	0.38
	16.02	0.03015	0.03979	99.4		
	16.02	0.03015	0.04009	100.1		
100	20.10	0.05100	0.05105	101.6	101.7	0.21
	20.10	0.05100	0.05110	101.7		
	20.20	0.05150	0.05140	101.8		
120	24.20	0.10166	0.06046	99.9	100.4	0.45
	24.10	0.10083	0.06053	100.5		
	24.00	0.10000	0.06050	100.8		

Tablo 22. Doks-HCl HBSS Ortamında Bulunan Doğruluk Verileri

% Seviye	Tartım miktarları (mg)	Teorik Konsantrasyon (mg/mL)	Deneysel Konsantrasyon (mg/mL)	Geri kazanım (%)	Ortalama (%)	RSS (%)
80	3.30	0.00825	0.00826	100.1	100.7	1.12
	3.20	0.00825	0.00825	100.0		
	3.21	0.00803	0.00822	102.0		
100	4.20	0.01050	0.01056	100.1	101.0	0.80
	4.10	0.01025	0.01049	101.5		
	4.10	0.01025	0.01040	101.5		
120	4.80	0.01200	0.01210	100.8	100.8	0.84
	4.80	0.01200	0.01220	101.7		
	4.80	0.01200	0.01200	100.0		

4.1.3.4 Kesinlik Parametresine ait Bulgular

4.1.3.4.1 Sistem Kesinliği Parametresine ait Bulgular

Yöntem 3.2.1.3.7’de anlatıldığı üzere standart çözeltilerin farklı çözücü ortamlarındaki enjeksiyonu onucunda elde edilen alıkonma zamanları ve alan değerleri Tablo 23’de verilmiştir.

Tablo 23. Doks-HCl'ün MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ve HBSS Ortamlarında Sistem Kesinliği Verileri

	Alan-MF	Alıkonm a Zamanı (dk.)- MF	Alan-pH 5.5	Alıkonm a Zamanı (dk.)- pH 5.5	Alan-pH 6.5	Alıkonm a Zamanı (dk.)- pH 6.5	Alan-pH 7.4	Alıkonm a Zamanı (dk.)- pH 7.4	Alan-HBSS	Alıkonm a Zamanı (dk.)- HBSS
1	620272	8.80	61057 8	8.79	60525 4	8.90	492541	8.91	120932	8.90
2	621064	8.80	61057 9	8.78	60254 5	8.91	493625	8.91	122154	8.90
3	619757	8.81	61036 8	8.79	60365 8	8.90	495263	8.91	122763	8.90
4	621312	8.81	61048 7	8.79	60548	8.91	498521	8.91	122873	8.91
5	620366	8.80	61098 5	8.78	60925 4	8.90	492574	8.90	122542	8.90
6	619806	8.80	61097 8	8.79	60587 4	8.91	498545	8.91	122873	8.91
ort	620429. 5	8.80	61066 2	8.79	60534 5	8.91	495178. 2	8.91	122356. 2	8.90
Ss	640.51	0.01	258.9 2	0.01	2292. 3	0.01	2780.9	0.00	748.8	0.01
% RS S	0.10	0.01	0.04	0.06	0.38	0.06	0.56	0.05	0.61	0.06

4.1.3.4.2 Tekrarlanabilirlik Parametresine ait Bulgular

Yöntem 3.2.1.3.7.2'de anlatıldığı üzere 6 adet numunenin farklı çözücü ortamlarında 2'şer enjeksiyon verilmesi ile elde edilen sonuçlardan MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ve HBSS çözücü ortamındaki sonuçlar sırası ile; Tablo 24, Tablo 25, Tablo 26, Tablo 27 ve Tablo 28'de verilmiştir. Doks-HCl'ün herbir çözücü ortamındaki standart tartım ve analiz başlangıcı ile sonundaki % uyum değerleri ise Tablo 29'da verilmiştir.

Tablo 24. Doks-HCl'ün MF Ortamında Tekrarlanabilirlik Verileri

Örnek	Tartımlar (mg)	Derişimler (mg/mL)	Alan değerleri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.	20.1	0.050	246760	101.8	101.8
1.			246640	101.8	
2.	20.0	0.050	243440	100.8	100.8
2.			243160	100.7	
3.	20.2	0.051	244560	100.1	100.1
3.			244560	100.1	
4.	20.3	0.051	247560	101.3	101.3
4.			247230	101.2	
5.	20.2	0.051	244210	101.2	100.6
5.			241310	100.0	
6.	20.1	0.050	244010	100.7	100.7
6.			244100	100,7	
ORT					99.9
SS					1.0
RSS					0.97
CI±					99.9±1.4

Tablo 25. Doks-HCl'ün pH 5.5 Ortamında Tekrarlanabilirlik Verileri

Örnek	Tartımlar (mg)	Derişimler (mg/mL)	Alan değerleri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.	20.2	0.051	203847	99.3	99.2
1.			203526	99.1	
2.	20.1	0.050	203746	100.2	100.2
2.			203624	100.2	
3.	20.2	0.051	203846	100.3	100.2
3.			203725	100.2	
4.	20.3	0.051	206343	99.5	98.9
4.			203749	98.3	
5.	20.0	0.050	203746	99.2	99.2
5.			203736	99.2	
6.	20.1	0.050	203846	99.3	100.6
6.			209382	102.0	
ORT	99.7				
SS	0.7				
RSS	0.71				
CI±	99.7±0.7				

Tablo 26. Doks-HCl'ün pH 6.5 Ortamında Tekrarlanabilirlik Verileri

Örnek	Tartımlar (mg)	Derişimler (mg/mL)	Alan değerleri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.	20.0	0.050	231478	100.0	100.2
1.			232351	100.4	
2.	20.4	0.051	236735	98.3	98.2
2.			235987	98.0	
3.	20.3	0.051	235298	98.7	98.6
3.			234786	98.5	
4.	20.4	0.051	245367	101.9	101.5
4.			243461	101.1	
5.	20.1	0.050	233739	100.0	99.7
5.			232467	99.4	
6.	20.3	0.051	236372	99.1	99.1
6.			236212	99.1	
ORT	99.5				
SS	1.2				
RSS	1.2				
CI±	99.9±1.4				

Tablo 27. Doks-HCl'ün pH 7.4 Ortamında Tekrarlanabilirlik Verileri

Örnek	Tartımlar (mg)	Derişimler (mg/mL)	Alan değerleri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.	20.2	0.051	256345	100.5	100.1
1.			254645	99.8	
2.	20.1	0.050	253876	100.5	100.2
2.			252341	99.9	
3.	20.2	0.051	252319	98.9	99.0
3.			252897	99.1	
4.	20.3	0.051	259868	100.8	100.6
4.			258760	100.4	
5.	20.0	0.050	254784	101.8	101.6
5.			253564	101.4	
6.	20.1	0.050	249870	99.9	99.7
6.			249087	99.6	
ORT	100.2				
SS	0.9				
RSS	0.9				
CI±	100.2±1.3				

Tablo 28. Doks-HCl'ün HBSS Ortamında Tekrarlanabilirlik Verileri

Örnek	Tartımlar (mg)	Derişimler (mg/mL)	Alan değerleri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.	4.00	0.010	120121	99.0	99.0
1.			120321	99.1	
2.	4.10	0.011	122432	98.4	98.3
2.			122239	98.2	
3.	4.00	0.010	121023	99.7	99.7
3.			121020	99.7	
4.	4.10	0.011	122982	98.8	98.8
4.			122892	98.8	
5.	4.10	0.011	123032	98.9	98.9
5.			123032	98.9	
6.	4.20	0.011	125321	98.3	98.3
6.			125273	98.3	
ORT	98.8				
SS	0.5				
RSS	0.5				
CI±	98.8±0.8				

Tablo 29. Doks-HCl'ün Tekrarlanabilirlik Çalışmasında Standart Tartım ve % Uyumları

	MF	pH 5.5	pH6.5	pH7.4	HBSS
Standart tartım (mg)	20.0	20.1	20.1	20.2	4.0
Kontrol standart tartım (mg)	20.1	20.2	20.0	20.3	4.1
Analiz başlangıcında % uyum	99.41	100.84	98.30	100.40	101.60
Analiz sonunda % uyum	99.65	100.77	98.40	99.80	101.30

4.1.3.4.3 Laboratuvarıçi Kesinlik Parametresine ait Bulgular

Yöntem 3.2.1.3.7.3'de anlatıldığı üzere Laboratuvarıçi kesinlik çalışması gerçekleştirilmiştir. Laboratuvar varyasyonlarının aynı çalışma numunesi ve standardı üzerindeki etkisi % Fark olarak verilmiştir. MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ve HBSS

çözücü ortamındaki sonuçlar sırası ile Tablo 30, Tablo 31, Tablo 32, Tablo 33, Tablo 34, Tablo 35, Tablo 36, Tablo 37, Tablo 38 ve Tablo 39’da verilmiştir. Doks-HCl’ün her bir çözücü ortamındaki standart tartım ve analiz başlangıcı ile sonundaki % uyum değerleri ise Tablo 40’da verilmiştir.

Tablo 30. Doks-HCl MF çözücü ortamında Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-1

Örnek	Tartımlar (mg)	Derişimler (mg/mL)	Alan değerleri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.	20.1	0.050	244568	99.3	98.9
1.			242640	98.5	
2.	20.0	0.050	245210	100.6	100.3
2.			244121	100.1	
3.	20.1	0.050	254376	99.2	98.6
3.			251255	98.0	
4.	20.3	0.051	247560	98.6	98.7
4.			248240	98.8	
5.	20.0	0.050	248240	101.8	101.4
5.			246440	101.1	
6.	20.0	0.050	243120	99.7	99.7
6.			243000	99.7	
ORT	99.6				
SS	1.1				
RSS	1.1				
CI±	99.6±1.7				

Tablo 31. Doks-HCl MF çözücü ortamında Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-2

Test No	Analist I / Cihaz I / Gün I	Analist II / Cihaz II /Gün II
1	101.8	98.9
2	100.8	100.3
3	100.1	98.6
4	101.3	98.7
5	100.6	101.4
6	100.7	99.7
Ortalama	99.9	99.6
	99.75	
SS	1.0	1.1
% RSS	0.97	1.1
CI	99.9±1.4	99.6±1.7
% Fark	0.3	

Tablo 32. Doks-HCl pH 5.5 çözücü ortamında Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-1

Örnek	Tartımlar (mg)	Derişimler (mg/mL)	Alan değerleri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.	20.2	0.050	203943	98.1	99.5
1.			210123	101.0	
2.	20.2	0.050	211232	101.6	101.1
2.			209471	100.7	
3.	20.0	0.050	203159	99.6	99.8
3.			203849	100.0	
4.	20.1	0.050	201923	98.1	98.5
4.			203945	99.0	
5.	20.2	0.050	203845	98.0	98.0
5.			203945	98.1	
6.	20.3	0.051	211283	100.6	100.8
6.			212034	101.0	
ORT	99.6				
SS	1.2				
RSS	1.2				
CI±	99.6±1.8				

Tablo 33. Doks-HCl pH 5.5 çözücü ortamında Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-2

Test No	Analist I / Cihaz I / Gün I	Analist II / Cihaz II /Gün II
1	99.2	99.5
2	100.2	101.1
3	100.2	99.8
4	98.9	98.5
5	99.2	98.0
6	100.6	100.8
Ortalama	99.7	99.6
	99.65	
SS	0.7	1.2
% RSS	0.71	1.2
CI	99.7±0.7	99.6±1.8
% Fark	0.1	

Tablo 34. Doks-HCl pH 6.5 çözücü ortamında Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-1

Örnek	Tartımlar (mg)	Derişimler (mg/mL)	Alan değerleri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.	20.2	0.051	238745	99.9	99.7
1.			237645	99.5	
2.	20.1	0.050	234998	99.3	100.1
2.			238734	100.9	
3.	20.3	0.051	235987	97.8	98.5
3.			239123	99.1	
4.	20.3	0.051	237639	98.5	98.8
4.			239127	99.1	
5.	20.0	0.050	234723	100.2	101.2
5.			239324	102.2	
6.	20.1	0.050	234739	99.2	99.8
6.			237634	100.5	
ORT	99.7				
SS	1.0				
RSS	1.0				
CI±	99.7±1.5				

Tablo 35. Doks-HCl pH 6.5 çözücü ortamında Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-2

Test No	Analist I / Cihaz I / Gün I	Analist II / Cihaz II /Gün II
1	100.2	99.7
2	98.2	100.1
3	98.6	98.5
4	101.5	98.8
5	99.7	101.2
6	99.1	99.8
Ortalama	99.5	99.7
	99.6	
SS	1.2	1.0
% RSS	1.2	1.0
CI	99.9±1.4	99.7±1.5
% Fark	0.2	

Tablo 36. Doks-HCl pH 7.4 çözücü ortamında Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-1

Örnek	Tartımlar (mg)	Derişimler (mg/mL)	Alan değerleri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.	20.4	0.051	267397	101.6	101.7
1.			267830	101.7	
2.	20.2	0.051	258324	100.0	99.9
2.			257639	99.8	
3.	20.3	0.051	264319	101.4	100.9
3.			261983	100.5	
4.	20.2	0.051	254739	98.7	99.0
4.			256598	99.4	
5.	20.1	0.050	259036	101.3	100.3
5.			253983	99.3	
6.	20.0	0.050	254837	100.7	100.4
6.			253278	100.1	
ORT	100.4				
SS	0.9				
RSS	0.9				
CI±	100.4±1.3				

Tablo 37. Doks-HCl pH 7.4 çözücü ortamında Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-2

Test No	Analist I / Cihaz I / Gün I	Analist II / Cihaz II /Gün II
1	100.1	101.7
2	100.2	99.9
3	99.0	100.9
4	100.6	99.0
5	101.6	100.3
6	99.7	100.4
Ortalama	100.2	100.4
	100.3	
SS	0.9	0.9
% RSS	0.9	0.9
CI	100.2±1.3	100.4±1.3
% Fark	0.1	

Tablo 38. Doks-HCl HBSS çözücü ortamında Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-1

Örnek	Tartımlar (mg)	Derişimler (mg/mL)	Alan değerleri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.	4.2	0.011	124232	98.0	98.0
1.			124432	98.1	
2.	4.1	0.010	125529	101.4	101.5
2.			125732	101.6	
3.	4.2	0.011	125763	99.2	99.2
3.			125932	99,3	
4.	4.0	0.010	122329	101.3	101.4
4.			122543	101.4	
5.	4.2	0.011	124983	98.5	98.5
5.			124892	98.5	
6.	4.1	0.010	125983	101.8	101.7
6.			125897	101.7	
ORT	100.1				
SS	1.7				
RSS	1.7				
CI±	100.1±1.7				

Tablo 39. Doks-HCl HBSS çözücü ortamında Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-2

Test No	Analist I / Cihaz I / Gün I	Analist II / Cihaz II /Gün II
1	99.0	98.0
2	98.3	101.5
3	99.7	99.2
4	98.8	101.4
5	98.9	98.5
6	98.3	101.7
Ortalama	98.8	100.1
	99.4	
SS	0.8	1.7
% RSS	0.8	1.7
CI	98.8±0.8	100.1±1.5
% Fark	1.2	

Tablo 40. Standart tartımları ve % Uyumlar

	MF	pH5.5	pH6.5	pH7.4	HBSS
Standart tartım (mg)	20.0	20.2	20.1	20.2	4.0
Kontrol standart tartım (mg)	20.1	20.1	20.2	20.3	4.2
Analiz başlangıcında % uyum	100	99.97	101.10	101.01	101.92
Analiz sonunda % uyum	99.6	98.93	100.73	100.12	101.73

4.1.3.5 Dayanıklılık Parametresine ait Bulgular

Yöntem 3.2.1.3.8’de anlatıldığı üzere çalışmalar yapıldı. Değişen herbir koşul için ve her bir çözücü için ayrı ayrı sonuçlar değerlendirildi. Her bir çözücü ortamındaki standart ve numune tartımları Tablo 41’de verilmiştir. Normal koşullardaki sonuçlarla karşılaştırma yapılarak % Farklar elde edildi. MF, pH 5.5, pH 6.6, pH 7.4 ve HBSS çözücü ortamlarında bulunan sonuçlar Tablo 42, Tablo 43, Tablo 44, Tablo 45 ve Tablo 46’da verilmiştir.

Tablo 41. Dayanıklılık Parametresi Standart ve Numune tartımları

	MF	pH 5.5	pH 6.5	pH 7.4	HBSS
Standart tartım (mg)	20.0	20.1	20.2	20.1	4.0
Numune-1 Tartım (mg)	20.0	20.2	20.1	20.0	4.1
Numune-2 Tartım (mg)	20.1	20.0	20.0	20.0	4.2

Tablo 42. Doks-HCl MF Ortamında Dayanıklılık Verileri

Parametre	% Miktar	%RSS	% Fark	Rt	Kuyruklanma Faktörü	Plaka Sayısı
Normal çalışma koşulları	100.6	0.4	-	8.6	1.1	18597
Akış hızı 0.9 mL/dk	101.7	0.3	1.1	8.8	1.2	17730
Akış hızı 1.1 mL/dk	101.7	0.1	1.1	7.6	1.1	17318
Kolon Sıcaklığı 20°C	101.9	0.3	1.3	8.7	1.1	19588
Kolon Sıcaklığı 30°C	100.6	0.1	0.0	8.5	1.0	19002
Tampon pH'ı 2.3	101.7	0.3	1.1	8.3	1.1	19661
Tampon pH'ı 2.7	100.1	0.2	0.5	7.8	0.9	19453

Tablo 43. Doks-HCl pH5.5 Ortamında Dayanıklılık Verileri

Parametre	% Miktar	%RSS	% Fark	Rt	Kuyruklanma Faktörü	Plaka Sayısı
Normal çalışma koşulları	100.5	0.5	-	8.6	1.0	19283
Akış hızı 0.9 mL/dk	100.8	0.1	0.3	8.5	1.2	19283
Akış hızı 1.1 mL/dk	100.4	0.3	0.1	8.7	0.9	19823
Kolon Sıcaklığı 20°C	101.3	0.8	0.8	8.1	1.2	19283
Kolon Sıcaklığı 30°C	101.1	0.2	0.6	8.8	1.0	19283
Tampon pH'ı 2.3	100.7	0.5	0.2	8.2	0.8	19283
Tampon pH'ı 2.7	100.8	0.8	0.3	8.7	0.8	19283

Tablo 44. Doks-HCl pH 6.5 Ortamında Dayanıklılık Verileri

Parametre	% Miktar	%RSS	% Fark	Rt	Kuyruklanma Faktörü	Plaka Sayısı
Normal çalışma koşulları	100.5	0.8	-	8.5	1.0	19457
Akış hızı 0.9 mL/dk	100.8	0.2	0.3	8.4	1.1	18634
Akış hızı 1.1 mL/dk	100.4	0.5	0.1	8.7	0.9	19287
Kolon Sıcaklığı 20°C	101.3	0.9	0.8	8.2	1.1	18945
Kolon Sıcaklığı 30°C	101.1	0.4	0.6	8.6	1.0	19783
Tampon pH'ı 2.3	100.7	0.4	0.2	8.4	0.9	18354
Tampon pH'ı 2.7	100.8	0.5	0.3	8.7	0.9	19826

Tablo 45. Doks-HCl pH 7.4 Ortamında Dayanıklılık Verileri

Parametre	% Miktar	%RSS	% Fark	Rt	Kuyruklanma Faktörü	Plaka Sayısı
Normal çalışma koşulları	100.4	0.2	-	8.6	1.1	20100
Akış hızı 0.9 mL/dk	100.7	0.1	0.3	8.5	1.1	19884
Akış hızı 1.1 mL/dk	100.2	0.3	0.2	8.7	0.9	20305
Kolon Sıcaklığı 20°C	100.7	0.8	0.3	8.7	1.2	19783
Kolon Sıcaklığı 30°C	101.0	0.8	0.6	8.5	1.1	19987
Tampon pH'ı 2.3	101.6	0.1	1.2	8.4	0.9	20003
Tampon pH'ı 2.7	100.7	0.5	0.3	8.6	1.1	20012

Tablo 46. Doks-HCl HBSS Ortamında Dayanıklılık Verileri

Parametre	% Miktar	%RSS	% Fark	Rt	Kuyruklanma Faktörü	Plaka Sayısı
Normal çalışma koşulları	100.5	0.7	-	8.5	1.0	20550
Akış hızı 0.9 mL/dk	100.4	0.8	0.1	8.7	1.1	19993
Akış hızı 1.1 mL/dk	100.5	0.4	0.0	8.4	0.9	19982
Kolon Sıcaklığı 20°C	100.9	0.9	0.4	8.6	1.1	19872
Kolon Sıcaklığı 30°C	100.3	0.3	0.2	8.4	1.0	20023
Tampon pH'ı 2.3	101.2	0.5	0.7	8.3	0.9	19982
Tampon pH'ı 2.7	100.4	0.6	0.1	8.7	1.1	20034

4.1.3.6 Çözelti Stabilitesi Parametresine ait Bulgular

Yöntem 3.2.1.3.10'da anlatıldığı gibi çalışıldı. Doks-HCl standart ve hammadde için her bir ortamda ayrı ayrı yapılan çözelti stabilitesi analizlerinde % Fark değerleri hesaplanmıştır. Bulunan sonuçlar Tablo 47 ve Tablo 48'de verilmiştir.

Tablo 47. Doks-HCl Standart Çözelti Stabilitesi

	Alan-MF	Alan-pH 5.5	Alan-pH 6.5	Alan-pH 7.4	Alan-HBSS	% Fark-MF	% Fark-pH 5.5	% Fark-pH 6.5	% Fark-pH 7.4	% Fark-HBSS
Başlangıç zamanı	251760	202354	278923	224543	120211	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2. saat	249720	203942	277432	227865	120210	0.8	0.6	0.5	1.5	0.0
4. saat	250400	203947	277323	226543	120290	0.5	0.6	0.6	0.9	0.0
6. saat	250920	203947	276920	225120	121872	0.3	0.6	0.7	0.3	0.3
8. saat	251000	203843	278000	226098	121982	0.3	0.6	0.3	0.7	0.3
12. saat	251520	203749	279456	226540	121990	0.1	0.5	0.2	0.9	0.3
18. saat	253720	203847	276860	224120	122321	0.8	0.6	0.7	0.2	0.4
24. saat	253560	203642	276574	225320	122983	0.7	0.5	0.8	0.3	0.5
36. saat	254520	203843	275770	223290	122012	1.1	0.6	1.1	0.6	0.3
48. saat	253730	203847	276123	223000	122430	0.8	0.6	1.0	0.7	0.4

Tablo 48. Doks-HCl Hammadde Çözelti Stabilitesi

	Alan-MF	Alan-pH 5.5	Alan-pH 6.5	Alan-pH 7.4	Alan-HBSS	% Fark-MF	% Fark-pH 5.5	% Fark-pH 6.5	% Fark-pH 7.4	% Fark-HBSS
Başlangıç zamanı	252080	203827	267637	223456	121232	-	-	-	-	-
2. saat	251960	203625	267837	225474	120921	0.0	-0.1	0.1	0.9	0.3
4. saat	252520	202632	268936	225487	122982	0.2	-0.5	0.5	0.9	1.4
6. saat	252440	203726	269836	224573	122893	0.1	0.0	0.8	0.5	1.4
8. saat	253160	205632	269827	225637	121983	0.4	0.7	0.8	1.0	0.6
12. saat	253440	204562	268235	226374	120342	0.5	0.3	0.2	1.3	0.7
18. saat	254400	204538	265357	225374	122329	0.9	0.3	0.9	0.9	0.9
24. saat	254600	205239	269382	227345	122532	1.0	0.5	0.7	1.7	1.1
36. saat	254800	204237	263940	227456	122632	1.1	0.2	1.4	1.8	1.2
48. saat	252080	203723	267093	227187	122567	0.0	0.0	0.2	1.7	1.1

4.1.3.7 Sistem Uygunluğu Parametresine ait Bulgular

Yöntem 3.2.1.3.10'da anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Her bir çözücü için; alan, alıkonma zamanı, kuyruklanma faktörü ve teorik plaka sayıları kaydedilmiş; ortalama, SS ve %RSS değerleri hesaplanmıştır. Bulunan sonuçlar Tablo 49, Tablo 50, Tablo 51, Tablo 52 ve Tablo 53'de verilmiştir.

Tablo 49. Doks-HCl'ün MF Ortamında Sistem Uygunluk Verileri

Enjeksiyon No	Alan	Rt	Kuyruklanma Faktörü	Teorik Plaka
1	252080	8.44	1.1	16723.5
2	252098	8.43	1.1	16561.5
3	253876	8.42	1.1	16533.6
4	259834	8.43	1.1	16548.9
5	258372	8.44	1.1	16595.4
6	256438	8.42	1.1	16647.2
Ortalama	255449.67	8.43	1.1	16601.68
SS	3280.36	0.01	-	72.09
% RSS	1.28	0.11	-	0.43

Tablo 50. Doks-HCl'ün pH 5.5 Ortamında Sistem Uygunluk Verileri

Enjeksiyon No	Alan	Rt	Kuyruklanma Faktörü	Teorik Plaka
1	201273	8.62	1.20	12536
2	206324	8.61	1.13	12123
3	203523	8.63	1.14	12588
4	203527	8.61	1.14	12736
5	201472	8.60	1.13	12832
6	203547	8.62	1.10	12938
Ortalama	203277.7	8.62	1.14	12625.50
SS	1830.5	0.0	0.0	287.9
% RSS	0.9	0.1	2.9	2.3

Tablo 51. Doks-HCl'ün pH 6.5 Ortamında Sistem Uygunluk Verileri

Enjeksiyon No	Alan	Rt	Kuyruklanma Faktörü	Teorik Plaka
1	269834	8.71	1.1	16767.5
2	268349	8.72	1.1	16576.3
3	264758	8.71	1.1	16765.2
4	267685	8.70	1.1	16875.6
5	268439	8.71	1.1	16769.8
6	266540	8.70	1.1	16665.6
Ortalama	267600.83	8.71	1.1	16736.57
SS	1758.61	0.01	-	102.89
% RSS	0.66	0.09	-	0.61

Tablo 52. Doks-HCl'ün pH 7.4 Ortamında Sistem Uygunluk Verileri

Enjeksiyon No	Alan	Rt	Kuyruklanma Faktörü	Teorik Plaka
1	224576	8.90	1.1	16767.5
2	227654	8.91	1.1	16576.3
3	228976	8.93	1.1	16765.2
4	224876	8.90	1.1	16875.6
5	228750	8.92	1.1	16769.8
6	228965	8.91	1.1	16665.6
Ortalama	227299.50	8.91	1.1	16840.17
SS	2054.51	0.01	-	16840.17
% RSS	0.90	0.13	-	16840.17

Tablo 53. Doks-HCl ‘ün HBSS Ortamında Sistem Uygunluk Verileri

Enjeksiyon No	Alan	Rt	Kuyruklanma Faktörü	Teorik Plaka
1	255664	8.92	1.1	122324
2	256876	8.91	1.1	121982
3	257965	8.90	1.1	120823
4	254786	8.92	1.1	120932
5	254798	8.92	1.1	120832
6	256987	8.91	1.1	121432
Ortalama	256179.33	8.91	1.1	121387.5
SS	1299.33	0.01	-	643.0
% RSS	0.51	0.09	-	0.50

4.1.4 Etkin madde Çözünürlük Çalışmasına ait Bulgular

Yöntem 3.2.1.4’de anlatıldığı şekilde çalışma gerçekleştirilmiştir. Doks-HCl etkin maddesinin distile su, %0.9 NaCl, HEPES, 0.5 mol/L Sodyum karbonat, Sitrik asit-Sodyum sitrat, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ve HBSS ortalarında 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan çözünürlük çalışmasında bulunan sonuçlar Tablo 54’de verilmiştir.

Tablo 54. Çözünürlük çalışması sonuçları (n=3)

	24. saat (mg/mL)	48. saat (mg/mL)	72. saat (mg/mL)
Distile su	7.48 ± 1.23	7.49 ± 0.88	7.50 ± 0.97
%0.9 NaCl	6.21± 1.56	6.43 ± 1.58	6.55 ± 1.43
HEPES	5.23 ± 0.45	5.65 ± 0.54	5.67 ± 0.46
0.5 mol/L Sodyum karbonat (pH11)	0.25 ± 0.23	0.22 ± 1.21	0.22 ± 1.24
Sitrik asit-Sodyum sitrat (pH4.0)	7.25 ± 0.28	7.84 ± 0.54	7.25 ± 0.65
pH 5.5 (Fosfat tamponu)	4.24 ± 1.31	5.34 ± 1.23	5.54 ± 1.42
pH 6.5 (Fosfat tamponu)	3.28 ± 1.01	3.45± 1.23	3.54 ± 1.21
pH 7.4 (Fosfat tamponu)	1.21 ± 0.89	1.22 ± 0.67	1.23 ± 0.76
HBSS	1.32 ± 0.68	1.43 ± 0.79	1.54 ± 0.89

4.2 Formülasyon Geliştirme Çalışmalarına ait Bulgular

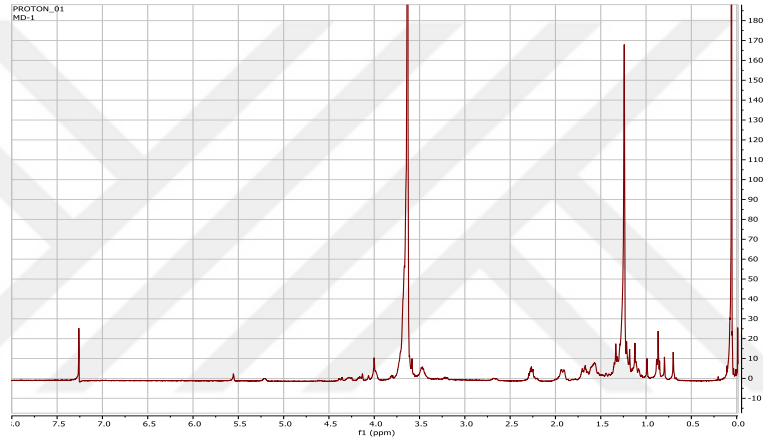
4.2.1 DSPE PEG2000-Glisirretinik asit Konjugasyonu Sentezi Bulguları

4.2.1.1 Nükleer Manyetik Rezonans Analizi Bulguları

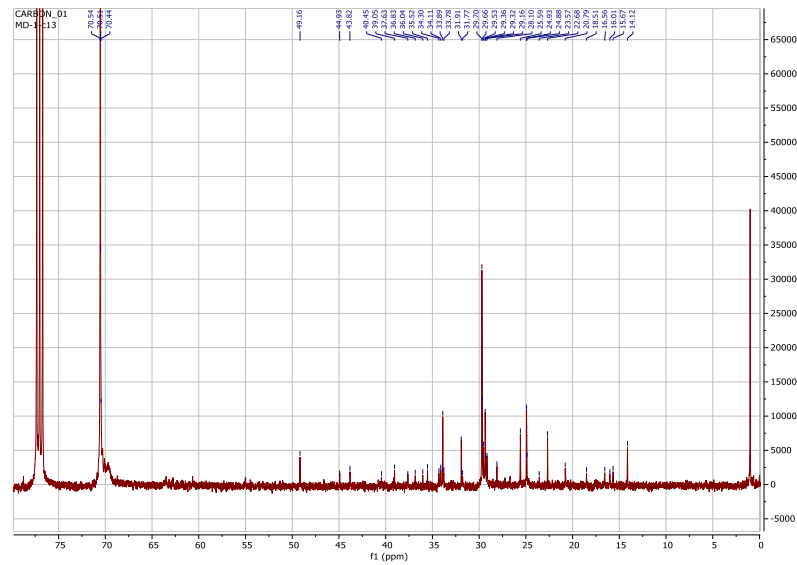
DSPE-PEG2000-GA konjugatının ¹H-NMR spektrumu Şekil 34’de, ¹³C-NMR spektrumu ise Şekil 35’de sunulmuştur. Şekil 34’de 0.75–1.5 ppm’de GA’in metil

grubuna ait yarılmalar gözlemlenmiştir. 1.254 ppmdeki pik DSPE PEG 2000 molekülündeki –NH grubuna atfedilirken, 3.64 ppmdeki yarılma ise DSPE PEG 2000 molekülündeki metilen grubuna atfedilebilir (Ye et al., 2019). Ayrıca 4.0 ppm deki yarılmalar ise sentezlenen konjugatın ester grubuna atfedilmektedir (Sousa, Gandini, Silvestre, & Neto, 2009).

C-13 NMR spektrumunda 25.59 ppm deki yarılmalar GA'in metil grubuna atfedilirken, 31.77 ppm deki şiddetli yarılma DSPE PEG 2000 molekülündeki etilen gruplarına atfedilebilir. Ayrıca 70.54 ppm deki şiddetli yarılma DSPE PEG 2000 molekülündeki C-N gruplarına atfedilebilir. GA'in hidroksil grubunun bağlı olduğu karbona ait yarılma ise 78.8 ppm'de görülmektedir (Y. Peng et al., 2019).



Şekil 34. DSPE-PEG 2000-GA konjugatının H-NMR spektrumu

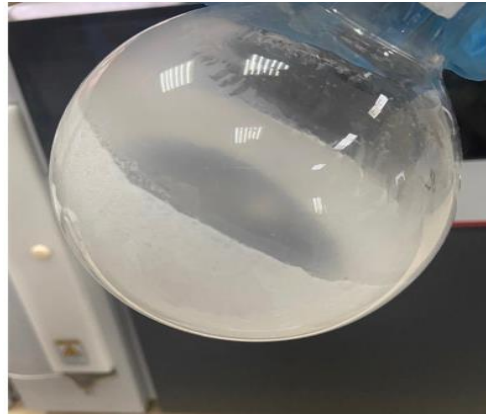


Şekil 35. DSPE-PEG 2000-GA konjugatının C-NMR spektrumu

4.2.2 Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesine ait Bulgular

Yöntem 3.2.2.2’de anlatıldığı üzere lipozomal ilaç taşıyıcı sistemler ince film hidrasyon ve pH gradient metodu ile Tablo 6’da verilen formülasyon terkipleri kullanılarak geliştirilmiştir. Organik çözücü olarak kullanılan Kloroform’un düşük basınç altında uzaklaştırılması sonrası oluşan film tabakası Şekil 36’de gösterilmiştir. Lipozomal ilaç taşıyıcı sistem formülasyonlarını pH gradient metodu ile gerçekleştirmek için öncelikle sitrik asit-sodyum sitrat/sodyum karbonat (F1) tamponu kullanılmıştır (Guoqin et al., 2010). Fakat bu tamponlama sisteminde Doks-HCl etkin maddesinde çökme gözlemlenmiştir. Çalışmalara sitrik asit-sodyum sitrat/HEPES tampon ikilisi ile devam edilmiştir (F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10).

Lipozom süspansiyonları (F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9 ve F10) mikrofluidisk cihazından on döngü geçirilmiş ve her döngü sonrası öncelikli olarak PB, PDI ve ZP değerleri ölçülmüş ve partikül boyutu küçültmede uygulanacak olan yöntem ve döngü sayıları optimize edilmiştir, sonuçlar Tablo 55’de verilmiştir. Ekstrüder cihazından geçirilen lipozomal süspansiyonların membranlardan geçişleri sonrası PB, PDI ve ZP değerleri ise Tablo 56’de verilmiştir. Formülasyonlara pH gradient metodu kullanılarak Doks-HCl etkin maddesinin yüklemesi sırasındaki görünümü Şekil 37’de gösterilmiştir. Etkin madde yüklenmesi sonrası formülasyonların in vitro karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve sonuçlar Tablo 57’de verilmiştir.



Şekil 36. Organik çözücü uzaklaştırıldıktan sonra film tabakası oluşumu



Şekil 37. Etkin madde yükleme aşamasından sonra Lipozom Formülasyonu

4.2.2.1 Lipozom Formülasyonu In Vitro Karakterizasyon Çalışmalarına ait Bulgular

4.2.2.1.1 Lipozom Formülasyonu Partikül Boyutu ve Polidispersite İndeksi Ölçümüne ait Bulgular

Yöntem 3.2.2.3.1’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Formülasyon geliştirilmesi sırasında partikül boyutu küçültme işlem ve döngü sayılarını optimize ederken bulunan sonuçlar Tablo 55 ve Tablo 56’de, lipozomal ilaç taşıyıcı sisteme Doks-HCl etkin maddesinin yüklemesi sonrası elde edilen sonuçlar ise Tablo 57’de verilmiştir.

4.2.2.1.2 Lipozom Formülasyonu Zetapotansiyel Değerinin Ölçümüne ait Bulgular

Yöntem 3.2.2.3.2’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Formülasyon geliştirilmesi sırasında partikül boyutu küçültme işlem ve döngü sayılarını optimize ederken bulunan sonuçlar Tablo 55 ve Tablo 56’da, lipozomal ilaç taşıyıcı sisteme Doks-HCl etkin maddesinin yüklemesi sonrası elde edilen sonuçlar ise Tablo 57’de verilmiştir.

4.2.2.1.3 Lipozom Formülasyonu pH Değerinin Saptanmasına ait Bulgular

Yöntem 3.2.2.3.3’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Formülasyonların pH değerlerine ait sonuçlar Tablo 57’de verilmiştir.

4.2.2.1.4 Lipozom Formülasyonu Viskozite Değerine ait Bulgular

Yöntem 3.2.2.3.4’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Formülasyonların viskozite değerlerine ait sonuçlar Tablo 57’de verilmiştir.

4.2.2.1.5 Lipozom Formülasyonu Enkapsülasyon Kapasitesi Ölçümüne ait Bulgular

Yöntem 3.2.2.3.5’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Formülasyonların enkapsülasyon kapasitesi ölçümüne ait sonuçlar Tablo 57’de verilmiştir.

4.2.2.1.6 Lipozom formülasyonu İlaç Yükleme Kapasitesine ait Bulgular

Yöntem 3.2.2.3.6’da anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Formülasyonların Doks-HCl miktar tayini ölçümüne ait sonuçlar Tablo 57’de verilmiştir.



Tablo 55. Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin mikrofluidisk sonrası PB, PDI, ZP sonuçları

Kod	Karakterizasyon	1.döngü	2.döngü	3.döngü	4.döngü	5.döngü	6.döngü	7.döngü	8.döngü	9.döngü	10.döngü
F2	P.B (nm)	1538	1487	1298	1203	1132	1003	989	983	996	1005
	PDI	0.99	0.97	0.96	0.85	0.79	0.60	0.59	0.58	0.60	0.68
	ZP (mV)	4.02	4.23	4.20	5.03	5.32	5.49	5.76	6.05	6.06	6.22
F3	P.B (nm)	1645	1574	1487	1398	1283	1109	998	967	990	1003
	PDI	0.98	0.99	0.87	0.84	0.81	0.74	0.64	0.51	0.54	0.57
	ZP (mV)	3.54	4.76	4.77	4.92	4.95	5.09	5.12	5.32	5.43	6.90
F4	P.B (nm)	1980	1909	1867	1656	1587	1435	1298	909	987	903
	PDI	0.94	0.95	0.84	0.80	0.71	0.70	0.60	0.61	0.72	0.79
	ZP (mV)	4.54	4.98	5.04	5.87	5.98	5.09	6.23	6.76	6.89	7.07
F5	P.B (nm)	1876	1734	1634	1589	1523	1345	1003	989	998	990
	PDI	0.97	0.96	0.88	0.83	0.81	0.73	0.71	0.67	0.72	0.77
	ZP (mV)	4.78	4.88	4.93	5.03	5.14	5.24	5.76	6.45	6.84	6.76
F6	P.B (nm)	1876	1734	1634	1589	1523	1345	1003	815	820	835
	PDI	0.97	0.96	0.88	0.83	0.81	0.73	0.71	0.67	0.72	0.77
	ZP (mV)	4.78	4.88	4.93	5.03	5.14	5.24	5.76	6.45	6.84	6.76
F7	P.B (nm)	1765	1723	1602	1509	1208	1003	984	823	910	998
	PDI	0.99	0.93	0.89	0.82	0.81	0.77	0.71	0.69	0.72	0.73
	ZP (mV)	3.23	3.45	4.02	4.09	5.03	5.09	6.04	6.09	6.79	7.03
F8	P.B (nm)	2003	1987	1884	1734	1504	1283	1098	827	867	898
	PDI	0.98	0.99	0.89	0.88	0.86	0.84	0.76	0.69	0.72	0.78
	ZP (mV)	2.54	2.98	3.04	3.87	4.98	5.09	5.23	5.76	5.89	6.07
F9	P.B (nm)	2012	2003	1982	1903	1893	1434	1008	823	842	900
	PDI	0.99	0.98	0.87	0.86	0.76	0.74	0.69	0.62	0.74	0.88
	ZP (mV)	3.23	2.43	3.23	3.42	3.65	4.76	4.87	5.76	5.09	6.09
F10	P.B (nm)	2010	1950	1843	1756	1300	1200	1043	834	842	943
	PDI	0.94	0.91	0.91	0.82	0.80	0.80	0.79	0.63	0.81	0.80
	ZP (mV)	1.23	1.25	2.45	3.48	3.49	5.37	5.39	6.04	6.19	7.14

Mikrofluidisk sonrası yapılan PB, PDI ve zeta potansiyeli sonuçları değerlendirildiğinde optimal döngü sayısının 8. Döngü olduğuna karar verilmiştir. Lipozomal süspansiyonlar

Ekstrüder ile 55 °C’de sırası ile 1000 µm, 800 µm, 400 µm, 200 µm ve 100 µm lik por çaplarındaki membranlardan geçirilmiştir (Guoqin et al., 2010). Partikül boyutları, PDI ve zetapotansiyel değerleri ölçülmüştür. Sonuçlar Tablo 56’da verilmiştir.



Tablo 56. Farklı por çaplarındaki polikarbonat filtre sonrası PB, PDI ve ZP sonuçları

Kod	Karakterizasyon	1000 μ M PC filtre	800 μ M PC filtre	400 μ M PC filtre	200 μ M PC filtre	100 μ M PC filtre (3 döngü sonrası)
F2	P.B (nm)	812	736	300	263	245
	PDI	0.54	0.43	0.42	0.41	0.33
	ZP (mV)	4.56	5.34	6.34	6.45	6.84
F3	P.B (nm)	910	812	412	276	232
	PDI	0.65	0.55	0.64	0.68	0.71
	ZP (mV)	5.34	6.34	6.87	7.45	7.98
F4	P.B (nm)	903	834	543	287	185
	PDI	0.54	0.52	0.48	0.33	0.43
	ZP (mV)	5.34	5.37	6.03	6.73	6.36
F5	P.B (nm)	910	832	428	276	133
	PDI	0.76	0.63	0.52	0.43	0.39
	ZP (mV)	4.63	4.55	5.03	6.05	7.23
F6	P.B (nm)	902	854	402	219	123
	PDI	0.83	0.73	0.69	0.52	0.49
	ZP (mV)	4.87	4.93	5.09	5.32	6.73
F7	P.B (nm)	934	832	439	209	118
	PDI	0.87	0.72	0.65	0.55	0.42
	ZP (mV)	4.89	5.87	5.95	6.93	6.98
F8	P.B (nm)	834	748	487	198	143
	PDI	0.73	0.68	0.53	0.58	0.49
	ZP (mV)	4.67	4.89	5.87	5.88	6.98
F9	P.B (nm)	898	734	634	202	129
	PDI	0.87	0.78	0.79	0.63	0.58
	ZP (mV)	5.98	5.89	6.01	6.03	7.43
F10	P.B (nm)	932	802	543	228	130
	PDI	0.76	0.89	0.69	0.55	0.49
	ZP (mV)	5.09	5.36	6.39	6.98	7.02

Tablo 57. Doks-HCl etkin maddesi yüklenmiş lipozom formülasyonları karakterizasyon çalışmalarına ait sonuçlar (n=3)

Karakterizasyon	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
PB (nm)	255±1.24	245±4.21	195±3.65	143±2.93	136±1.67	128±1.98	153±1.30	149±2.54	150±3.02
PDI	0.51±0.04	0.63±0.04	0.53±0.34	0.32±0.05	0.39±0.04	0.37±0.02	0.53±0.04	0.62±0.43	0.59±0.76
ZP (mV)	7.98±1.3	8.04±0.45	7.05±0.76	7.54±0.43	7.09±0.59	7.05±0.58	6.98±0.49	7.54±0.63	7.05±0.49
pH	5.91±0.03	5.92±0.01	5.90±0.12	5.89±0.15	5.90±0.23	5.91±0.14	5.89±0.45	5.89±0.23	5.90±0.14
Viskozite	14.92±0.92	15.04±0.23	15.03±0.37	14.86±0.49	14.91±0.54	14.88±0.64	14.79±0.73	15.09±0.84	15.05±0.43
Enkapsülasyon Kapasitesi (%)	69.04±1.23	71.04±0.32	77.45±0.39	89.98±0.47	88.89±0.57	90.32±0.87	87.32±0.62	85.34±0.34	80.45±0.59
İlaç yükleme Kapasitesi (%)	100.02±0.89	99.04±0.79	98.98±0.94	100.03±0.96	99.08±0.95	100.0±0.86	100.23±0.76	100.08±0.86	99.90±0.93

Karakterizasyon çalışmaları yapılan Lipozomal ilaç taşıyıcı sistem formülasyonlarından F5, F6 ve F7 formülasyonları ile prolipozomal ilaç taşıyıcı sistem formülasyon geliştirme çalışmalarına geçilmiştir.

4.2.3 Prolipozomal İlaç Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesine ait Bulgular

Yöntem 3.2.2.4’de anlatıldığı üzere in vitro karakterizasyon çalışmalarında optimal sonuçlar veren F5, F6 ve F7 lipozom formülasyonlarının farklı miktarlarda mannitol kullanılarak liyofilize edilmesi ile geliştirilen aktif hedefli pegile prolipozomal ilaç taşıyıcı sistemlere ait terkipler Tablo 7’de verilmiştir. Geliştirilen prolipozom formülasyonlarına ait görseller ise Şekil 38, Şekil 39 ve Şekil 40’da verilmiştir. Aktif hedefli pegile F5-1, F5-2, F5-3, F6-1, F6-2, F6-3, F7-1, F7-2, F7-3 ve F7-4 prolipozom formülasyonlarının in vitro karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 38. Aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonlarının liyofilizasyon aşamasındaki görüntüsü



Şekil 39. Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun görselleri



Şekil 40. Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun partiküler yapısının görseli

4.2.3.1 Prolipozom Formülasyonu In Vitro Karakterizasyon Çalışmalarına ait Bulgular

4.2.3.1.1 Prolipozom Formülasyonu Partikül Boyutu ve Polidispersite İndeksi Ölçümüne ait Bulgular

Yöntem 3.2.2.5.1’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Prolipozom formülasyonlarının partikül boyutu ve PDI ölçümlerine ait sonuçlar Tablo 58’de verilmiştir.

4.2.3.1.2 Prolipozom Formülasyonu Zeta Potansiyel Değerlerinin Ölçümüne ait Bulgular

Yöntem 3.2.2.5.2’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Prolipozom formülasyonlarının zeta potansiyel değerlerine ait sonuçlar Tablo 58’de verilmiştir.

4.2.3.1.3 Prolipozom Formülasyonunun pH Değerinin Saptanmasına ait Bulgular

Yöntem 3.2.2.5.3’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Prolipozom formülasyonlarının pH değerlerine ait sonuçlar Tablo 58’de verilmiştir.

4.2.3.1.4 Prolipozom Formülasyonunun Viskozite Değerinin Ölçümüne ait Bulgular

Yöntem 3.2.2.5.4’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Prolipozom formülasyonlarının Viskozite değerlerine ait sonuçlar Tablo 58’de verilmiştir.

4.2.3.1.5 Prolipozom Formülasyonu Enkapsülasyon Kapasitesi Ölçümüne ait Bulgular

Yöntem 3.2.2.5.5’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Prolipozom formülasyonlarının Enkapsülasyon kapasitesi değerlerine ait sonuçlar Tablo 58’de verilmiştir. Enkapsülasyon kapasitesinin ölçümü için santrifüj sonrası Amicon Ultra santrifüj tüpünün görünümü Şekil 41’de verilmiştir.



Şekil 41. Enkapsülasyon Kapasitesi Ölçümü için Santrifüj Sonrası Görünüm

4.2.3.1.6 Prolipozom Formülasyonu İlaç Yükleme Kapasitesine ait Bulgular

Yöntem 3.2.2.5.6’da verildiği şekilde çalışılmıştır. Prolipozom formülasyonlarının etkin madde miktar tayinine ait sonuçlar Tablo 58’de verilmiştir.

4.2.3.1.7 Prolipozom Formülasyonu Yeniden Dağılılabilme Zamanına ait Bulgular

Yöntem 3.2.2.5.7’de verildiği şekilde çalışılmıştır. Prolipozom formülasyonlarının yeniden dağılılabilme zamanına ait sonuçlar Tablo 58’de verilmiştir. %5’lik Dekstroz çözeltisinde disperse edilen F7-3 prolipozom formülasyonuna ait görsel Şekil 42’de verilmiştir.



Şekil 42. %5’lik Dekstroz Çözeltisinde Disperse Edilen Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Görünümü

4.2.3.1.8 Prolipozom Formülasyonu Nem Miktarına ait Bulgular

Yöntem 3.2.2.5.8’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Prolipozom formülasyonlarının nem miktarlarına ait sonuçlar Tablo 58’de verilmiştir. Optimal prolipozom formülasyon sonuçlarını veren aktif hedefli pegile F7-3 formülasyonunun Karl Fisher nem miktarı ölçümüne ait örnek cihaz çıktısı ise Şekil 43’de verilmiştir.

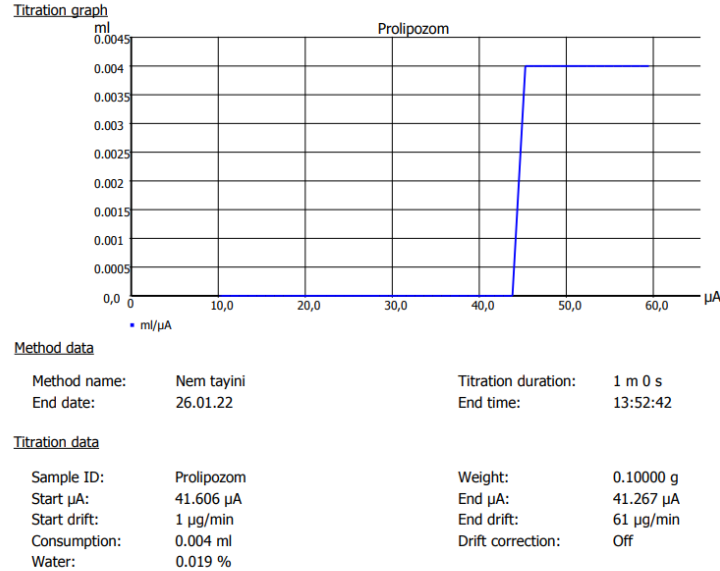
Tablo 58. Prolipozom Formülasyonlarına ait In Vitro Karakterizasyon Çalışması Bulguları

	F5-1	F5-2	F5-3	F6-1	F6-2	F6-3	F7-1	F7-2	F7-3	F7-4
PB (nm)	154 ±2.5	163±3.2	153±2.4	129±2.6	128±1.9	126±1.3	124±0.9	122±1.4	120±1.5	132±1.8
PDI	0.67±0.2	0.56±0.4	0.53±0.5	0.57±0.3	0.45±0.9	0.42±1.1	0.41±1.4	0.42±1.2	0.36±1.8	0.47±1.4
ZP (mV)	9.58±1.4	9.67±1.5	8.56±1.8	8.79±1.4	9.54±1.6	9.49±1.7	9.40±0.9	9.53±0.7	9.57±0.5	9.98±1.7
pH	6.61±0.3	6.63±0.4	6.65±0.8	6.13±0.5	6.24±0.9	6.45±1.4	6.63±1.5	6.53±1.3	6.50±1.5	6.56±1.5
Viskozite (cP)	10.4±0.5	11.3±1.7	12.6±1.3	10.7±1.9	11.8±1.8	12.4±1.8	11.3±1.4	12.5±1.6	11.3±1.3	17.8±1.8
Enkapsülasyon Kapasitesi (%)	88.3±1.4	89.1±1.3	85.4±0.4	84.7±0.5	83.9±1.3	80.3±0.4	89.6±0.8	89.9±0.9	90.0±0.5	85.6±0.9
İlaç yükleme kapasitesi (%)	100.2±0.02	100.1±0.3	100.3±0.2	99.9±0.3	99.8±0.1	100.2±0.6	100.1±0.6	100.0±0.9	100.0±0.3	99.9±0.9
Yeniden Dağılılabilme Zamanı (sn)	12.4±1.3	12.6±2.1	11.9±1.5	14.2±1.3	14.8±1.4	10.9±1.5	13.5±1.1	14.3±1.2	10.0±0.4	16.2±1.6
Nem miktarı (%)	0.347±0.02	0.436±0.3	0.142±0.6	0.687±0.01	0.765±0.02	0.053±0.03	0.536±0.04	0.234±0.04	0.019±0.01	0.025±0.04

SI Analytics GmbH
Hattenbergstraße 10
55122 Mainz
Germany

SI Analytics

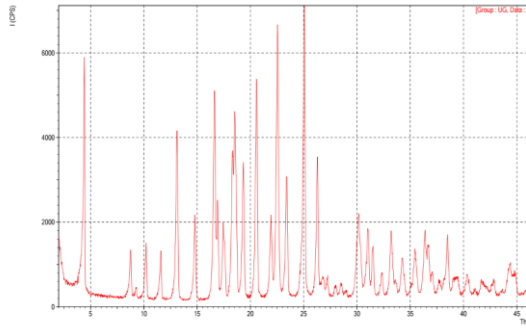
GLP documentation



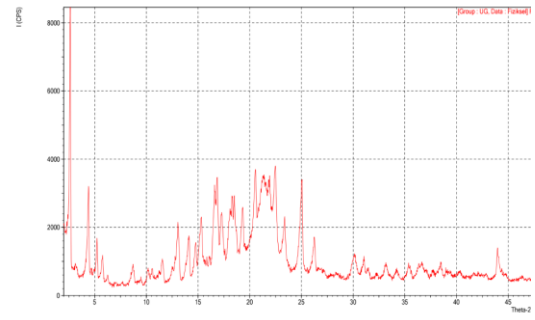
Şekil 43. F7-3 Prolipozom Formülasyonu Nem Miktarı Ölçümü Karl Fisher Cihazı Çıktısı Örneği

4.2.3.1.9 Prolipozom Formülasyonu X-Işını Kırınım Tayini Bulguları

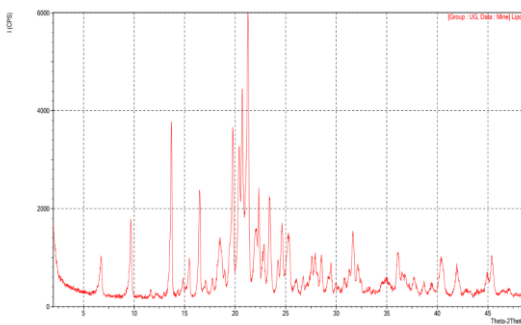
Yöntem 3.2.2.5.9’da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Doks-HCl etkin maddesi 20.5463° de kesin yansımali karakteristik pik göstermiştir. Benzer keskin yansımali pikler aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunda 20.6783° de, fiziksel karışımında ise 20.6199° de gözlenmiştir. Ayrıca fiziksel karışımında ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunda bulunan ikincil yüksek intensiteli 21.2242° de ki pik Mannitol yardımcı maddesine aittir (Şekil 44). Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun kristalinite yüzdesi hesabı XRD cihaz programı yardımıyla hesaplatılmış ve formülasyonda bulunan Doks-HCl’ün %89.51 oranında kristal özelliğini koruduğu gösterilmiştir (Şekil 44 -d).



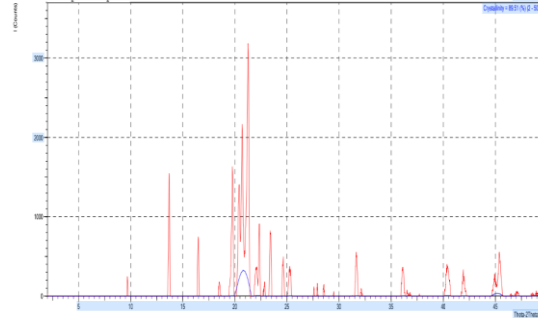
a. Doks-HCl XRD analizi



b. F7-3 Formülasyonu Fiziksel Karışım XRD analizi



c. Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu XRD analizi

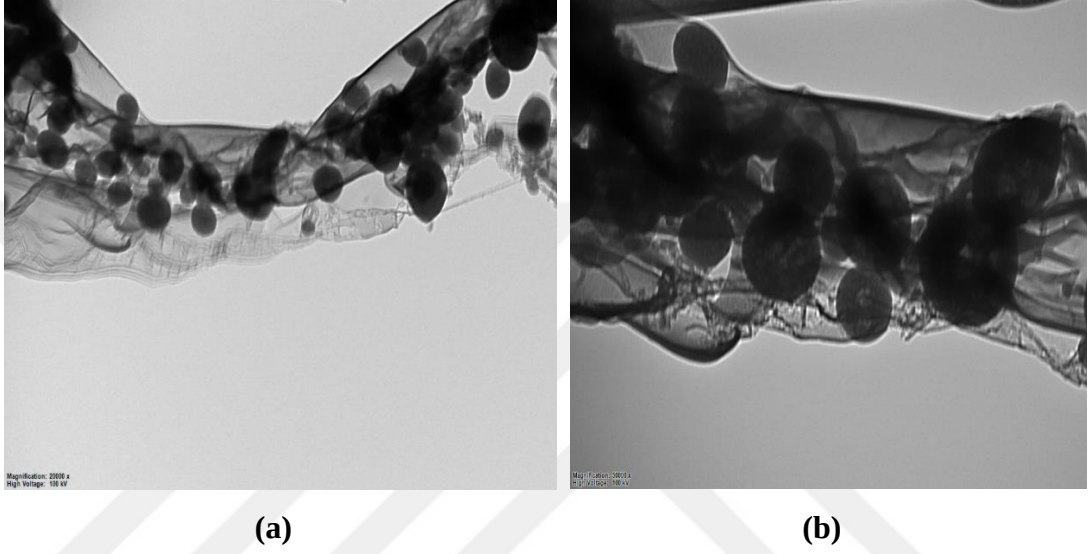


d. Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu XRD kristalogramı

Şekil 44. XRD Analiz Bulguları

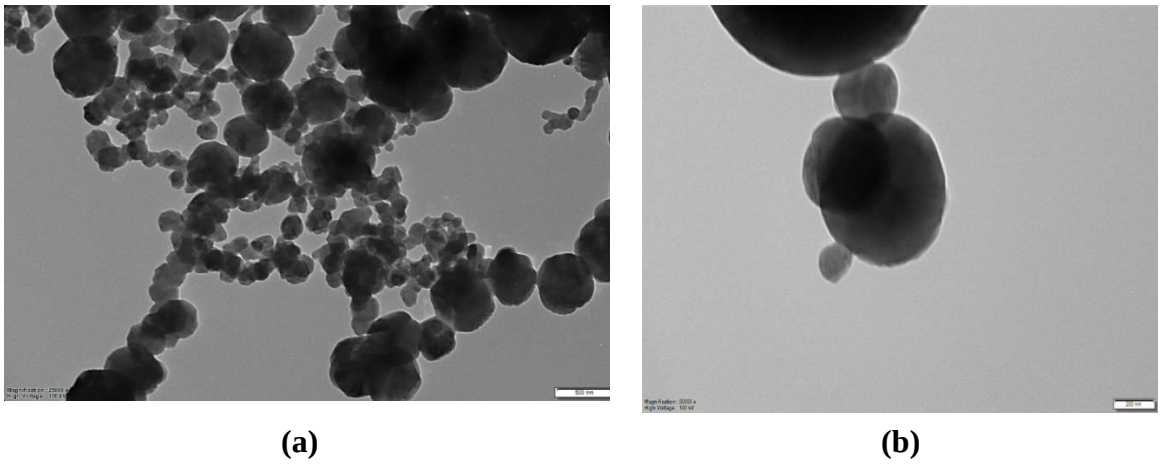
4.2.4 Lipozom ve Prolipozom Formülasyonlarının Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi

Yöntem 3.2.3’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Aktif hedefli F7 lipozom formülasyonuna ait KryoTEM görüntüsünün 5000 nm ve 200 nm skala ölçümlerine ait görseller Şekil 45’de; Aktif hedefli F7-3 prolipozom formülasyonuna ait KryoTEM görüntüsünün 5000 nm ve 200 nm skala ölçümlerine ait görseller Şekil 46’da verilmiştir.



Şekil 45. Aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonuna ait KryoTEM görüntüsü.

(a) skala 5000 nm, (b) skala 200 nm

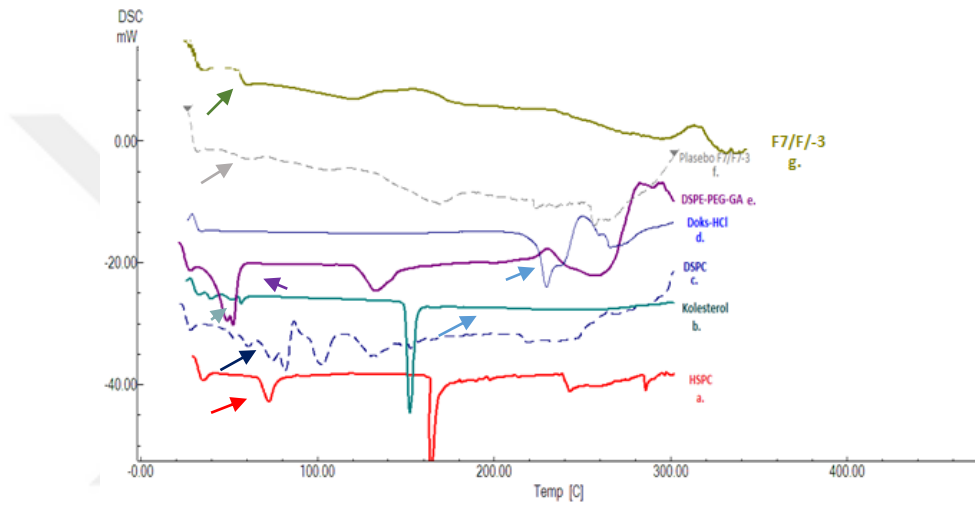


Şekil 46. Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonuna ait KryoTEM

görüntüsü. (a) skala 5000 nm, (b) skala 200 nm

4.2.5 Lipozom ve Prolipozom Formülasyonlarının Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analizleri

Yöntem 3.2.4’de anlatıldığı gibi çalışılmıştır. DSC analizleri sonucu; HSPC, Kolesterol, DSPC, DSPE-PEG 2000, plasebo aktif hedefli pegile F7/F7-3 ve aktif hedefli pegile F7/F7-3’e ait T_g değerleri sırası ile 62.85 °C, 56.61°C, 46.56 °C, 51.90, 49.95 °C, 49.95 °C bulunmuştur. Doks-HCl etkin maddesi için ise 229.50 °C’de bir erime piki gözlenmiştir. DSC termogramları Şekil 47’de verilmiştir.



Şekil 47. DSC analizi sonuçları

a. HSPC DSC Termogramı, **b.** Kolesterol DSC Termogramı, **c.** DSPC DSC Termogramı, **d.** Doks-HCl Termogramı, **e.** DSPE-PEG 2000-GA DSC Termogramı, **f.** Plasebo aktif hedefli pegile F7/F7-3 DSC Termogramı, **g.** Aktif hedefli pegile F7/F7-3 DSC Termogramı

4.2.6 Lipozom ve Prolipozom Formülasyonunun Osmolarite Analizlerine ait Bulgular

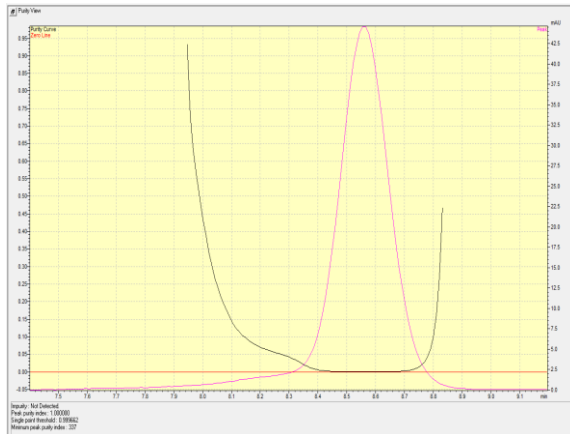
Yöntem 3.2.5’de anlatıldığı şekilde çalışılarak aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun osmolarite değerleri saptanmıştır. Yapılan analiz sonucu aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu osmolarite değeri 310 mOsm/L bulunurken, %5’lik desktoz çözeltisi içerisinde 2 mg/mL Doks-HCl bulunacak şekilde disperse edilmiş aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun osmolarite değeri 252 mOsm/L bulunmuştur.

4.2.7 Lipozom ve Prolipozom Formülasyonunda Doks-HCl'ün Bitmiş Ürün Analitik Validasyonuna ait Bulgular

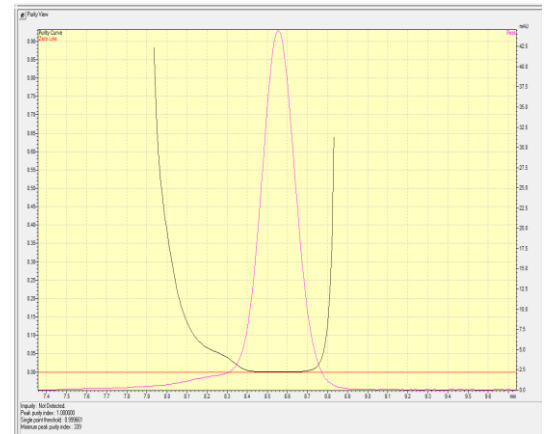
Yöntem 3.2.6'da anlatıldığı gibi, bitmiş ürün olan aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun ekstraksiyon yöntemi optimize edildikten sonra MF çözücü ortamı optimal çözücü olarak belirlenmiş bitmiş ürün validasyonu yapılmıştır. MF'in çözücü olarak kullanılması ile doğrusallık, çalışma aralığı, duyarlılık ve saptama sınırı gibi standart için gerçekleştirilmiş parametreler dışında kalan özgünlük ve seçicilik, doğruluk, kesinlik (sistem kesinliği, tekrarlanabilirlik, laboratuvar içi kesinlik), dayanıklılık, sistem uygunluğu ve çözelti stabilitesi parametreleri gerçekleştirilerek validasyonları yapılmıştır.

4.2.7.1 Özgünlük ve Seçicilik Parametresine ait Bulgular

Yöntem 3.2.6.3'de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Enjekte edilen MF (çözücü), Doks-HCl standart çözelti, plasebo aktif hedefli pegile F7 lipozom ve plasebo aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom numune çözeltileri, aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom numune çözeltilerinin enjeksiyon sonrası HPLC kromatogramları incelenmiştir ve pik saflığı değerlendirilmiştir (Şekil 48). Enjeksiyonlardan elde edilen HPLC kromatogramları Şekil 49'da verilmiştir. Metot seçiciliğinde önemli değerlendirme parametrelerinden biri olan etkin madde pikinin altında herhangi bir girişim olup olmadığının kanıtı olan enjeksiyonların HPLC kromatogramlarının üst üste çakıştırılmış görselleri ise Şekil 50 ve Şekil 51'de verilmiştir.

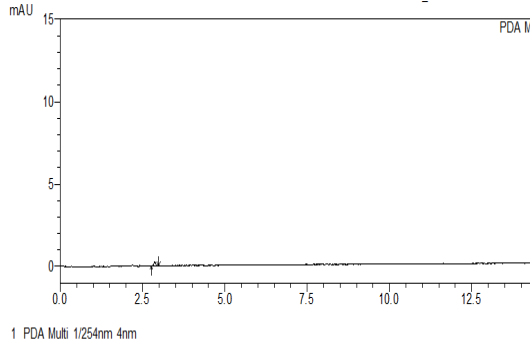


a. Aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyon çözeltisi pik saflığı

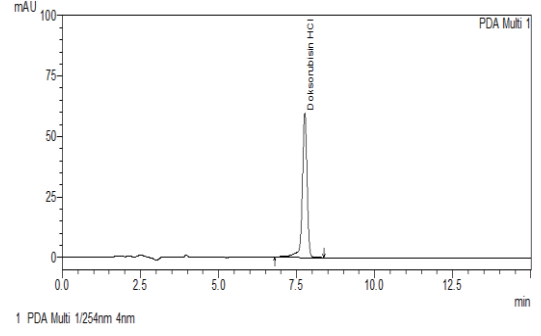


b. Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyon çözeltisi pik saflığı

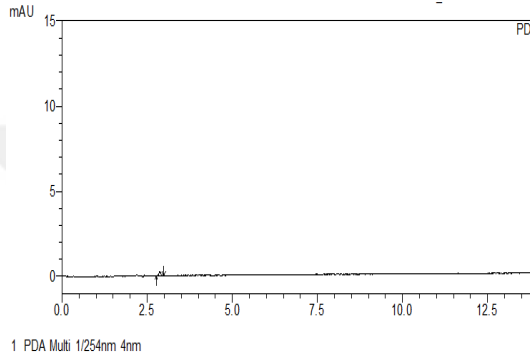
Şekil 48. Aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyon çözeltilerine ait pik saflığı kromatogram verileri



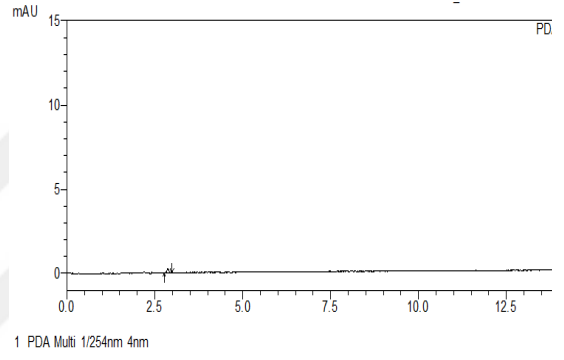
MF enjeksiyonunun HPLC
kromatogramı



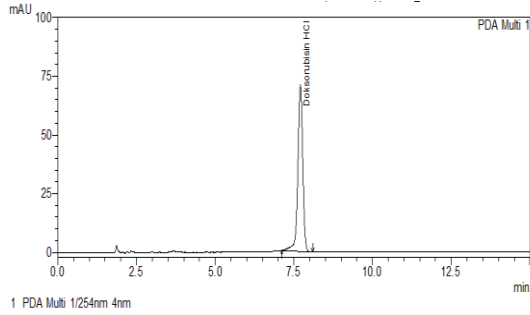
MF ile hazırlanmış Doks-HCl standart
kromatogramı



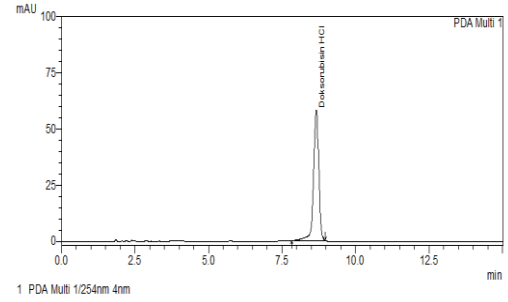
Aktif hedefli pegile F7 lipozom
plasebo numune çözeltisi
kromatogramı



Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom
plasebo numune çözeltisi kromatogramı

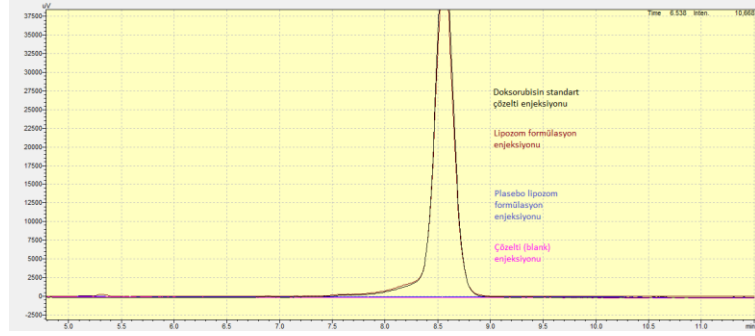


Aktif hedefli pegile F7 lipozom
formülasyon numune çözeltisi
kromatogramı

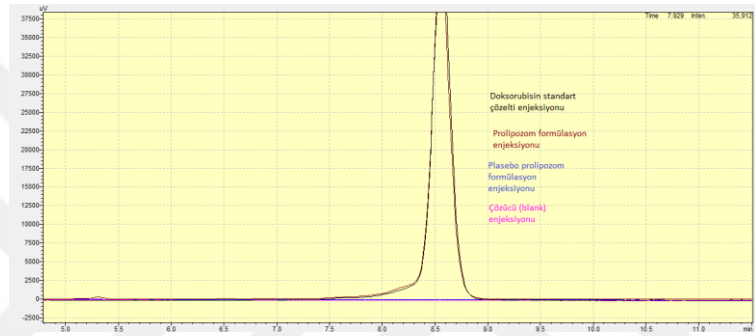


Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom
formülasyonu numune çözeltisi
kromatogramı

Şekil 49. Özgünlük ve Seçicilik Parametresine ait HPLC Kromatogramları



Şekil 50. MF, Doks-HCl standart çözeltisi, plasebo aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu numune çözeltisi, aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu numune çözeltisi karşılaştırılmış HPLC kromatogramı



Şekil 51. MF, Doks-HCl standart çözeltisi, plasebo aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu numune çözeltisi, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu numune çözeltisi karşılaştırılmış HPLC kromatogramı

4.2.7.2 Doğruluk Parametresine ait Bulgular

Yöntem 3.2.6.4.'de anlatıldığı şekilde %80, %100 ve %120 seviyelerinde aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyon numuneleri, her seviye için 3'er toplam da 9 adet olmak üzere hazırlanmıştır. Her seviye için geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 59 ve Tablo 60'da verilmiştir.

Tablo 59. Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Formülasyonu Doks-HCl Doğruluk Sonuçları

% Seviye	Tartım miktarları (mg)	Teorik Konsantrasyon (mg/mL)	Deneyisel Konsantrasyon (mg/mL)	Geri kazanım (%)	Ortalama (%)	RSS (%)
80	0.40	0.040	0.0401	100.2	99.1	1.0
	0.41	0.041	0.0403	98.2		
	0.42	0.042	0.0416	99.0		
100	0.50	0.050	0.0498	99.6	98.8	0.7
	0.50	0.050	0.0494	98.6		
	0.51	0.051	0.0502	98.3		
120	0.62	0.062	0.0620	99.8	100.5	1.1
	0.61	0.061	0.0621	101.8		
	0.60	0.060	0.0599	99.9		

Tablo 60. Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Doks-HCl Doğruluk Sonuçları

% Seviye	Tartım miktarları (mg)	Teorik Konsantrasyon (mg/mL)	Deneyisel Konsantrasyon (mg/mL)	Geri kazanım (%)	Ortalama (%)	RSS (%)
80	0.41	0.0410	0.0416	101.4	100.3	1.9
	0.41	0.0410	0.0410	98.2		
	0.42	0.0420	0.0420	101.4		
100	0.51	0.0510	0.0501	99.9	100.7	0.7
	0.50	0.0500	0.0505	101.1		
	0.51	0.0510	0.0506	101.2		
120	0.62	0.0620	0.0629	100.0	99.6	0.5
	0.60	0.0600	0.0607	99.1		
	0.61	0.0610	0.0608	99.6		

4.2.7.3 Kesinlik Parametresine ait Bulgular

4.2.7.3.1 Sistem Kesinliği Parametresine ait Bulgular

Yöntem 3.2.6.4.1’de anlatıldığı şekilde standart enjeksiyonu sonucu bulunan değerler Tablo 61’de verilmiştir.

Tablo 61. Doks-HCl standart çözeltisinin sistem kesinliği sonuçları

	Alan	Alınma Zamanı (dk)
1	612343	8.41
2	613452	8.42
3	612843	8.43
4	614129	8.42
5	613828	8.42
6	614103	8.42
ORT	613449.7	8.42
SS	724.5	0.004
% RSS	1.0	0.053

4.2.7.3.2 Tekrarlanabilirlik Parametresine ait Bulgular

Yöntem 3.2.6.4.2’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonuna ait tekrarlanabilirlik bulguları Tablo 62’de, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonuna ait tekrarlanabilirlik bulguları ise Tablo 63’de verilmiştir.

Tablo 62. Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Formülasyonu Numune Çözeltisi Tekrarlanabilirlik Sonuçları

Örnek	Tartımlar (g)	Derişimler (mg/mL)	Alan değerleri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.	0.255	0.051	622539	99.5	99.5
1.			622376	99.5	
2.	0.255	0.051	620973	99.2	99.2
2.			620283	99.1	
3.	0.260	0.052	633126	99.2	99.7
3.			638723	100.1	
4.	0.260	0.050	619382	101.0	101.0
4.			619452	101.0	
5.	0.255	0.051	632938	101.2	101.2
5.			632983	101.2	
6.	0.260	0.052	649834	101.9	101.8
6.			649234	101.8	
ORT	100.4				
SS	1.1				
RSS	1.1				
CI±	100.4±1.12				

Tablo 63. Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Numune Çözeltisi Tekrarlanabilirlik Sonuçları

Örnek	Tartımlar (g)	Derişimler (mg/mL)	Alan değerleri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.	0.0645	0.051	623452	101.0	101.1
1.			624572	101.2	
2.	0.0640	0.050	615872	100.6	100.4
2.			614387	100.3	
3.	0.0640	0.050	619832	101.2	101.1
3.			618729	101.0	
4.	0.0645	0.051	620192	100.5	100.5
4.			620235	100.5	
5.	0.0645	0.051	626732	101.5	101.5
5.			626570	101.5	
6.	0.0640	0.050	619834	101.2	101.1
6.			618848	101.0	
ORT	101.0				
SS	0.4				
RSS	0.42				
CI±	101.0±0.44				

4.2.7.3.3 Laboratuvarıci Kesinlik Parametresine ait Bulgular

Yöntem 3.2.6.4.3’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Hem aktif hedefli pegile F7 lipoozom formülasyonu numune çözeltisi, hem de aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu numune çözeltisinin 6’şar adet enjeksiyonu sonrası elde edilen

sonuçların birbirlerine yakınlık derecesi değerlendirilmiştir (Tablo 64, Tablo 65, Tablo 66, Tablo 67).

Tablo 64. Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Formülasyonu Numune Çözeltisi Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-1

Örnek	Tartımlar (g)	Derişimler (mg/mL)	Alan değerleri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.	0.250	0.05	602635	99.3	99.7
1.			607349	100.1	
2.	0.255	0.051	612533	99.0	99.2
2.			614537	99.3	
3.	0.250	0.051	613749	101.2	101.2
3.			614235	101.3	
4.	0.256	0.051	618374	98.0	98.0
4.			618674	98.1	
5.	0.256	0.052	624358	99.0	99.1
5.			625487	99.1	
6.	0.250	0.050	608354	100.3	100.3
6.			608352	100.3	
ORT					99.6
SS					1.1
RSS					1.1
CI±					99.6±1.63

Tablo 65. Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Formülasyonu Numune Çözeltisi Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-2

Test No	Cihaz I / Gün I	Cihaz II /Gün II
1	99.5	99.7
2	99.2	99.2
3	99.7	101.2
4	101.0	98.0
5	101.2	99.
6	101.8	100.3
ORT	100.4	99.6
	100.0	
SS	1.1	1.1
% RSS	1.1	1.1
CI	100.4±1.6	99.6±1.6
% Fark	0.8	

Tablo 66. Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Numune Çözeltilisi Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-1

Örnek	Tartımlar (mg)	Derişimler (mg/mL)	Alan değerleri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.	0.0645	0.050	602635	98.7	99.1
1.			607349	99.5	
2.	0.0640	0.051	612533	101.1	101.3
2.			614537	101.5	
3.	0.0645	0.051	613749	100.5	100.6
3.			614235	100.6	
4.	0.0645	0.051	618374	101.3	101.3
4.			618674	101.4	
5.	0.0640	0.050	602394	99.5	99.5
5.			603284	99.6	
6.	0.0640	0.050	608354	100.4	100.4
6.			608352	100.4	
ORT	100.4				
SS	0.9				
RSS	0.9				
CI±	100.4±1.35				

Tablo 67. Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Numune Çözeltilisi Miktar Tayini Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-2

Test No	Analist I / Cihaz I / Gün I	Analist II / Cihaz II /Gün II
1	101.1	99.1
2	100.4	101.3
3	101.1	100.6
4	100.5	101.3
5	101.5	99.5
6	101.1	100.4
Ortalama	101.0	100.4
	100.7	
SS	0.80	0.9
% RSS	0.81	0.9
CI	101.0±0.44	100.4±0.95
% Fark	0.6	

4.2.7.4 Dayanıklılık Parametresine ait Bulgular

Standart ve numune çözeltileri Yöntem 3.2.6.5’de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Çalışma sonunda % miktar, %RSS, % fark, alıkonma zamanı (RT), kuyruklanma faktörü ve teorik plaka sayıları kaydedilmiştir. Kullanılan standart ve numunlerin

tartım bilgileri Tablo 68’de, dayanıklılık çalışması sonucu bulunan değerlerin verileri ise Tablo 69 ve Tablo 70’de verilmiştir.

Tablo 68. Dayanıklılık çalışmasında kullanılan standart ve numunelerin tartım verileri

Doks-HCl Standart tartım (mg)	20.000
Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Numune-1 Tartım (g)	0.2550
Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Numune-2 Tartım (g)	0.2560
Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Numune-1 Tartım (g)	0.0640
Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Numune-2 Tartım (g)	0.0645

Tablo 69. Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Formülasyonu Numune Çözeltisi Dayanıklılık Parametresine ait Bulgular

Parametre	% Miktar	%RSS	% Fark	Rt	Kuyruklanma Faktörü	Plaka Sayısı
Normal çalışma koşulları	99.7	1.5	-	8.2	1.1	16459
Akış hızı 0.9 mL/dk	99.1	0.4	0.6	8.4	1.2	16229
Akış hızı 1.1 mL/dk	99.2	1.5	0.5	8.1	1.0	15322
Kolon Sıcaklığı 20°C	98.8	1.4	0.9	8.3	1.2	16521
Kolon Sıcaklığı 30°C	98.6	0.8	1.2	8.1	1.1	16673
Tampon pH 2.3	98.3	0.4	1.5	7.9	1.0	14599
Tampon pH 2.7	99.4	0.2	0.3	8.2	1.2	15340

Tablo 70. Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Numune Çözeltisi Dayanıklılık Parametresine ait Bulgular

Parametre	% Miktar	%RSS	% Fark	Rt	Kuyruklanma Faktörü	Plaka Sayısı
Normal çalışma koşulları	101.4	0.5	-	8.2	1.1	16459
Akış hızı 0.9 mL/dk	101.2	0.5	0.2	8.4	1.2	16229
Akış hızı 1.1 mL/dk	101.1	0.4	0.1	8.1	1.0	15322
Kolon Sıcaklığı 20°C	100.1	0.6	0.9	8.3	1.2	16521
Kolon Sıcaklığı 30°C	101.3	0.2	0.3	8.1	1.1	16673
Tampon pH 2.3	100.6	1.1	0.4	7.9	1.0	14599
Tampon pH 2.7	99.7	0.4	1.4	8.2	1.2	15340

4.2.7.5 Çözelti Stabilitesi Parametresine ait Bulgular

Yöntem 3.2.6.6'da anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Doks-HCl standart çözeltisi, aktif hedefli pegile F7 lipozom numune çözeltisi ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom numune çözeltisinin 48 saat boyunca alan değerleri gözlenmiş ve %Fark hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 71'de verilmiştir.

Tablo 71. Doks- HCl, Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Formülasyonu Numune Çözeltisi ve Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Numune Çözelti Stabilitesi Sonuçları

	Doks-HCl- Alan	Doks-HCl-% Fark	Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom- Alan	Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom-% Fark	Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom- Alan	Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom-% Fark
Başlangıç zamanı	612734	0.0	623547	0.0	635243	0.0
2. saat	617384	0.8	623543	0.0	638763	0.6
4. saat	609824	0.5	634762	1.8	629382	1.0
6. saat	609823	0.5	634653	1.8	638723	0.6
8. saat	612374	0.1	634762	1.8	639826	0.7
12. saat	612736	0.0	623764	0.0	638475	0.5
18. saat	608273	0.7	627634	0.7	639837	0.7
24. saat	608723	0.7	628742	0.8	623483	1.9
36. saat	609823	0.5	623726	0.0	628374	1.1
48. saat	609823	0.5	634762	1.8	628374	1.1

4.2.7.6 Sistem Uygunluk Parametresine ait Bulgular

Yöntem 3.2.6.7’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Sistem uygunluk sonuçları Tablo 72’de verilmiştir.

Tablo 72. Sistem uygunluk verileri

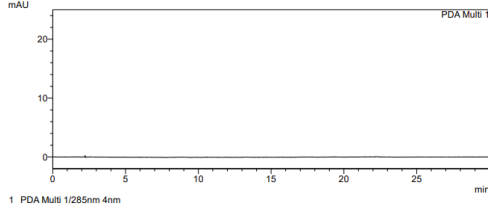
Enjeksiyon No	Alan	Rt	Kuyruklanma Faktörü	Teorik Plaka
1	24984	8.31	1.0	16539
2	24985	8.32	1.1	16535
3	24986	8.32	1.0	16537
4	24986	8.31	1.1	16540
5	24983	8.32	1.1	16539
6	24984	8.31	1.0	16538
Ortalama	24984.67	8.32	1.05	16538
SS	1.21	0.01	0.05	1.79
% RSS	0.005	0.07	5.22	0.01

4.2.8 Lipozom ve Prolipozom Formülasyonunda Vitamin E Asetat’ın Bitmiş Ürün Analitik Validasyonu Bulguları

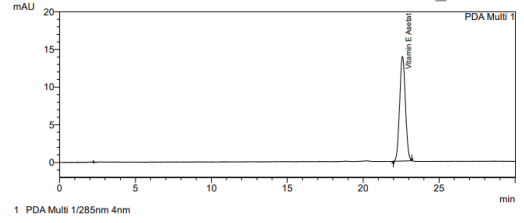
Geliştirilen Lipozomal ve Prolipozomal ilaç taşıyıcı sistem formülasyonları terkinde bulunan koruyucu madde Vit E Asetat’ın HPLC validasyonu Yöntem 3.2.7’de verildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

4.2.8.1 Özgünlük ve Seçicilik Parametresine ait Bulgular

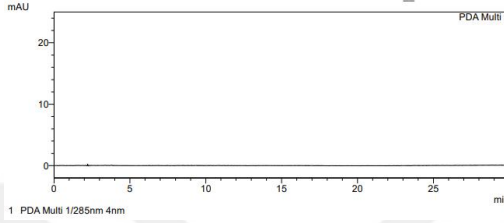
Yöntem 3.2.7.3’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Enjekte edilen; çözücü, Vit E Asetat standart çözeltisi, plasebo aktif hedefli pegile F7 lipozom ve plasebo aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu numune çözeltileri, aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu numune çözeltilerine ait kromatogramlar değerlendirilmiştir. HPLC kromatogramları Şekil 52’de verilmiştir.



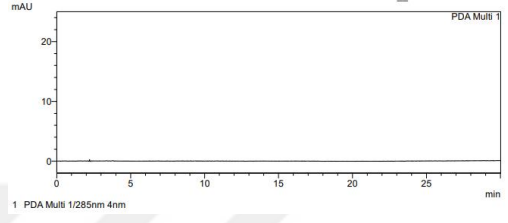
Çözücüye ait HPLC Kromatogramı



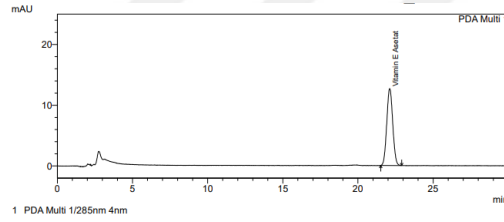
Vit E Asetat Standart Çözeltisine ait
HPLC Kromatogramı



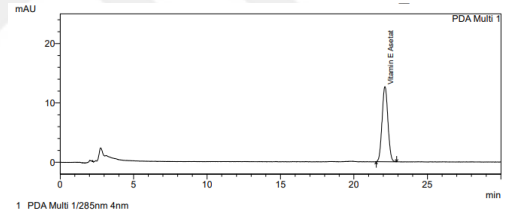
Plasebo Aktif Hedefli Pegile F7
Lipozom Formülasyonu Numune
Çözeltisine ait HPLC Kromatogramı



Plasebo Aktif Hedefli Pegile F7-3
Prolipozom Formülasyonu Numune
Çözeltisine ait HPLC Kromatogramı



Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom
Formülasyonu Numune Çözeltisine ait
HPLC Kromatogramı



Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom
Formülasyonu Numune Çözeltisine ait
HPLC Kromatogramı

Şekil 52. Vit E Asetat Özgünlük ve Seçicilik Parametresine ait HPLC
Kromatogramları

4.2.8.2 Çalışma Aralığı ve Doğrusallık Parametresine ait Bulgular

Yöntem 3.2.7.4’de anlatıldığı gibi çalışılmıştır. Çalışma aralığı parametresi için Vit E Asetat standart çözeltisinin %20 ve %140 konsantrasyonlarında altışar enjeksiyonu yapılmış bu alanlar arasındaki RSS değerleri sırası Tablo 73’de verilmiştir.

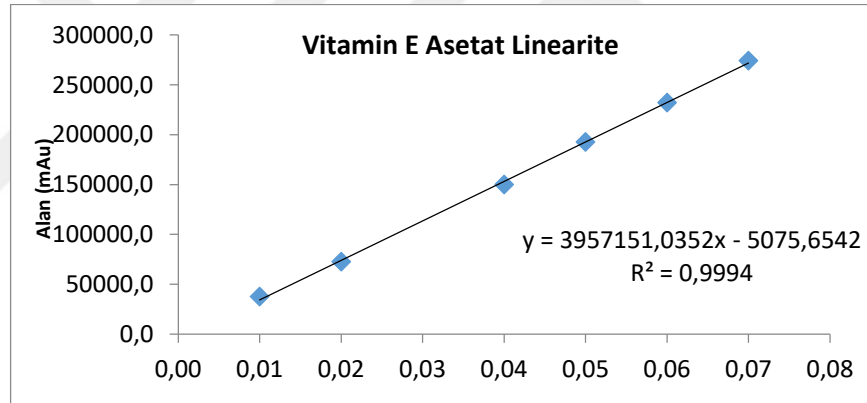
Doğrusallık parametresi için ise %20 ile %140 arasında değişen 6 farklı konsantrasyondaki Standart Çözeltilerinin 3’er enjeksiyonu sonucu alanlar ortalaması ile kalibrasyon eğrisi çizilip korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Bulunan değerler Tablo 74’de, doğrusallık parametresine ait kalibrasyon grafiği ise Şekil 53’de verilmiştir.

Tablo 73. Vit E Asetat Çalışma Aralığı Sonuçları

	%20 (0.01 mg/mL)	%140 (0.07 mg/mL)
1.enjeksiyon	37513	274879
2.enjeksiyon	37478	273838
3.enjeksiyon	37298	273740
4.enjeksiyon	37712	271634
5.enjeksiyon	37829	273852
6.enjeksiyon	37790	271135
ort	37603.08	273179.42
SS	207.22	1460.12
%RSS	0.55	0.53

Tablo 74. Vit E Asetat Doğrusallık Sonuçları

Derişimler (mg/mL)	Alan değerleri
0.010	75025
	74955
	74596
0.02	146089
	145136
	144677
0.04	298343
	300834
	300083
0.05	385214
	385425
	385425
0.06	461245
	465785
	465258
0.07	549758
	547675
	547480

**Şekil 53.** Vit E Asetat kalibrasyon eğrisi grafiği**4.2.8.2.1 Duyarlılık ve Saptama Sınırına ait Bulgular**

Vitamin E Asetat'a ait LOD ve LOQ değerleri Tablo 75'de verilmiştir.

Tablo 75. Vit E Asetat'a ait LOD ve LOQ değerleri

LOD (mg/mL)	0.0087
LOQ (mg/mL)	0.0260

4.2.8.3 Doğruluk Parametresine ait Bulgular

Yöntem 3.2.7.5'de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. % 80, % 100 ve % 120 seviyelerinde Vit E Asetat içeren aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile

F7-3 prolipozom formülasyon numuneleri her seviye için 3'er toplam da 9 adet olmak üzere hazırlanmıştır. Her seviye için geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 76 ve Tablo 77'de sunulmuştur.

Tablo 76. Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Formülasyonu Numune Çözeltili Vit E Asetat Doğruluk Sonuçları

% Seviye	Tartım miktarları (mg)	Teorik Konsantrasyon (mg/mL)	Deneyisel Konsantrasyon (mg/mL)	Geri kazanım (%)	Ortalama (%)	RSS (%)
80	0.200	0.040	0.040	100.7	100.7	1.0
	0.199	0.040	0.041	101.7		
	0.198	0.040	0.040	99.6		
100	0.270	0.054	0.054	100.0	99.7	1.4
	0.275	0.055	0.054	98.2		
	0.276	0.055	0.055	101.0		
120	0.340	0.068	0.068	101.2	100.6	1.6
	0.330	0.066	0.067	98.7		
	0.330	0.066	0.067	101.8		

Tablo 77. Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Numune Çözeltili Vit E Asetat Doğruluk Sonuçları

% Seviye	Tartım miktarları (mg)	Teorik Konsantrasyon (mg/mL)	Deneyisel Konsantrasyon (mg/mL)	Geri kazanım (%)	Ortalama (%)	RSS (%)
80	0.202	0.040	0.040	99.7	100.2	0.6
	0.201	0.040	0.040	100.1		
	0.199	0.040	0.040	100.9		
100	0.272	0.054	0.054	99.9	99.5	0.5
	0.273	0.055	0.054	99.5		
	0.275	0.055	0.055	99.0		
120	0.340	0.068	0.068	99.5	98.7	0.7
	0.335	0.067	0.066	98.4		
	0.338	0.068	0.067	98.3		

4.2.8.4 Kesinlik Parametresine ait Bulgular

4.2.8.4.1 Sistem kesinliği Parametresine ait Bulgular

Vit E Asetat Standart çözeltisinden verilen 6 enjeksiyonun pik alanları arasındaki RSS değerlendirilmiştir. Sonuçlar Tablo 78'de verilmiştir.

Tablo 78. Vit E Asetat standart çözeltisinin sistem kesinliği sonuçları

	Alan	Alıkonma Zamanı (dk.)
1	183106	22.6
2	185505	22.7
3	185268	22.8
4	183975	22.5
5	184521	22.1
6	185095.5	22.0
ort	184578.4	22.5
SS	909.6	0.301
% RSS	0.5	1.342

4.2.8.4.2 Tekrarlanabilirlik Parametresine ait Bulgular

Yöntem 3.2.7.6.2'deki gibi çalışılmıştır. Aktif hedefli pegile F7 Lipozom formülasyonuna ait tekrarlanabilirlik bulguları Tablo 79'da, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonuna ait tekrarlanabilirlik bulguları ise Tablo 80'de verilmiştir.

Tablo 79. Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Formülasyonu Numune Çözeltisi Vit E Asetat Tekrarlanabilirlik Sonuçları

Örnek	Tartımlar (g)	Derişimler (mg/mL)	Alan değerleri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.	2.130	0.05	189625	99.7	99.8
1.			189987	99.9	
2.	2.120	0.05	190325	100.5	100.6
2.			190453	100.6	
3.	2.096	0.05	190165	101.6	101.7
3.			190457	101.8	
4.	2.090	0.05	189365	101.5	101.5
4.			189457	101.5	
5.	2.095	0.05	190365	101.8	101.7
5.			190145	101.6	
6.	2.096	0.05	190654	101.9	101.9
6.			190597	101.8	
ORT	101.2				
SS	0.82				
RSS	0.81				
CI±	101.2±0.86				

Tablo 80. Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Numune Çözeltilisi Vit E Asetat Tekrarlanabilirlik Sonuçları

Örnek	Tartımlar (mg)	Derişimler (mg/mL)	Alan değerleri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.	0.506	0.05	188625	100.6	100.7
1.			188965	100.8	
2.	0.510	0.05	190023	100.6	100.6
2.			190036	100.6	
3.	0.504	0.05	190358	101.9	101.9
3.			190387	101.9	
4.	0.515	0.05	190124	99.8	99.8
4.			190265	99.8	
5.	0.505	0.05	189654	101.4	101.4
5.			189965	101.5	
6.	0.506	0.05	190365	101.6	101.6
6.			190378	101.6	
ORT					101.0
SS					0.8
RSS					0.78
CI±					101.0±0.82

4.2.8.4.3 Laboratuvarıçi Kesinlik Parametresine ait Bulgular

Yöntem 3.2.7.6.3’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Hem aktif hedefli pegile F7 lipoozom formülasyonu hem de aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun altı şar adet enjeksiyonu sonrası elde edilen sonuçların birbirlerine yakınlık derecesi değerlendirilmiştir. Bulunan sonuçlar Tablo 81, Tablo 82, Tablo 83 ve Tablo 84’de verilmiştir.

Tablo 81. Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Formülasyonu Numune Çözeltilisi Vit E Asetat Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-1

Örnek	Tartımlar (mg)	Derişimler (mg/mL)	Alan değeri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.	2.092	0.05	189632	101.3	101.3
1.			189547	101.3	
2.	2.105	0.05	190845	101.3	101.4
2.			190965	101.4	
3.	2.095	0.05	189654	101.2	101.3
3.			189978	101.4	
4.	2.100	0.05	190036	101.1	101.2
4.			190157	101.2	
5.	2.103	0.05	189997	101.0	101.0
5.			189996	101.0	
6.	2.096	0.05	190125	101.4	101.4
6.			190287	101.5	
ORT	101.3				
SS	0.2				
RSS	0.2				
CI±	101.3±0.24				

Tablo 82. Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Formülasyonu Numune Çözeltilisi Vit E Asetat Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-2

Test No	Cihaz I / Gün I	Cihaz II /Gün II
1	99.8	101.3
2	100.6	101.4
3	101.7	101.3
4	101.5	101.2
5	101.7	101.0
6	101.9	101.4
Ortalama		101.3
	101.2	
SS	0.8	0.2
% RSS	0.8	0.2
CI	101.2±0.9	101.3±0.2
% Fark	0.1	

Tablo 83. Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Numune Çözeltilisi Vit E Asetat Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-1

Örnek	Tartımlar (mg)	Derişimler (mg/mL)	Alan değerleri	% Miktar	%Ortalama Miktar
1.	0.511	0.005	190565	100.5	100.4
1.			190064	100.3	
2.	0.512	0.005	192535	101.4	101.3
2.			192365	101.3	
3.	0.509	0.005	191625	101.5	101.4
3.			191526	101.4	
4.	0.511	0.005	191635	101.1	101.1
4.			191645	101.1	
5.	0.513	0.005	190085	99.9	99.9
5.			190074	99.9	
6.	0.513	0.005	189954	99.8	99.8
6.			189854	99.8	
ORT	100.7				
SS	0.7				
RSS	0.7				
CI±	100.7±0.76				

Tablo 84. Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Numune Çözeltisi
Vit E Asetat Laboratuvar İçi Kesinlik Sonuçları-2

Test No	Analist I / Cihaz I / Gün I	Analist II / Cihaz II /Gün II
1	100.1	100.4
2	101.8	101.3
3	101.9	101.4
4	101.6	101.1
5	100.2	99.9
6	101.6	99.8
Ortalama	101.6	100.7
	101.2	
SS	0.80	0.7
% RSS	0.81	0.7
CI	101.2±0.86	100.7±0.76
% Fark	0.4	

4.2.8.5 Dayanıklılık Parametresine ait Bulgular

Bir adet standart ve numunelerin çözeltileri Yöntem 3.2.7.7’de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Çalışma sonunda % miktar, %RSS, % fark, alıkonma zamanı (RT), kuyruklanma faktörü ve teorik plaka sayıları kaydedilmiştir. Kullanılan standart ve numunelerin tartım bilgileri Tablo 85’de, dayanıklılık çalışması sonucu bulunan değerlerin verileri ise Tablo 86 ve Tablo 87’de verilmiştir.

Tablo 85. Dayanıklılık çalışmasında kullanılan standart ve numunelerin tartım verileri

Standart tartım (mg)	50.0
Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Numune-1 Tartım (g)	2.08
Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Numune-2 Tartım (g)	2.09
Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Numune-1 Tartım (g)	0.51
Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Numune-2 Tartım (g)	0.50

Tablo 86. Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Formülasyonu Numune Çözeltisi Vit E Asetat Dayanıklılık Parametresine ait Bulgular

Parametre	% Miktar	%RSS	% Fark	Rt	Kuyruklanma Faktörü	Plaka Sayısı
Normal çalışma koşulları	100.5	0.2	-	22.5	1.0	15500
Akış hızı 1.1 mL/dk	101.3	0.3	0.8	22.7	1.2	15520
Akış hızı 1.3 mL/dk	100.8	0.8	0.3	22.3	1.0	15100
Kolon Sıcaklığı 20°C	100.4	0.9	0.1	22.6	1.1	15250
Kolon Sıcaklığı 30°C	101.5	0.5	1.0	22.4	1.0	15236

Tablo 87. Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Numune Çözeltisi Vit E Asetat Dayanıklılık Parametresine ait Bulgular

Parametre	% Miktar	%RSS	% Fark	Rt	Kuyruklanma Faktörü	Plaka Sayısı
Normal çalışma koşulları	100.5	0.3	-	22.5	1.0	15654
Akış hızı 0.9 mL/dk	100.5	0.6	-	22.6	1.3	15741
Akış hızı 1.1 mL/dk	100.8	0.5	0.3	22.4	1.0	15852
Kolon Sıcaklığı 20°C	101.5	0.8	1.0	22.5	1.1	15800
Kolon Sıcaklığı 30°C	100.8	0.9	0.3	22.4	1.0	15950
Tampon pH 2.3	100.5	0.6	-	22.6	1.2	15971
Tampon pH 2.7	101.6	0.7	1.1	22.7	1.1	15962

4.2.8.6 Sistem Uygunluk Parametresine ait Bulgular

Yöntem 3.2.7.8’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Sistem uygunluk sonuçları Tablo 88’de verilmiştir.

Tablo 88. Vit E Asetat Sistem uygunluk sonuçları

Enjeksiyon No	Alan	Rt	Kuyruklanma Faktörü	Teorik Plaka
1	185536	22.5	1.02	15259
2	186214	22.4	1.05	15613
3	186544	22.5	1.05	15427
4	186325	22.5	1.06	15811
5	186421	22.4	1.05	15691
6	185096	22.5	1.05	15470
Ortalama	186022.6	22.5	1.047	15545.2
SS	575.3	0.052	0.014	199.018
% RSS	0.3	0.230	1.305	1.280

4.2.8.7 Çözelti Stabilitesi

Yöntem 3.2.7.9’da anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Vit E Asetat standart çözeltisinin, aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom numune çözeltilerinin 48 saat boyunca % alan farklanmaları hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 89’de gösterilmiştir.

Tablo 89. Vit E Asetat Çözelti Stabilitesi Sonuçları

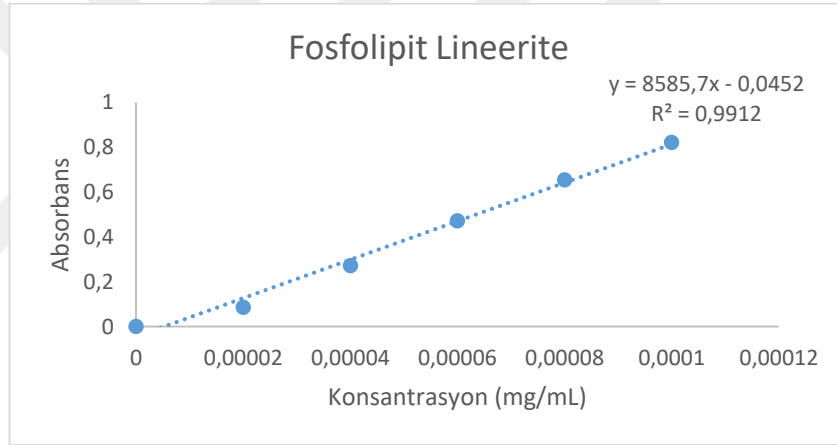
	Vit E Asetat standart-Alan	Vit E Asetat standart-% Fark	Aktif Hedefli Pegile F7-Lipozom-Alan	Aktif Hedefli Pegile F7-Lipozom-% Fark	Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom-Alan	Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom-% Fark
Başlangıç zamanı	185225	0.0	182126	0.0	183654	0.0
2. saat	185126	0.1	182659	0.3	183745	0.0
4. saat	184218	0.5	182954	0.5	184326	0.4
6. saat	183217	1.1	183654	0.8	184218	0.3
8. saat	183165	1.1	184256	1.2	184658	0.5
12. saat	182069	1.7	184265	1.2	184269	0.3
18. saat	184215	0.5	185247	1.7	184025	0.2
24. saat	184325	0.5	183698	0.9	184965	0.7
36. saat	185116	0.1	184365	1.2	185369	0.9
48. saat	184236	0.5	184785	1.5	185698	1.1

4.2.9 Lipozom ve Prolipozom Formülasyonlarında Fosfolipit Miktarına ait Bulgular

Yöntem 2.2.6.’da anlatıldığı şekilde çalışıldı. Bu amaçla öncelikle K_2HPO_4 standart çözeltisi ile kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 54). Ardından aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom için bulunan değerler kalibrasyon eğrisi ile değerlendirilip formülasyonların fosfolipit miktarları bulunmuş ve teorik olarak formülasyon terkinde bulunan miktarlar ile kıyaslanmıştır. Ayrıca stabilite takibinde fosfolipitlerin olası bir oksidasyon ya da hidrolize maruziyetini tahminlemek ve belirlemek için de fosfolipit miktar tayini metodu kullanılmıştır.

Tablo 90. Fosfolipit konsantrasyonuna karşı okunan absorbens değerleri

Konsantrasyon (mg/mL)	Absorpsiyon	Ortalama Absorbans
0.000	0.000	0.000 ±0.001
	0.000	
	0.000	
2 x10 ⁻⁵	0.087	0.086±0.001
	0.085	
	0.086	
4 x10 ⁻⁵	0.272	0.272±0.001
	0.273	
	0.271	
6 x10 ⁻⁵	0.471	0.471±0.001
	0.472	
	0.471	
8 x10 ⁻⁵	0.653	0.654±0.001
	0.654	
	0.655	
1 x10 ⁻⁵	0.821	0.821±0.001
	0.821	
	0.822	



Şekil 54. Fosfolipit Kalibrasyon Eğrisi

Tablo 91. Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom ve Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Numunlerinin Fosfolipit Miktarları

Formülasyon adı	Absorpsiyon	Fosfolipit Konsantrasyonu (mg/mL)	% Fosfolipit Miktarı
Aktif Hedefli Pegile F7 lipozom formülasyonu 1. numune	0.387	5.05×10^{-4}	101.7
Aktif Hedefli Pegile F7 lipozom formülasyonu 2. numune	0.385	5.02×10^{-4}	101.5
Aktif Hedefli Pegile F7 lipozom formülasyonu 3. numune	0.389	5.05×10^{-4}	101.5
Aktif Hedefli Pegile F7-3 prolipozom formülasyonu 1. numune	0.382	4.97×10^{-4}	100.5
Aktif Hedefli Pegile F7-3 prolipozom formülasyonu 2. numune	0.375	4.89×10^{-4}	98.9
Aktif Hedefli Pegile F7-3 prolipozom formülasyonu 3. numune	0.387	5.03×10^{-4}	101.7

4.3 *In vitro* Salım Çalışmasına ait Bulgular

Yöntem 3.2.9’da anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. pH 5.5 tampon ortamında Doks-HCl etkin maddesine, piyasa preparatına, aktif hedefli pegile olmayan F7 lipozom ve aktif hedefli pegile olmayan F7-3 prolipozom formülasyonuna, aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonuna ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonuna ait sonuçlar Tablo 92’de, 24. saat sonunda bu örneklerin diyaliz membran içerisinde kalan miktarları Tablo 93’de, *in vitro* salım grafiği ise Şekil 55’de verilmiştir. pH 6.5 tampon ortamında Doks-HCl etkin maddesine, piyasa preparatına, aktif hedefli pegile olmayan F7 lipozom ve aktif hedefli pegile olmayan F7-3 prolipozom formülasyonuna, aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonuna ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonuna ait sonuçlar Tablo 94’de, 24. saat sonunda bu örneklerin diyaliz membran içerisinde kalan miktarları Tablo 95’de, *in vitro* salım grafiği ise Şekil 56’da verilmiştir. pH 7.4 tampon ortamında Doks-HCl etkin maddesine, piyasa preparatına, aktif hedefli pegile olmayan F7 lipozom ve aktif hedefli pegile olmayan F7-3 prolipozom formülasyonuna, aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonuna ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonuna ait sonuçlar Tablo 96’de 24. saat sonunda bu örneklerin diyaliz membran içerisinde kalan

miktarları Tablo 97’de, *in vitro* salım grafiği ise Şekil 57’de verilmiştir. Piyasa preparatı, aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun salım kinetiklerinin modellere uyumluluğu matematiksel olarak hesaplanmış ve sonuçlar en yüksek korelasyon bulunan modelden, en düşük korelasyon modeline doğru sıralanmıştır. Kinetik modelleme sonuçları pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.4 ortamı için sırasıyla; Tablo 98, Tablo 99 ve Tablo 100’de verilmiştir.

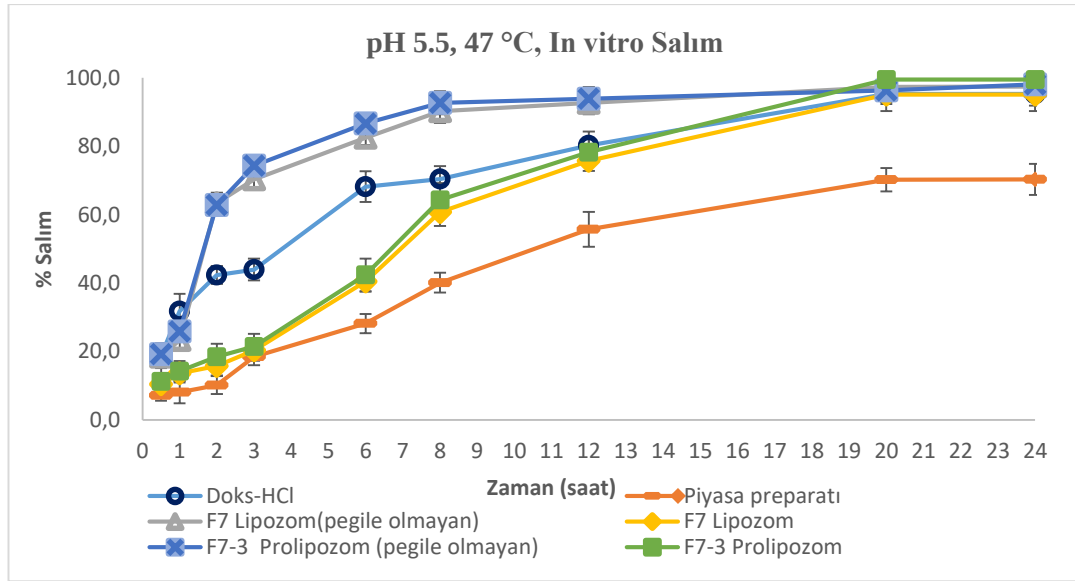
pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.4 ortamlarında; aktif hedefli F7-3 prolipozom formülasyonu ile piyasa preparatına, aktif hedefli F7 lipozom formülasyonu ile piyasa preparatına ve aktif hedefli F7-3 prolipozom formülasyonu ile aktif hedefli F7 lipozom formülasyonuna F2 testi uygulanmıştır. Sonuçlar Tablo 101’de verilmiştir.

Tablo 92. pH 5.5 Tampon ortamında *In vitro* salım çalışması sonuçları (n=6)

Zaman (Saat)	Doks-HCl (% Doks-HCl ± SS)	Piyasa preparatı (% Doks-HCl±SS)	Aktif Hedefli F7 lipozom (pegile olmayan) (% Doks-HCl ±SS)	Aktif Hedefli F7-3 prolipozom (pegile olmayan) (% Doks-HCl ± SS)	Aktif Hedefli Pegile F7 lipozom (%Doks-HCl±SS)	Aktif Hedefli Pegile F7-3 prolipozom (% Doks-HCl ± SS)
0.5	18.8 ± 3.2	7.2 ± 1.6	18.5 ± 3.3	19.2 ± 3.0	10.4 ± 2.0	11.3 ± 4.2
1	31.7 ± 5.1	8.1 ± 3.2	12.5 ± 3.1	25.9± 3.1	13.6 ± 2.6	14.3± 2.9
2	42.4 ± 2.6	10.2 ± 2.6	23.4 ± 3.0	62.8 ± 4.0	15.8 ± 2.8	18.5 ± 3.8
3	44.0 ± 3.2	18.5 ± 2.5	63.4 ± 2.9	74.3 ± 5.1	20.4 ± 3.1	21.5 ± 3.7
6	68.2 ± 4.5	28.2 ± 2.8	70.3 ± 2.1	86.7 ± 1.9	40.5 ± 3.0	42.4 ± 4.8
8	70.4 ± 3.8	40.1 ± 2.9	90.2 ± 3.4	92.7 ± 1.8	60.8 ± 4.1	64.3 ± 4.9
12	80.2 ± 4.1	55.7 ± 5.1	92.7 ± 3.4	93.9 ± 2.2	75.7 ± 2.9	78.3 ± 4.0
20	95.3 ± 5.0	70.2 ± 3.4	97.3 ± 2.6	96.3 ± 2.6	95.1 ± 2.8	99.5 ± 3.9
24	95.3 ± 5.0	70.3 ± 4.5	97.4 ± 2.7	98.1 ± 2.7	95.1 ± 3.2	99.5 ± 3.8

Tablo 93. 24 saat sonunda pH 5.5 tampon ortamında diyaliz membran içi miktar tayini sonuçları

	% Doks-HCl
Doks-HCl	% 0.30
Piyasa preparatı	% 28.65
Aktif Hedefli F7 Lipozom Formülasyonu (pegile olmayan)	% 3.92
Aktif Hedefli F7-3 Prolipozom Formülasyonu (pegile olmayan)	% 2.10
Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Formülasyonu	% 4.61
Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu	% 0.31



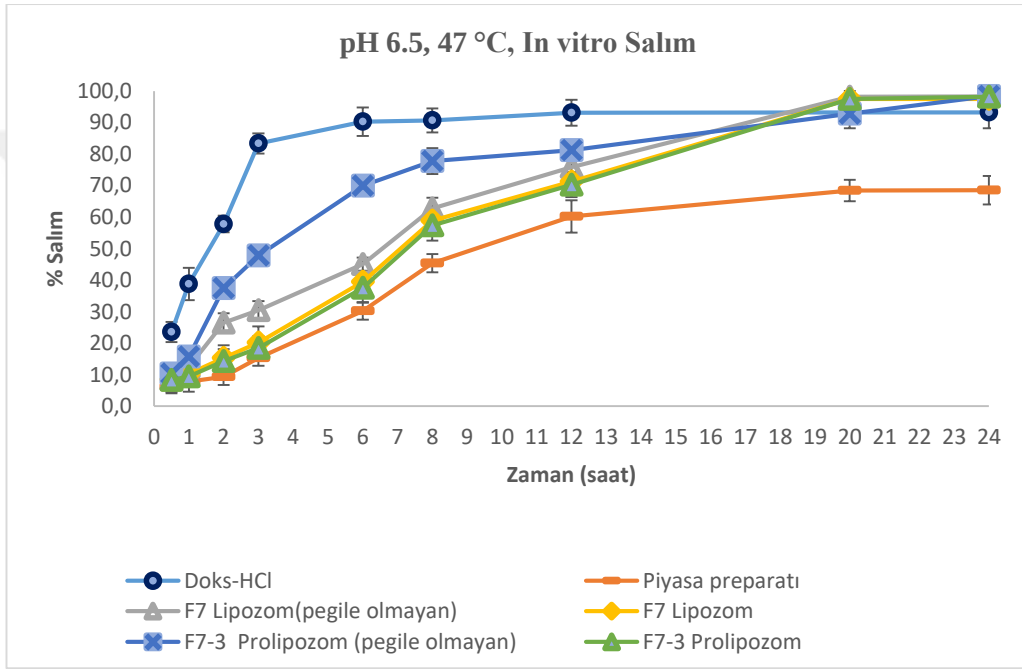
Şekil 55. pH 5.5 Tampon ortamında *In vitro* salım grafiği

Tablo 94. pH 6.5 Tampon ortamında *In vitro* salım çalışması sonuçları (n=6)

Zaman (Saat)	Doks-HCl (% Doks-HCl ± SS)	Piyasa preparatı (% Doks-HCl ± SS)	Aktif Hedefli F7 lipozom (pegile olmayan) (% Doks-HCl ± SS)	Aktif Hedefli F7-3 prolipozom (pegile olmayan) (% Doks-HCl ± SS)	Aktif Hedefli Pegile F7 lipozom (% Doks-HCl ± SS)	Aktif Hedefli Pegile F7-3 prolipozom (% Doks-HCl ± SS)
0.5	23.5 ± 2.1	6.1 ± 1.6	8.6 ± 3.2	10.3 ± 3.2	8.5 ± 2.1	8.3 ± 2.1
1	38.8 ± 5.0	7.8 ± 3.2	12.5 ± 2.9	15.7 ± 3.8	10.2 ± 2.6	9.4 ± 2.6
2	57.8 ± 1.6	9.3 ± 2.5	26.5 ± 2.8	37.5 ± 4.1	15.3 ± 3.1	14.3 ± 4.2
3	83.4 ± 2.8	15.3 ± 2.4	30.4 ± 3.7	47.8 ± 4.2	20.2 ± 3.4	18.5 ± 4.3
6	90.3 ± 4.7	30.2 ± 5.1	45.1 ± 1.8	70.0 ± 1.9	39.5 ± 4.1	37.6 ± 5.1
8	90.7 ± 3.6	45.4 ± 5.3	62.7 ± 3.5	77.8 ± 2.5	58.9 ± 2.6	57.4 ± 5.2
12	93.1 ± 4.2	60.2 ± 5.9	75.8 ± 2.7	81.2 ± 2.4	71.3 ± 2.4	70.3 ± 3.1
20	93.2 ± 5.2	68.4 ± 1.8	98.2 ± 2.4	92.8 ± 2.6	97.5 ± 2.5	97.5 ± 3.3
24	93.2 ± 5.4	68.5 ± 4.6	98.3 ± 3.4	98.4 ± 2.4	97.7 ± 3.1	98.2 ± 3.2

Tablo 95. 24 saat sonunda pH 6.5 tampon ortamında diyaliz membran içi miktar tayini sonuçları

	% Doks-HCl
Doks-HCl	% 6.62
Piyasa preparatı	% 21.4
Aktif Hedefli F7 Lipozom Formülasyonu (pegile olmayan)	% 1.44
Aktif Hedefli F7-3 Prolipozom Formülasyonu (pegile olmayan)	% 1.32
Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Formülasyonu	% 2.87
Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu	% 1.88



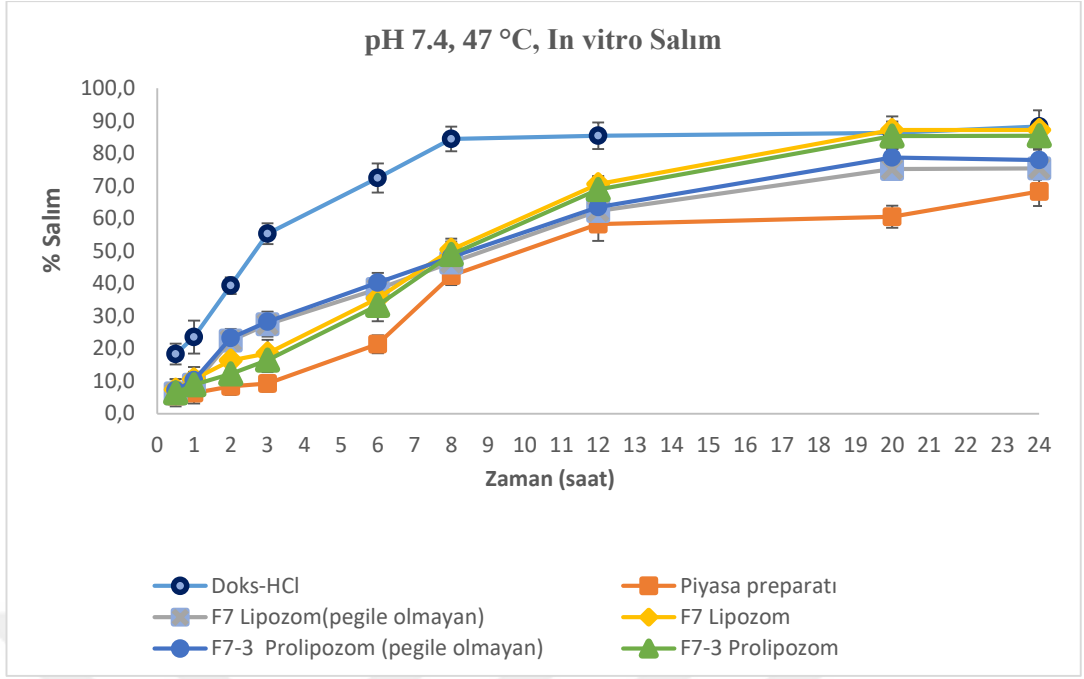
Şekil 56. pH 6.5 Tampon ortamında *in vitro* salım grafiği

Tablo 96. pH 7.4 Tampon ortamında *In vitro* salım çalışması sonuçları (n=6)

Zaman (Saat)	Doks-HCl (% Doks-HCl $\pm$ SS)	Piyasa preparatı (% Doks-HCl $\pm$ SS)	Aktif Hedefli F7 lipozom (pegile olmayan) (% Doks-HCl $\pm$ SS)	Aktif Hedefli F7-3 prolipozom (pegile olmayan) (% Doks-HCl $\pm$ SS)	Aktif Hedefli Pegile F7 lipozom (% Doks-HCl $\pm$ SS)	Aktif Hedefli Pegile F7-3 prolipozom (% Doks-HCl $\pm$ SS)
0.5	18.3 $\pm$ 3.2	5.3 $\pm$ 1.6	6.2 $\pm$ 3.3	7.2 $\pm$ 4.2	7.4 $\pm$ 3.2	6.4 $\pm$ 1.2
1	23.5 $\pm$ 5.1	6.3 $\pm$ 3.2	8.9 $\pm$ 3.1	10.2 $\pm$ 2.9	10.5 $\pm$ 3.8	8.9 $\pm$ 2.3
2	39.3 $\pm$ 2.6	8.4 $\pm$ 2.6	22.4 $\pm$ 4.0	23.2 $\pm$ 3.8	16.3 $\pm$ 4.1	12.2 $\pm$ 3.5
3	55.3 $\pm$ 3.2	9.2 $\pm$ 2.5	27.4 $\pm$ 5.1	28.2 $\pm$ 3.7	18.5 $\pm$ 4.2	16.4 $\pm$ 2.8
6	72.4 $\pm$ 4.5	21.3 $\pm$ 2.8	38.3 $\pm$ 1.9	40.2 $\pm$ 4.8	36.4 $\pm$ 1.9	33.2 $\pm$ 3.2
8	84.4 $\pm$ 3.8	42.4 $\pm$ 2.9	46.4 $\pm$ 1.8	48.1 $\pm$ 4.9	44.6 $\pm$ 2.5	46.7 $\pm$ 4.3
12	85.4 $\pm$ 4.1	58.2 $\pm$ 5.1	62.3 $\pm$ 2.2	63.4 $\pm$ 4.0	70.6 $\pm$ 2.4	75.3 $\pm$ 4.2
20	86.3 $\pm$ 5.0	60.5 $\pm$ 3.4	75.2 $\pm$ 2.6	78.7 $\pm$ 3.9	87.2 $\pm$ 2.6	80.1 $\pm$ 5.2
24	88.2 $\pm$ 5.0	68.3 $\pm$ 4.5	75.3 $\pm$ 2.7	77.9 $\pm$ 3.8	87.2 $\pm$ 2.4	80.2 $\pm$ 2.2

Tablo 97. 24 saat sonunda pH 7.4 tampon ortamında diyaliz membran içi miktar tayini sonuçları

	% Doks-HCl
Doks-HCl	% 11.45
Piyasa preparatı	% 30.23
Aktif Hedefli F7 Lipozom Formülasyonu (pegile olmayan)	% 23.42
Aktif Hedefli F7-3 Prolipozom Formülasyonu (pegile olmayan)	% 23.10
Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Formülasyonu	% 10.61
Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu	% 19.31



Şekil 57. pH 7.4 Tampon ortamında *in vitro* salım grafiği

Tablo 98. pH 5.5 ortamında Salım Kinetik Modellerin İncelenmesi

		m	n	r	r²	Res	Res/n-2
Piyasa Preparatı	Birinci derece	-0.054	4.557	-0.988	0.975	84.130	12.019
	Higuchi	17.112	-9.392	0.988	0.977	124.827	17.833
	Peppas	0.6737	-0.248	0.983	0.966	144.805	20.686
	Hixon Crowel	0.0673	0.107	0.983	0.967	365.956	52.279
	Sıfırıncı derece	2.937	9.317	0.969	0.939	1110.13	158.589
Aktif Hedefli F7 Lipozom Formülasyonu	Hixon Crowel	0.131	0.063	0.990	0.981	167.088	23.870
	Birinci derece	-0.137	4.711	-0.988	0.976	483.160	69.023
	Higuchi	23.058	-11.350	0.984	0.969	304.530	43.504
	Peppas	0.645	-0.028	0.979	0.959	355.379	50.768
	Sıfırıncı derece	3.940	14.000	0.961	0.923	2516.199	359.457
Aktif Hedefli F7-3 Prolipozom Formülasyonu	Hixon Crowel	0.172	-0.047	0.989	0.979	257.468	36.781
	Higuchi	23.907	-11.052	0.985	0.970	313.284	44.755
	Peppas	0.632	0.032	0.982	0.963	358.635	51.234
	Birinci derece	-0.243	5.065	-0.966	0.933	5174.639	739.234
	Sıfırıncı derece	4.086	15.224	0.962	0.925	2875.959	410.851

Tablo 99. pH 6.5 ortamında Salım Kinetik Modellerin İncelenmesi

		m	n	r	r²	Res	Res/n-2
Piyasa Preparatı	Peppas	0.720	-0.374	0.979	0.958	376.748	53.821
	Higuchi	17.327	-9.637	0.977	0.955	254.188	36.313
	Birinci derece	-0.052	4.538	-0.968	0.937	262.657	37.522
	Hixon Crowel	0.066	0.126	0.961	0.923	641.729	91.676
	Sıfırıncı derece	2.926	9.704	0.943	0.889	1472.774	210.396
Aktif Hedefli F7 Lipozom Formülasyonu	Hixon Crowel	0.147	-0.037	0.990	0.981	142.140	20.306
	Higuchi	23.914	-14.479	0.990	0.980	214.023	30.575
	Peppas	0.708	-0.212	0.988	0.976	265.487	37.927
	Birinci derece	-0.169	4.859	-0.976	0.953	1536.836	219.548
	Sıfırıncı derece	4.108	11.630	0.971	0.943	1810.846	258.692
Aktif Hedefli F7-3 Prolipozom Formülasyonu	Hixon Crowel	0.152	-0.079	0.992	0.984	265.687	37.955
	Higuchi	24.174	-15.965	0.989	0.978	233.115	33.302
	Peppas	0.725	-0.269	0.985	0.971	260.704	37.243
	Birinci derece	-0.178	4.917	-0.977	0.955	2284.445	326.349
	Sıfırıncı derece	4.170	10.280	0.975	0.950	1486.856	212.408

Tablo 100. pH 7.4 ortamında Salım Kinetik Modellerin İncelenmesi

		m	n	r	r²	Res	Res/n-2
Piyasa Preparatı	Higuchi	16.905	-12.038	0.966	0.933	368.657	52.665
	Birinci derece	-0.049	4.573	-0.964	0.929	329.798	47.114
	Peppas	0.760	-0.546	0.964	0.929	449.413	64.202
	Hixon Crowel	0.063	0.073	0.958	0.918	483.710	69.102
	Sıfırıncı derece	2.892	6.520	0.944	0.891	980.858	140.123
Aktif Hedefli F7 Lipozom Formülasyonu	Peppas	0.692	-0.202	0.992	0.984	258.370	36.910
	Birinci derece	-0.094	4.618	-0.990	0.980	122.329	17.476
	Higuchi	21.410	-12.035	0.988	0.975	209.126	29.875
	Hixon Crowel	0.103	0.085	0.987	0.975	215.047	30.721
	Sıfırıncı derece	3.668	11.427	0.966	0.934	1731.474	247.354
Aktif Hedefli F7-3 Prolipozom Formülasyonu	Birinci derece	-0.088	4.628	-0.990	0.980	131.019	18.717
	Peppas	0.743	-0.370	0.988	0.976	317.158	45.308
	Hixon Crowel	0.099	0.058	0.986	0.972	180.439	25.777
	Higuchi	21.477	-14.183	0.986	0.971	243.098	34.728
	Sıfırıncı derece	3.683	9.316	0.966	0.932	1355.671	193.667

Tablo 101. F2 Testi Bulguları

	pH 5.5 (%)	pH 6.5 (%)	pH 7.4 (%)
Aktif hedefli F7-3 prolipozom formülasyonu-Piyasa preparatı	37.5	42.0	51.4
Aktif hedefli F7 lipozom formülasyonu-Piyasa preparatı	41.0	41.0	44.5
Aktif hedefli F7-3 prolipozom formülasyonu-Aktif hedefli F7 lipozom formülasyonu	77.4	91.4	82.1

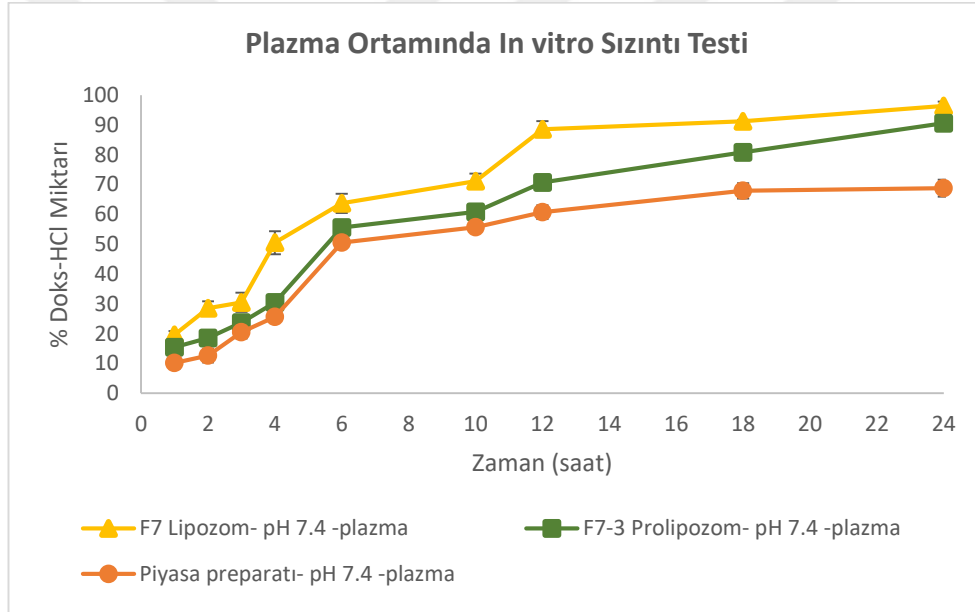
4.4 *In vitro* Sızıntı Testine ait Bulgular

4.4.1 Plazma Ortamında *In vitro* Sızıntı Testi Bulguları

Yöntem 3.2.10.1’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Aktif hedefli pegile F7 Lipozom, aktif hedefli pegile F7-3 Prolipozom ve piyasa preparatının pH 7.4 tampon-yapay plazma karışımı ortamında bulunan sonuçlar Tablo 102’de, karşılaştırmalı grafik ise Şekil 58’de verilmiştir.

Tablo 102. Plazma ortamında in vitro sızıntı çalışması sonuçları (n=3)

Zaman (saat)	Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom- pH 7.4 - plazma (% Doks-HCl $\pm$ SS)	Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom- pH 7.4 - plazma (% Doks-HCl $\pm$ SS)	Piyasa preparatı- pH 7.4 -plazma (% Doks-HCl $\pm$ SS)
1	19.6 $\pm$ 1.2	15.4 $\pm$ 2.5	10.2 $\pm$ 1.9
2	28.5 $\pm$ 2.3	18.5 $\pm$ 2.3	12.6 $\pm$ 2.3
3	30.5 $\pm$ 3.2	23.7 $\pm$ 1.6	20.5 $\pm$ 2.1
4	50.5 $\pm$ 3.9	30.5 $\pm$ 1.7	25.6 $\pm$ 1.8
6	63.4 $\pm$ 3.2	55.6 $\pm$ 2.4	50.5 $\pm$ 1.5
10	71.2 $\pm$ 2.5	60.9 $\pm$ 2.3	55.7 $\pm$ 0.4
12	88.6 $\pm$ 2.7	70.7 $\pm$ 1.8	60.7 $\pm$ 2.3
18	91.2 $\pm$ 0.5	80.8 $\pm$ 1.6	67.9 $\pm$ 2.6
24	96.4 $\pm$ 1.7	90.6 $\pm$ 1.5	68.8 $\pm$ 1.8



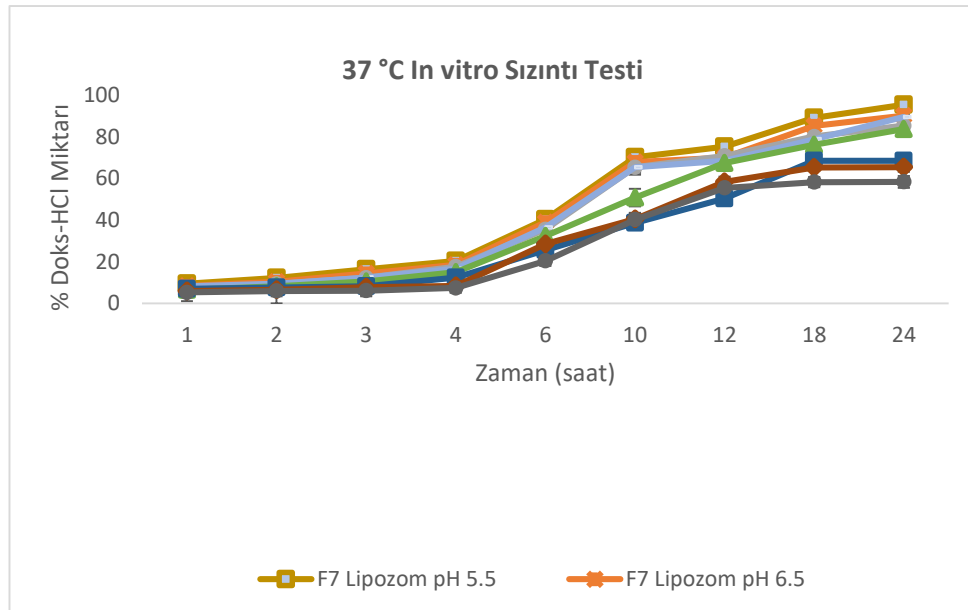
Şekil 58. Plazma ortamında In vitro Sızıntı Çalışması Grafiği

4.4.2 37 °C’de pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 Ortamlarında In vitro Sızıntı Testi Bulguları

Yöntem 3.2.10.2’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Aktif hedefli pegile F7 Lipozom, aktif hedefli pegile F7-3 Prolipozom ve piyasa preparatının pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ortamlarında bulunan sonuçlar Tablo 103’de, karşılaştırmalı grafik ise Şekil 59’da verilmiştir.

Tablo 103. 37 °C pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ortamlarında *in vitro* sızıntı testi sonuçları (n=3)

Zaman (saat)	Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom- pH 5.5 (% Doks-HCl ± SS)	Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom- pH 6.5 (% Doks-HCl ± SS)	Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom- pH 7.4 (% Doks-HCl ± SS)	Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom- pH 5.5 (% Doks-HCl ± SS)	Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom- pH 6.5 (% Doks-HCl ± SS)	Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom- pH 7.4 (% Doks-HCl ± SS)	Piyasa preparatı pH 5.5 (% Doks-HCl ± SS)	Piyasa preparatı pH 6.5 (% Doks-HCl ± SS)	Piyasa preparatı pH 7.4 (% Doks-HCl ± SS)
1	9.4 ± 3.2	8.3 ± 1.6	7.5 ± 2.1	8.2 ± 2.1	8.2 ± 2.1	6.5 ± 3.2	7.0 ± 1.6	5.9 ± 3.2	5.2 ± 4.2
2	12.2 ± 2.9	10.4 ± 3.2	9.3 ± 5.0	9.4 ± 2.6	9.4 ± 2.6	8.2 ± 3.8	7.5 ± 2.5	6.5 ± 3.2	5.9 ± 2.9
3	16.4 ± 2.8	14.3 ± 2.5	12.3 ± 1.6	12.4 ± 4.2	12.4 ± 3.1	10.5 ± 4.1	8.2 ± 2.8	7.8 ± 4.1	6.1 ± 2.7
4	20.3 ± 3.7	18.5 ± 2.4	17.6 ± 2.8	16.6 ± 4.3	16.6 ± 3.4	15.0 ± 4.2	12.3 ± 4.1	8.4 ± 2.0	7.4 ± 2.4
6	40.3 ± 1.8	38.9 ± 5.1	35.5 ± 4.7	36.4 ± 5.1	36.4 ± 4.1	32.3 ± 1.9	25.6 ± 3.1	28.4 ± 2.8	20.4 ± 2.4
10	70.2 ± 3.5	67.9 ± 5.3	65.3 ± 3.6	65.3 ± 5.2	65.3 ± 2.6	50.8 ± 2.5	38.6 ± 4.2	40.4 ± 3.0	40.2 ± 3.1
12	75.2 ± 2.7	70.0 ± 5.9	70.8 ± 4.2	68.4 ± 3.1	68.4 ± 2.4	67.4 ± 2.4	50.3 ± 2.7	58.3 ± 2.5	55.4 ± 2.4
18	89.1 ± 2.4	85.2 ± 1.8	80.1 ± 5.2	78.8 ± 3.3	78.8 ± 2.5	76.1 ± 2.6	68.4 ± 2.7	65.2 ± 1.6	58.2 ± 2.5
24	95.3 ± 3.4	90.1 ± 4.6	85.3 ± 5.4	89.5 ± 3.2	89.5 ± 3.1	83.7 ± 2.4	68.4 ± 2.7	65.4 ± 2.3	58.3 ± 2.8



Şekil 59. 37 °C pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 Ortamlarında *In vitro* Sızıntı Testi Grafiği

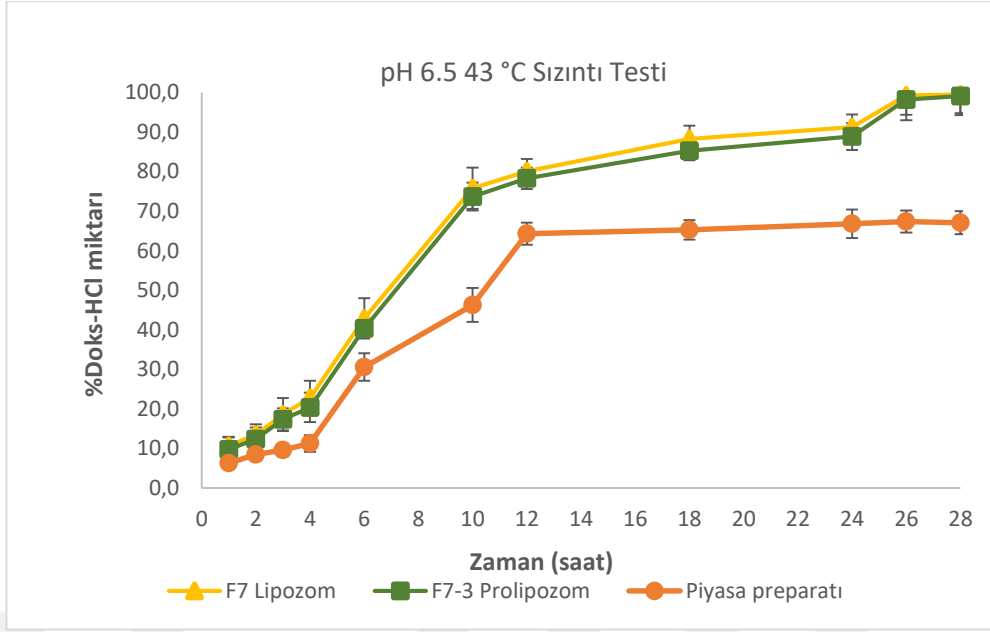
4.4.3 43 °C, 47 °C, 52 °C ve 57 °C’ de pH 6.5 Ortamlarında *In vitro* Sızıntı Testi

Bulguları

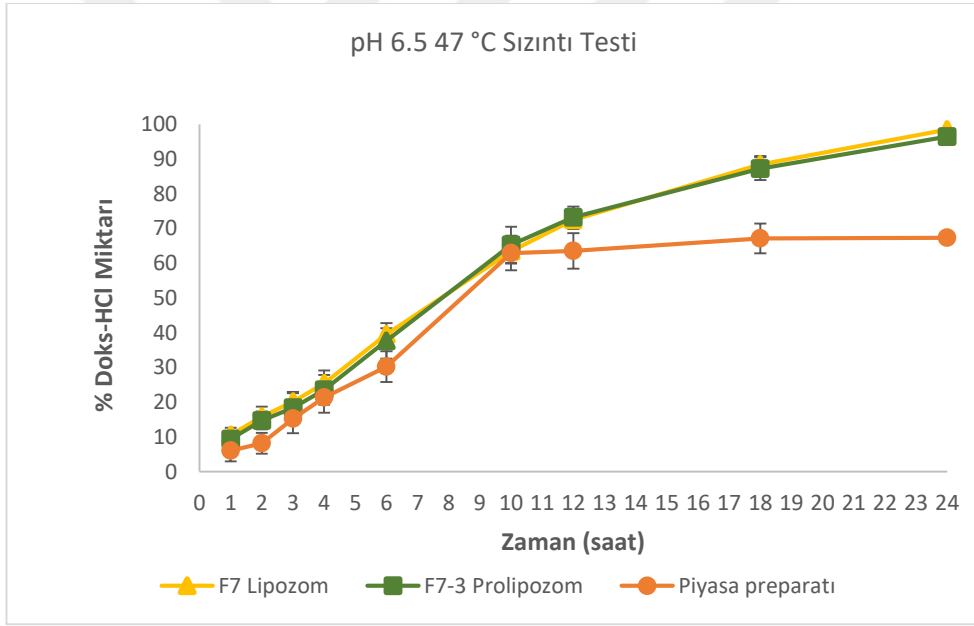
Yöntem 3.2.10.3’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. 43 °C, 47 °C, 52 °C ve 57 °C’lerde pH 6.5 tampon ortamlarında elde edilen % Doks-HCl miktarları Tablo 104’de, karşılaştırmalı grafikler ise Şekil 60, Şekil 61, Şekil 62, Şekil 63’de verilmiştir.

Tablo 104. 43 °C, 47 °C, 52 °C ve 57 °C’ lerde pH 6.5 ortamlarında *in vitro* sızıntı testi (n=3)

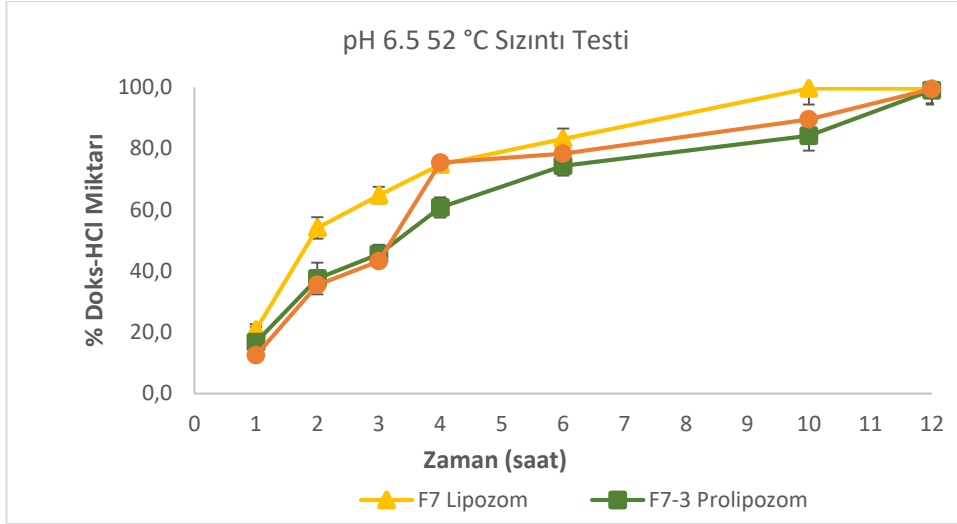
Zaman (saat)	43 °C			47 °C			52 °C			57 °C		
	Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom (% Doks-HCl ± SS)	Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom (% Doks-HCl ± SS)	Piyasa preparatı (% Doks-HCl ± SS)	Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom (% Doks-HCl ± SS)	Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom (% Doks-HCl ± SS)	Piyasa preparatı (% Doks-HCl ± SS)	Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom (% Doks-HCl ± SS)	Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom (% Doks-HCl ± SS)	Piyasa preparatı (% Doks-HCl ± SS)	Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom (% Doks-HCl ± SS)	Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom (% Doks-HCl ± SS)	Piyasa preparatı (% Doks-HCl ± SS)
1	10.7 ± 3.2	9.8 ± 2.1	6.3 ± 1.1	10.5 ± 1.1	9.3 ± 2.1	6.0 ± 2.1	20.8 ± 1.8	16.7 ± 5.1	12.4 ± 2.7	51.9 ± 4.8	33.3 ± 4.7	30.4 ± 2.1
2	13.5 ± 2.9	12.4 ± 2.6	8.5 ± 1.3	15.8 ± 2.2	14.7 ± 2.6	8.1 ± 2.9	54.0 ± 3.5	37.5 ± 5.2	35.4 ± 3.1	59.8 ± 5.2	74.8 ± 4.9	68.2 ± 3.4
3	18.6 ± 2.8	17.4 ± 4.2	9.6 ± 2.1	20.1 ± 2.5	18.4 ± 4.2	15.2 ± 2.8	64.8 ± 2.7	45.5 ± 3.1	43.2 ± 5.0	70.8 ± 3.4	83.1 ± 3.2	84.3 ± 2.7
4	22.8 ± 3.7	20.4 ± 4.3	11.3 ± 2.0	25.4 ± 1.7	23.5 ± 4.3	21.3 ± 3.7	74.7 ± 2.4	60.7 ± 3.3	75.4 ± 4.8	87.7 ± 2.4	90.8 ± 3.3	89.2 ± 3.1
6	42.9 ± 1.8	40.4 ± 5.1	30.6 ± 1.4	39.5 ± 1.5	37.6 ± 5.1	30.2 ± 1.8	83.1 ± 2.4	74.3 ± 3.2	78.3 ± 4.9	99.5 ± 2.7	91.9 ± 3.1	90.2 ± 1.9
10	75.8 ± 3.5	73.7 ± 5.2	46.3 ± 3.4	63.4 ± 2.5	65.3 ± 5.2	62.9 ± 3.5	99.6 ± 3.4	84.2 ± 4.9	89.5 ± 3.4	100.6 ± 3.5	100.5 ± 5.2	99.5 ± 2.3
12	80.1 ± 2.7	78.3 ± 3.1	64.3 ± 2.2	72.5 ± 2.9	73.2 ± 3.1	63.5 ± 2.7	99.6 ± 5.2	99.0 ± 4.7	99.4 ± 3.1	*	*	*
18	88.3 ± 2.4	85.3 ± 3.3	65.3 ± 4.3	88.4 ± 2.2	87.2 ± 3.3	67.1 ± 2.4	*	*	*	*	*	*
24	91.3 ± 3.4	88.9 ± 3.2	66.8 ± 2.4	98.4 ± 1.4	96.4 ± 3.2	67.3 ± 3.4	*	*	*	*	*	*
26	99.3 ± 5.2	98.2 ± 4.9	67.4 ± 1.0	*	*	*	*	*	*	*	*	*
28	99.5 ± 4.8	99.1 ± 4.7	67.1 ± 2.4	*	*	*	*	*	*	*	*	*



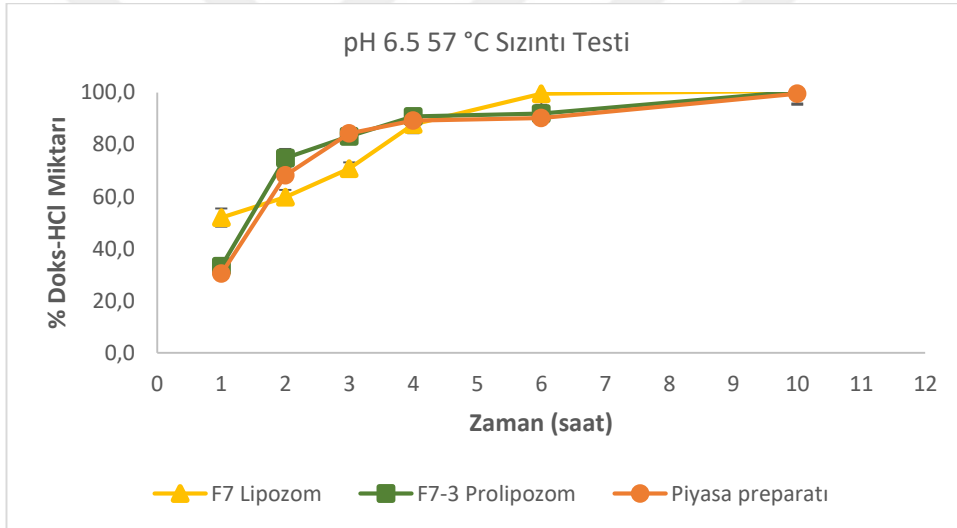
Şekil 60. pH 6.5 43 °C *In vitro* Sızıntı Testi Grafiği



Şekil 61. pH 6.5 47 °C *In vitro* Sızıntı Testi Grafiği



Şekil 62. pH 6.5 52 °C *In vitro* Sızıntı Testi Grafiği



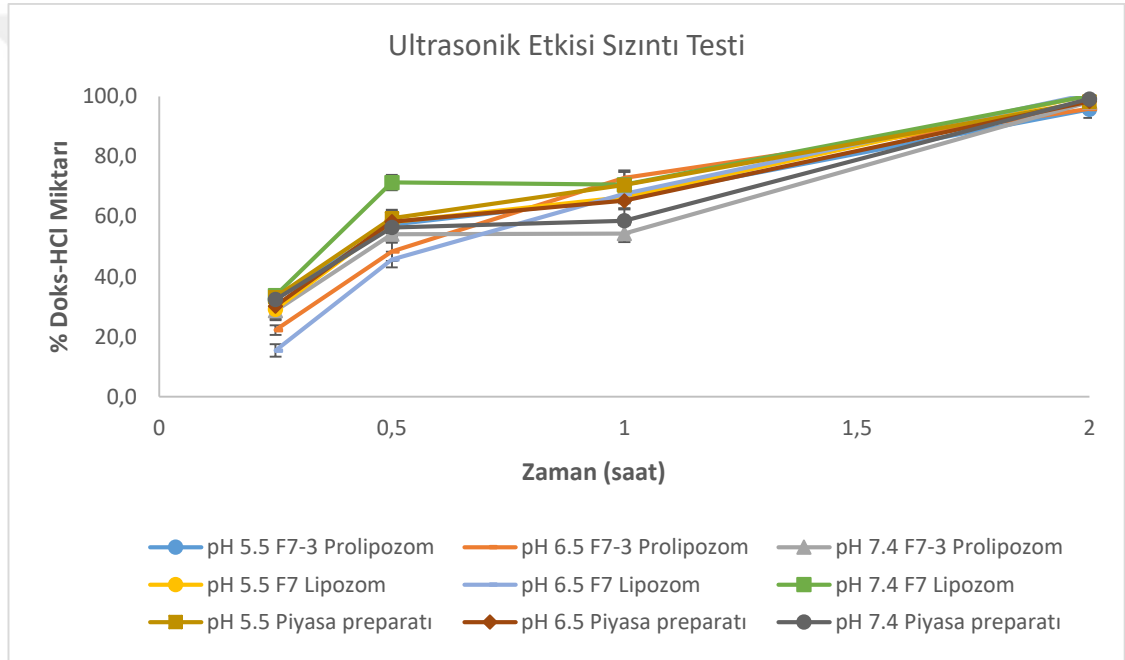
Şekil 63. pH 6.5 57 °C *In vitro* Sızıntı Testi Grafiği

4.4.4 Ultrasonik Enerji Etkisi *In vitro* Sızıntı Testi Bulguları

Yöntem 3.2.10.4’de anlatıldığı şekilde çalışıldı. Ultrasonik etkisi sonrası pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.4 elde edilen % Doks-HCl miktarları Tablo 105’de, karşılaştırmalı grafik ise Şekil 64’de verilmiştir.

Tablo 105. Ultrasonik Enerji Etkisi *In vitro* Sızıntı Testi Bulguları (n=3)

Zaman	pH 5.5 Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom	pH 6.5 Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom	pH 7.4 Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom	pH 5.5 Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom	pH 6.5 Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom	pH 7.4 Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom	pH 5.5 Aktif Hedefli Pegile Piyasa preparatı	pH 6.5 Aktif Hedefli Pegile Piyasa preparatı	pH 7.4 Aktif Hedefli Pegile Piyasa preparatı
15. Dakika	28.7 ± 3.2	29.1 ± 3.2	15.4 ± 2.1	32.5 ± 2.0	22.2 ± 2.0	28.7 ± 2.1	33.2 ± 2.1	30.2 ± 2.1	32.4 ± 2.0
30. Dakika	54.1 ± 2.9	58.2 ± 3.8	45.7 ± 2.6	57.3 ± 1.9	48.4 ± 1.9	54.1 ± 2.3	59.4 ± 2.6	58.3 ± 2.3	56.4 ± 1.9
1. Saat	54.3 ± 2.8	66.5 ± 4.1	67.5 ± 3.1	66.2 ± 1.6	72.9 ± 1.6	54.3 ± 3.0	70.5 ± 4.2	65.3 ± 3.0	58.6 ± 1.6
2. Saat	98.2 ± 3.7	100.5 ± 4.2	100.8 ± 3.4	95.7 ± 2.1	95.9 ± 2.1	98.2 ± 3.1	98.3 ± 4.3	98.4 ± 3.1	99.2 ± 2.1



Şekil 64. Ultrasonik Enerji Etkisi *In vitro* Sızıntı Testi Grafiği

4.5 Stabilité Çalışmalarına ait Bulgular

Yöntem 3.2.11’de anlatıldığı şekilde aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonlarının stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonunun stabilite çalışmasına ait bulgular Tablo 106’da, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun toz haline uygulanan stabilite çalışma bulguları Tablo 107’de, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun %5’lik dekstroz çözeltisi içerisinde disperse edildikten sonraki stabilite çalışmalarına ait bulgular Tablo 108’de verilmiştir.

Tablo 106. Aktif Hedefli Pegile F7 Lipozom Formülasyonu Stabilite Çalışması Sonuçları

	0.	1.	3.	6.	9.	12.	0.	1.	3.	6.	9.	12.	0.	1.	3.	6.	9.	12.	0.	1.	3.	6.
Görünüş	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	X	*	*	*	X	X	X	*	*	X	X
pH	5.9	5.8	5.8	5.9	6.0		5.9	6.1	6.0	6.2	X	X	5.9	5.8	5.9	X	X	X	5.9	6.0	X	X
Partikül boyutu (nm)	128.8	124.2	122.5	124.4	128.7		128.8	125.2	128.5	130.4	X	X	128.8	134.4	157.4	X	X	X	128.8	223.4	X	X
PDI	0.37	0.35	0.35	0.38	0.42		0.37	0.40	0.45	0.48	X	X	0.37	0.45	0.52	X	X	X	0.37	0.55	X	X
Zeta potansiyeli (mV)	27.05	20.1	20.2	23.2	24.1		27.05	20.3	28.4	20.2	X	X	27.05	21.2	17.3	X	X	X	27.05	19.5	X	X
Viskozite (cp)	14.8	16.2	16.4	17.3	18.5		14.8	17.3	18.3	18.5	X	X	14.8	18.4	19.1	X	X	X	14.8	18.5	X	X
İlaç yükleme Kapasitesi (%)	100.0	98.3	97.2	97.3	96.2		100.0	99.3	96.4	89.2	X	X	100.0	91.2	82.2	X	X	X	100.0	84.2	X	X
Vit E Asetat Miktar tayini (%)	100.0	98.2	97.3	98.1	96.4		100.0	98.2	97.1	96.8	X	X	100.0	97.3	95.2	X	X	X	100.0	95.7	X	X
Enkapsülasyon kapasitesi (%)	90.3	85.2	83.4	80.1	80.0		90.3	90.1	89.2	68.2	X	X	90.3	73.2	62.3	X	X	X	90.3	60.2	X	X
Fosfolipit Miktar Tayini (%)	100.4	98.4	97.2	95.4	93.2		100.4	97.5	96.3	85.2	X	X	100.4	92.5	80.4	X	X	X	100.4	81.0	X	X

*Yarı saydam, kırmızı renkli dispersiyon.

Tablo 107. Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Stabilite Çalışması Sonuçları

	5 ± 3 °C						25 ± 2°C % 60± 5						30 ± 2°C % 65± 5						40 ± 2°C % 75± 5			
	0.	1.	3.	6.	9.	12.	0.	1.	3.	6.	9.	12.	0.	1.	3.	6.	9.	12.	0.	1.	3.	6.
Görünüş	*	*	*	*			*	*	*				*	*	*	X	X		*	*	X	X
İlaç Yükleme Kapasitesi (%)	100.0	98.0	97.0	96.0	98.2		100.0	99.5	96.0	95.5	92.1		100.0	90.2	80.2	X	X		100.0	83.2	X	X
Nem miktarı (%)	0.019	0.021	0.022	0.025	0.027		0.019	0.025	0.027	0.035	0.042		0.019	0.063	0.098	X	X		0.019	0.102	X	X

* Kırmızı renkli toz.

Tablo 108. Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu %5’lik Dekstroz Çözeltisinde Disperse Edildikten Sonra Stabilité Çalışması Sonuçları

	5 ± 3 °C						25 ± 2°C % 60± 5						30 ± 2°C % 65± 5						40 ± 2°C % 75± 5			
	0.	1.	3.	6.	9.	12.	0.	1.	3.	6.	9.	12.	0.	1.	3.	6.	9.	12.	0.	1.	3.	6.
Görünüş	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*		*	*	*	X	X	X	*	*	X	X
pH	6.5	6.3	6.2	6.1	6.1		6.5	6.3	6.4	6.3	6.2		6.5	6.4	6.5	X	X	X	6.5	6.5	X	X
Partikül boyutu (nm)	120.0	120.3	123.3	135.2	138.2		120.0	134.5	136.4	138.2	142.3		120	123	144	X	X	X	120	143	X	X
PDI	0.36	0.29	0.32	0.35	0.38		0.36	0.32	0.35	0.38	0.40		0.36	0.32	0.41	X	X	X	0.36	0.48	X	X
Zeta potansiyeli (mV)	27.5	26.1	26.2	23.2	24.1		27.5	26.3	28.4	26.2	23.2		27.5	21.2	17.3	X	X	X	27.5	19.5	X	X
Viskozite (cp)	11.3	10.3	10.4	11.2	11.5		11.3	12.4	14.2	13.5	14.2		11.3	11.4	10.5	X	X	X	11.3	12.6	X	X
İlaç Yükleme Kapasitesi (%)	100.0	98.3	97.2	97.3	96.2		100.0	99.3	96.4	94.2	93.1		100.0	91.2	82.2	X	X	X	100.0	84.2	X	X
Vit E Asetat miktar tayini (%)	100.0	99.3	98.2	98.0	97.9		100.0	99.1	98.3	97.4	96.2		100.0	98.7	96.3	X	X	X	100.0	97.3	X	X
Yeniden dağılılabılme zamanı (saniye)	10	11	12	12	13		10	12	13	15	16		10	12	15	X	X	X	10	19	X	X
Enkapsülasyon kapasitesi (%)	90.0	89.5	89.2	89.1	89.1		90.0	90.0	88.2	87.4	87.5		90.0	85.2	80.2	X	X	X	90.0	80.1	X	X
Fosfolipit Miktar Tayini (%)	100.3	100.2	99.3	99.8	98.7		100.3	99.3	98.4	97.9	98.3		100.3	98.3	87.4	X	X	X	100.3	85.3	X	X

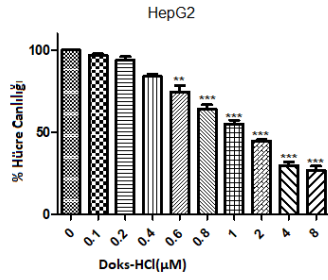
4.6 *In vitro* Sitotoksosite Çalışmalarına ait Bulgular

4.6.1 Hep G2 Hücre Hattı için Bulunan Sitotoksosite Sonuçları

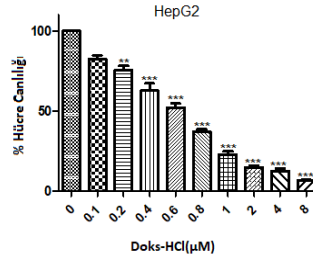
Yöntem 3.2.12’de anlatıldığı üzere Hep G2 hücre hattı içi öncelikle Doks-HCl etkin maddesinin 24., 48. ve 72. Saatlerde IC50 değerleri bulunmuştur. Bu amaçla yapılan MTT çalışmasında hücre canlılığının 24., 48.ve 72. saat değişimine ait veriler Şekil 65’de; 24.saat, 48.saat ve 72.saat IC50 değerinin logaritmik grafiği Şekil 66’da gösterilmiştir.

Doks-HCl etkin maddesi içermeyen plasebo aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu bileşenlerinin 24., 48. ve 72.saatlerde herhangi bir sitotoksik etkisinin olmadığı gösterilmiş ve optimal konsantrasyon belirlenmiştir. 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 mg/mL konsantrasyonunda uygulama yapılarak optimal plasebo aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu dozu 100 mg/mL belirlenmiştir. 24., 48. ve 72.saate ait sonuçlar Şekil 67’de gösterilmiştir.

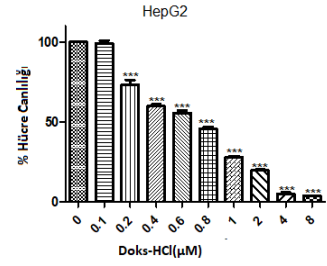
Doks-HCl etkin maddesinin 48.saat IC50 dozu ile Doks-HCl’ün 48.saat IC50 dozunun aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonuna enkapsüle edilmesi ile oluşan sitotoksik etki farklanması gözlemlemek adına yeni bir MTT çalışması dizayn edilmiştir. Bu çalışmada aynı plate üzerinde; hücre içermeyen besi yeri (blank), DMSO (blank), dmsö ve besi yeri içeren hücreler (kontrol), Doks-HCl’ün Hep G2 hücreleri üzerindeki 48. Saat IC50 dozu ve Doks-HCl’ün Hep G2 hücreleri üzerindeki 48. Saat IC50 dozunu içeren aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonunun MTT çalışması yapılmış ve sonuçlar Şekil 68’de verilmiştir. MTT çalışması yapılan plate örnekleri Şekil 69’da verilmiştir.



24. saat IC50

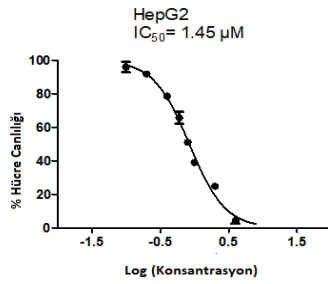


48. saat IC50

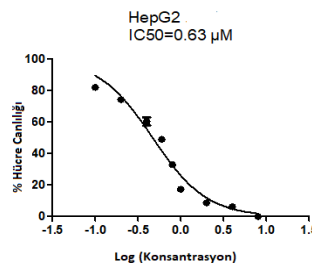


72. saat IC50

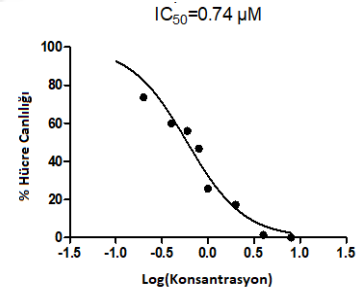
Şekil 65. a. Doks-HCl 24. Saat Hücre canlılığı, b. Doks-HCl 48. Saat Hücre canlılığı, c. Doks-HCl 72. Saat Hücre canlılığı



24. saat IC50

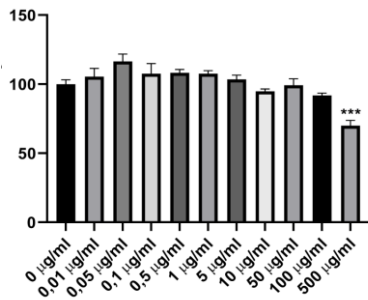


48. saat IC50

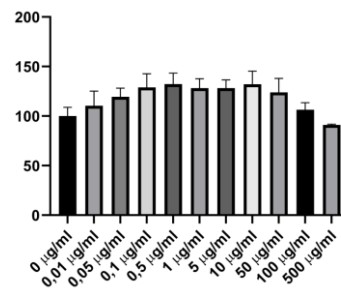


72. saat IC50

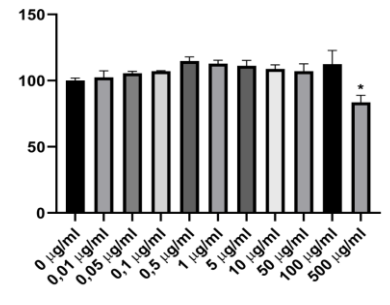
Şekil 66. Doks-HCl 24., 48. ve 72. saat IC50 Logoritmik grafiği/Hep G2



a



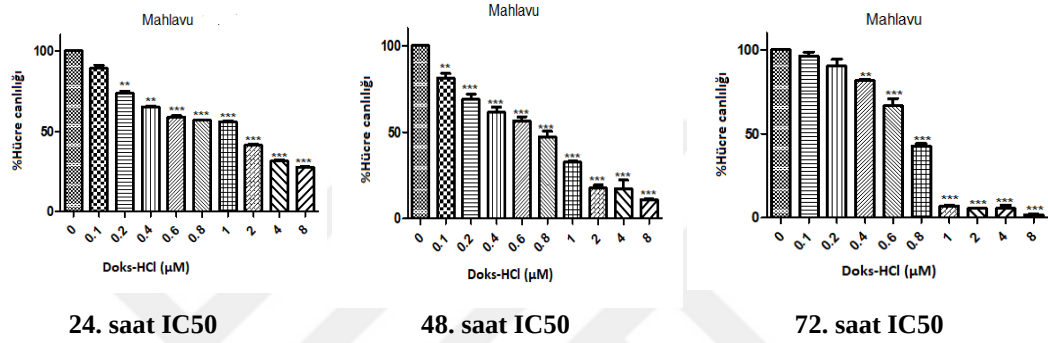
b



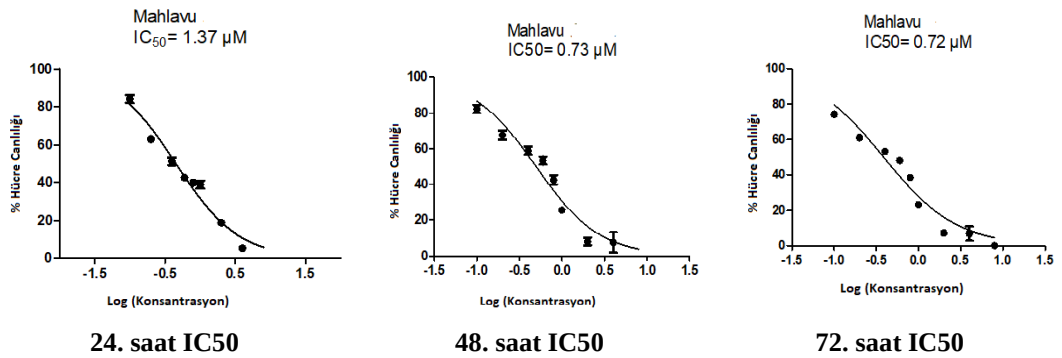
c

Şekil 67. a. Plasebo formülasyon 24. Saat Hücre canlılığı, b. Plasebo formülasyon 48. Saat Hücre canlılığı, c. Plasebo formülasyon 72. Saat Hücre canlılığı

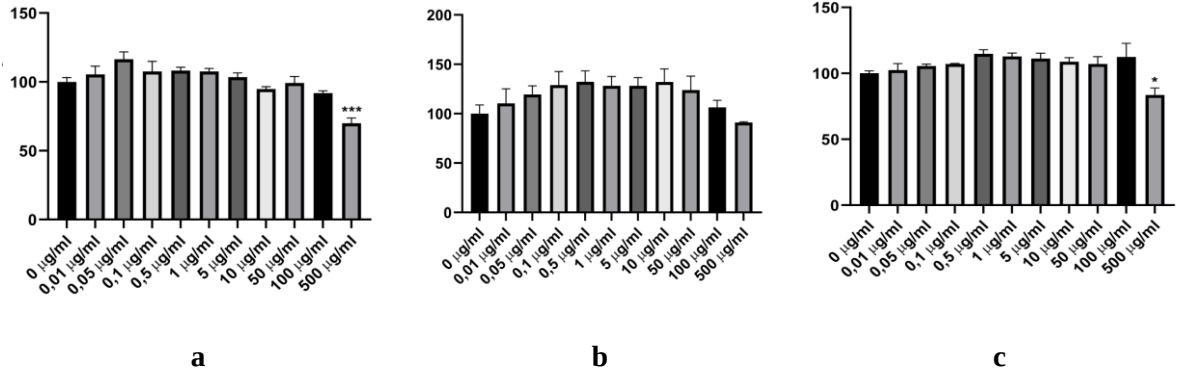
Doks-HCl etkin maddesinin Mahlavu hücre hattı üzerinde 48.saat IC50 dozu ile Doks-HCl'ün 48.saat IC50 dozunu içeren aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonunun sitotoksik etki farklanması gözlemlemek adına yeni bir MTT çalışması dizayn edilmiştir. Bu çalışmada aynı plate üzerinde; hücre içermeyen besi yeri (blank), DMSO (blank), dmsö ve besi yeri içeren hücreler (kontrol), Doks-HCl'ün Mahlavu hücreleri üzerindeki 48. Saat IC50 dozu ve Doks-HCl'ün Mahlavu hücreleri üzerindeki 48. Saat IC50 dozunu içeren aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonunun MTT çalışması yapılmış ve sonuçlar Şekil 73'de verilmiştir.



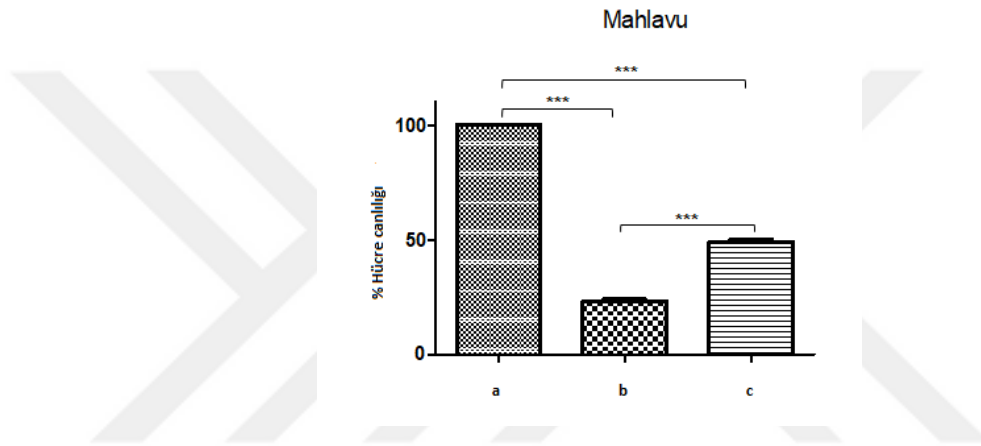
Şekil 70.a. Doks-HCl 24. saat Hücre canlılığı, b. Doks-HCl 48. saat Hücre canlılığı, c. Doks-HCl 72. saat Hücre canlılığı



Şekil 71. Doks-HCl 24., 48. ve 72. saat IC50 Logaritmik grafiği



Şekil 72. a. Plasebo formülasyon 24. Saat Hücre canlılığı, **b.** Plasebo formülasyon 48. Saat Hücre canlılığı, **c.** Plasebo formülasyon 72. Saat Hücre canlılığı



Şekil 73. 1. a.Kontrol, **b.** Doks-HCl 48.saat IC50 dozunu içeren aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu, **c.** Doks-HCl 48.saat IC50 dozu (n=4)

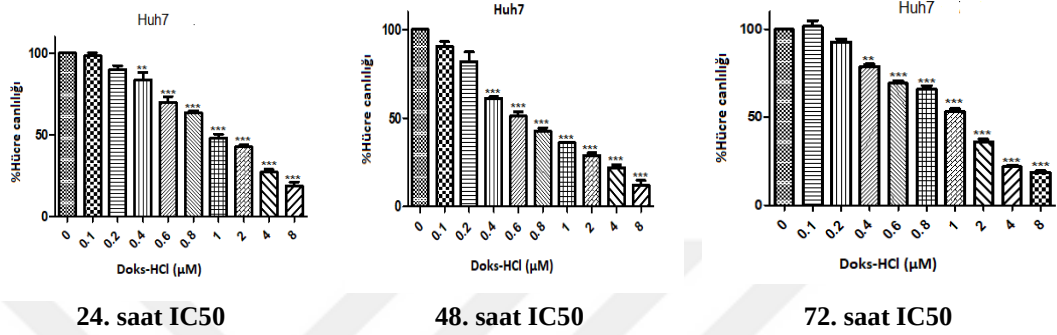
4.6.3 Huh- 7 Hücre Hattı için Bulunan Sitotoksikite Sonuçları

Yöntem 3.2.12’de anlatıldığı üzere Huh 7 hücre hattı içi Doks-HCl etkin maddesinin 24., 48. ve 72. saatlerde IC50 değerleri bulunmuştur. Bu amaçla yapılan MTT çalışmasında hücre canlılığının 24., 48.ve 72. saat değişimine ait veriler; Şekil 74’de, 24.saat, 48.saat ve 72.saat IC50 değerinin logaritmik grafiği Şekil 75’de gösterilmiştir.

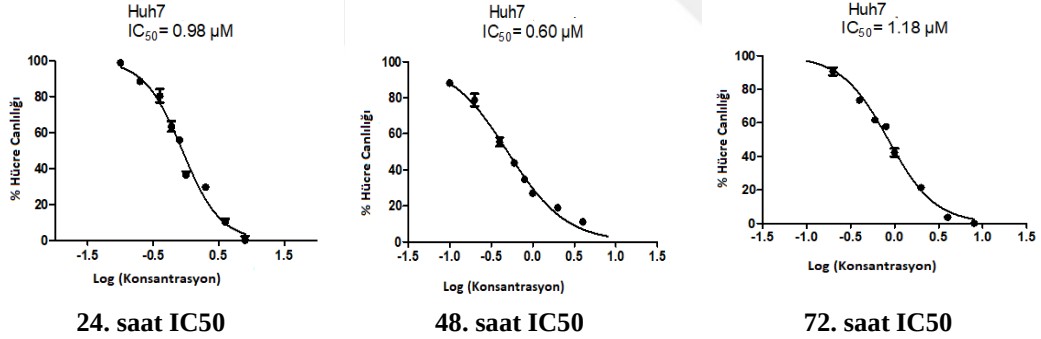
Doks-HCl etkin maddesi içermeyen plasebo aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu bileşenlerinin Huh 7 hücre hattı üzerinde 24., 48. ve 72.saatlerde herhangi bir sitotoksik etkisinin olmadığı gösterilmiş ve optimal konsantrasyon 100 mg/mL belirlenmiştir. 24., 48. ve 72.saate ait sonuçlar Şekil 76’da gösterilmiştir.

Doks-HCl etkin maddesinin 48.saat IC50 dozu ile Doks-HCl’ün 48.saat IC50 dozunu içeren aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonunun Huh 7 hücreleri üzerine

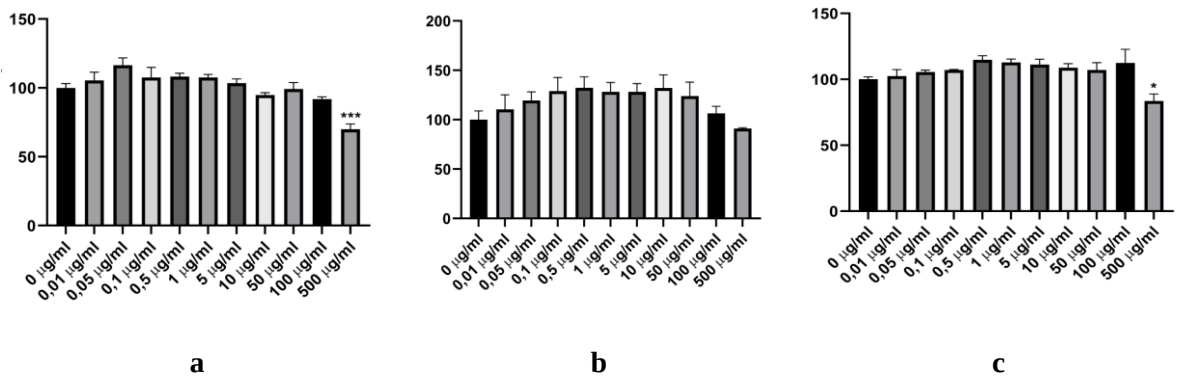
sitotoksik etki farklanması gözlemek adına yeni bir MTT çalışması dizayn edilmiştir. Bu çalışmada aynı plate üzerinde; hücre içermeyen besi yeri (blank), DMSO (blank), dmsö ve besi yeri içeren hücreler (kontrol), Doks-HCl'ün Huh 7 hücreleri üzerindeki 48. Saat IC50 dozu ve Doks-HCl'ün Huh 7 hücreleri üzerindeki 48. Saat IC50 dozunu içeren aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonunun MTT çalışması yapılmış ve sonuçlar Şekil 77'de verilmiştir.



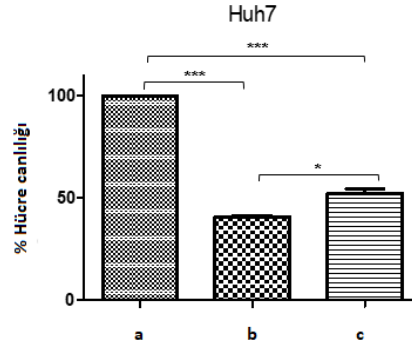
Şekil 74. a. Doks-HCl 24. saat Hücre canlılığı/Huh-7, **b.** Doks-HCl 48. saat Hücre canlılığı/ Huh-7, **c.** Doks-HCl 72. saat Hücre canlılığı/ Huh-7



Şekil 75. Doks-HCl 24., 48. ve 72.saat IC50 logoritmik grafiği/Huh-7



Şekil 76. a. Plasebo formülasyon 24. saat Hücre canlılığı, **b.** Plasebo formülasyon 48. saat Hücre canlılığı, **c.** Plasebo formülasyon 72. saat Hücre canlılığı



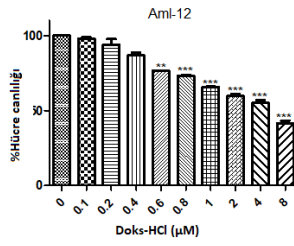
Şekil 77. a.Kontrol, **b.** Doks-HCl 48.saat IC50 dozunu içeren aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu, **c.** Doks-HCl 48.saat IC50 dozu (n=4)

4.6.4 AML 12 Hücre Hattı için Bulunan Sitotoksikite Sonuçları

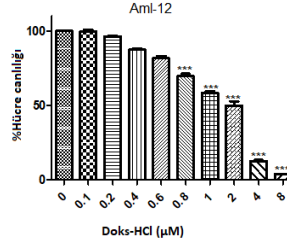
Yöntem 3.2.12’de anlatıldığı üzere AML 12 hücre hattı içi Doks-HCl etkin maddesinin 24., 48. ve 72. saatlerde IC50 değerleri bulunmuştur. Bu amaçla yapılan MTT çalışmasında hücre canlılığının 24., 48.ve 72. saat değişimine ait veriler; Şekil 78’de, 24.saat, 48.saat ve 72.saat IC50 değerinin logaritmik grafiği Şekil 79’da gösterilmiştir

Doks-HCl etkin maddesi içermeyen plasebo aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu bileşenlerinin AML 12 hücre hattı üzerinde 24., 48. ve 72.saatlerde herhangi bir sitotoksik etkisinin olmadığı gösterilmiş ve optimal konsantrasyon 100 mg/mL belirlenmiştir. 24., 48. ve 72.saate ait sonuçlar Şekil 80’de gösterilmiştir.

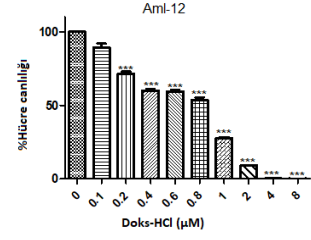
Doks-HCl etkin maddesinin 48.saat IC50 dozu ile Doks-HCl’ün 48.saat IC50 dozunu içeren aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonunun AML 12 hücreleri üzerine sitotoksik etki farklanması gözlemlemek adına yeni bir MTT çalışması dizayn edilmiştir. Bu çalışmada aynı plate üzerinde; hücre içermeyen besi yeri (blank), DMSO (blank), dmsö ve besi yeri içeren hücreler (kontrol), Doks-HCl’ün AML 12 hücreleri üzerindeki 48. Saat IC50 dozu ve Doks-HCl’ün AML 12 hücreleri üzerindeki 48. Saat IC50 dozunu içeren aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonunun MTT çalışması yapılmış ve sonuçlar Şekil 81’de verilmiştir.



24. saat IC50

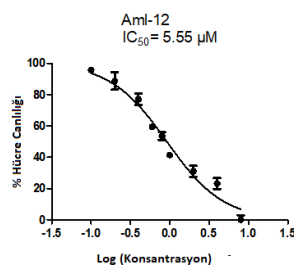


48. saat IC50

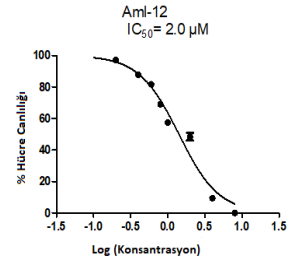


72. saat IC50

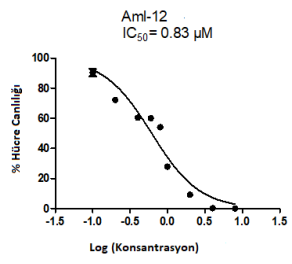
Şekil 78. a. Doks-HCl 24. saat Hücre canlılığı/AML 12, b. Doks-HCl 48. saat Hücre canlılığı/ AML 12, c. Doks-HCl 72. saat Hücre canlılığı/ AML 12



24. saat IC50

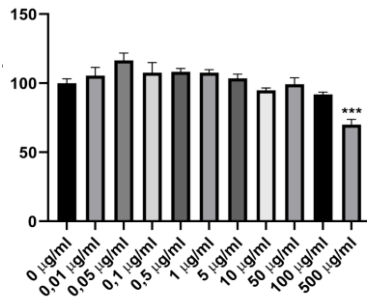


48. saat IC50

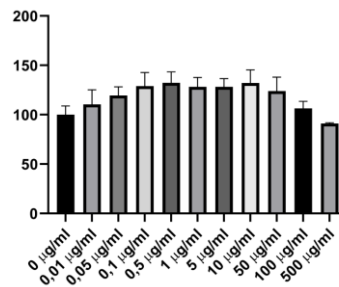


72. saat IC50

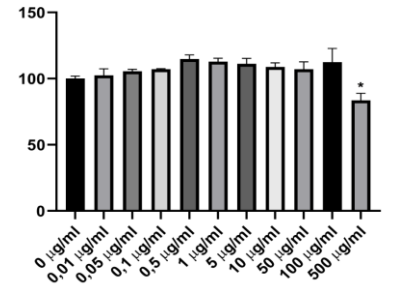
Şekil 79. Doks-HCl 24., 48. ve 72. saat IC50 Logoritmik grafiği/AML 12



a

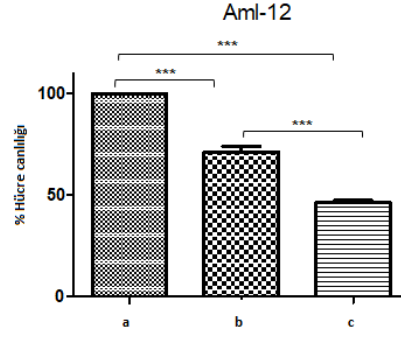


b



c

Şekil 80. a. Plasebo formülasyon 24. saat Hücre canlılığı/AML 12, b. Plasebo formülasyon 48. saat Hücre canlılığı/ AML 12, c. Plasebo formülasyon 72. saat Hücre canlılığı/ AML 12



Şekil 81. a.Kontrol, b. Doks-HCl 48.saat IC50 dozunu içeren aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu, c. Doks-HCl 48.saat IC50 dozu (n=4)

4.7 In vitro Permeabilite Çalışmalarına ait Bulgular

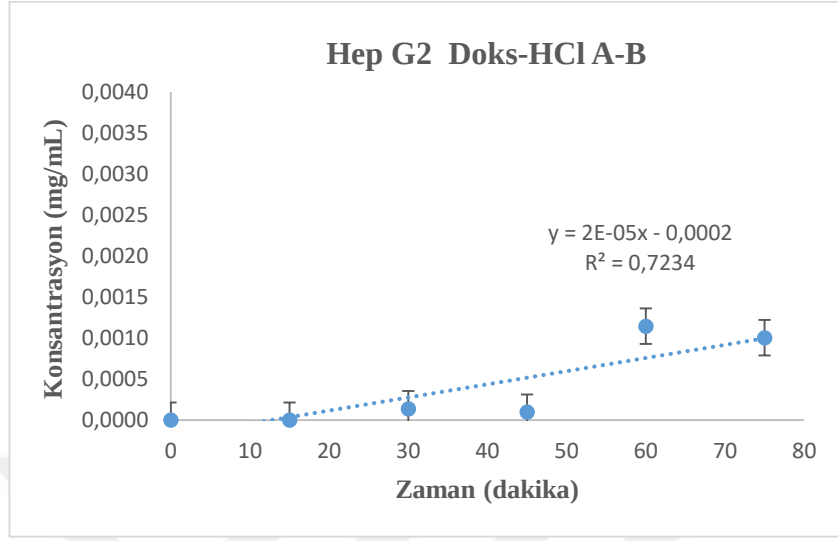
4.7.1 Hep G2 Hücre Hattı ile Yapılan In vitro Permeabilite Çalışmasına ait Bulgular

Yöntem 3.2.13.2’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Hep G2 hücre hattına uygulanan Doks-HCl, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu ve piyasa preparatının konsantrasyonları; Doks-HCl’ün HPLC ile HBSS ortamında valide edilen metodu uygulanarak bulunmuş ve konsantrasyon verileri Tablo 109’da verilmiştir. Hep G2 Doks-HCl A→B konstrasyon-zaman grafiği Şekil 82’de, Hep G2 Doks-HCl B→A konstrasyon-zaman grafiği Şekil 83’de, Hep G2 aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu A→B konstrasyon-zaman grafiği Şekil 84’de, Hep G2 F7-3 prolipozom formülasyonu B→A konstrasyon-zaman grafiği Şekil 85’de, Hep G2 Piyasa Preparatı A→B konstrasyon-zaman grafiği Şekil 86’da, Hep G2 piyasa preparatı B→A konsantrasyon-zaman grafiği Şekil 87’de gösterilmiştir.

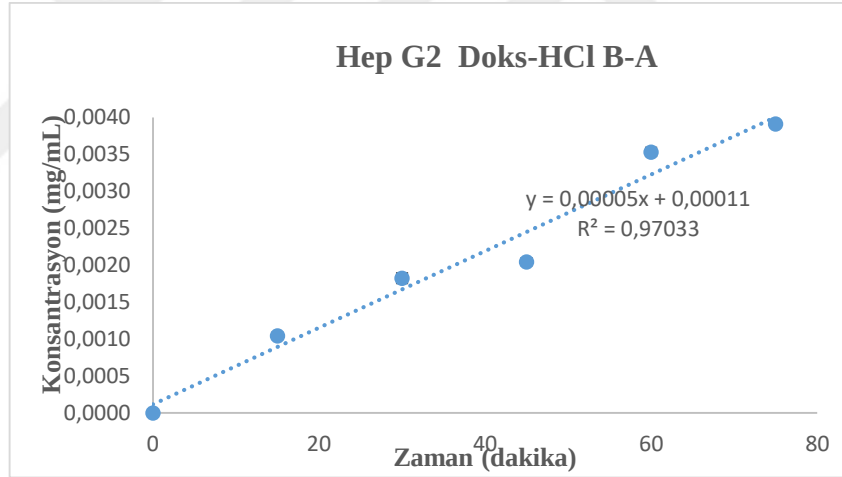
Tablo 109. Hep G2 Hücre Hattı In vitro Permeabilite Çalışması Konsantrasyon Sonuçları (n=3)

	Dok-HCl A→B		Doks-HCl B→A		Aktif Hedefli Pegile F7-Prolipozom A→B		Aktif Hedefli Pegile F7-Prolipozom B→A		Piyasa preparatı A→B		Piyasa preparatı B→A	
	Konsantrasyon (mg/mL)	Ort ±SS	Konsantrasyon (mg/mL)	Ort ±SS	Konsantrasyon (mg/mL)	Ort ±SS	Konsantrasyon (mg/mL)	Ort ±SS	Konsantrasyon (mg/mL)	Ort ±SS	Konsantrasyon (mg/mL)	Ort ±SS
0.dakika 1. kuyucu k	0.00	0.00 ± 0.00	0.00	0.00 ± 0.00	6.0 x10 ⁻⁴	8.0 x10 ⁻⁴ ± 1.5 x10 ⁻⁴	3.0 x10 ⁻⁴	3.0 x10 ⁻⁴ ± 1.0 x10 ⁻⁴	8.0 x10 ⁻⁴	8.0 x10 ⁻⁴ ± 1.0 x10 ⁻⁴	6.0 x10 ⁻⁴	6.0 x10 ⁻⁴ ± 5.8 x10 ⁻⁵
0.dakika 2. kuyucu k	0.00		0.00		8.0 x10 ⁻⁴		4.0 x10 ⁻⁴		7.0 x10 ⁻⁴		5.0 x10 ⁻⁴	
0.dakika 3. kuyucu k	0.00		0.00		9.0 x10 ⁻⁴		2.0 x10 ⁻⁴		7.0 x10 ⁻⁴		6.0 x10 ⁻⁴	
15.dakika 1. kuyucu k	0.00	0.00 ± 0.00	1.1 x10 ⁻³	1.0 x10 ⁻³ ± 4.2 x10 ⁻⁵	1.5 x10 ⁻³	1.7 x10 ⁻⁴ ± 2.1 x10 ⁻⁴	9.0 x10 ⁻⁴	8.0 x10 ⁻⁴ ± 1.0 x10 ⁻⁴	2.3 x10 ⁻³	2.6 x10 ⁻³ ± 4.0 x10 ⁻⁴	1.5 x10 ⁻³	1.7 x10 ⁻³ ± 2.0 x10 ⁻⁴
15.dakika 2. kuyucu k	0.00		1.0 x10 ⁻³		1.8 x10 ⁻³		8.0 x10 ⁻⁴		2.7x10 ⁻³		1.8 x10 ⁻³	
15.dakika 3. kuyucu k	0.00		1.0 x10 ⁻³		1.9 x10 ⁻³		8.0 x10 ⁻⁴		3.0 x10 ⁻³		1.9 x10 ⁻³	
30.dakika 1. kuyucu k	1.0 x10 ⁻⁴	1.0x10 ⁻⁴ ± 0.00	1.8 x10 ⁻³	1.8 x10 ⁻⁴ ± 6.7 x10 ⁻⁵	1.9 x10 ⁻³	2.0 x10 ⁻³ ± 1.1 x10 ⁻⁴	1.2 x10 ⁻³	1.3x10 ⁻³ ± 1.0 x10 ⁻⁴	3.1 x10 ⁻³	3.2 x10 ⁻³ ± 1.0 x10 ⁻⁴	2.0 x10 ⁻³	1.9 x10 ⁻³ ± 1.0 x10 ⁻⁴
30.dakika 2. kuyucu k	1.0 x10 ⁻⁴		1.8 x10 ⁻³		2.1 x10 ⁻³		1.4 x10 ⁻³		3.3 x10 ⁻³		1.9 x10 ⁻³	
30.dakika 3. kuyucu k	1.0 x10 ⁻⁴		1.9 x10 ⁻³		2.1 x10 ⁻³		1.3 x10 ⁻³		3.1 x10 ⁻³		1.8 x10 ⁻³	
45.dakika 1. kuyucu k	1.0 x10 ⁻⁴	1.0x10 ⁻⁴ ± 0.00	2.0 x10 ⁻³	2.0 x10 ⁻³ ± 5.0 x10 ⁻⁵	2.2 x10 ⁻³	2.4 x10 ⁻³ ± 3.2 x10 ⁻⁴	1.5 x10 ⁻³	1.6 x10 ⁻³ ± 1.0 x10 ⁻⁴	3.3 x10 ⁻³	3.2 x10 ⁻³ ± 1.0 x10 ⁻⁴	2.1x10 ⁻³	2.2 x10 ⁻³ ± 1.1 x10 ⁻⁴
45.dakika 2. kuyucu k	1.0 x10 ⁻⁴		2.1 x10 ⁻³		2.3 x10 ⁻³		1.6 x10 ⁻³		3.2 x10 ⁻³		2.3x10 ⁻³	
45.dakika 3. kuyucu k	1.0 x10 ⁻⁴		2.0 x10 ⁻³		2.8 x10 ⁻³		1.7 x10 ⁻³		3.1 x10 ⁻³		2.3x10 ⁻³	
60..dakika 1. kuyucu k	1.0 x10 ⁻³	1.0x10 ⁻³ ± 1.8x10 ⁻⁴	3.5 x10 ⁻³	3.5 x10 ⁻³ ± 5.8 x10 ⁻⁵	3.2 x10 ⁻³	3.3x10 ⁻³ ± 1.7 x10 ⁻⁴	2.1 x10 ⁻³	2.3x10 ⁻³ ± 2.0 x10 ⁻⁴	3.7 x10 ⁻³	3.7 x10 ⁻³ ± 1.0 x10 ⁻⁴	3.1x10 ⁻³	3.0 x10 ⁻³ ± 1.0 x10 ⁻⁴
60 .dakika 2. kuyucu k	1.1 x10 ⁻³		3.5 x10 ⁻³		3.2 x10 ⁻³		2.3 x10 ⁻³		3.8 x10 ⁻³		3.0x10 ⁻³	
60.dakika 3. kuyucu k	1.3 x10 ⁻³		3.6 x10 ⁻³		3.5 x10 ⁻³		2.4 x10 ⁻³		3.7 x10 ⁻³		2.9x10 ⁻³	
75.dakika 1. kuyucu k	1.0 x10 ⁻³	1.0x10 ⁻³ ± 0.00	3.9 x10 ⁻³	3.9 x10 ⁻³ ± 1.9 x10 ⁻⁵	3.8 x10 ⁻³	3.9x10 ⁻³ ± 5.7 x10 ⁻⁴	2.5 x10 ⁻³	2.5x10 ⁻³ ± 2.0 x10 ⁻⁴	4.0 x10 ⁻³	3.9 x10 ⁻³ ± 1.0 x10 ⁻⁴	3.1x10 ⁻³	3.0 x10 ⁻³ ± 5.7 x10 ⁻⁵
75.dakika 2. kuyucu k	1.0 x10 ⁻³		3.9 x10 ⁻³		3.9 x10 ⁻³		2.3 x10 ⁻³		3.8 x10 ⁻³		3.0x10 ⁻³	

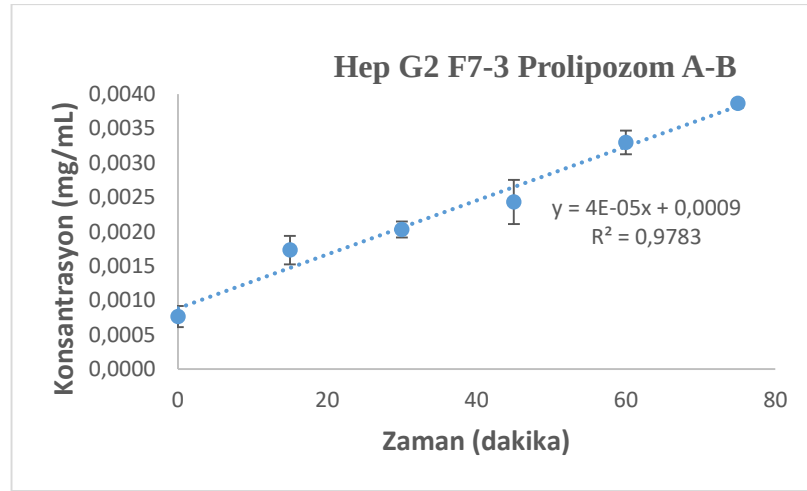
75.dakika 3. kuyucu k	1.0×10^{-3}		3.9×10^{-3}		3.9×10^{-3}		2.6×10^{-3}		3.9×10^{-3}		3.0×10^{-3}	



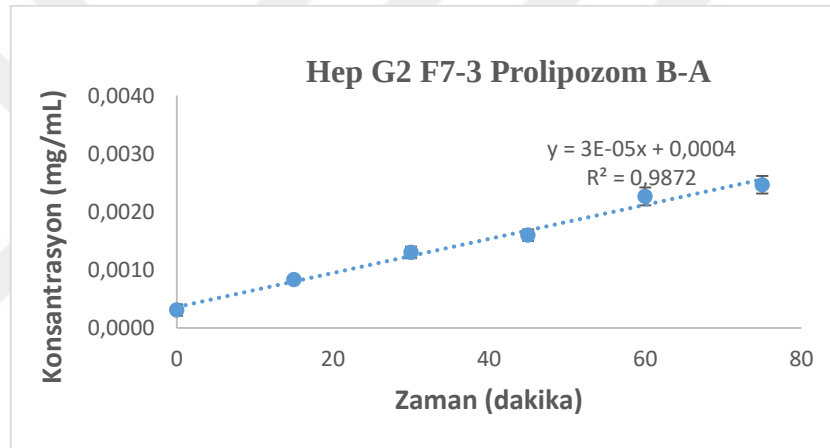
Şekil 82. Hep G2 Doks-HCl A→B Konstrasyon-zaman grafiği



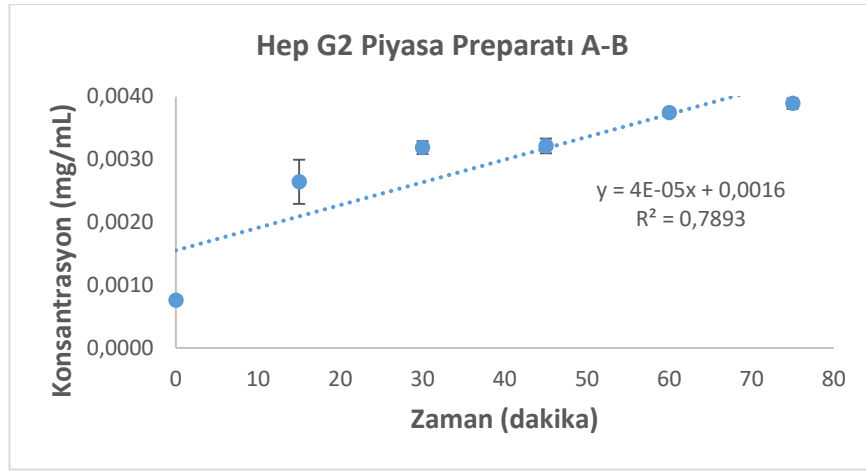
Şekil 83. Hep G2 Doks-HCl B→A Konstrasyon-zaman grafiği



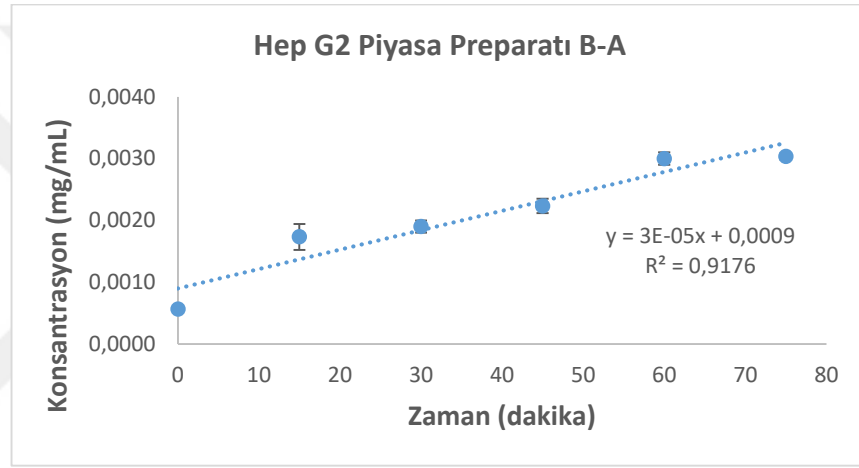
Şekil 84. Hep G2 Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu A→B
Konstrasyon-zaman grafiği



Şekil 85. Hep G2 Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu B→A
Konstrasyon-zaman grafiği



Şekil 86. Hep G2 Piyasa Preparatı A→B Konstrasyon-zaman grafiği



Şekil 87. Hep G2 Piyasa Preparatı B→A Konstrasyon-zaman grafiği

Zamana karşı çizilen kümülatif Doks-HCl miktarları grafiğinin eğim değerleri (dQ/dt) ve Eşitlik 5 kullanılarak etkili permeabilite değeri hem apikalden bazolaterale ($P_{A \rightarrow B}$) geçiş için hemde bazolateralinden apikale ($P_{B \rightarrow A}$) geçiş için hesaplanmıştır. Eşitlik 6 kullanılarak Effluks değerleri hesaplanmıştır. Doks-HCl, F7-3 prolipozom formülasyny ve piyasa preparatı ile Hep G2 hücre hattında yapılan permeabilite ve effluks değerleri Tablo 110'de verilmiştir. $P_{A \rightarrow B}$ ve $P_{B \rightarrow A}$ için çalışılan A_M ve A_{OH} için Doks-HCl miktarı saptanamamıştır.

Tablo 110. Hep G2 Hücre hattı Permeabilite ve Effluks sonuçları

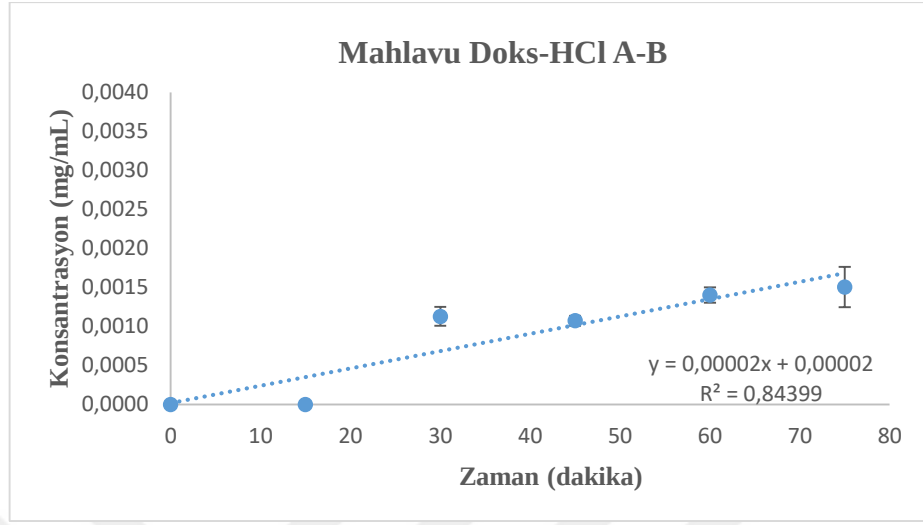
	Başlangıç konsantrasyonu A→B (mg/mL)	Başlangıç konsantrasyonu B→A (mg/mL)	Transwell alanı (cm ²)	Papp A→B (cm/s)	Papp B→A (cm/s)	Effluks
Doks-HCl	0.0040 ±0.0002	0.0040±0.0001	4.67	$1.78 \times 10^{-5} \pm 1 \times 10^{-7}$	$4.46 \times 10^{-5} \pm 3 \times 10^{-7}$	2.50±0.07
Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu	0.0038±0.0001	0.0040±0.0002		$3.76 \times 10^{-5} \pm 3 \times 10^{-7}$	$2.68 \times 10^{-5} \pm 1 \times 10^{-7}$	0.71±0.08
Piyasa Preparatı	0.0040±0.0002	0.0040±0.0003		$3.57 \times 10^{-5} \pm 4 \times 10^{-7}$	$2.68 \times 10^{-5} \pm 2 \times 10^{-7}$	0.75±0.05

4.7.2 Mahlavu Hücre Hattı ile Yapılan In vitro Permeabilite Çalışmasına ait Bulgular

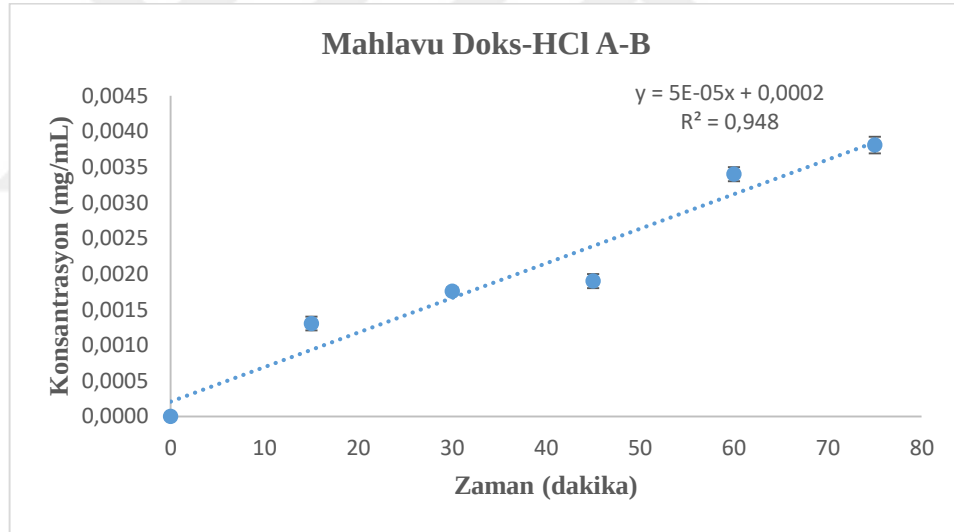
Yöntem 3.2.13.2’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Mahlavu hücre hattına uygulanan Doks-HC, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu ve piyasa preparatının konsantrasyonları; Doks-HCl’ün HPLC ile HBSS ortamında valide edilen metodu uygulanarak hesaplanmış ve konsantrasyon verileri Tablo 111’de verilmiştir. Mahlavu Doks-HCl A→B konsantrasyon-zaman grafiği Şekil 88’de, Mahlavu Doks-HCl B→A konsantrasyon-zaman grafiği Şekil 89’de, Mahlavu aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu A→B konsantrasyon-zaman grafiği Şekil 90’da, Mahlavu F7-3 prolipozom formülasyonu B→A konsantrasyon-zaman grafiği Şekil 91’de, Mahlavu piyasa preparatı A→B konsantrasyon-zaman grafiği Şekil 92’de, Mahlavu piyasa preparatı B→A konsantrasyon-zaman grafiği Şekil 93’de gösterilmiştir.

Tablo 111. Mahlavu Hücre Hattı In vitro Permeabilite Çalışması Konsantrasyon Sonuçları (n=3)

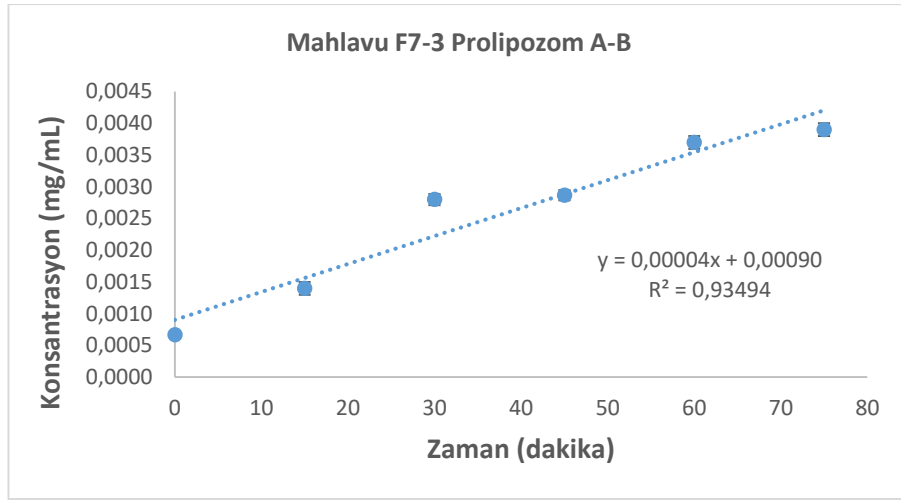
	Dok-HCl A→B		Doks-HCl B→A		Aktif Hedefli Pegile F7-Prolipozom A→B		Aktif Hedefli Pegile F7-Prolipozom B→A		Piyasa preparatı A→B		Piyasa preparatı B→A	
	Konsantrasyon (mg/mL)	Ort ±S	Konsantrasyon (mg/mL)	Ort ±S	Konsantrasyon (mg/mL)	Ort ±S	Konsantrasyon (mg/mL)	Ort ±S	Konsantrasyon (mg/mL)	Ort ±S	Konsantrasyon (mg/mL)	Ort ±S
0.dakika 1. kuyucuk	0.00	0.00	0.00	0.00	0.5 x10 ⁻⁴	0.7 x10 ⁻⁴	1.0 x10 ⁻⁴	1.0 x10 ⁻⁴	8.0 x10 ⁻⁴	8.0 x10 ⁻⁴	5.0 x10 ⁻⁴	6.0 x10 ⁻⁴
0.dakika 2. kuyucuk	0.00	±0.00	0.00	±0.00	0.7 x10 ⁻⁴	±2.0 x10 ⁻⁴	2.0 x10 ⁻⁴	±0.00	8.0 x10 ⁻⁴	±0.00	6.0 x10 ⁻⁴	±0.00
0.dakika 3. kuyucuk	0.00		0.00		0.8 x10 ⁻⁴		2.0 x10 ⁻⁴		8.0 x10 ⁻⁴		6.0 x10 ⁻⁴	
15.dakika 1. kuyucuk	0.00	0.00	1.2 x10 ⁻³	1.3 x10 ⁻³	1.1 x10 ⁻³	1.4 x10 ⁻³	1.0 x10 ⁻³	1.0 x10 ⁻³	2.7 x10 ⁻³	2.7 x10 ⁻³	1.8 x10 ⁻³	1.8 x10 ⁻³
15.dakika 2. kuyucuk	0.00	±0.00	1.3 x10 ⁻³	±9.5 x10 ⁻⁵	1.5 x10 ⁻³	±3.0 x10 ⁻⁴	1.0 x10 ⁻³	±1.0 x10 ⁻⁴	2.7 x10 ⁻³	±1.0 x10 ⁻⁴	1.7 x10 ⁻³	±1.0 x10 ⁻⁴
15.dakika 3. kuyucuk	0.00		1.4 x10 ⁻³		1.6 x10 ⁻³		1.1 x10 ⁻³		2.8 x10 ⁻³		1.8 x10 ⁻³	
30.dakika 1. kuyucuk	1.0 x10 ⁻⁴	1.1 x10 ⁻⁴	1.8 x10 ⁻³	1.8 x10 ⁻³	2.9 x10 ⁻³	2.8 x10 ⁻³	1.6 x10 ⁻³	1.4 x10 ⁻³	3.2 x10 ⁻³	3.3 x10 ⁻³	2.0 x10 ⁻³	2.0 x10 ⁻³
30.dakika 2. kuyucuk	1.2 x10 ⁻⁴	±1.2 x10 ⁻⁴	1.7 x10 ⁻³	±5.1 x10 ⁻⁵	2.8 x10 ⁻³	±1.0 x10 ⁻⁴	1.3 x10 ⁻³	±2.0 x10 ⁻⁴	3.3 x10 ⁻³	±1.0 x10 ⁻⁴	1.9 x10 ⁻³	±1.0 x10 ⁻⁴
30.dakika 3. kuyucuk	1.2 x10 ⁻⁴		1.8 x10 ⁻³		2.7 x10 ⁻³		1.2 x10 ⁻³		3.4 x10 ⁻³		2.0 x10 ⁻³	
45.dakika 1. kuyucuk	1.1 x10 ⁻⁴	1.1 x10 ⁻⁴	2.0 x10 ⁻³	1.9 x10 ⁻³	2.9 x10 ⁻³	2.9 x10 ⁻³	1.8 x10 ⁻³	1.9 x10 ⁻³	3.1 x10 ⁻³	3.1 x10 ⁻³	2.0 x10 ⁻³	2.1 x10 ⁻³
45.dakika 2. kuyucuk	1.0 x10 ⁻⁴	±6.4 x10 ⁻⁵	1.9 x10 ⁻³	±1.0 x10 ⁻⁴	2.8 x10 ⁻³	±1.0 x10 ⁻⁴	1.9 x10 ⁻³	±1.0 x10 ⁻⁴	3.2 x10 ⁻³	±1.0 x10 ⁻⁴	2.2 x10 ⁻³	±1.0 x10 ⁻⁴
45.dakika 3. kuyucuk	1.1 x10 ⁻⁴		1.8 x10 ⁻³		2.9 x10 ⁻³		1.9 x10 ⁻³		3.0 x10 ⁻³		2.1 x10 ⁻³	
60..dakika 1. kuyucuk	1.3 x10 ⁻⁴	1.4 x10 ⁻⁴	3.4 x10 ⁻³	3.4 x10 ⁻³	3.6 x10 ⁻³	3.7 x10 ⁻³	2.1 x10 ⁻³	2.1 x10 ⁻³	3.8 x10 ⁻³	3.7 x10 ⁻³	3.1 x10 ⁻³	3.0 x10 ⁻³
60 dakika 2. kuyucuk	1.4 x10 ⁻⁴	±9.8 x10 ⁻⁵	3.5 x10 ⁻³	±1.0 x10 ⁻⁴	3.7 x10 ⁻³	±1.0 x10 ⁻⁴	2.0 x10 ⁻³	±1.0 x10 ⁻⁴	3.6 x10 ⁻³	±1.0 x10 ⁻⁴	3.0 x10 ⁻³	±1.0 x10 ⁻⁴
60.dakika 3. kuyucuk	1.5 x10 ⁻⁴		3.3 x10 ⁻³		3.8 x10 ⁻³		2.2 x10 ⁻³		3.7 x10 ⁻³		2.9 x10 ⁻³	
75.dakika 1. kuyucuk	1.2 x10 ⁻⁴	1.5 x10 ⁻⁴	3.9 x10 ⁻³	3.8 x10 ⁻³	3.9 x10 ⁻³	3.9 x10 ⁻³	2.1 x10 ⁻³	2.1 x10 ⁻³	4.1 x10 ⁻³	4.0 x10 ⁻³	3.0 x10 ⁻³	3.0 x10 ⁻³
75.dakika 2. kuyucuk	1.6 x10 ⁻⁴	±2.6 x10 ⁻⁴	3.8 x10 ⁻³	±1.1 x10 ⁻⁴	3.9 x10 ⁻³	±0.00	2.2 x10 ⁻³	±1.0 x10 ⁻⁴	3.9 x10 ⁻³	±1.0 x10 ⁻⁴	3.1 x10 ⁻³	±1.0 x10 ⁻⁴
75.dakika 3. kuyucuk	1.7 x10 ⁻⁴		3.7 x10 ⁻³		3.9 x10 ⁻³		2.0 x10 ⁻³		3.9 x10 ⁻³		2.9 x10 ⁻³	



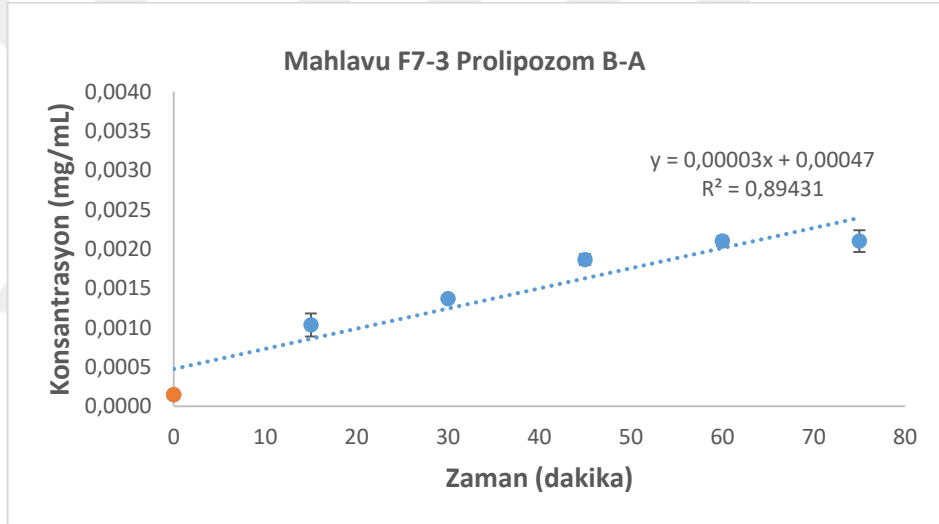
Şekil 88. Mahlavu Doks-HCl A→B Konstrasyon-zaman grafiği



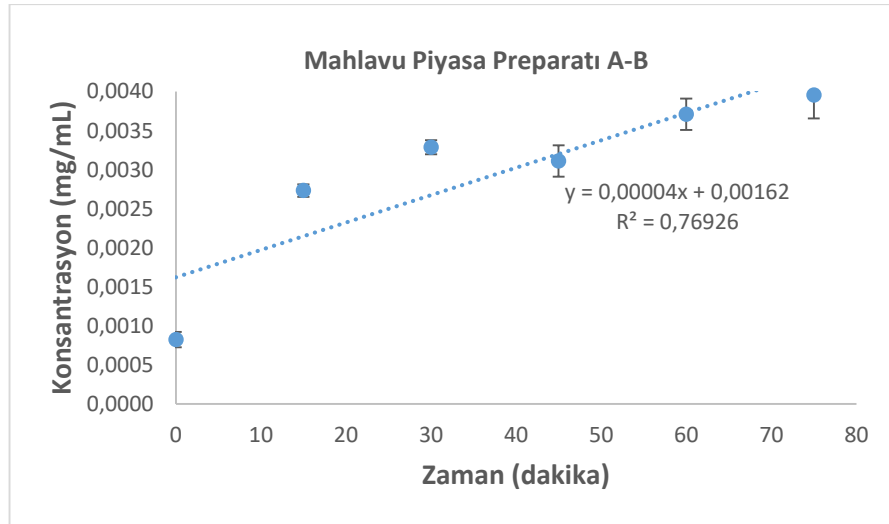
Şekil 89. Mahlavu Doks-HCl B→A Konstrasyon-zaman grafiği



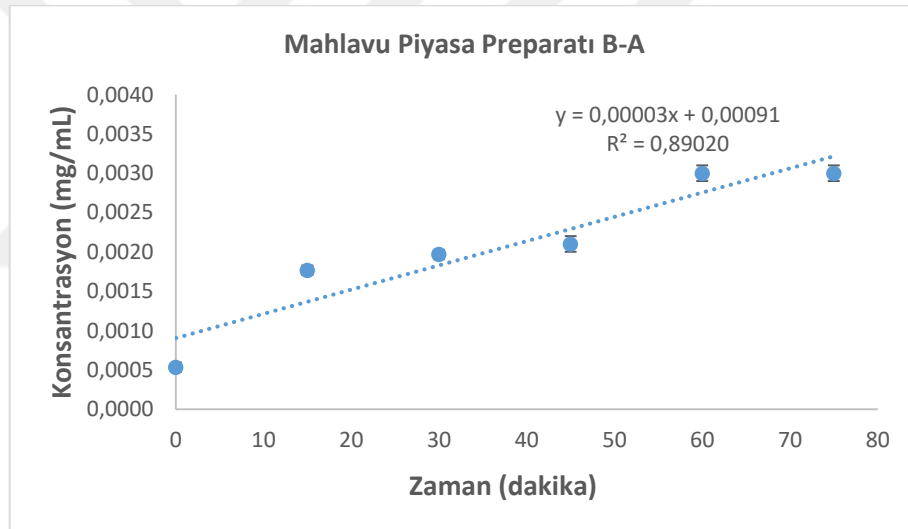
Şekil 90. Mahlavu Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu A→B
Konstrasyon-zaman grafiği



Şekil 91. Mahlavu Aktif Hedefli F7-3 Prolipozom Formülasyonu B→A
Konstrasyon-zaman grafiği



Şekil 92. Mahlavu Piyasa Preparatı A→B Konstrasyon-zaman grafiği



Şekil 93. Mahlavu Piyasa Preparatı B→A Konstrasyon-zaman grafiği

Zamana karşı çizilen kümülatif Doks-HCl miktarları grafiğinin eğim değerleri (dQ/dt) ve Eşitlik 5 kullanılarak etkili permeabilite değeri hem apikalden bazolaterale ($P_{A \rightarrow B}$) geçiş için hemde bazolateralden apikale ($P_{B \rightarrow A}$) geçiş için hesaplanmıştır. Eşitlik 6 kullanılarak Effluks değerleri hesaplanmıştır. Doks-HCl, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyunu ve piyasa preparatı ile Mahlavu hücre hattında yapılan permeabilite ve effluks değerleri Tablo 112’de verilmiştir. $P_{A \rightarrow B}$ ve $P_{B \rightarrow A}$ için çalışılan A_M ve A_{OH} için Doks-HCl miktarı saptanamamıştır.

Tablo 112. Mahlavu Hücre hattı Permeabilite ve Effluks sonuçları

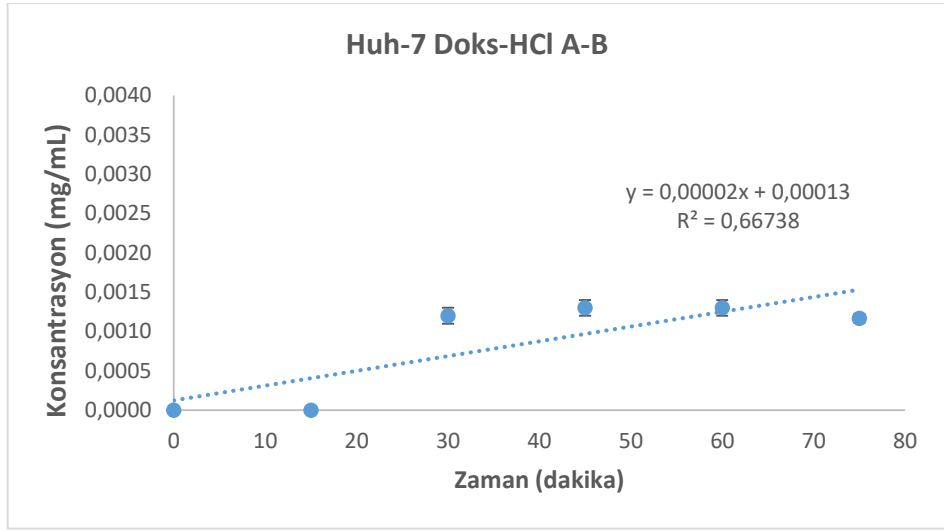
	Başlangıç konsantrasyonu A→B (mg/mL)	Başlangıç konsantrasyonu B→A (mg/mL)	Transwell alanı (cm ²)	Papp A→B	Papp B→A	Effluks
Doks-HCl	0.0040±0.0001	0.0038±0.0001	4.67	$1.78 \times 10^{-5} \pm 2 \times 10^{-7}$	$4.70 \times 10^{-5} \pm 2 \times 10^{-7}$	2.63± 0.05
Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu	0.0039±0.0002	0.0040±0.0001		$3.66 \times 10^{-5} \pm 3 \times 10^{-7}$	$2.68 \times 10^{-5} \pm 1 \times 10^{-7}$	0.73±0.04
Piyasa Preparatı	0.0040±0.0003	0.0038±0.0002		$3.57 \times 10^{-5} \pm 1 \times 10^{-7}$	$2.82 \times 10^{-5} \pm 1 \times 10^{-7}$	0.79±0.03

4.7.3 Huh-7 Hücre Hattı ile Yapılan In vitro Permeabilite Çalışmasına ait Bulgular

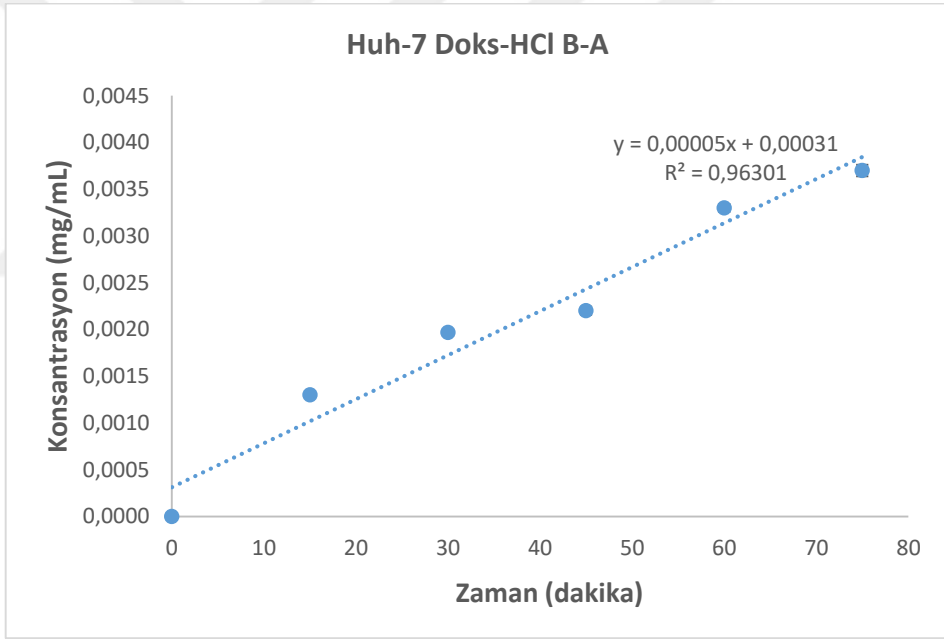
Yöntem 3.2.13.2’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Huh-7 hücre hattına uygulanan Doks-HCl, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu ve piyasa preparatının konsantrasyonları; Doks-HCl’ün HPLC ile HBSS ortamında valide edilen metodu uygulanarak hesaplanmış ve konsantrasyon verileri Tablo 113’de verilmiştir. Huh-7 Doks-HCl A→B konsantrasyon-zaman grafiği Şekil 94’de, Huh-7 Doks-HCl B→A konsantrasyon-zaman grafiği Şekil 95’de, Huh-7 aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu A→B konsantrasyon-zaman grafiği Şekil 96’da, Huh-7 aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu B→A konsantrasyon-zaman grafiği Şekil 97’de, Huh-7 piyasa preparatı A→B konsantrasyon-zaman grafiği Şekil 98’de, Huh-7 piyasa preparatı B→A konsantrasyon-zaman grafiği Şekil 99’da gösterilmiştir.

Tablo 113. Huh-7 Hücre Hattı In vitro Permeabilite Çalışması Konsantrasyon Sonuçları (n=3)

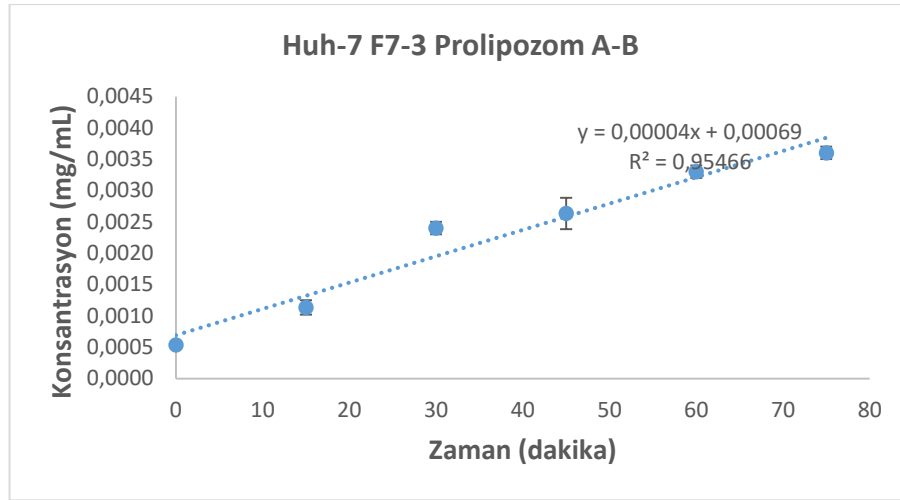
	Dok-HCl A→B		Doks-HCl B→A		Aktif Hedefli Pegile F7-Prolipozom A→B		Aktif Hedefli Pegile F7-Prolipozom B→A		Piyasa preparatı A→B		Piyasa preparatı B→A	
	Konsantrasyon (mg/mL)	Ort ±SS	Konsantrasyon (mg/mL)	Ort ±SS	Konsantrasyon (mg/mL)	Ort ±SS	Konsantrasyon (mg/mL)	Ort ±SS	Konsantrasyon (mg/mL)	Ort ±SS	Konsantrasyon (mg/mL)	Ort ±SS
0.dakika 1. kuyucuk	0.00	0.00 ±0.00	0.00	0.00 ±0.00	5.0 x10 ⁻⁴	5.0 x10 ⁻⁴ ±0.6 x10 ⁻⁵	1.0 x10 ⁻⁴	2.0 x10 ⁻⁴ ±1.0 x10 ⁻⁴	0.00	4.0 x10 ⁻⁴ ±4.0 x10 ⁻⁴	1.0 x10 ⁻⁴	2.3 x10 ⁻⁴ ±2.0 x10 ⁻⁴
0.dakika 2. kuyucuk	0.00		0.00		6.0 x10 ⁻⁴		2.0 x10 ⁻⁴		6.0 x10 ⁻⁴		2.0 x10 ⁻⁴	
0.dakika 3. kuyucuk	0.00		0.00		5.0 x10 ⁻⁴		3.0 x10 ⁻⁴		7.0 x10 ⁻⁴		4.0 x10 ⁻⁴	
15.dakika 1. kuyucuk	0.00	0.00 ±0.00	1.2 x10 ⁻³	1.3 x10 ⁻³ ±1.0 x10 ⁻⁴	1.0 x10 ⁻³	1.1 x10 ⁻³ ±1.2 x10 ⁻⁴	1.2 x10 ⁻³	1.3 x10 ⁻³ ±1.0 x10 ⁻⁴	2.6 x10 ⁻³	2.7 x10 ⁻³ ±2.0 x10 ⁻⁴	1.2 x10 ⁻³	1.6 x10 ⁻³ ±4.0 x10 ⁻⁴
15.dakika 2. kuyucuk	0.00		1.3 x10 ⁻³		1.2 x10 ⁻³		1.3 x10 ⁻³		2.5 x10 ⁻³		1.6 x10 ⁻³	
15.dakika 3. kuyucuk	0.00		1.4 x10 ⁻³		1.2 x10 ⁻³		1.4 x10 ⁻³		2.9 x10 ⁻³		1.9 x10 ⁻³	
30.dakika 1. kuyucuk	1.2 x10 ⁻³	1.2 x10 ⁻³ ±1.0 x10 ⁻⁴	1.9 x10 ⁻³	2.0 x10 ⁻³ ±1.6 x10 ⁻⁴	2.5 x10 ⁻³	2.4 x10 ⁻³ ±1.0 x10 ⁻⁴	1.3 x10 ⁻³	1.4 x10 ⁻³ ±1.0 x10 ⁻⁴	3.2 x10 ⁻³	3.2 x10 ⁻³ ±1.0 x10 ⁻⁴	1.9 x10 ⁻³	1.8 x10 ⁻³ ±1.0 x10 ⁻⁴
30.dakika 2. kuyucuk	1.1 x10 ⁻³		1.9 x10 ⁻³		2.3 x10 ⁻³		1.4 x10 ⁻³		3.1 x10 ⁻³		1.8 x10 ⁻³	
30.dakika 3. kuyucuk	1.3 x10 ⁻³		2.1 x10 ⁻³		2.4 x10 ⁻³		1.5 x10 ⁻³		3.3 x10 ⁻³		1.7 x10 ⁻³	
45.dakika 1. kuyucuk	1.3 x10 ⁻³	1.3 x10 ⁻³ ±1.0 x10 ⁻⁴	2.1 x10 ⁻³	2.2 x10 ⁻³ ±1.6 x10 ⁻⁴	2.4 x10 ⁻³	2.6 x10 ⁻³ ±2.5 x10 ⁻⁴	2.0 x10 ⁻³	2.1 x10 ⁻³ ±6.0 x10 ⁻⁴	3.0 x10 ⁻³	3.1 x10 ⁻³ ±1.0 x10 ⁻⁴	1.9 x10 ⁻³	2.1 x10 ⁻³ ±2.0 x10 ⁻⁴
45.dakika 2. kuyucuk	1.2 x10 ⁻³		2.2 x10 ⁻³		2.6 x10 ⁻³		2.1 x10 ⁻³		3.1 x10 ⁻³		2.1 x10 ⁻³	
45.dakika 3. kuyucuk	1.3 x10 ⁻³		2.3 x10 ⁻³		2.9 x10 ⁻³		2.1 x10 ⁻³		3.2 x10 ⁻³		2.2 x10 ⁻³	
60..dakika 1. kuyucuk	1.2 x10 ⁻³	1.3 x10 ⁻³ ±1.0 x10 ⁻⁴	3.2 x10 ⁻³	3.3 x10 ⁻³ ±1.0 x10 ⁻⁴	3.2 x10 ⁻³	3.3 x10 ⁻³ ±1.0 x10 ⁻⁴	2.2 x10 ⁻³	2.3 x10 ⁻³ ±1.0 x10 ⁻⁴	3.5 x10 ⁻³	3.5 x10 ⁻³ ±1.0 x10 ⁻⁴	2.8 x10 ⁻³	2.9 x10 ⁻³ ±2.0 x10 ⁻⁴
60 .dakika 2. kuyucuk	1.4 x10 ⁻³		3.3 x10 ⁻³		3.3 x10 ⁻³		2.3 x10 ⁻³		3.5 x10 ⁻³		2.9 x10 ⁻³	
60.dakika 3. kuyucuk	1.3 x10 ⁻⁴		3.4 x10 ⁻³		3.4 x10 ⁻³		2.4 x10 ⁻³		3.6 x10 ⁻³		3.1 x10 ⁻³	
75.dakika 1. kuyucuk	1.1 x10 ⁻³	1.2 x10 ⁻³ ±5.7 x10 ⁻⁵	3.8 x10 ⁻³	3.7 x10 ⁻³ ±1.7 x10 ⁻⁴	3.5 x10 ⁻³	3.6 x10 ⁻³ ±1.0 x10 ⁻⁴	2.5 x10 ⁻³	2.6 x10 ⁻³ ±1.0 x10 ⁻⁴	3.9 x10 ⁻³	3.9 x10 ⁻³ ±1.0 x10 ⁻⁴	3.0 x10 ⁻³	3.2 x10 ⁻³ ±2.0 x10 ⁻⁴
75.dakika 2. kuyucuk	1.2 x10 ⁻³		3.5 x10 ⁻³		3.6 x10 ⁻³		2.6 x10 ⁻³		3.8 x10 ⁻³		3.2 x10 ⁻³	
75.dakika 3. kuyucuk	1.2 x10 ⁻³		3.8 x10 ⁻³		3.7 x10 ⁻³		2.7 x10 ⁻³		4.0 x10 ⁻³		3.3 x10 ⁻³	



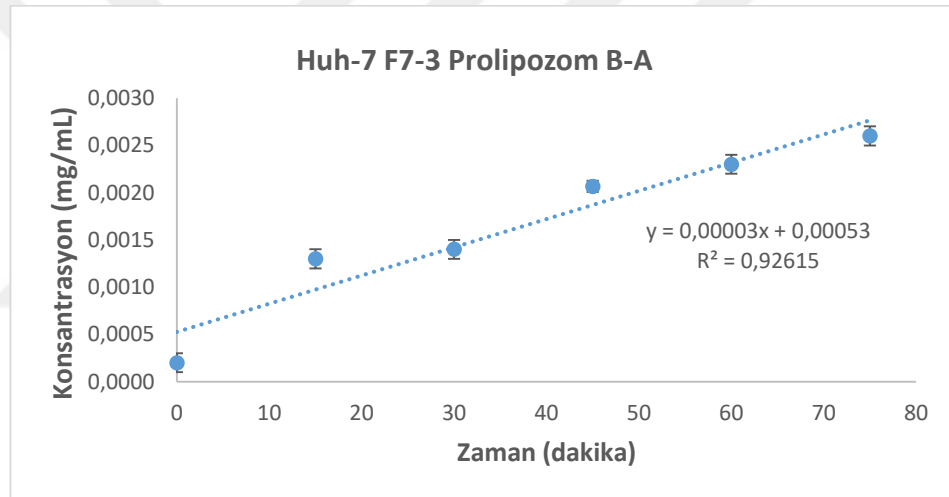
Şekil 94. Huh-7 Doks-HCl A→B Konstrasyon-zaman grafiği



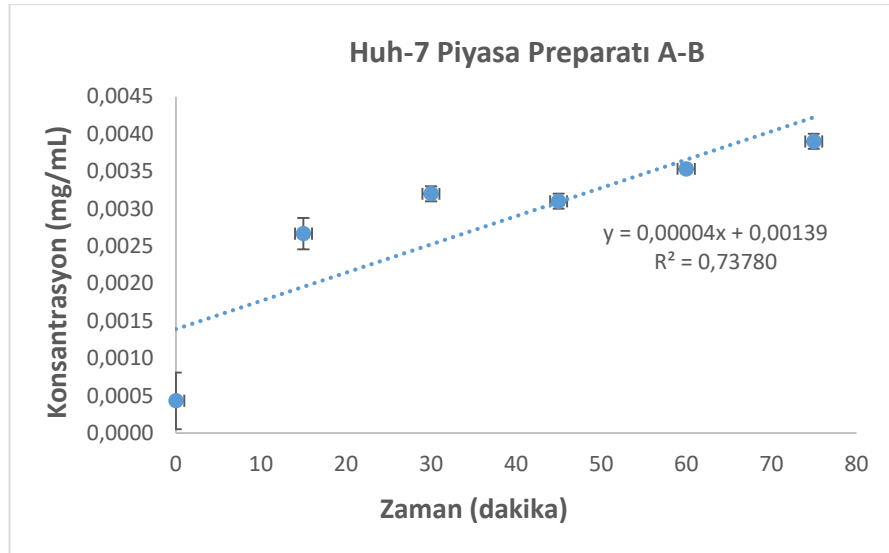
Şekil 95. Huh-7 Doks-HCl B→A Konstrasyon-zaman grafiği



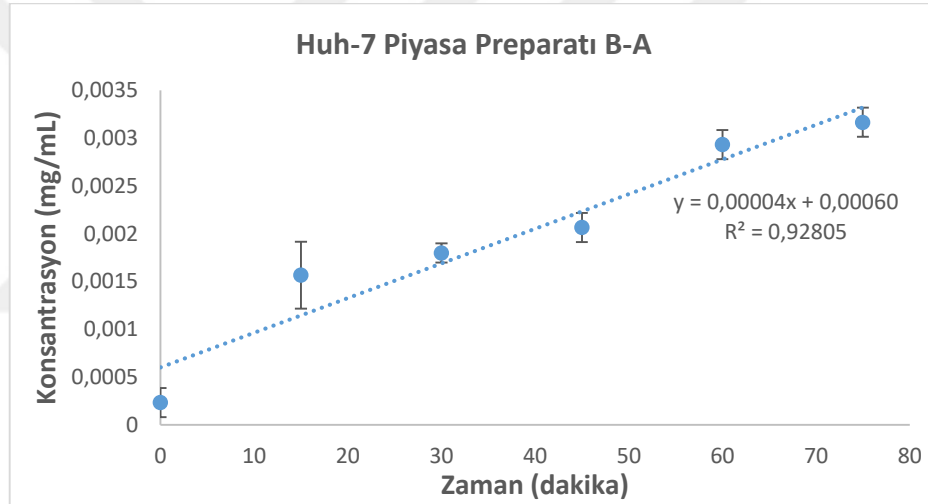
Şekil 96. Huh-7 Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu A→B Konstrasyon-zaman grafiği



Şekil 97. Huh-7 Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu B→A Konstrasyon-zaman grafiği



Şekil 98. Huh-7 Piyasa Preparatı A→B Konstrasyon-zaman grafiği



Şekil 99. Huh-7 Piyasa Preparatı B→A Konstrasyon-zaman grafiği

Zamana karşı çizilen kümülatif Doks-HCl miktarları grafiğinin eğim değerleri (dQ/dt) ve Eşitlik 5 kullanılarak etkili permeabilite değeri hem apikalden bazolaterale ($P_{A \rightarrow B}$) geçiş için hemde bazolateralinden apikale ($P_{B \rightarrow A}$) geçiş için hesaplanmıştır. Eşitlik 6 kullanılarak Effluks değerleri hesaplanmıştır. Doks-HCl, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu ve piyasa preparatı ile Huh-7 hücre hattında yapılan permeabilite ve effluks değerleri Tablo 114’de verilmiştir. $P_{A \rightarrow B}$ ve $P_{B \rightarrow A}$ için çalışılan A_M ve A_{OH} için Doks-HCl miktarı saptanamamıştır.

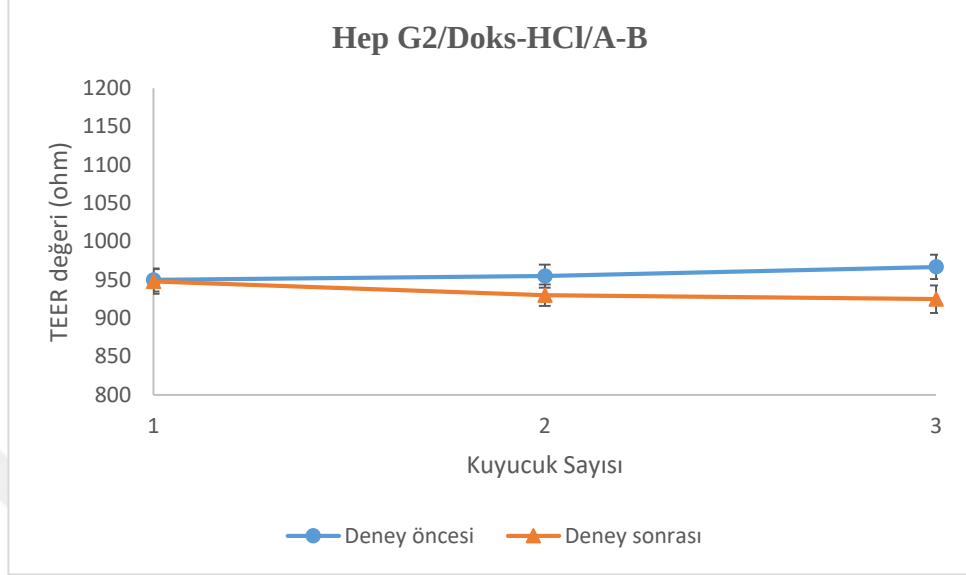
Tablo 114. Huh-7 Hücre hattı Permeabilite ve Effluks sonuçları

	Başlangıç konsantrasyonu A→B (mg/mL)	Başlangıç konsantrasyonu B→A (mg/mL)	Transwell alanı (cm ²)	Papp A→B	Papp B→A	Effluks
Doks-HCl	0.0040±0.0002	0.0038±0.0001	4.67	$1.78 \times 10^{-5} \pm 1 \times 10^{-7}$	$4.70 \times 10^{-5} \pm 2 \times 10^{-7}$	2.63±0.05
Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu	0.0040±0.0001	0.0038±0.0003		$3.57 \times 10^{-5} \pm 3 \times 10^{-7}$	$2.82 \times 10^{-5} \pm 3 \times 10^{-7}$	0.79±0.06
Piyasa Preparatı	0.0039±0.0001	0.0042±0.0004		$3.70 \times 10^{-5} \pm 2 \times 10^{-7}$	$3.40 \times 10^{-5} \pm 1 \times 10^{-7}$	0.93±0.07

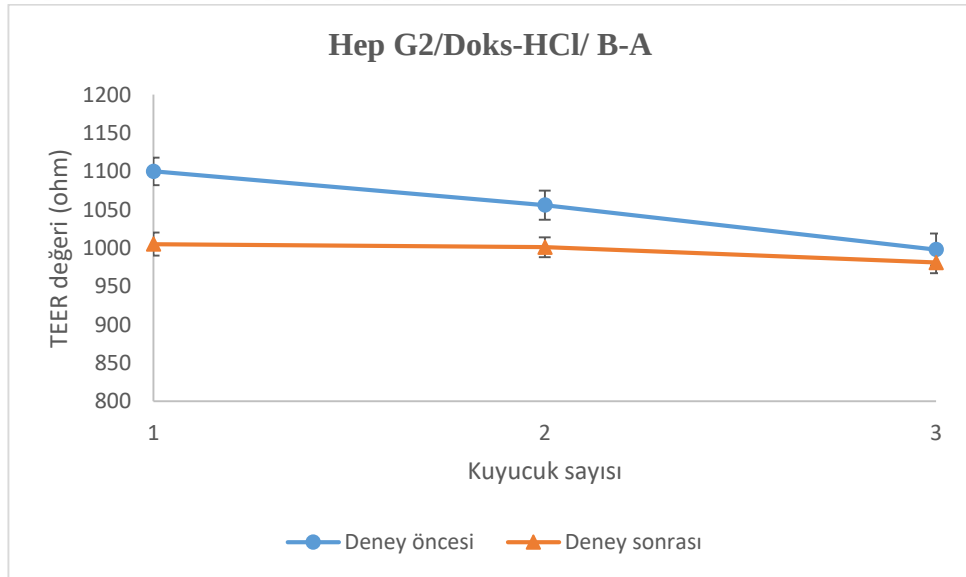
4.7.3.1 Transepitelyal Elektrik Rezistans (TEER) Değerlerine ait Bulgular

Yöntem 3.2.13.3’de TEER değerinin ölçülmesi konusunda anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Deney her hücre hattı ve için deney başı ve sonunda TEER değerleri ölçülmüştür. Hep G2 hücre hattında A→B ’e ve B→A’e Doks-HCl uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri sırası ile Şekil 100 ve Şekil 101’de, Hep G2 hücre hattında A→B ’e ve B→A’e aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri sırası ile Şekil 102 ve Şekil 103’de, Hep G2 hücre hattında A→B ’e ve B→A’e piyasa preparatı uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri sırası ile Şekil 104 ve Şekil 105’de verilmiştir. Mahlavu hücre hattında A→B ’e ve B→A’e Doks-HCl uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri sırası ile Şekil 106 ve Şekil 107’de, Mahlavu hücre hattında A→B ’e ve B→A’e aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri sırası ile Şekil 108 ve Şekil 109’da, Mahlavu hücre hattında A→B ’e ve B→A’e piyasa preparatı uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri sırası ile Şekil 110 ve Şekil 111’de verilmiştir. Huh-7 hücre hattında A→B ’e ve B→A’e Doks-HCl uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri sırası ile Şekil 112 ve Şekil 113’de, Huh-7 hücre hattında A→B ’e ve B→A’e aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri sırası ile Şekil 114 ve Şekil 115’de, Huh-7 hücre hattında A→B ’e ve B→A’e piyasa preparatı uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri sırası ile Şekil 116 ve Şekil 117’de verilmiştir. Hep G2 hücre hattında deney öncesi ve deney sonrası %TEER değişimi Tablo 115’de, Mahlavu hücre hattında deney öncesi ve deney sonrası %TEER değişimi Tablo 116’de, Huh-7

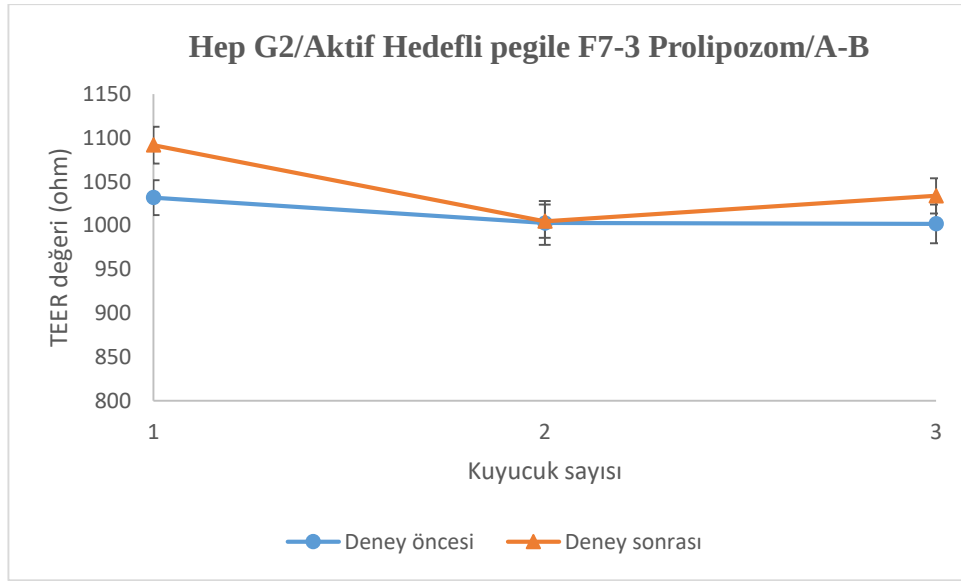
hücre hattında deney öncesi ve deney sonrası %TEER değişimi Tablo 117’de verilmiştir.



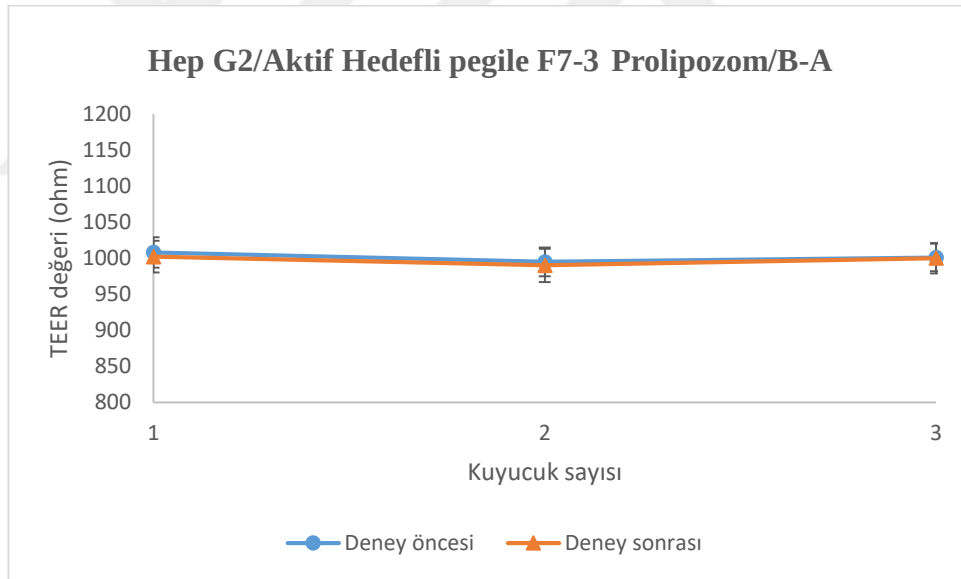
Şekil 100. Hep G2 hücre hattının A→B ’e Doks-HCl uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri



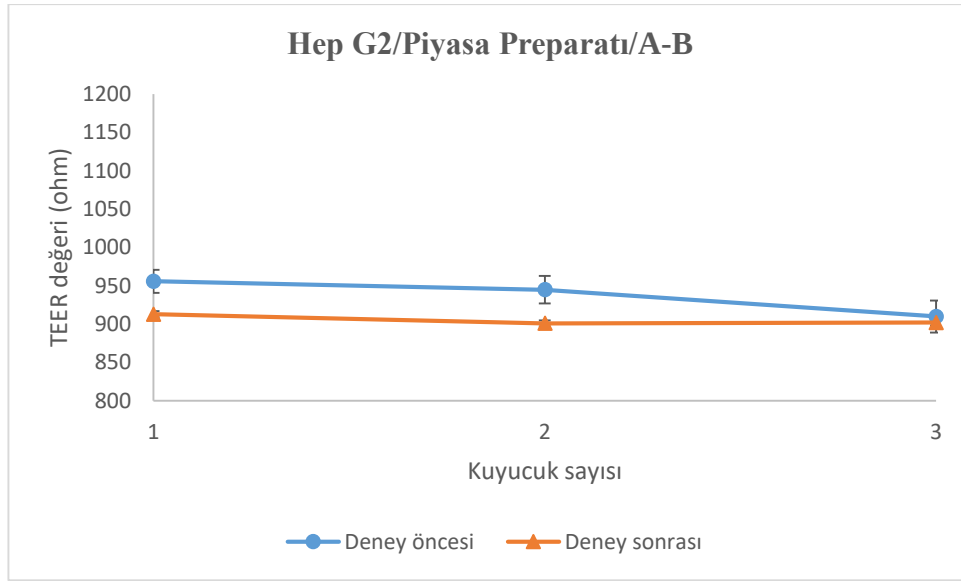
Şekil 101. Hep G2 hücre hattının B→A’e Doks-HCl uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri



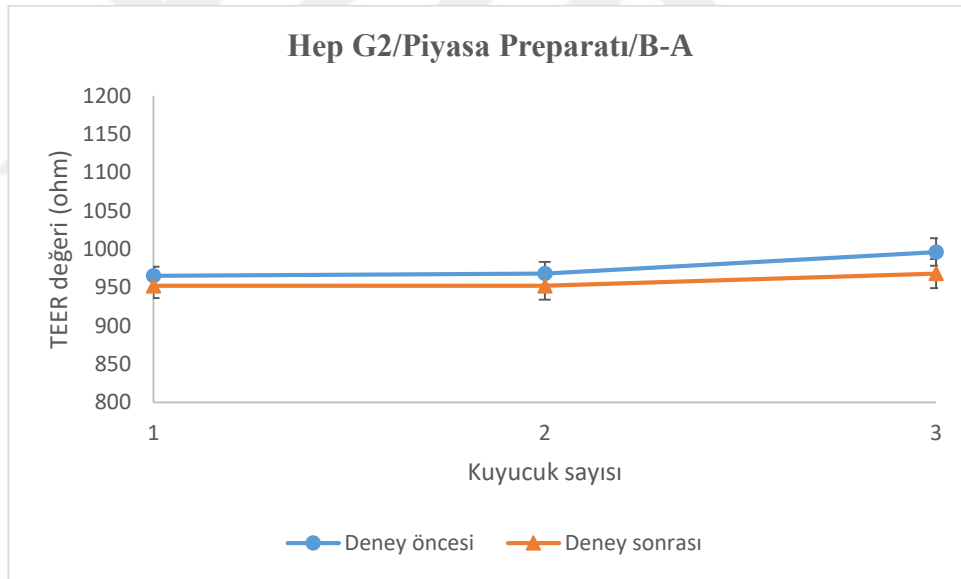
Şekil 102. Hep G2 hücre hattının A→B 'e aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri



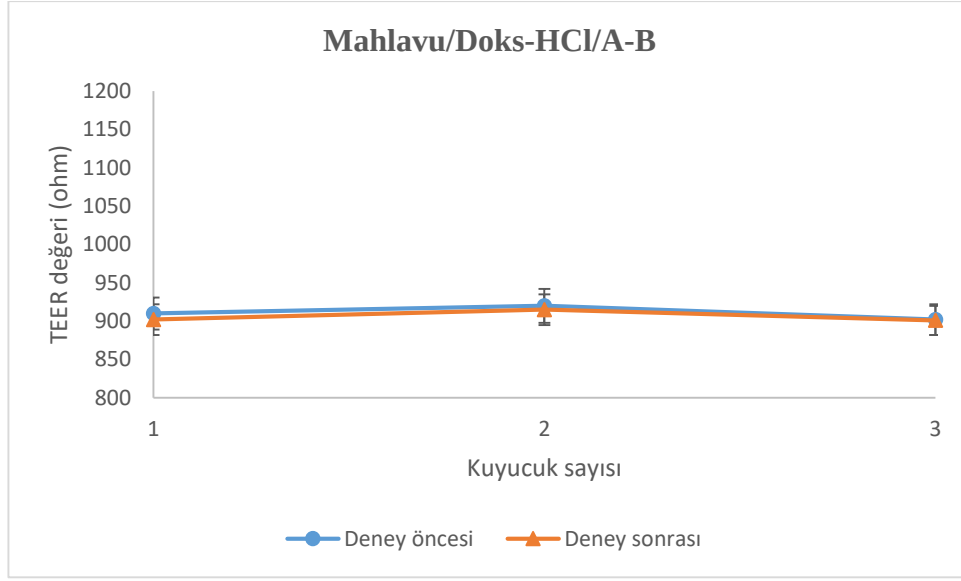
Şekil 103. Hep G2 hücre hattının B→A'e aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri



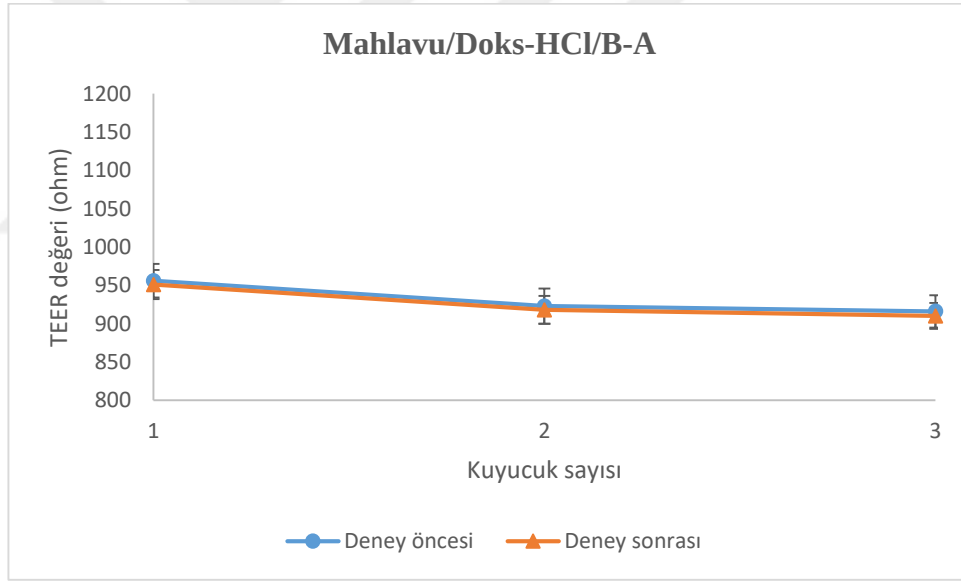
Şekil 104. Hep G2 hücre hattının A→B 'e piyasa preparatı uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri



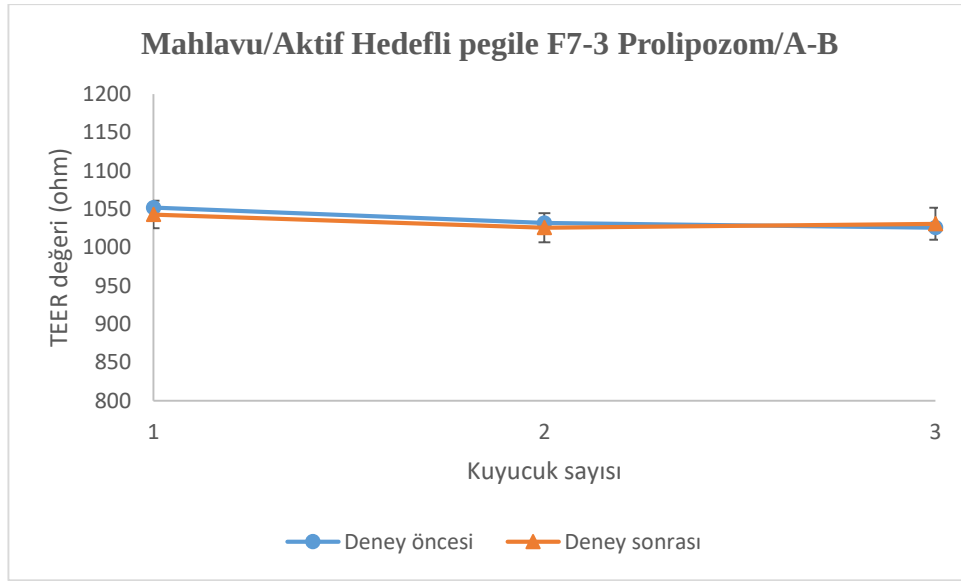
Şekil 105. Hep G2 hücre hattının B→A 'e piyasa preparatı uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri



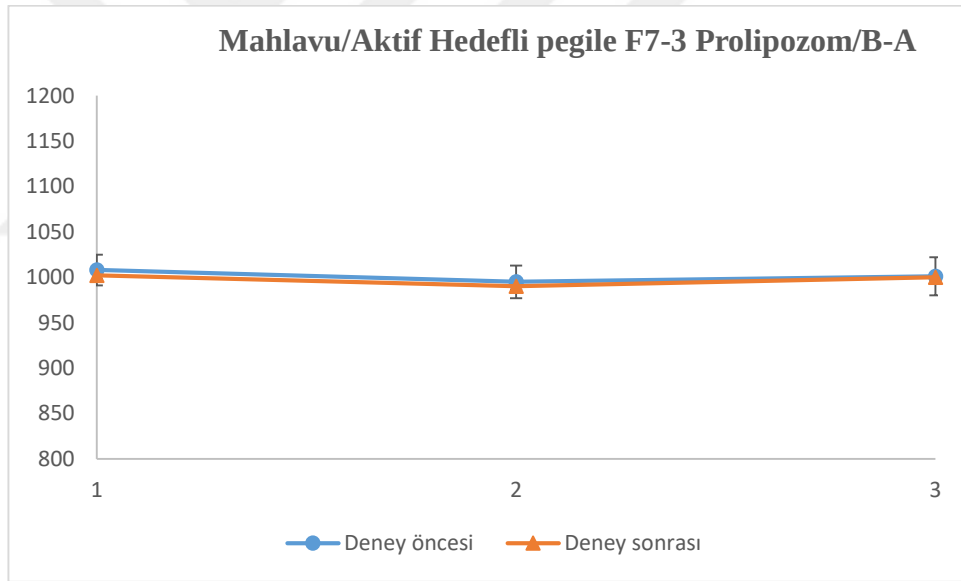
Şekil 106. Mahlavu hücre hattının A→B 'e Doks-HCl uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri



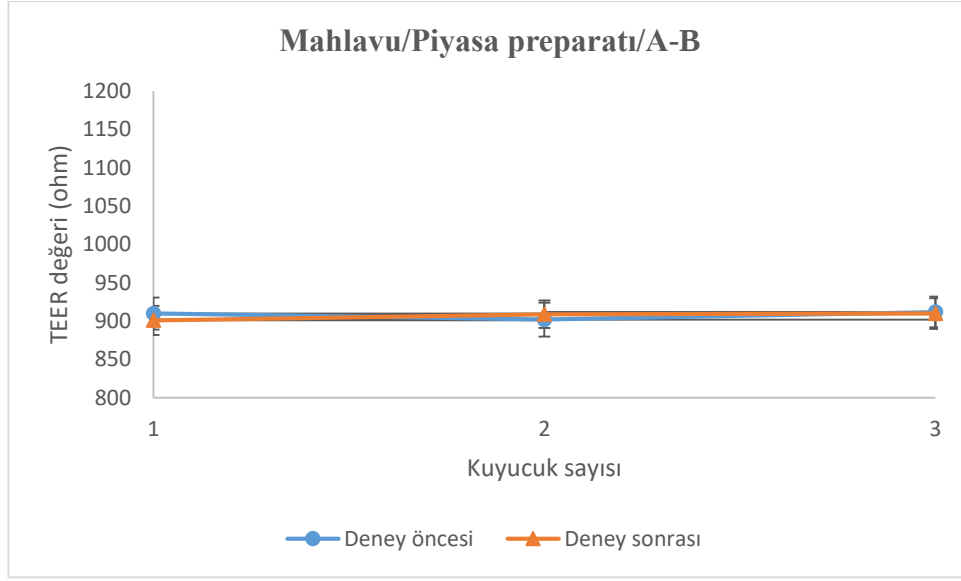
Şekil 107. Mahlavu hücre hattının B→A'e Doks-HCl uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri



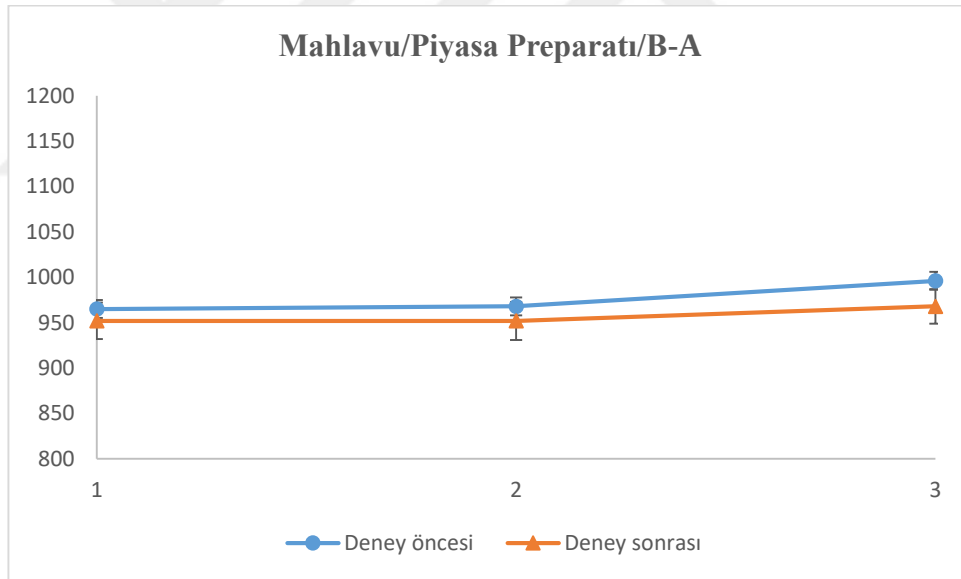
Şekil 108. Mahlavu hücre hattının A→B 'e aktif hedefli pegile F7-3prolipozom formülasyonu uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri



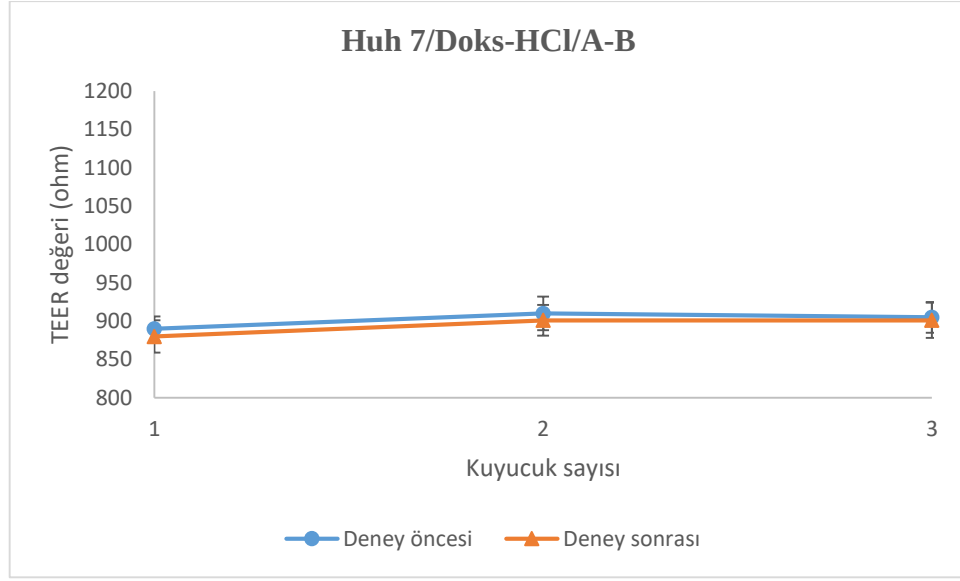
Şekil 109. Mahlavu hücre hattının B→A'e aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri



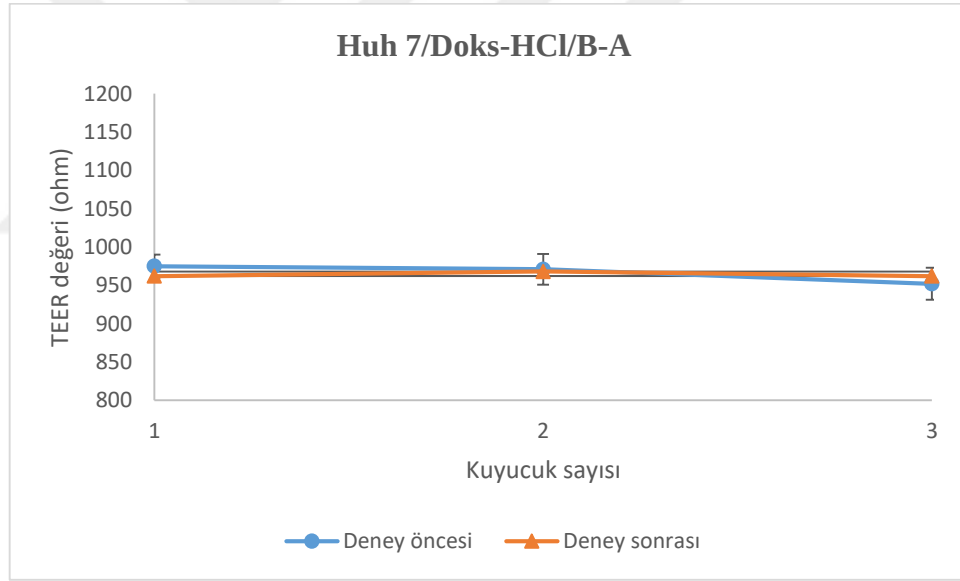
Şekil 110. Mahlavu hücre hattının A→B 'e piyasa preparatı uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri



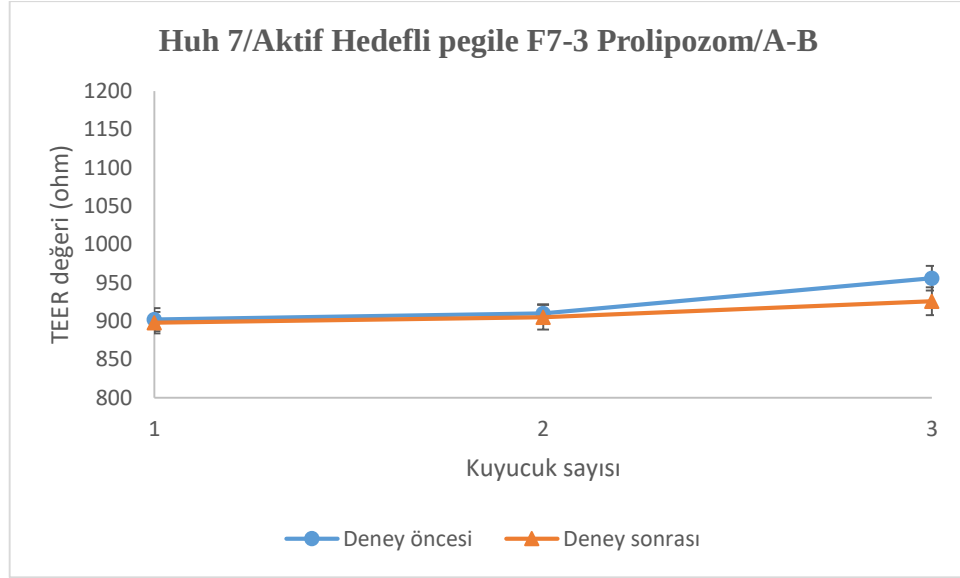
Şekil 111. Mahlavu hücre hattının B→A 'e piyasa preparatı uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri



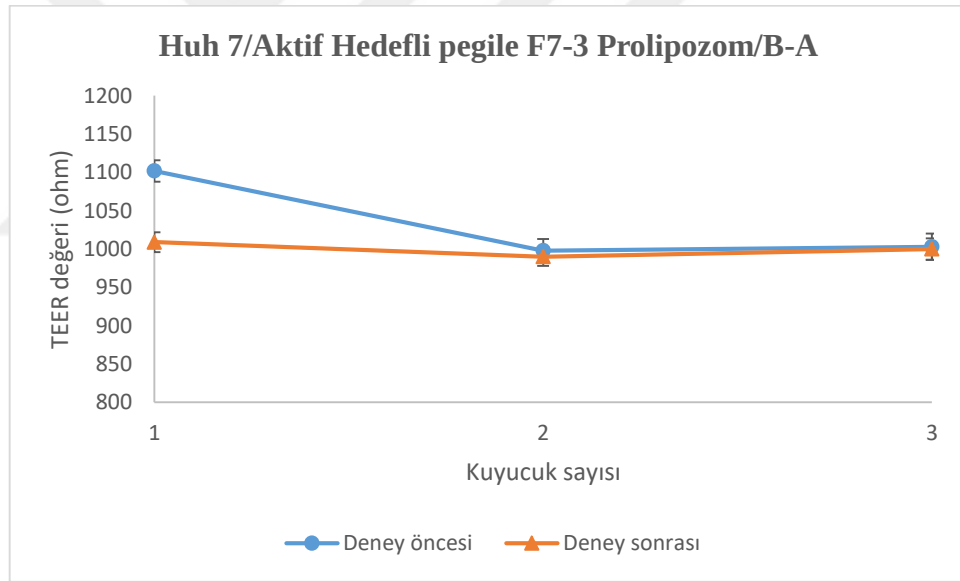
Şekil 112. Huh-7 hücre hattının A→B 'e Doks-HCl uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri



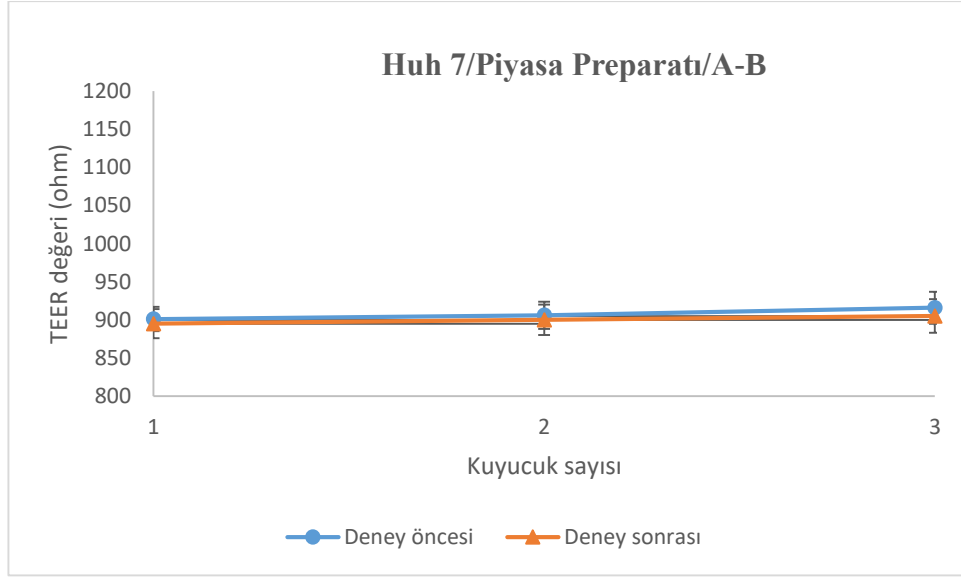
Şekil 113. Huh-7 hücre hattının B→A'e Doks-HCl uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri



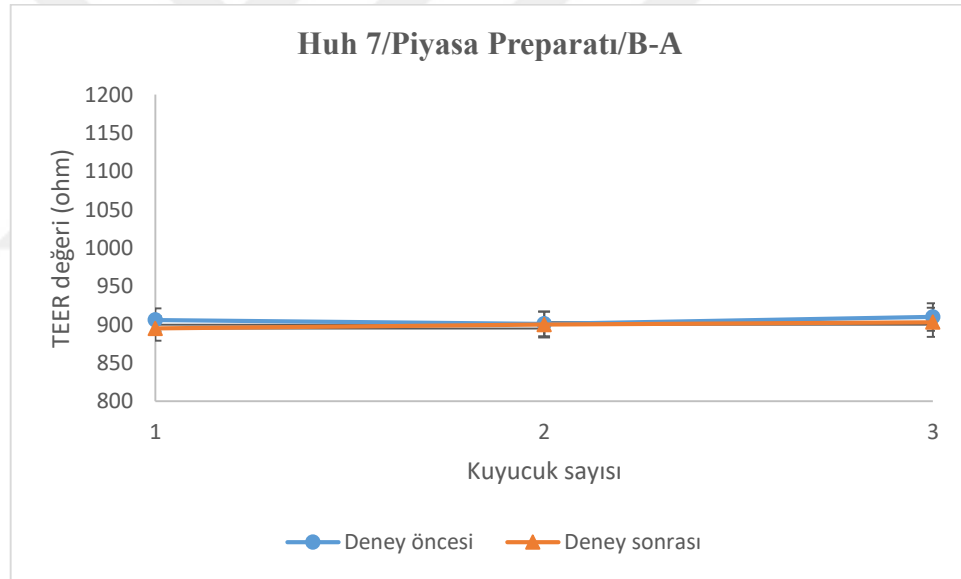
Şekil 114. Huh-7 hücre hattının A→B 'e aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri



Şekil 115. Huh-7 hücre hattının B→A'e aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri



Şekil 116. Huh-7 hücre hattının A→B 'e piyasa preparatı uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri



Şekil 117. Huh-7 hücre hattının B→A'e piyasa preparatı uygulamasında deney öncesi ve deney sonrası TEER değerleri

Tablo 115. Hep G2 Hücre Hattı % TEER Değişimi Sonuçları

	Doks-HCl	Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu	Piyasa Preparatı
A→B % TEER Değişimi	2.39	0.53	3.34
B→A % TEER Değişimi	5.18	0.40	1.94

Tablo 116. Mahlavu Hücre Hattı % TEER Değişimi Sonuçları

	Doks-HCl	Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu	Piyasa Preparatı
A→B % TEER Değişimi	0.51	0.14	0.32
B→A % TEER Değişimi	0.57	1.94	0.40

Tablo 117. Huh-7 Hücre Hattı % TEER Değişimi Sonuçları

	Doks-HCl	Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu	Piyasa Preparatı
A→B % TEER Değişimi	0.85	0.84	1.38
B→A % TEER Değişimi	0.20	0.70	3.18

4.8 *In vivo* Çalışmalara ait Bulgular

4.8.1 Biyodağılım Çalışmasına ait Bulgular

Yöntem 3.2.14.1’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Çalışma öncesinde 16 adet dişi/erkek Nude CD 1 fare 4 gruba ayrılmış ve 5 gün boyunca karantineda bekletilmiştir. Bu süre boyunca ağırlıkları ve sağlık durumları takip edilmiştir. Günlük ağırlık verileri Tablo 118’de verilmiştir.

1. Grup Nude CD 1 fare: Doks-HCl’ün %5 lik Dekstroz çözeltisi (2 mg/ mL)
2. Grup Nude CD 1 fare: Piyasa preparatı (2 mg/mL)
3. Grup Nude CD 1 fare: Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun %5’lik dekstroz çözeltisi içindeki dispersiyonu (2 mg/ mL)
4. Grup Nude CD 1 fare: Aktif hedefsiz pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun %5’lik dekstroz çözeltisi içindeki dispersiyonu (2 mg/ mL)

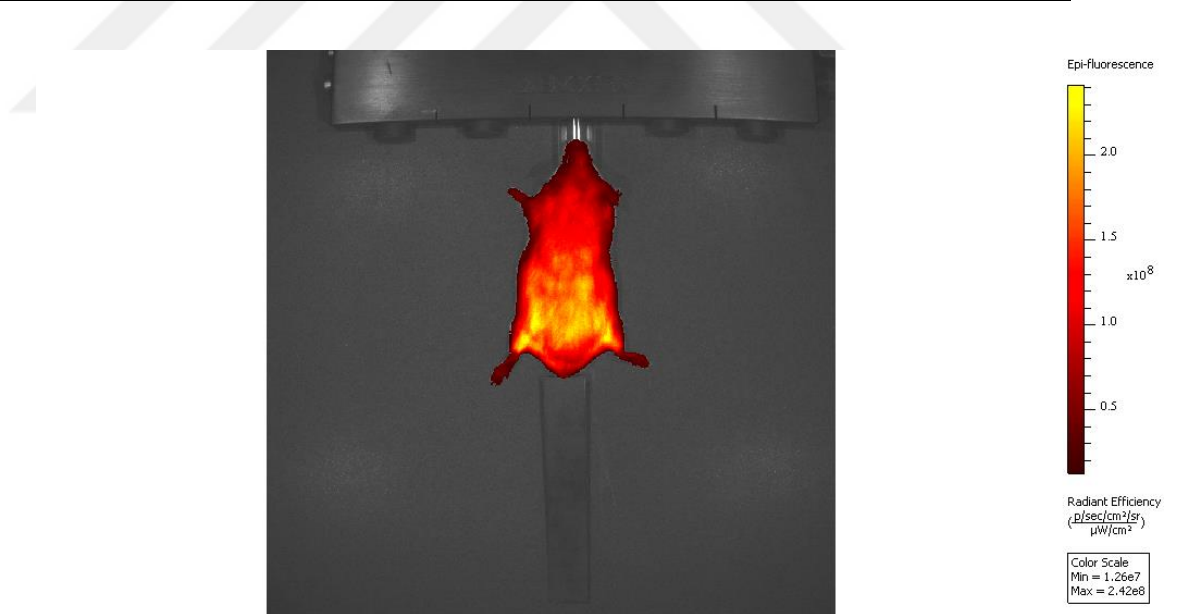
Sonuç görselleri çok benzer olduğu için her gruptan 1’er nude CD 1 sonucu verilmiştir.

1. Gruba ait IVIS 1. saat, 3. saat, 5. saat, 7. saat, 9. saat, 12. saat ve 24. saat verileri sırası ile, Şekil 118, Şekil 119, Şekil 120, Şekil 121, Şekil 122, Şekil 123 ve Şekil 124’da;
2. Gruba ait IVIS 1. saat, 3. saat, 5. saat, 7. saat, 9. saat, 12. saat ve 24. saat

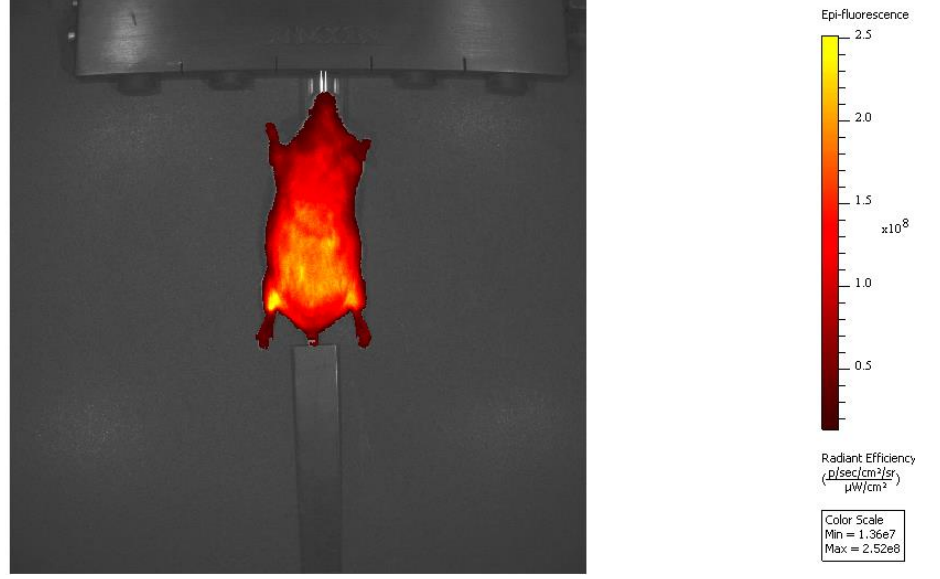
verileri sırası ile, Şekil 125, Şekil 126, Şekil 127, Şekil 128, Şekil 129, Şekil 130 ve Şekil 131’de; 3. Gruba ait IVIS 1. saat, 3. saat, 5. saat, 7. saat, 9. saat, 12. saat ve 24. saat verileri sırası ile Şekil 132, Şekil 133, Şekil 134, Şekil 135, Şekil 136, Şekil 137 ve Şekil 138’da; 4. Gruba ait IVIS IVIS 1. saat, 3. saat, 5. saat, 7. saat, 9. saat, 12. saat ve 24. saat verileri sırası ile Şekil 139, Şekil 140, Şekil 141, Şekil 142, Şekil 143, Şekil 144 ve Şekil 145’de verilmiştir. 1. Gruba ait, 2. Gruba ait, 3. Gruba ait ve 4. Gruba ait akciğer, dalak, kalp, karaciğer ve böbreklerin ex vivo IVIS verileri sırası ile; Şekil 146, Şekil 147, Şekil 148 ve Şekil 149’de verilmiştir.

Tablo 118. Nude CD 1 farelerin Ağırlık Verileri

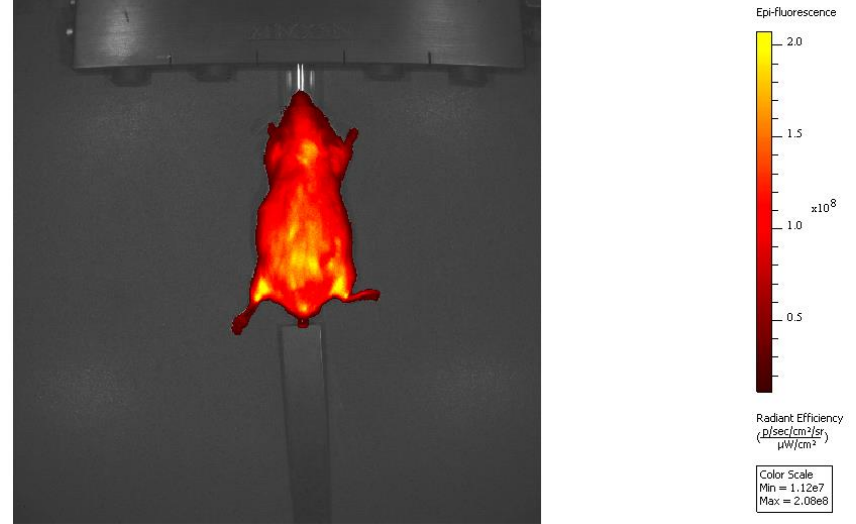
	1. Grup (gram)					2. Grup (gram)					3. Grup (gram)					4. Grup (gram)				
1.gün	34.2	36.2	34.2	36.2	33.2	32.7	35.3	31.6	28.9	34.6	31.2	29.6	30.2	32.3	35.2	34.7	28.2	29.4	31.2	29.6
2.gün	34.3	36.3	34.3	36.3	33.2	32.8	35.4	31.3	29.1	34.9	31.4	29.8	30.2	32.4	35.3	34.7	28.3	29.5	31.4	29.8
3.gün	34.2	36.4	34.2	36.4	33.5	32.9	35.6	31.6	29.3	34.9	31.5	30.0	30.1	32.4	35.4	34.8	28.3	29.5	31.5	30.0
4.gün	34.4	36.5	34.4	36.5	33.7	33.0	35.7	31.8	29.3	34.2	31.3	30.0	30.4	32.5	35.6	34.9	28.5	29.6	31.3	30.0
5.gün	34.3	36.7	34.3	36.7	33.8	33.1	35.8	31.9	29.4	34.4	31.4	30.2	30.6	32.5	35.7	34.9	28.9	29.7	31.4	30.2
% Ağırlık Değişimi	0.3	1.4	0.3	1.4	1.8	1.2	1.4	0.9	1.7	0.6	0.2	0.6	0.4	0.2	0.5	0.2	0.7	0.3	0.2	0.6



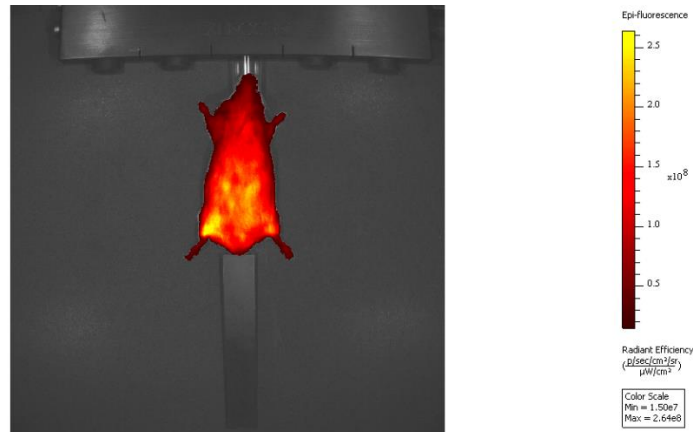
Şekil 118. 1. Grup 1. Saat sonunda IVIS görüntüsü



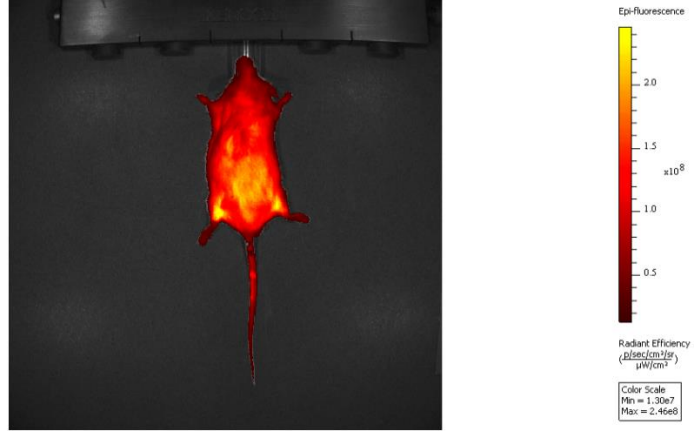
Şekil 119. 1. Grup 3. Saat sonunda IVIS görüntüsü



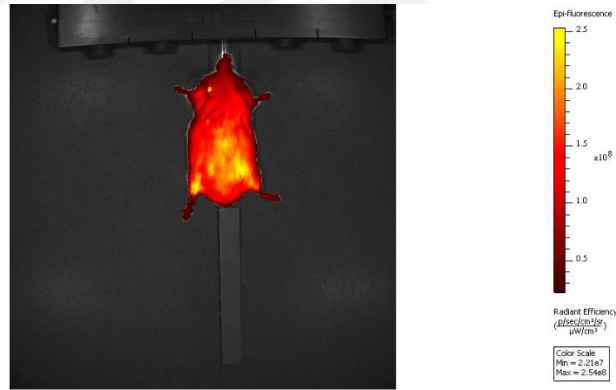
Şekil 120. 1. Grup 5. Saat sonunda IVIS görüntüsü



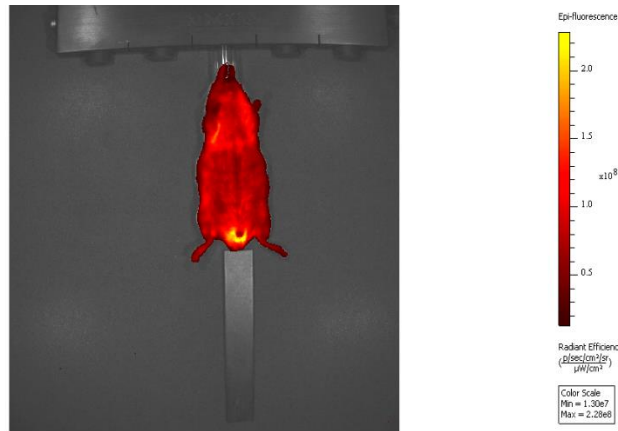
Şekil 121. 1. Grup 7. Saat sonunda IVIS görüntüsü



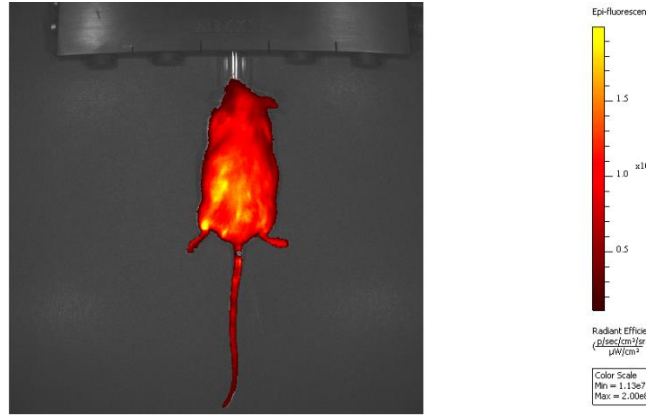
Şekil 122. 1. Grup 9. Saat sonunda IVIS görüntüsü



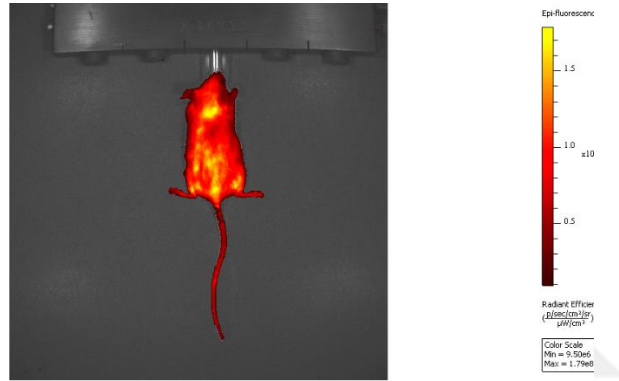
Şekil 123. 1. Grup 12. Saat sonunda IVIS görüntüsü



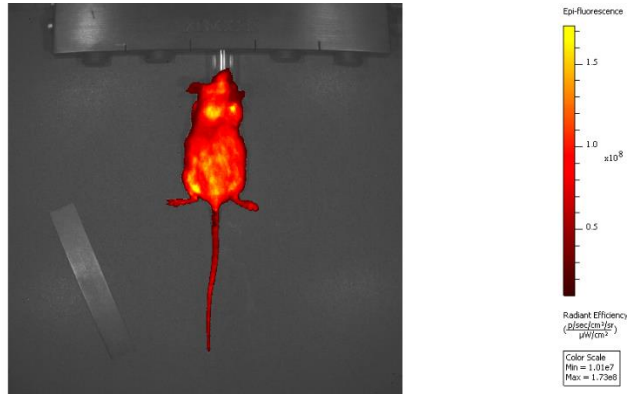
Şekil 124. 1. Grup 24. Saat sonunda IVIS görüntüsü



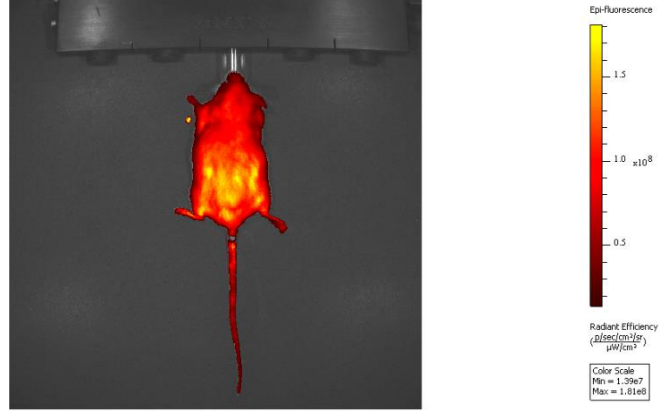
Şekil 125. 2. Grup 1. Saat sonunda IVIS görüntüsü



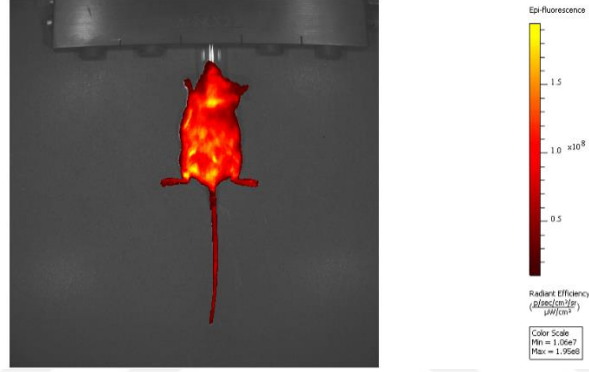
Şekil 126. 2. Grup 3. Saat sonunda IVIS görüntüsü



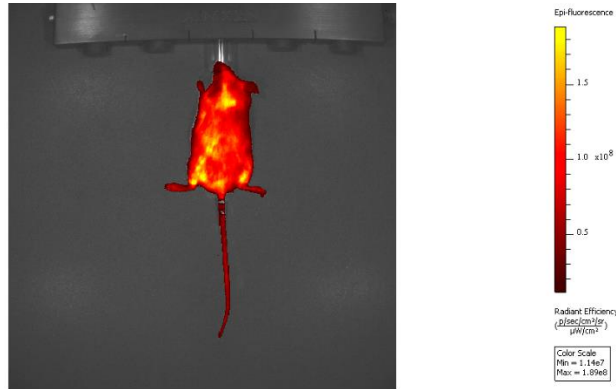
Şekil 127. 2. Grup 5. Saat sonunda IVIS görüntüsü



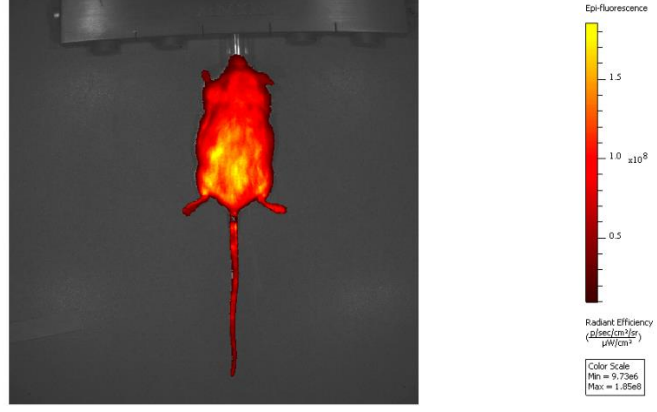
Şekil 128. 2. Grup 7. Saat sonunda IVIS görüntüsü



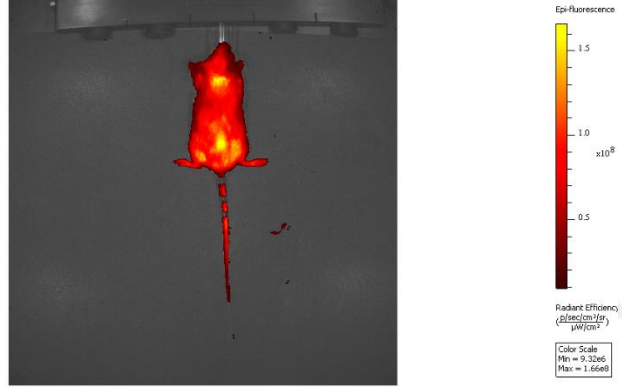
Şekil 129. 2. Grup 9. Saat sonunda IVIS görüntüsü



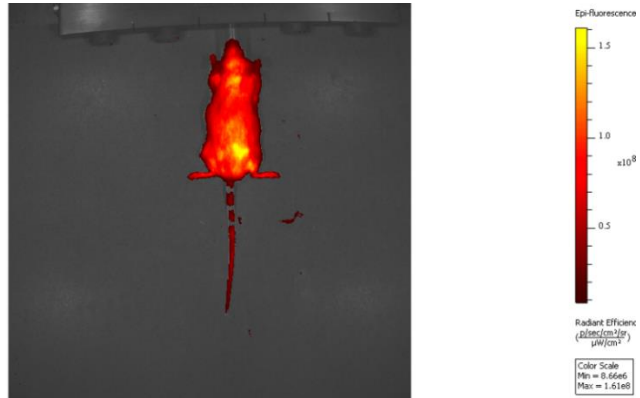
Şekil 130. 2. Grup 12. Saat sonunda IVIS görüntüsü



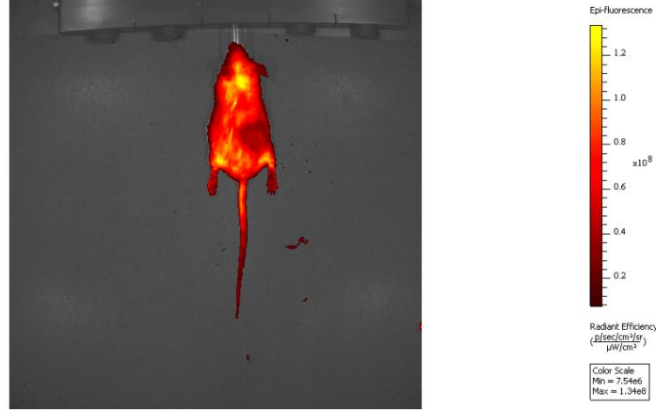
Şekil 131. 2. Grup 24. Saat sonunda IVIS görüntüsü



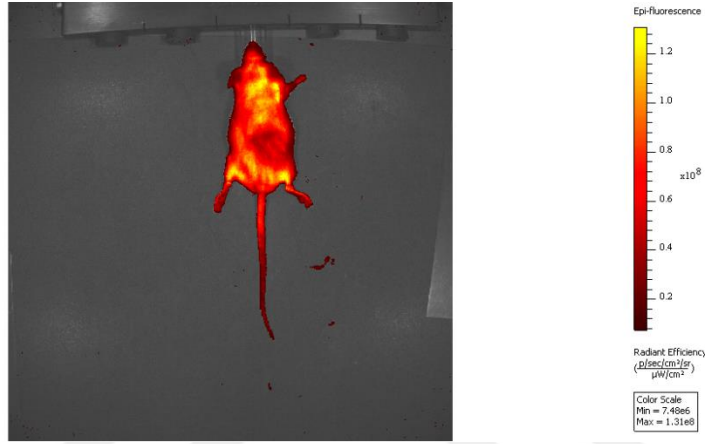
Şekil 132. 3. Grup 1. Saat sonunda IVIS görüntüsü



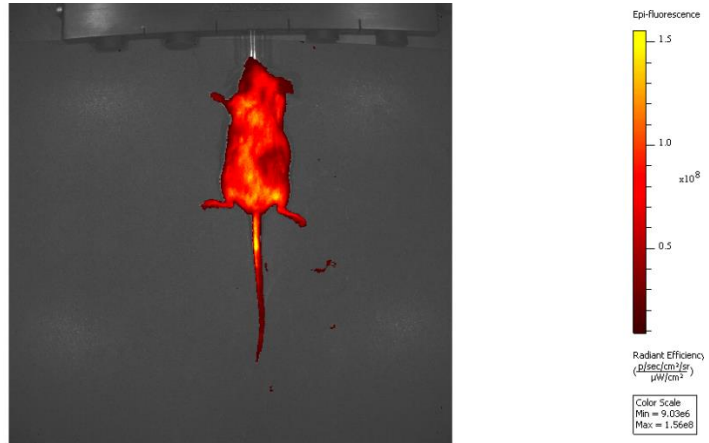
Şekil 133. 3. Grup 3. Saat sonunda IVIS görüntüsü



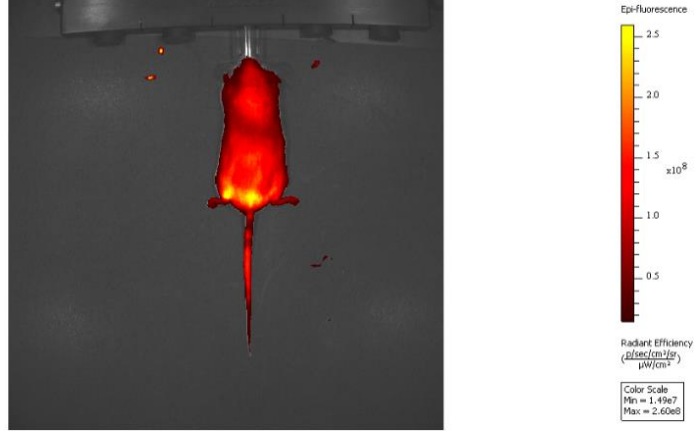
Şekil 134. 3. Grup 5. Saat sonunda IVIS görüntüsü



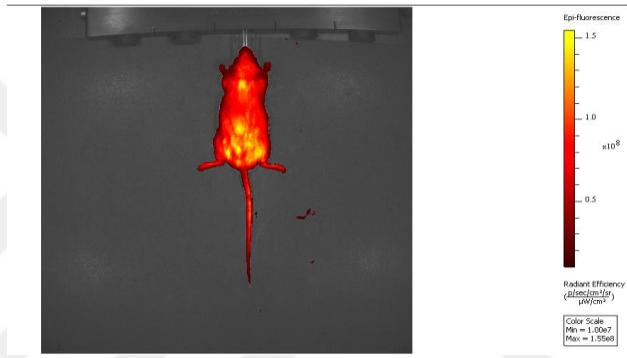
Şekil 135. 3. Grup 7. Saat sonunda IVIS görüntüsü



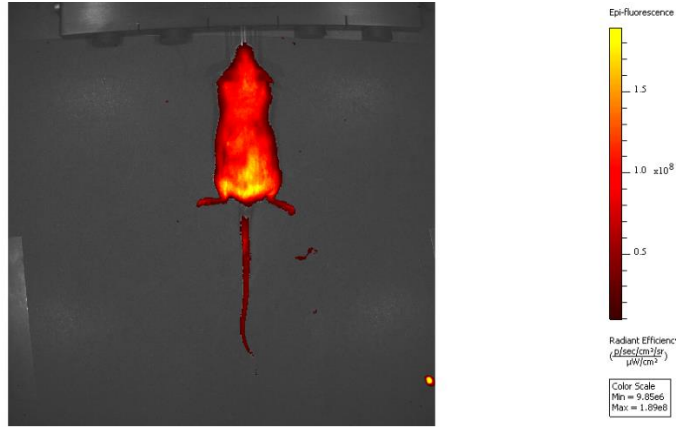
Şekil 136. 3. Grup 9. Saat sonunda IVIS görüntüsü



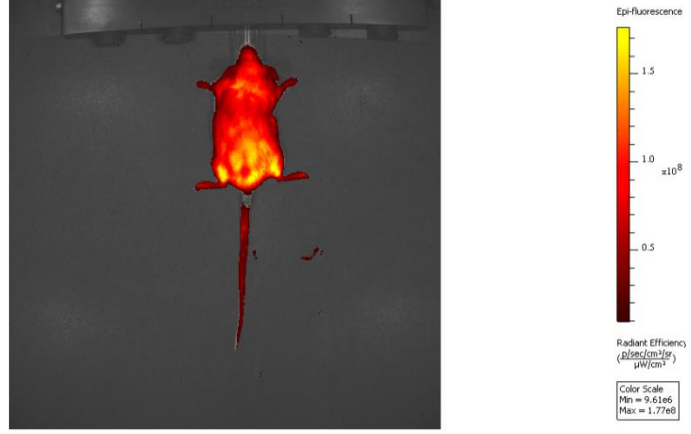
Şekil 137. 3. Grup 12. Saat sonunda IVIS görüntüsü



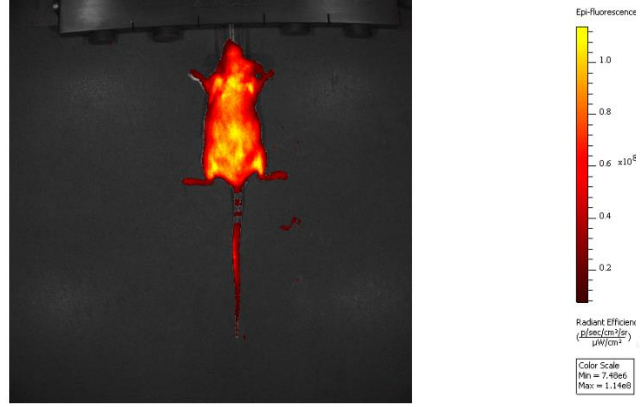
Şekil 138. 3. Grup 24. Saat sonunda IVIS görüntüsü



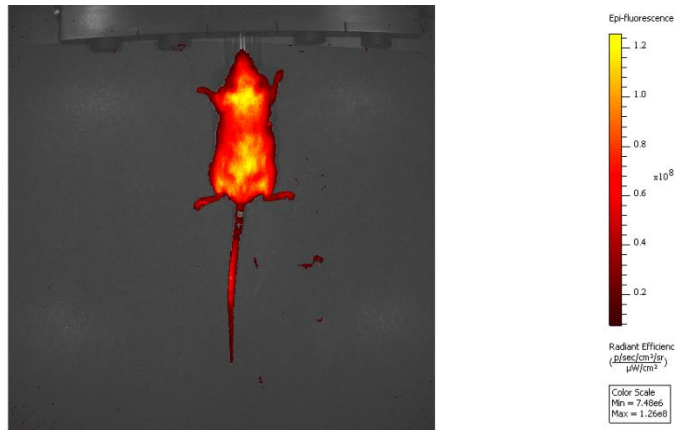
Şekil 139. 4. Grup 1. Saat sonunda IVIS görüntüsü



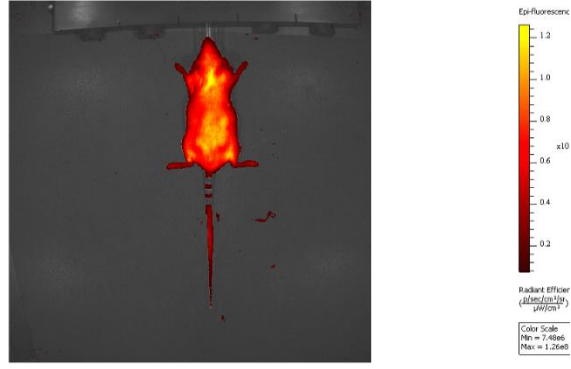
Şekil 140. 4. Grup 3. Saat sonunda IVIS görüntüsü



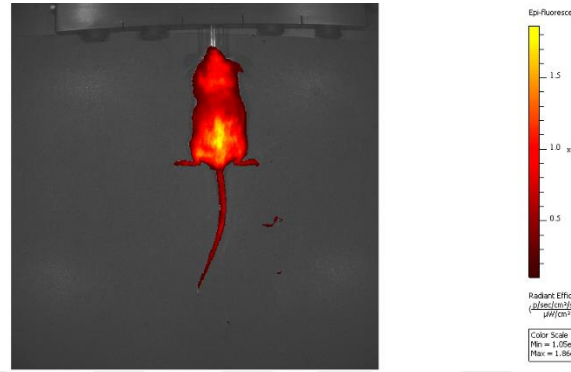
Şekil 141. 4. Grup 5. Saat sonunda IVIS görüntüsü



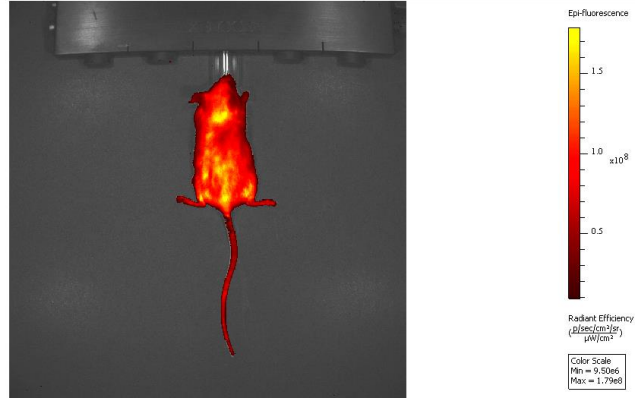
Şekil 142. 4. Grup 7. Saat sonunda IVIS görüntüsü



Şekil 143. 4. Grup 9. Saat sonunda IVIS görüntüsü



Şekil 144. 4. Grup 12. Saat sonunda IVIS görüntüsü



Şekil 145. 4. Grup 24. Saat sonunda IVIS görüntüsü



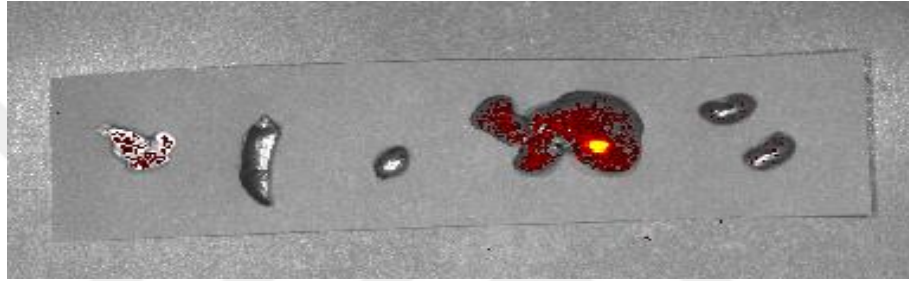
Akciğer Dalak Kalp Karaciğer Böbrekler

Şekil 146. 1. Grup ex vivo IVIS görüntüsü



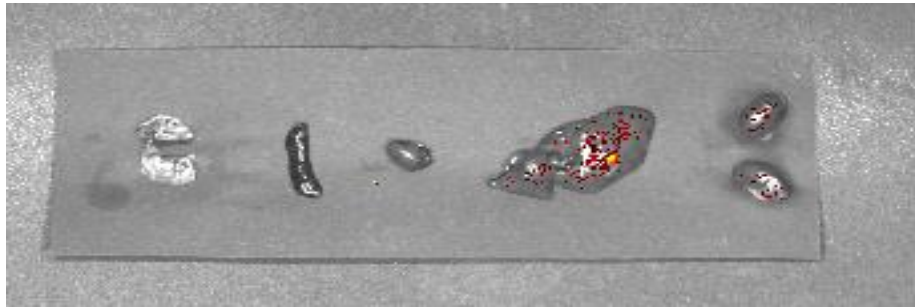
Akciğer Dalak Kalp Karaciğer Böbrekler

Şekil 147. 2. Grup ex vivo IVIS görüntüsü



Akciğer Dalak Kalp Karaciğer Böbrekler

Şekil 148. 3. Grup ex vivo IVIS görüntüsü



Akciğer Dalak Kalp Karaciğer Böbrekler

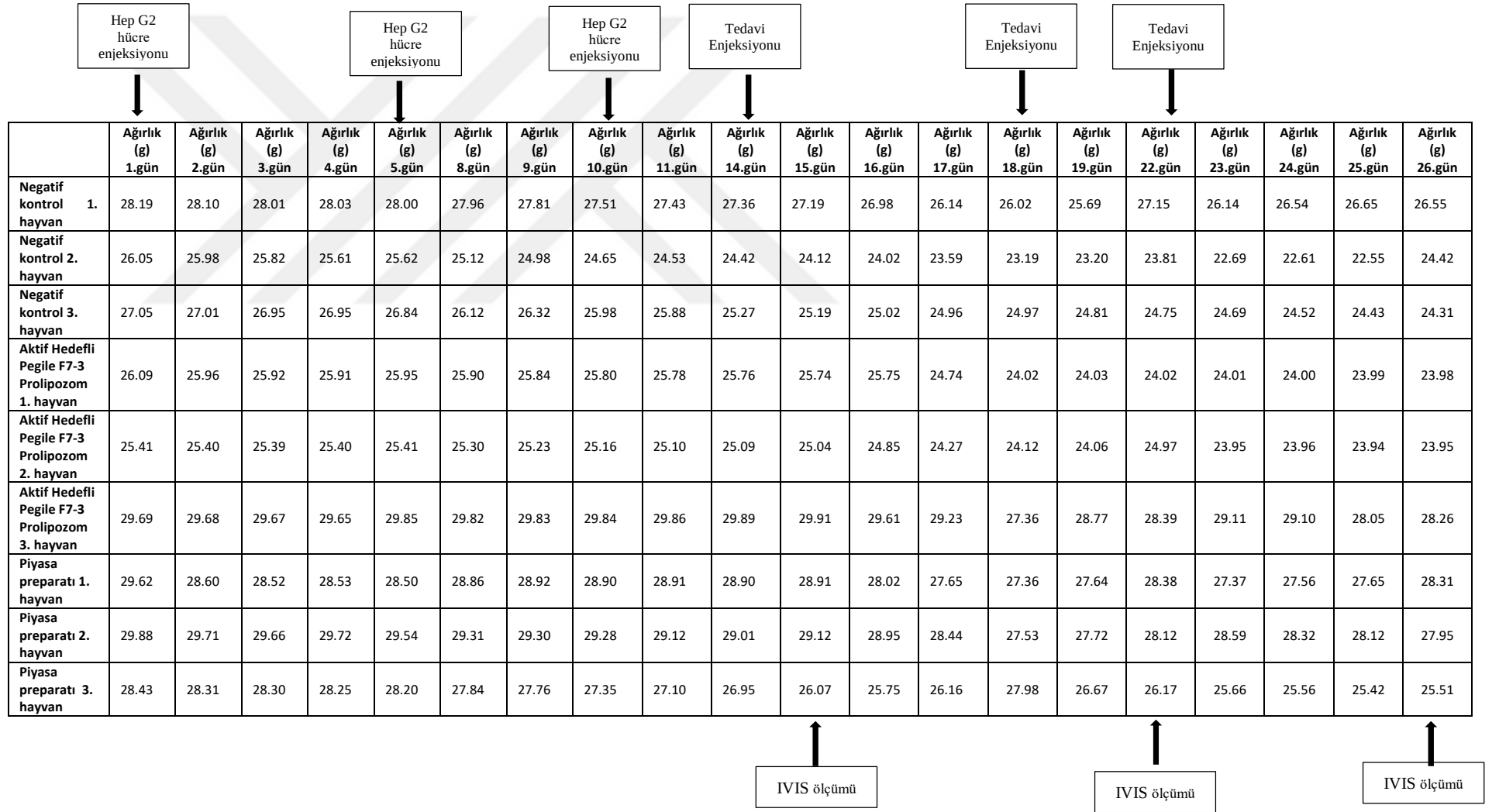
Şekil 149. 4. Grup ex vivo IVIS görüntüsü

4.8.2 Etkinlik Çalışmasına ait Bulgular

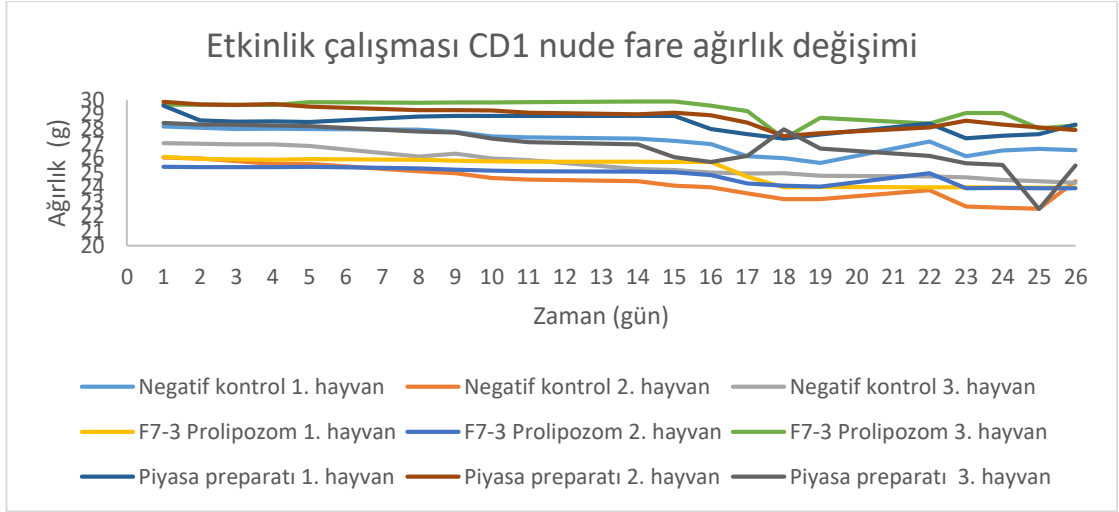
Yöntem 3.2.14.2’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Çalışma boyunca nude CD 1 farelerin ağırlıkları kaydedilmiş ve çizelgeye işlenmiştir. Ayrıca Hep G2 hücre enjeksiyonu, IVIS görüntüleme ve tedavi uygulanma takvimi de aynı çizelgede gösterilmiştir (Şekil 150). Etkinlik çalışması boyunca tartımları kaydedilen nude CD

1 farelerin ağırlık değişim grafiği Şekil 151’de, % ağırlık değişimleri ise Tablo 119’de verilmiştir. Şekil 152’de negatif kontrol (1. Grup) nude CD 1 fareye ait karaciğer tümörünün deney boyunca 1. ölçüm IVIS görüntüsü, 2. ölçüm IVIS görüntüsü ve 3. ölçüm IVIS görüntüsü verilmiştir. Şekil 153’de pozitif kontrol (2. Grup= F7-3 prolipozom formülasyonu tedavisi uygulanan grup) nude CD 1 fareye ait tedaviye başlanmadan oluşturulan karaciğer tümörü (a), 1. ve 2. doz uygulama sonrası IVIS görüntüsü (b), 3. doz uygulama sonrası IVIS görüntüsü (c) gösterilmiştir. Şekil 154’de ise pozitif kontrol (3. Grup= piyasa preparatı tedavisi uygulanan grup) nude CD 1 fareye ait tedaviye başlanmadan oluşturulan karaciğer tümörü (a), 1. ve 2. doz uygulama sonrası IVIS görüntüsü (b), 3. doz uygulama sonrası IVIS görüntüsü (c) gösterilmiştir.





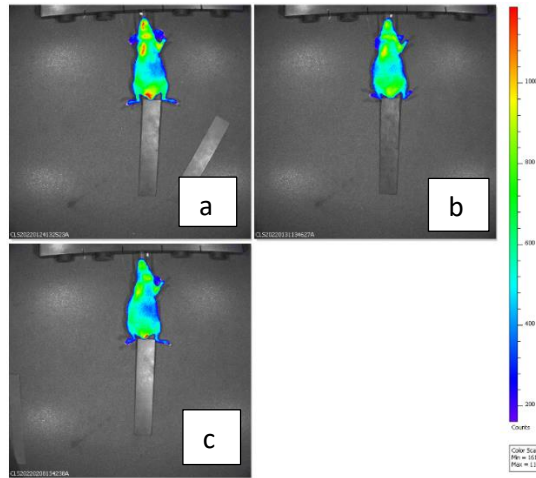
Şekil 150. Etkinlik çalışmasında; ağırlık, hücre enjeksiyonu, tedavi çizelgesi ve IVIS görüntüleme çizelgesi



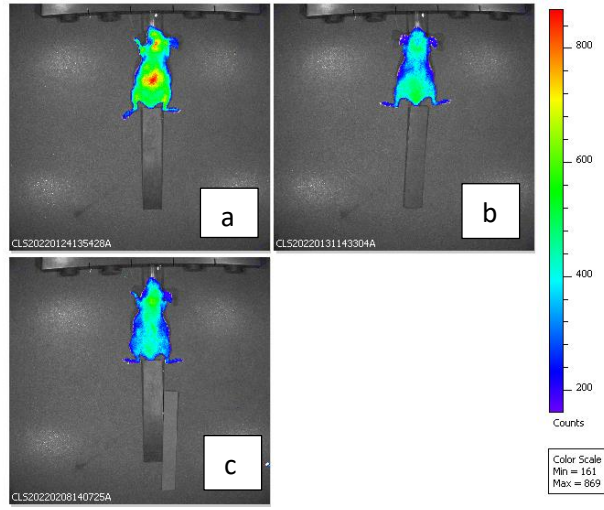
Şekil 151. Etkinlik çalışması nude CD 1 fare ağırlık değişimi grafiği

Tablo 119. Etkinlik çalışması nude CD 1 fare %Ağırlık Değişimi

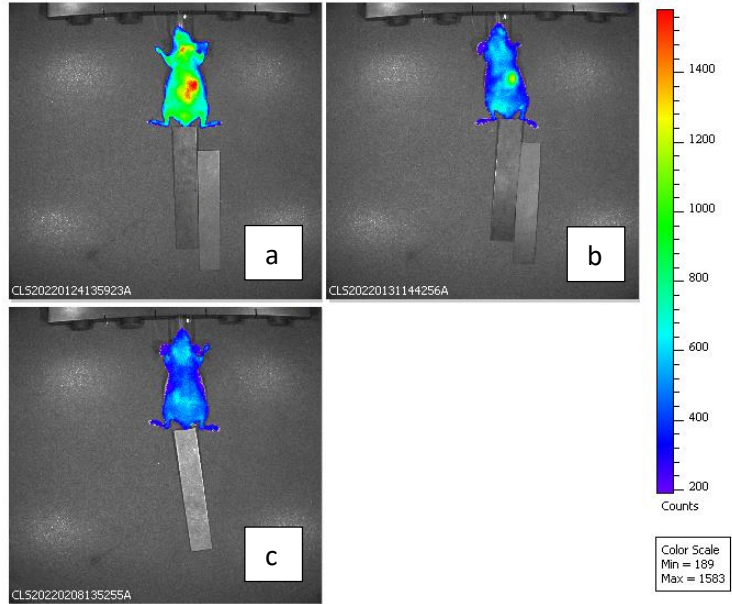
	% Ağırlık Değişimi
Negatif kontrol 1. hayvan	5.82
Negatif kontrol 2. hayvan	13.93
Negatif kontrol 3. hayvan	10.13
Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom 1. hayvan	8.09
Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom 2. hayvan	5.75
Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom 3. hayvan	4.82
Piyasa preparatı 1. hayvan	4.42
Piyasa preparatı 2. hayvan	6.46
Piyasa preparatı 3. hayvan	10.27



Şekil 152. Negatif kontrol (1. Grup) nude CD 1 fare karaciğer tümörü a. 1. ölçüm IVIS görüntüsü, b. 2. ölçüm IVIS görüntüsü, c. 3. ölçüm IVIS görüntüsü



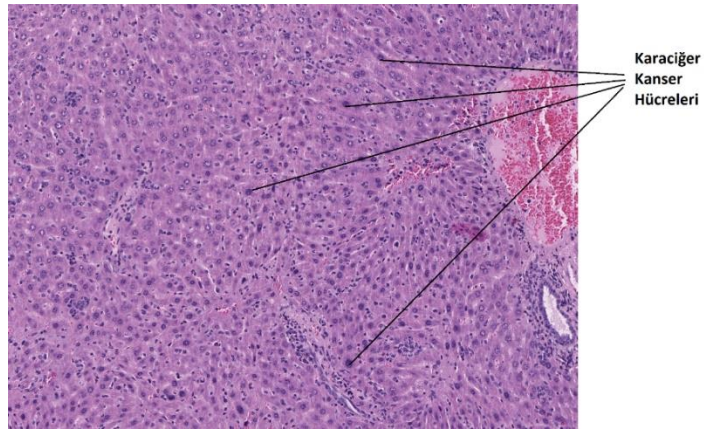
Şekil 153. Pozitif kontrol (2. Grup) nude CD 1 fare karaciğer tümörü a. 1. ölçüm IVIS görüntüsü b. 2. ölçüm IVIS görüntüsü, c. 3. ölçüm IVIS görüntüsü



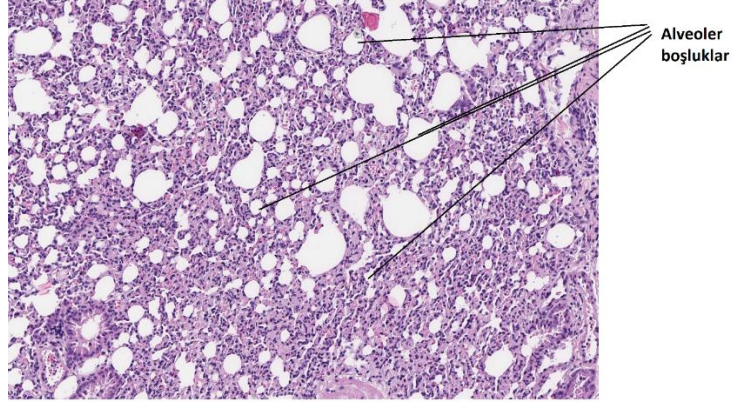
Şekil 154. Pozitif kontrol (3. Grup) nude CD 1 fare karaciğer tümörü a. 1. ölçüm IVIS görüntüsü b. 2. ölçüm IVIS görüntüsü, c. 3. ölçüm IVIS görüntüsü

4.8.3 Patolojik Çalışmalara ait Bulgular

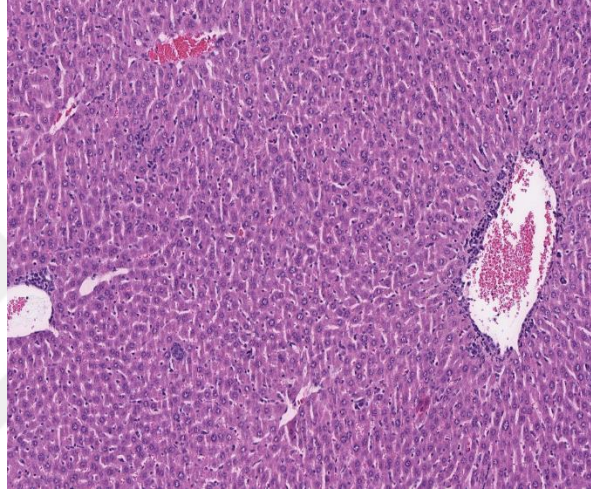
Yöntem 3.2.15.5’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Patoloik incelemede dokular; nekroz odakları, tümör hücreleri ve toksik etkiler açısından değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirme sonucunda; 1. Grupta (Negatif Kontrol Grubu) bulunan nude CD-1 farelerin karaciğer dokularında kanser hücrelerine rastlanırken (Şekil 155); akciğer (Şekil 156), dalak, kalp ve böbrek organlarının dokuları normal bulunmuştur. 2. Grupta (Pozitif Kontrol Grubu= Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Tedavisi Uygulanmış Grup) bulunan nude CD-1 farelerin karaciğer dokularında kanser hücrelerine rastlanmazken, hücrelerde nekrozlara da rastlanmamıştır (Şekil 157). Bu grupta dalak, kalp ve böbrek organlarının dokuları normal bulunurken, iki nude CD-1 farenin akciğerinde hafif pnömani gözlenirken bir farenin akciğerinde orta düzeyde pnömani gözlenmiştir (Şekil 158). 3. Grupta (Pozitif Kontrol Grubu= Piyasa Preparatı Tedavisi Uygulanmış Grup) bulunan nude CD-1 farelerin karaciğer dokularında kanser hücrelerine rastlanmazken; bir farenin karaciğerinde şiddetli nekroz ve iki farenin karaciğerinde hafif nekroz gözlenmiştir (Şekil 159). Bu grupta dalak, kalp ve böbrek organlarının dokuları normal bulunurken, bir nude CD-1 farenin akciğerinde orta pnömani gözlenirken iki farenin akciğerinde şiddetli düzeyde pnömani gözlenmiştir (Şekil 160).



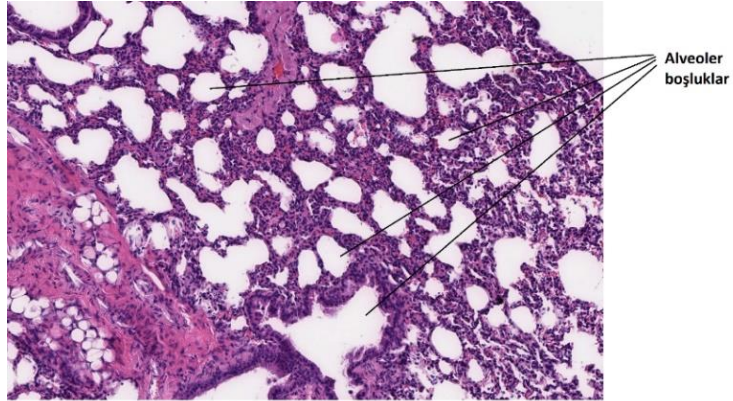
Şekil 155. 1. Grup Karaciğer Dokusunun Patolojik İncelemesi



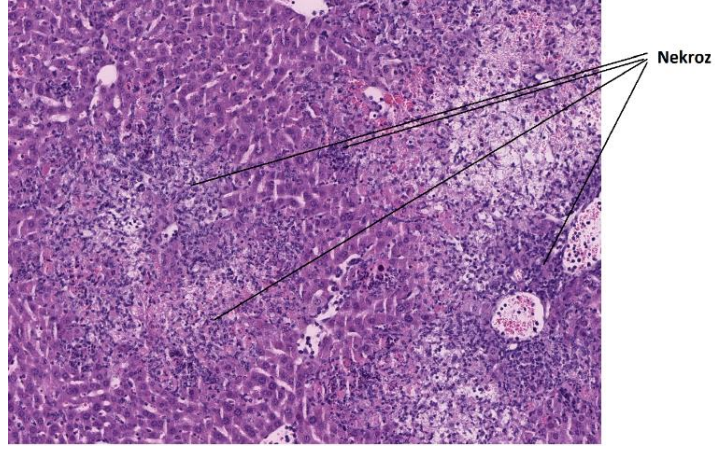
Şekil 156. 1. Grup Akciğer Dokusunun Patolojik İncelemesi



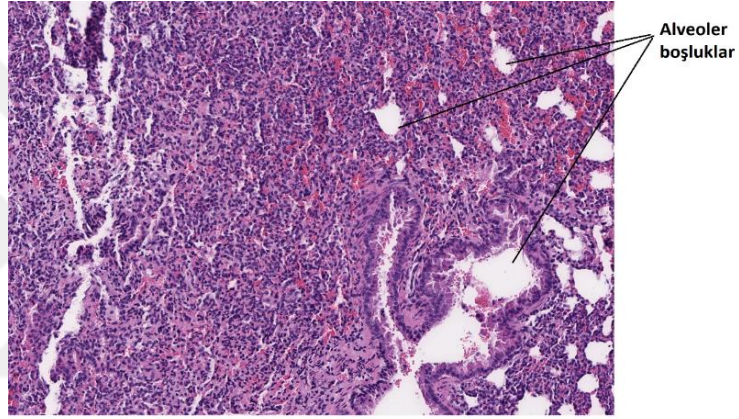
Şekil 157. 2. Grup Karaciğer Dokusunun Patolojik İncelemesi



Şekil 158. 2. Grup Akciğer Dokusunun Patolojik İncelemesi



Şekil 159. 3. Grup Karaciğer Dokusunun Patolojik İncelemesi



Şekil 160. 3. Grup Akciğer Dokusunun Patolojik İncelemesi

4.8.4 Organlarda Bulunan Doks-HCl Tayini için Metot Geliştirme Çalışması

Etkinlik çalışması sonrası fareler sakrifiye edilerek; akciğer, dalak, kalp, karaciğer ve böbreklerde biriken Dok-HCl'ün tayini için HPLC-Floresan Dedektör (HPLC-FLD) cihazında miktar tayini yöntemi geliştirilmiştir. Cihaz parametreleri, standart ve iç standart çözeltilerinin hazırlanışı, matriks ve numune çözeltilerinin hazırlanışları Yöntem 3.2.15'de verildiği şekildedir.

4.8.4.1 Özgünlük ve Seçicilik Parametresine ait Bulgular

Matriks çözeltisi üzerine ekim yapılan Doks-HCl standart çözeltisi ve Dau iç standart çözeltisi ile matriks çözeltisi kromatogramları karşılaştırılmış ve her iki maddenin alıkonma zamanlarından matriks çözeltisinden herhangi bir girişim olmadığı gözlenmiştir.

4.8.4.2 Çalışma Aralığı ve Doğrusallık Parametresine ait Bulgular

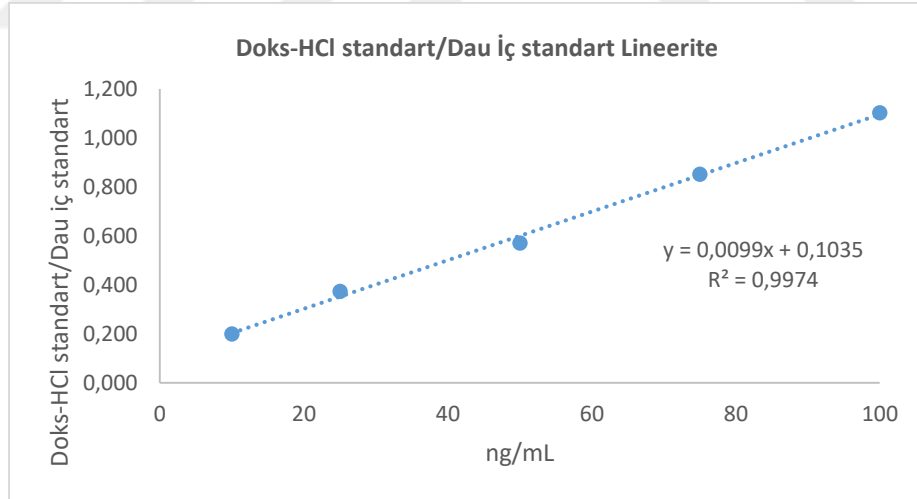
Yöntem 3.2.15.3’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Çalışma aralığı parametresinde 100 ng/mL Dau iç standardını içeren %20 ile %200 derişim için yapılan enjeksiyonlara ait alan değerleri, Tablo 120’de verilmiştir. Doğrusallık çalışması için 100 ng/mL Dau iç standardını içeren %20, %50, %100, %150, %200 Doks-HCl derişimdeki çözeltilerden verilen 3’er enjeksiyona ait alan değerleri Tablo 121’de, kalibrasyon eğrisi grafiğı ise Şekil 161’de verilmiştir.

Tablo 120. Doks-HCl ve Dau Çalışma Aralığı Sonuçları

	Alan Doks-HCl Standart Çözeltisi	Alan Dau İç standart	Doks-HCl Standart Çözeltisi Alan/ Dau İç standart Alan oranı
%20 (C _{Doks-HCl} = 10 ng/mL, C _{Dau} =100 ng/mL)	4525	42657	0.106
	4515	42280	0.107
	4245	41671	0.102
	4521	42152	0.107
	4258	42365	0.101
	4321	42356	0.102
ORT			0.104
% SS			0.003
% RSS			1.208
%200 (C _{Doks-HCl} = 100 ng/mL, C _{Dau} =100 ng/mL)	51816	47251	1.097
	51252	47525	1.078
	53254	47236	1.127
	52154	47125	1.107
	53215	47625	1.117
	52365	47215	1.109
ORT			1.106
% SS			0.017
% RSS			1.538

Tablo 121. Doks-HCl ve Dau Doğrusallık Sonuçları

Konsantrasyon	Alan Doks-HCl Standart Çözeltilisi	Alan Dau İç standart	Doks-HCl Standart Çözeltilisi Alan/ Dau İç standart Alan oranı	Doks-HCl Standart Çözeltilisi Alan/ Dau İç standart Alan ort
$C_{\text{Doks-HCl}} = 10 \text{ ng/mL}$, $C_{\text{Dau}} = 100 \text{ ng/mL}$	8787	43861	0.200	0.200
	8754	43926	0.199	
	8810	43803	0.201	
$C_{\text{Doks-HCl}} = 25 \text{ ng/mL}$, $C_{\text{Dau}} = 100 \text{ ng/mL}$	17556	47041	0.373	0.373
	17577	47145	0.373	
	17578	47167	0.373	
$C_{\text{Doks-HCl}} = 50 \text{ ng/mL}$, $C_{\text{Dau}} = 100 \text{ ng/mL}$	27545	47289	0.582	0.570
	26585	47106	0.564	
	26565	47048	0.565	
$C_{\text{Doks-HCl}} = 75 \text{ ng/mL}$, $C_{\text{Dau}} = 100 \text{ ng/mL}$	41269	48443	0.852	0.853
	41305	48315	0.855	
	41386	48631	0.851	
$C_{\text{Doks-HCl}} = 100 \text{ ng/mL}$, $C_{\text{Dau}} = 100 \text{ ng/mL}$	52816	47942	1.102	1.103
	52319	47368	1.105	
	52141	47326	1.102	

**Şekil 161.** Doks-HCl ve Dau Kalibrasyon Eğrisi Grafiği**4.8.4.2.1 LOD ve LOQ Değerine ait Bulgular**

Yöntem 3.2.15.3.1’de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Doks-HCl’e ait LOD değeri 0.314 ng/mL bulunurken, LOQ değeri 1.04 ng/mL bulunmuştur.

4.8.4.3 Organlarda Bulunan Doks-HCl'ün Miktar Tayini Çalışmasına ait Bulgular

Organlarda bulunan Doks-HCl miktarlarının tayini için numuneler Yöntem 3.2.15.4'de anlatıldığı şekilde analizlenmiş ve kalibrasyon eğrisi yardımıyla miktar tayinleri hesaplanmıştır. Bulunan sonuçlar Tablo 122'de verilmiştir.

Tablo 122. Organlarda biriken Doks-HCl Miktar Tayini Sonuçları (n=3)

	Tedavi uygulaması yapılmayan negatif kontrol grubu (Doks-HCl (ng/g)) $\pm$ SS	Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu (Doks-HCl (ng/g)) $\pm$ SS	Piyasa preparatı (Doks-HCl (ng/g)) $\pm$ SS
Akciğer	-	29.3 $\pm$ 1.32	32.0 $\pm$ 1.65
Dalak	-	827.2 $\pm$ 2.35	895.5 $\pm$ 1.96
Kalp	-	66.1 $\pm$ 1.38	94.7 $\pm$ 2.98
Karaciğer	-	195.8 $\pm$ 2.63	79.1 $\pm$ 2.96
Böbrek	-	16.4 $\pm$ 1.69	12.6 $\pm$ 2.31

5 Tartışma

5.1 Etkin madde Üzerine Yapılan Çalışmaların Değerlendirilmesi

Doks-HCl etkin maddesinin fizikokimyasal özelliklerini belirlemek adına UV spektrumu alındı ve sonuçların literatür bilgileri ile uyumu araştırıldı. Doks-HCl'ün distile su içerisindeki çözeltisinin 495 nm de verdiği maksimum absorbands, literatür bilgileri ile uyumlu bulundu (Coluccini et al., 2020). FTIR spektrumunda elde edilen pik değerleri Doks-HCl'ün yapısında; keton, eter, alkol gruplarının varlığını göstermiştir. 3560 ve 3160 cm^{-1} O-H bağ gerilmesini, 3160 ve 2300 cm^{-1} NH_3 bağ gerilmesini, 1724 cm^{-1} keton bağ gerilmesini, 1613 ve 1580 $\text{C}=\text{O}$ çift bağ gerilme bandını, 1282 cm^{-1} C-O-C eter gerilme bandını, 1115 cm^{-1} üçüncül alkol bağ gerilmesini, 1071 cm^{-1} ikincil alkol bağ gerilmesini, 1008 cm^{-1} birincil alkol bağ gerilmesini ifade etmektedir. Sonuçta elde edilen bulguların literatür kayıtlarına uygun olduğu görülmüştür (Bansal et al., 2021).

Doks-HCl etkin maddesinin miktar tayini çalışmalarını gerçekleştirmek adına Avrupa Farmakopesinde verilen yöntem kullanılarak MF çözücüsü ile; in vitro salım, in vitro sızıntı ve in vitro permeabilite çalışmalarında miktar tayinlerinin doğru ve güvenilir yapılabilmesi adına ise pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ve HBSS ortamlarında HPLC validasyonları gerçekleştirildi. Validasyon paramatereleri “ICH Validation of Analytical Procedures” e göre; özgünlük ve seçicilik, çalışma aralığı ve doğrusallık, duyarlılık ve saptama sınırı, doğruluk, kesinlik (sistem kesinliği, tekrarlanabilirlik, laboratuvar içi kesinlik), dayanıklılık, çözelti stabilitesi, sistem uygunluk parametrelerini içermektedir. Bu amaçla çalışmada, validasyon parametreleri her bir çözücü ortamı için gerçekleştirildi. MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ve HBSS ortamlarının, Doks-HCl pikinin altında girişiminin bulunmadığı gözlenerek metotun özgün ve seçici olduğu gösterildi. MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ortamlarında 0.01-0.075 mg/mL derişim aralığında validasyon çalışması sürdürüldü. Fakat, in vitro permeabilite çalışmasının yapılacağı HBSS ortamlarında düşük konsantrasyonlarda çalışılacağından 0.0005-0.015 mg/mL derişim aralığında çalışma dizayn edildi. Çalışma aralığı parametresinde Doks-HCl etkin maddesinin MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ortamlarında %20 ve %150 konsantrasyonlarında, HBSS ortamında ise %5 ve %150 konsantrasyonlarında yapılan altışar enjeksiyonun alanı ve bu alanlar arasındaki %RSS değerlendirildi. Her bir ortam koşulunda %RSS %2'den küçük bulundu. Doğrusallık parametresinde; MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ve HBSS ortamlarındaki r^2 değerleri ise sırası ile; 0.9996, 0.9999, 0.9994, 0.9996, 1.0000 şeklinde bulundu ve bu değerlerin (r^2) ≥ 0.999 olma kriterini

sağladığı gözlemlendi. Her bir ortam için LOD ve LOQ değerleri hesaplandı. LOD değeri; MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ve HBSS ortamları için sırasıyla; 15×10^{-4} , 7×10^{-5} , 19×10^{-4} , 8×10^{-5} ve 4×10^{-5} mg/mL şeklinde bulundu. LOQ değerleri ise MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ve HBSS ortamları için sırasıyla; 46×10^{-4} , 22×10^{-5} , 56×10^{-4} , 23×10^{-5} ve 12×10^{-5} mg/mL bulundu. Doğruluk parametresinde tüm validasyon ortamlarının %80, %100 ve %120 seviyelerinde Doks-HCl geri kazanımları hesaplandı. MF ortamında %80 derişimde geri kazanım %99.8, %100 derişimde geri kazanım %101.0, %120 derişimde geri kazanım %100.7; pH 5.5 ortamında %80 derişimde geri kazanım 100.1, %100 derişimde geri kazanım %100.5, %120 derişimde geri kazanım %99.8; pH 6.5 ortamında %80 derişimde geri kazanım 100.0, %100 derişimde geri kazanım %100.1, %120 derişimde geri kazanım %100.3; pH 7.4 ortamında %80 derişimde geri kazanım %99.7, %100 derişimde geri kazanım %101.7, %120 derişimde geri kazanım %100.4; HBSS ortamında %80 derişimde geri kazanım %100.7, %100.0 derişimde geri kazanım %101.0, %120 derişimde geri kazanım %100.8 bulundu. Sonuçlar değerlendirildiğinde, her bir seviyedeki geri kazanım %98.0-%102.0 arasında olup kabul kriterlerine uygun bulundu. Ayrıca her bir seviyedeki 3'er enjeksiyonun geri kazanım değerleri arasındaki %RSS<%2 bulundu.

Sistem kesinliğinde, validasyonu gerçekleştirilen her ortam için yapılan altı enjeksiyon sonunda alanlar ve alıkonma zamanları değerlendirildi. Alan değerleri arasında %RSS<%2 bulundu. Tekrarlanabilirlik parametresinde; MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ve HBSS ortamları için altışar enjeksiyon sonucu %RSS<%2 bulundu. Analiz başlangıcında ve analiz sonunda enjekte edilen standart ve kontrol standart enjeksiyonları değerlendirildi ve % uyumları değerlendirildi, sonuçlar %98-%102.0 arasında bulunarak kabul kriterlerine uygun sonuçlar elde edildi. Laboratuvar içi kesinlik çalışmasında, farklı günlerde ve farklı cihazlarda yapılan analiz sonuçlarının birbirine yakınlık derecesinin ölçülmesinin değeri olan % farklanma hesaplandı. Yüzde fark; MF ortamı için %0.3, pH 5.5 ortamı için %0.1, pH 6.5 ortamı için %0.2, pH 7.4 ortamı için %0.1, HBSS ortamı için %1.2 bulunarak %fark değerinin <%2.0 olması kriterini sağladı. Tekrarlanabilirlik çalışmasında olduğu gibi analiz başlangıcında ve sonunda standart ve kontrol standart uyumları kontrol edildi, sonuçlar %98.0-%102.0 arasında bulundu. Her bir çözücü ortamı için gerçekleştirilen dayanıklılık parametrelerinde normal çalışma koşulları, akış hızı 0.9 mL/dk, akış hızı 1.1 mL/dk, kolon sıcaklığı 20°C, kolon sıcaklığı 30°C, tampon pH 2.3 ve tampon pH 2.7 değişikliklerindeki enjeksiyonlar değerlendirildi. Her bir ortam için kabul kriterleri

olan Doks-HCl pikinin teorik plaka sayısı ≥ 2000 , kuyruklanma faktörü ≤ 2 , normal çalışma koşullarında bulunan sonuçlar ile çalışılan koşulların ortalama sonucunun %fark<%2 olma koşulu sağlandı.

Doks-HCl etkin maddesinin her bir ortam için çözelti stabilitesi değerlendirildi. Doks-HCl etkin maddesinin; MF, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ve HBSS çözücülerinde 48 saat boyunca stabil olduğu, başlangıçtaki alan ile belirli saatlerde yapılan enjeksiyon alanları arasındaki farkın %2'den küçük bulunması ile gösterildi. Sistem uygunluk parametresi için yapılan altı enjeksiyon sonucu; alan, alıkonma zamanları, kuyruklanma faktörleri ve teorik plaka sayıları değerlendirildi. Validasyon süreci boyunca tüm sonuçlar ICH kriterlerine uygun bulundu (ICH, 1995).

Doks-HCl etkin maddesinin, fizikokimyasal özelliklerini doğrulamak ve literatür sonuçları ile karşılaştırmak adına distile suda; formülasyon geliştirme aşamasında kullanılacak ortamlardaki çözünürlük bilgisi için; %0.9 NaCl çözeltisi, 1M HEPES tampon çözeltisi, 0.5 mol/L Sodyum karbonat tampon çözeltisi, Sitrik asit-Sodyum sitrat tampon çözeltisi ortamlarında 24., 48. ve 72. saatlerde çözünürlük çalışması gerçekleştirildi. Ayrıca in vitro salım ve permeabilite çalışmalarında sink koşulu sağlayabilmek adına ise pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ve HBSS ortamlarında 24., 48. ve 72. saatlerde çözünürlük çalışması yapıldı. Doks-HCl'ün distile sudaki çözünürlüğü 72. saat sonunda 7.5 mg/mL bulunarak literatür verilerine uygun bulundu (Chemical, 2013). DoksHCl'ün; %0.9 NaCl, 1M HEPES tampon çözeltisi, 0.5 mol/L Sodyum karbonat tampon çözeltisi, Sitrik asit-Sodyum sitrat tampon çözeltisi, pH 5.5 tampon çözeltisi, pH 6.5 tampon çözeltisi, pH 7.4 tampon çözeltisi ve HBSS çözeltisi içindeki çözünürlükleri sırası ile 6.55 mg/mL, 5.67 mg/mL, 0.22 mg/mL, 7.25 mg/mL, 5.54 mg/mL 3.54 mg/mL, 1.23 mg/mL, 1.54 mg/mL bulunarak, sonuçlar literatür verileri ile uyumlu bulundu (Tablo 54) (Yamada, 2020).

5.2 Formülasyon Geliştirme Çalışmalarının Değerlendirilmesi

5.2.1 DSPE PEG 2000-Glisirretinik asit Konjugasyonu Sentezi Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Kanser tedavilerinde aktif hedefleyici moleküller, etkin maddelerin hedeflenen dokuya taşınmasını sağlayarak hedef olmayan bölgelerde minimum toksik etki yaratmasını sağlarlar (Alavi & Hamidi, 2019). RES organelleri tarafından vücut sirkülasyonundan uzaklaştırılmanın önüne geçen PEG moleküllerinin yüzeyleri konjugat sentezine olanak veren kimyasal yapıları içermektedir. Bu nedenle aktif hedefleyici moleküllerin

PEG molekülleri ile olan konjugasyon sentezleri son dönemde üzerinde oldukça çalışılan alanlardan biri olmuştur (Gupta et al., 2019; Shi et al., 2021). Karaciğer kanseri hücrelerinde 1.5-5 kat daha fazla reseptör içermesi ve yüksek oranda karaciğerde eksprese edilmesinden dolayı GA molekülü bu çalışmada aktif hedefleyici molekül olarak kullanılmıştır (Cao et al., 2019).

Yapılan literatür araştırmalarında DSPE PEG 2000 amin maddesi kullanılarak GA'e konjugasyonun sağlandığı gözlenmiştir (Speciale et al., 2022; Yuqi et al., 2018). Reaksiyonun gerçekleştiği koşullar ve moleküller ile yapılan sentez çalışmalarında elde edilen molekül, stokiyometrik olarak reaksiyona giren ve çıkan madde miktarlarının eşit olmaması dolayısıyla saf bir şekilde elde edilememiştir. Bu amaçla yapılan araştırmalar sonucu DSPE PEG 2000 karboksilik asit yapısı temin edilmiş ve yapısındaki karboksilik asit grubu ile GA molekülündeki hidroksil grubu arasında Steglich esterifikasyon reaksiyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

5.2.1.1.1 Nükleer Manyetik Rezonans Analizi Çalışmalarının Değerlendirilmesi

NMR, kimyasal bileşiklerin konjugasyonları sonrası yapılarının aydınlatılmasında oldukça önemlidir (Sugiki, Furuita, Fujiwara, & Kojima, 2018). DSPE PEG 2000 karboksilik asit ve GA arasında gerçekleştirilen Steglich esterifikasyonu sonrasında ¹H-NMR ve ¹³C-NMR analizleri gerçekleştirildi. Konjugasyon sentezinde kullanılan DSPE PEG 2000 karboksilik asit ve GA'e ait spesifik pik yarılımları NMR spekturumunda gözlenirken, ¹H-NMR'da 4.0 ppm'deki ester grubuna ait yarılma ve ¹³C-NMR 78.8 ppm'de ki GA'in hidroksil grubunun bağlı olduğu karbona ait yarılımlar konjugatın başarılı şekilde sentezlendiğini göstermektedir.

5.2.2 Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistem Geliştirme Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında; basit adımları içermesi, yaygın ve uzun süredir kullanılan bir teknik olması nedeniyle lipit hidrasyon metodu kullanıldı (Mani Sharma, Jyoti Joshi, Neeraj Kumar Chouhan, Mamta N. Talati, 2020; Vemuri & Rhodes, 1995). Ayrıca lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin en büyük stabilite problemlerinden biri olan lipitlerin oksidasyonunun önüne geçilebilmesi için formülasyon terkiplerine Vit E Asetat maddesi antioksidan olarak dahil edildi (Yadav, Sandeep, Pandey, & Dutta, 2017). Doks-HCl etkin maddesinin in vivo toksisitesinin enkapsülasyon kapasitesinin artması ile azaldığı, formülasyon stabilitesinin ise

enkapsüle edilmiş Doks-HCl'ün veziküllerden sızıntı yapmadan uzun süre stabil kalarak arttırıldığı yapılan çalışmalarda gösterilmektedir (Fritze, Hens, Kimpf, Schubert, & Peschka-süss, 2006). Enkapsülasyon kapasitesinin arttırılması ve sızıntı oluşturmeyen stabil lipozomal ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesinde; formülasyon bileşenlerinin oranı ve etkin madde yükleme yönteminin seçimi çok önemlidir. Bu amaçla öncelikle lipitlerin, kolesterolün ve pegilasyon ajanının oranları, Doks-HCl etkin maddesinin pegile lipozomal piyasa preparatına göre belirlendi (% mol oranları fosfolipit:kolesterol:pegilasyon ajanı; 56: 38:5).

Doks-HCl etkin maddesi gibi zayıf bazik özellikle olan ve amfifilik özellik gösteren etkin maddelerin pH gradient metodu ile etkin madde yüklemesinin yapılması literatürlerde önerilmektedir (Mayer, Cullis, & Bally, 1994; Rehman et al., 2019). Doks-HCl etkin maddesi ($pK_a=8.6$) iç kısmı asidik lipozomal sistemlerin varlığında nötral pH'da inkübasyona bırakıldığında, lipozomun iç kısmına difüze olarak buradaki asidik yapıdan dolayı protonlanarak (H^+) çökelmektedir. H^+ lanmış bu yapı tekrar vezikül içerisinden çıkamamakta ve böylece etkin madde lipozomal sisteme yüklenmektedir. pH gradient metotunda, lipozomun içi asidik iken dış tampon bazik ya da nötral pH'ya ayarlanmaktadır (Fritze et al., 2006). pH gradient metodu oluşturmak için öncelikle sitrik asit-sodyum sitrat/sodyum karbonat tamponları kullanıldı (Guoqin et al., 2010). Fakat sodyum karbonat çözeltisinin pH değeri yaklaşık pH 9 bulundu ve formülasyon geliştirme aşamasında Doks-HCl etkin maddesinin bu ortamda çökeldiği gözlemlendi. Bu nedenle F1 formülasyonunun in vitro denemeleri gerçekleştirilmedi. Yapılan araştırmalar sonrası Doks-HCl'ün bazik ortamda çözünürlüğünün düşmesi nedeni ile çökelmenin olduğu belirlenerek (Fritze et al., 2006) tampon ortamı HEPES ile değiştirildi (Barenholz & Haran, 1994). Lipozomal ilaç taşıyıcı sistem geliştirmek için yapılan ön formülasyon çalışmalarında aktif hedefli pegile F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9 ve F10 lipozom formülasyonlarının enkapsülasyon kapasitesini belirleyen farklı etkin madde:lipit oranları kullanıldı (Chountoules, Naziris, Pippa, & Demetzos, 2018). Etkin madde:lipit oranı 1.0:1.0 ila 0.2:1.0 olan 9 adet formülasyon terkihi denemesi yapıldı. Lipozomal ilaç taşıyıcı sisteme etkin madde yüklemesinde pH gradient metodunu oluşturabilmek adına öncelikle lipozomal ilaç taşıyıcı sistem oluşturuldu ardından Doks-HCl etkin madde yüklemesi yapılarak, enkapsülasyon kapasitesi hesaplandı. Ardından PB adımını optimize etmek için mikrofluidik döngülerinden sonra PB, PDI ve zeta potansiyel

değerleri ölçüldü (G. Zhang & Sun, 2021). Yaklaşık tüm formülasyon terkiplerinde 8. döngüye kadar PB ve PDI azalırken, 8. döngüden sonra değerler arttı. Bu döngü sonrası mikrofludiskten geçirilme partiküllerin birleşmesine, boyutlarının ve PDI değerlerinin artmasına neden olmuştur. Bu nedenle optimal döngü sayısı 8 döngü olarak belirlendi. Ardından lipozomal ilaç taşıyıcı sistemler ekstrüder cihazındaki 1000 µm, 800 µm, 400 µm, 200 µm ve 100 µm lik (3 döngü) por çaplarına sahip polikarbonat filtrelerden geçirildi ve PB, PDI ve ZP değerleri ölçüldü.

Aktif hedefli pegile F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9 ve F10 lipozomal formülasyonlarının in vitro karakterizasyon çalışmalarından; pH, viskozite, enapsülasyon kapasitesi, ilaç yükleme kapasitesi tayini analizleri yapıldı. Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerde kritik parametrelerden olan enapsülasyon kapasitesi sonuçları değerlendirildiğinde yüksek enapsülasyon kapasitesinin aktif hedefli pegile F5, F6 ve F7 formülasyonlarında olduğu ve sonuçların sırası ile; %89.98, %88.89, 90.32 olarak bulunduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar formülasyon terkiibinde bulunan lipidler ile lipozomal ilaç taşıyıcı sistem geliştirmede Doks-HCl etkin maddesinin optimal etkin madde:lipit oranının 0.4:1.0 olduğunu gösterdi ve bu sonuç literatür verileri ile benzer bulundu (Johnston, Edwards, Karlsson, & Cullis, 2008). Aktif hedefli pegile F5, F6 ve F7 lipozomal formülasyonları ile prolipozom formülasyon geliştirme çalışmalarına geçildi.

5.2.3 Prolipozomal İlaç Taşıyıcı Sistem Geliştirilme Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin tüm farmasötik ürünlerde olduğu gibi stabilite süresince fiziksel ve kimyasal özelliklerini koruyabilmeleri gerekmektedir. Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin en büyük dezavantajları; yapılarında bulunan lipidlerin, oksidasyon ve hidroliz yoluyla kimyasal olarak bozunmaya uğramalarıdır. Bu bozunmanın önüne geçmek adına son dönemde üzerinde en çok çalışılan sistemler prolipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Lipozomal formülasyonların liyofilize edilmesi ile sulu yapıların ortamdan uzaklaştırılması sonucu; hidroliz, oksidasyon, ilaç sızıntısı ve agregasyonun önüne geçilebilmektedir (Sopyan, K, & Gozali, 2020). Liyofilizasyonda dondurma ve kurutma aşamasındaki stres koşullardan formülasyonları koruyan maddelere liyoprotektan denir. Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin liyofilizasyon aşamasında liyoprotektan maddeler, fosfolipitlerin baş gruplarının yanıl boşuklarını koruyarak lipozomların stabilitesini sağlar (Stark et al.,

2010). Liyoprotektan özellikteki mannitol kurutma sonrası kek oluşumunu sağlayarak yeniden dağılım zamanını azaltan ve lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerde sıklıkla kullanılan yardımcı maddelerdendir (K. N. Kumar, Mallik, & Sarkar, 2017). Bu amaçla prolipozomal ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesinde aktif hedefli pegile F5, F6 ve F7 lipozom formülasyonlarına liyoprotektan görevi görecektir mannitol maddesi farklı miktarlarda eklendi ve 10 adet terkip oluşturuldu. Formülasyon terkibine dahil edilen mannitol yüzdeleri ve mannitol:lipit oranları Tablo 7’de verildi. Oluşturulan aktif hedefli pegile F5-1, F5-2, F5-3, F6-1, F6-2, F6-3, F7-1, F7-2, F7-3 ve F7-4 prolipozom formülasyonları %5 lik dekstroza çözeltisi içerisinde disperse edilmeden nem miktarları ölçüldü, en etkin kurutmaların aktif hedefli pegile F5-3, F6-3 ve F7-3 prolipozom formülasyonlarında olduğu gözlemlendi. Özellikle aktif hedefli pegile F7-3 formülasyonunda nem yüzdesi oldukça düşük (%0.019) bulundu. Liyofilizasyonda düşük nem miktarına kadar etkin bir kurutmanın yapılabildiği olması lipozomların en büyük dezavantajı olan lipitlerin oksidasyon ve hidrolizinin önüne geçilip prolipozom formülasyonunun stabilitesini arttırmayı sağlamaktadır (Franz & Selmin, 2018).

Liyofilize ürünlerde yeniden dağılabilme zamanı, liyofilizasyon sürecinin performans ölçütü olarak oldukça önemlidir (Beech et al., 2015). Tüm formülasyonlar %5’lik dekstroza çözeltisi içerisinde disperse edilirken, yeniden dağılabilme zamanları ölçüldü ve etkin kurutmanın sağlandığı aktif hedefli pegile F5-3, F6-3 ve F7-3 formülasyonlarında birbirlerine yakın zamanlarda dispersiyon oluşturduğu fakat en kısa sürede en homojen görünümü aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun sağladığı gözlemlendi. Geliştirilen prolipozom formülasyonları diğer in vitro karakterizasyon çalışmaları olan; PB, PDI, ZP, pH, viskozite, enkapsülasyon kapasitesi ve etkin miktar tayini yönünden de değerlendirildi ve optimal sonuçların aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonuna ait olduğu gözlemlendi.

X-ışını difraksiyonu, katıların kristallografik özelliklerini ve içerdikleri fazların belirlenmesini sağlayan bir tekniktir. Maddelerin kristal ve amorf özelliklerini belirlemede oldukça önemlidir. Etkin maddelerin toz morfolojilerinin formülasyon geliştirme süreçlerinden sonra (özellikle eritme, liyofilizasyon, baskı-öğütme vb) gözlenmesi önemlidir (Einfal, Planinšek, & Hrovat, 2013). Bu amaçla Doks-HCl etkin maddesinin, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyon bileşenlerinin fiziksel karışımlarının ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun XRD

analizleri gerçekleştirildi. XRD analizinde gözlemlenen; 20.5463° de kesin yansımali Doks-HCl etkin maddesine ait karakteristik pik, pegile F7-3 prolipozom formülasyonunda (20.6783°) ve fiziksel karışımda (20.6199°) da gözlemlendi, sonuçlar literatür bilgileri ile uyumlu bulundu (Chai et al., 2017). Ayrıca fiziksel karışımda ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunda bulunan ikincil yüksek intensiteli 21.2242° de ki pikin mannitole ait olduğu gözlemlendi (van der Schoot et al., 2007). Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunda bulunan Doks-HCl'ün kristalinite yüzdesi ise %89.51 bulundu. Bu sonuçlar Doks-HCl'ün formülasyon geliştirme süreci sonunda kristal özelliğini koruduğunu gösterdi (Şekil 44).

5.3 Lipozom ve Prolipozom Formülasyonlarının Morfolojik Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Lipozomal ilaç taşıyıcı sistem formülasyonlarının geliştirildikten sonra morfolojik görüntülemelerinin yapılması oldukça önemlidir. Bu morfolojik görüntülemelerden KryoTEM aracılığıyla doğrudan yapılan görüntülemeler, amfifilik moleküllerin sıvı bir faz içerisinde herhangi bir yapay doku ya da kimyasal bir uygulama olmadan doğrudan görüntülenmesini sağlar (Damari, 2014). Bu amaçla, geliştirilen aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonunun ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun %5 lik dekstroz çözeltisi içerisinde seyreltilmesinden sonra KryoTEM analizi yapıldı (Şekil 45, Şekil 46).

Özellikle film hidrasyon tekniği ile geliştirilen lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerde MLV yapıya sahip lipozomal yapılar oluşur, ardından partikül boyutu küçültme işlemleri ile SUV yapıları oluşur (Christian Isalomboto Nkanga, Alain Murhimalika Bapolisi, 2019). Geliştirilen lipozomal ve prolipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin çok katmanlı (multilameller=MLV) yapıya sahip olmadığı, tek katmanlı (unilammeller) yapıda olduğu, partikül boyutu küçültme işlemlerinin başarılı bir şekilde gerçekleşip, bu aşamalardan lipozomal yapının morfolojik olarak etkilenmediği ve morfolojik yapının literatürlerle uyumlu olduğu gözlemlendi (Trevisan, Cavalcanti, Oliveira, Torre, & Santana, 2011).

5.4 Lipozom ve Prolipozom Formülasyonlarının Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analizlerinin Değerlendirilmesi

Formülasyon geliştirme süreçlerinde yapılan DSC analizleri; erime dereceleri, Tg değerleri gibi formülasyon bileşenlerinin karakterizasyon sonuçlarını hakkında bilgi vermektedir (Humboldt Universitat zu Berlin, 2009).

Aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom terkininde bulunan HSPC, DSPC, Kolesterol, DSPE-PEG 2000-Glisirretinik asit, Doks-HCl maddelerinin DSC analizleri yapılarak Tg ve erime noktaları değerlendirildi ve literatürler ile karşılaştırmalar yapıldı. Tg değerleri; HSPC için 62.85 °C, DSPC için 46.56 °C, Kolesterol için 56.61°C, DSPE-PEG 2000-GA için 51.90 °C bulunarak literatür verileri ile uygun bulundu (Şekil 47) (Demetzos, Tzani, Naziris, Pippa, & Pispas, 2017; Kaneshina, Ichimori, Hata, & Matsuki, 1998). Doks-HCl için ise erime piki gözlemlendi ve bu değer 229.50 °C bulundu (Şekil 47) (Tahir et al., 2019). Plasebo aktif hedefli pegile F7 lipozom ve plasebo aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonlarının DSC analizleri yapıldı ve DSC termogramları benzer bulundu. Aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonlarının da DSC analizleri birbirine benzer bulundu (Şekil 47). Tg<37 °C olan lipozomal taşıyıcılar, fizyolojik sıcaklıkta etken maddenin sızmasına neden olur. Ancak lipozomların yüksek Tg değerine sahip olması (37°C'den büyük) ile fizyolojik sıcaklıkta daha az sızıntı olasılığı vardır (Abuwatfa, Awad, Pitt, & Hussein, 2022). Şekil 47'de görüldüğü gibi, aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonlarının DSC termogramında Tg değeri 49.95 °C bulunarak 37 °C'den büyük bulunmuştur.

Ayrıca aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonlarının DSC termogramlarında Doks-HCl'e ait erime pikinin gözlenmemiş olması lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerde etkin maddenin lipital yapılaraya yüksek afinitesi nedeniyle gerçekleşmiştir. Bu sonuç literatür bilgileri ile uyumlu bulundu. DSC analizlerinin kristal hal yorumlamasında XRD çalışmalarının destekleyici veri olarak kullanıldığı bilinmektedir. Bu amaçla aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunda bulunan Doks-HCl'ün kristal yapısı için XRD çalışmaları gerçekleştirildi ve yorumlandı (Bulgular 4.2.3.1.9).

5.5 Lipozom ve Prolipozom Formülasyonunun Osmolarite Analizlerinin Değerlendirilmesi

İzotonik çözeltiler, vücut sıvıları (kan plazması) ile aynı osmotik basınca sahip çözeltilerdir. Vücut sıvılarından veya kan plazmasının osmotik basıncından daha düşük osmotik basınç gösteren çözeltilere hipotonik, vücut sıvılarından veya kan plazmasının osmotik basıncından daha yüksek osmotik basınç gösteren çözeltilere hipertonic çözeltiler denir. Parenteral formülasyonların osmolaritenin değerlendirilmesi oldukça önemlidir (Roethlisberger, Mahler, Altenburger, & Pappenberger, 2016). Hipoosmolariteye (hipotonik) veya hiperosmolariteye (hipertonik) sahip parenteral formülasyonlar ağrıya, eritrositlerin morfolojik değişikliğine ve enjeksiyon bölgesinde doku hasarına neden olabilir. USP (<785>) rehberine göre kanın ozmolalitesi 285 ile 310 mOsm/L arasında değişmektedir (USP 785, 2022). Ortalama fizyolojik ozmolalite bu nedenle yaklaşık 297.5 mOsm/L olarak kabul edilmektedir (Date & Nagarsenker, 2008). Aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonunun osmolarite değeri 310 mOsm/L, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun ise %5'lik dekstroza içinde dispersiyonu sonrası osmolarite değeri 252 mOsm/L bulunarak sonuçlar kabul sınırları arasında bulunmuştur (USP, n.d.).

5.6 Lipozom ve Prolipozom Formülasyonunda Doks-HCl'ün Bitmiş Ürün Analitik Validasyonunun Değerlendirilmesi

Doks-HCl etkin maddesi ile gerçekleştirilen HPLC validasyonu sonrası, bitmiş ürünler aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunda bulunan Doks-HCl etkin maddesinin yüksek duyarlılık ve doğrulukta tayin edilebilmesini sağlamak adına HPLC validasyonları gerçekleştirildi. Öncelikli olarak etkin madde validasyonunda kullanılan metod parametreleri kullanılarak ekstraksiyon denemeleri yapıldı. En iyi Doks-HCl ekstraksiyonunun MF çözücüsü kullanılarak ve 10 dakika ultrasonikasyonla gerçekleştiği gözlemlendi. Bu şartlar altında numune hazırlama süreçleri gerçekleştirildi. Doks-HCl hammadde validasyon parametreleri, Doks-HCl standart hazırlama prosedürleri ve çözücü değiştirilmediği için validasyon parametrelerinden; doğrusalılık, çalışma aralığı, duyarlılık ve saptama sınırı gibi standart çözelti ile gerçekleştirilmiş parametreler dışında kalan; özgünlük ve seçicilik, doğruluk, kesinlik (sistem kesinliği,

tekrarlanabilirlik, laboratuvar içi kesinlik), dayanıklılık, sistem uygunluğu ve çözelti stabilitesi parametreleri gerçekleştirilerek validasyonlar tamamlandı.

HPLC analizlerinde pik saflığının belirlenmesi, yüksek doğruluk ve seçicilikte analiz yapabilmek için oldukça önemlidir. Bu nedenle aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonlarında pik saflıkları değerlendirildi (Şekil 48). Aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonlarında pik saflığı 1.000 bulunarak kabul kriteri olan >0.9999 şartını sağlamıştır (Karthikeyan K, Saravanan R., Rajeswari R., 2009). Seçicilik parametresinde enjekte edilen MF, plasebo aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu numune çözeltisi, aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu numune çözeltisi ve Doks-HCl standart çözeltisi enjeksiyonlarının kromatogramları karşılaştırıldı (Şekil 50). Doks-HCl'ün tayin edildiği alıkonma zamanında çözücü ve plasebo aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonundan herhangi bir girişim olmaması bu HPLC metodunun aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu için seçici olduğunu göstermiştir. Aynı şekilde MF, plasebo aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu numune çözeltisi, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu numune çözeltisi ve Doks-HCl standart çözeltisi enjeksiyonlarının kromatogramları da karşılaştırıldı (Şekil 51). Doks-HCl'ün tayin edildiği alıkonma zamanında çözücü ve plasebo aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonundan herhangi bir girişim olmaması bu HPLC metodunun aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu için de seçici olduğunu göstermiştir. Doğruluk çalışmasında aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonunun %80 derişim seviyesindeki geri kazanım değeri %99.1, %100 derişim seviyesindeki gerikazanım %98.8 ve %120 derişim seviyesindeki geri kazanım değeri %100.5 bulundu. Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun %80 derişim seviyesindeki geri kazanım değeri %100.3, %100 derişim seviyesindeki gerikazanım %100.7 ve %120 derişim seviyesindeki geri kazanım değeri %99.6 bulundu ve her iki formülasyon için kabul kriteri olan %98-%102.0 aralığını sağladı. Ayrıca her bir seviyedeki 3'er enjeksiyon %RSS değerleri de <2 bulundu. Kesinlik parametrelerinden, sistem kesinliğinde yapılan Doks-HCl standart çözeltisinin altı enjeksiyonunda alan ve alıkonma zamanlarındaki %RSS <2 bulunarak kabul kriterini sağlamıştır. Aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun numune çözeltileri için yapılan altı enjeksiyon sonrası %geri kazanım ve %RSS değerleri hesaplandı ve her iki numune

çözeltisi içinde %RSS<%2 olarak bulundu. Laboratuvar içi kesinlik çalışmasında ise iki farklı cihazda gerçekleştirilen analiz farkı; aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonunda %0.8, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunda ise %0.6 bulundu. Dayanıklılık çalışması için hem Doks-HCl standart çözeltisi, hem de aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom numune çözeltileri değişen şartlarda (akış hızı 0.9 mL/dk, akış hızı 1.1 mL/dk, kolon sıcaklığı 20°C, kolon sıcaklığı 30°C, tampon pH 2.7, tampon pH 2.7) HPLC'ye enjekte edildi. Normal koşullarda verilen enjeksiyon ile karşılaştırma yapılarak miktar tayinindeki %fark değerlendirildi. Her bir ortam için kabul kriterleri olan Doks-HCl pikinin teorik plaka sayısı ≥ 2000 , kuyruklanma faktörü ≤ 2 , normal çalışma koşullarında bulunan sonuçlar ile çalışılan koşulların ortama sonucu arasında %fark<%2 bulundu. Çözelti stabilitesi analizi için Doks-HCl standart çözelti enjeksiyonu, aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyon numune çözeltisi enjeksiyonu ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyon numune çözeltisi enjeksiyonu 48 saat boyunca değerlendirildi. Alan değerleri arasındaki %fark<2 bulundu. Tüm parametrelerde bulunan sonuçlar kabul kriterlerine uygun bulunarak aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonlarında Doks-HCl'ün HPLC metot validasyonu tamamlandı (ICH, 1995)

5.7 Lipozom ve Prolipozom Formülasyonunda Vitamin E Asetat'ın Bitmiş Ürün Analitik Validasyonunun Değerlendirilmesi

Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerde gözlenen lipitlerin oksidasyonundan kaynaklı stabilite problemlerinin önüne geçmek adına formülasyon terkibine antioksidan olarak Vit E Asetat dahil edilmiştir (Stone, Mu, Smith, & Salil, n.d.). Formülasyon geliştirme sırasında ve stabilite boyunca koruyucu maddelerin miktar takipleri oldukça önemlidir. Bu amaçla formülasyonların terkiibinde bulunan Vit E Asetat'ın HPLC metodu geliştirildi ve validasyonu yapıldı. Seçicilik parametresinde çözücü, Vit E Asetat standart çözeltisi, plasebo aktif hedefli pegile F7 lipozom ve plasebo aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom numune çözeltileri, aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu numune çözeltileri enjekte edildi kromatogramlar karşılaştırıldı ve Vit E Asetat pikine herhangi bir girişim olmadığı gözlemlendi. Ayrıca Vit E Asetat pikinin pik sağlığı değerlendirildi ve 0.9999'dan büyük bulundu. Çalışma aralığı parametresinde %20 ve %140 derişimlerde yapılan altı enjeksiyonda %RSS değerlendirildi ve <%2 bulundu. Doğrusallık çalışmasında ise

0.01, 0.02, 0.04, 0.05, 0.06 ve 0.07 mg/mL derişimlerinde yapılan Vit E Asetat standart çözeltili enjeksiyonlarının alan değerleri değerlendirildi. Bu alan değerleri ile çizilen kalibrasyon eğrisinde $r^2=0.9994$ bulundu. LOD ve LOQ değerleri hesaplandı. Doğruluk çalışmaları için %80 derişim seviyesinde, %100 derişim seviyesinde ve %120 derişim seviyesinde aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu numune çözeltilerinde geri kazanımlar hesaplandı. Aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu numune çözeltilisinin %80 derişim seviyesinde geri kazanım değeri ortalaması %100.7, %100 derişim seviyesinde geri kazanım değeri ortalaması %99.7, %120 derişim seviyesinde geri kazanım değeri ortalaması %100.6; aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu numune çözeltilisinin %80 derişim seviyesinde geri kazanım değeri ortalaması %100.2, %100 derişim seviyesinde geri kazanım değeri ortalaması %99.5, %120 derişim seviyesinde geri kazanım değeri ortalaması %98.7 bulunarak tüm değerler kabul kriteri olan %98-%102 değer aralığında bulundu. Ayrıca her derişim seviyesinde yapılan üçer enjeksiyonda %RSS değerleri <%2 bulundu. Sistem kesinliği çalışmasında Vit E Asetat standart çözeltisi için yapılan altı enjeksiyon sonucunda bulunan alan değerleri ve alıkonma zamanları değerlendirildi ve %RSS <2 bulundu. Aktif hedefli pegile F7 lipozom numune çözeltilisinden ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonundan yapılan altı enjeksiyonda tekrarlanabilirlik sonuçları değerlendirildi ve kabul kriterlerine uygun bulundu. Tekrarlanabilirlik çalışmasında ise iki farklı günde yapılan çalışmada aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonunun %fark değeri %0.1, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunda ise %fark değeri %0.4 bulunarak kabul kriteri olan %2'den küçük bulundu. Dayanıklılık çalışmasında aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu numune çözeltileri; normal çalışma koşulları, akış hızı 1.1 mL/dk, akış hızı 1.3 mL/dk, kolon sıcaklığı 20°C, kolon sıcaklığı 30°C çalışma koşullarında analiz yapıldı. % Miktar tayinleri her bir koşul için hesaplandı, normal çalışma koşulları ile karşılaştırılarak %fark değerlendirildi ve %fark<%2 bulundu. Sistem uygunluk parametresinde Vit E Asetat standart çözeltilisinden yapılan altı enjeksiyon; alan, alıkonma zamanı, kuyruklanma faktörü ve teorik plaka sayısı açısından değerlendirildi. Çözelti stabilitesi çalışması için 48 saat boyunca belirli aralıklarla standart çözelti, aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu numune çözeltilisi, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu numune çözeltilisi enjeksiyonu yapıldı ve Vit E Asetat maddesinin çözeltisi stabilitesini 48 saat boyunca koruduğu gözlemlendi. Tüm parametrelerde bulunan sonuçlar kabul

kriterlerine uygun bulunarak, aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonlarında Vit E Asetat HPLC metot validasyonu tamamlandı (ICH, 1995)

5.8 Lipozom ve Prolipozom Formülasyonlarında Fosfolipit Miktarının Değerlendirilmesi

Lipozomal ilaç taşıyıcı sistem formülasyonu geliştirilmesinin ardından ve stabilite takibinde fosfolipit miktar tayini çalışmalarının yapılması çok önemlidir. Veziküler yapıda bulunan lipidlerin oksidasyon ve hidrolize uğraması sonucu fosfolipit miktarında değişiklik olmaktadır. Kimyasal degradasyona uğrayan lipidler lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerde partikül boyutu değişimine, agregasyona ve etkin madde sızıntısına neden olmaktadır. Bu nedenle lipozomal ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilirken formülasyonun çalışıldığı farklı pH tampon çözeltilerinin ve stabilite boyunca sıcaklık, nem koşullarının fosfolipitler üzerine etkisi, fosfolipit miktarı analizi yapılarak gözlenebilir (Grit & Crommelin, 1993). Bu amaçla fosfolipit miktar tayini için, UV spekturum ölçümüne dayanan Bartlett yöntemi kullanıldı. Beş farklı konsantrasyonda UV-Spektrofotometre absorpsiyonları kaydedildi ve kalibrasyon eğrisi çizildi. Aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu için üçer numune hazırlandı, formülasyonlarda bulunan deneysel fosfolipit miktarı ile kalibrasyon eğrisinden hesapla bulunan fosfolipit miktarları oranlanarak % fosfolipit miktarları hesaplandı. Fosfolipit miktarları %98-%102 arasında bulundu.

5.9 *In vitro* Salım Çalışmasının Değerlendirilmesi

FDA'de lipozomal Doks-HCl'ün *in vitro* salım çalışmaları için $47^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ de, pH 6.00 ± 0.05 koşulundan başlayarak yöntem geliştirilmesi önerilmiştir. Kanseri hücrelerinin ortam pH'ı (pH: 6.5–6.9) sağlıklı hücrelere göre (pH: 7.4) daha düşüktür ve ayrıca endozomların ve lizozomların pH değerleri daha asidiktir (pH: 5-5.5). Karaciğer tümörleri de asidik mikro çevreye (pH 4.5-5.5) sahiptir. Bu amaçla pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.4 ortamlarında salım profillerini incelemek oldukça önemlidir (Saadat, Mostafaei, Mahdinloo, & Abdi, 2021). Ayrıca, Doks-HCl için FDA tarafından yayınlanan kılavuzda bulunan ve *in vitro* sızıntı çalışmalarında önerilen; pH 6.5 (kanseri hücrelerin pH değeri), pH 7.4 (sağlıklı hücrelerin pH değeri) ve pH 5.5 (kanseri hücrelerin endozom ve lizozom pH değeri) koşulları da dikkate alınarak in

vitro salım çalışmaları bu pH değerlerinde sürdürüldü (Food and Drug Administration (FDA), 2018).

Bu amaçla, pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.4 tampon ortamlarında Doks-HCl, aktif hedefli pegile F7 lipozom, aktif hedefli pegile olmayan F7 lipozom, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom, aktif hedefli pegile olmayan F7-3 prolipozom formülasyonlarında *in vitro salım* alışmaları yapıldı. pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.4 ortamlarında validasyonu gerçekleştirilen HPLC yöntemleri ile miktar tayinleri yapıldı. pH 5.5 ortamında yapılan salım çalışmasında; 24. saat sonunda Doks-HCl etkin maddesinin salımı %95.3 bulunurken, piyasa preparatının salımı %70.3 bulundu. Pegilasyonun salım profiline etkisinin gözlenmesi adına aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile olmayan F7 lipozom; aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom ve aktif hedefli pegile olmayan F7-3 prolipozom formülasyonlarının salımları incelendi. pH 5.5 ortamında 24. saat sonunda aktif hedefli pegile olmayan F7 lipozom formülasyonunun salımı %97.4 bulunurken, aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonunun salımı %95.2 bulundu. Aktif hedefli pegile olmayan F7-3 prolipozom formülasyonunun 24. saat sonunda salımı %98.1 bulunurken, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun salımı %99.5 bulundu. Salım profili grafiği şekil 55’de verilmiştir.

24. saat sonunda pH 6.5 tampon ortamında Doks-HCl etkin maddesinin salımı %93.2 bulunurken, piyasa preparatının salımı %68.5 bulundu. Aktif hedefli pegile olmayan F7 lipozom formülasyonunun salımı %98.3 bulunurken, aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonunun salımı %97.7 bulundu. Aktif hedefli pegile olmayan F7-3 prolipozom formülasyonunun 24. saat sonunda salımı %98.4 bulunurken, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun salımı %98.2 bulundu. Salım profili grafiği şekil 56’da verilmiştir. Sonuçlar literatür verileri ile uygun bulundu (Dumindika, 2021).

pH 7.4 tampon ortamında yapılan salım çalışmaları incelendi. Doks-HCl etkin maddesinin salımı %88.2 bulunurken, piyasa preparatının salımı %68.3 bulundu. Aktif hedefli pegile olmayan F7 lipozom formülasyonunun salımı %75.3 bulunurken, aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonunun salımı %87.2 bulundu. Aktif hedefli pegile olmayan F7-3 prolipozom formülasyonunun 24. saat sonunda salımı %77.9 bulunurken, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun salımı %80.2 bulundu. Salım profili grafiği şekil 57’de verilmiştir. Her bir tampon ortamında

yapılan çalışmalardan sonra diyaliz membranlar içerisinde örnek alıp miktar tayinleri analiz edildi, sonuçlar; Tablo 93, Tablo 95 ve Tablo 97’de verilmiştir.

Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerde veziküllerin membran kaynaklı bariyer etkisi dolayısıyla etkin madde salımı, salt etkin madde salımından daha yavaş ve kontrollü gerçekleşmektedir. Bu kontrollü salım; i) lipozom içinde kümelenmiş Doks-HCl’ün yavaş çözünme hızı, ii) çözünmüş Doks-HCl’ün lipozomdan difüzyonu ve diyaliz membranın dışına aktarılması ve iii) dispersiyon adımlarını içermektedir. Elde edilen *in vitro* salım sonuçları; piyasa preparatı, geliştirilen aktif hedefli F7 lipozomal ve aktif hedefli F7-3 prolipozomal ilaç taşıyıcı sistem formülasyonlarının kontrollü ilaç salımı gerçekleştirdiğini literatür verileri ile benzer şekilde göstermiştir. Ayrıca yine literatür verisi ile benzer şekilde düşük pH değerlerinin Doks-HCl’ün hidrofilikliğini ve lipozom içinde çözünmeyi artırması nedeniyle ilaç salınımının salımının arttığı gözlenmiştir (Haghiralsadat et al., 2017). Piyasa preparatı pH bağımlı çözünürlük göstererek 24.saatte yaklaşık %70 salım gösterirken, geliştirilen aktif hedefli F7 lipozom ve aktif hedefli F7-3 prolipozom formülasyonu 24.saat sonunda pH bağımlı olarak %80-%98 salım göstermiştir (Tablo 92, Tablo 94, Tablo 96). Ayrıca çalışma sonunda diyaliz membran içinde kalan Doks-HCl miktarının tayini yapılmış ve bulunan sonuçlar membranlarda herhangi bir Doks-HCl tutulumunun olmadığını, çalışmanın sağlıklı bir şekilde sürdürüldüğünü göstermiştir (Tablo 93, Tablo 95, Tablo 97).

In vitro salım profillerinin matematiksel modellemesinde Sıfıncı derece, Birinci derece, Peppas, Higuchi, Hixon Crowel, Hopfenberg, Langenbucher kinetik modelleri kullanılarak uyum analizleri yapılır. Fakat yapılan literatür araştırmalarında lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerde en çok kullanılan modeller olan Sıfıncı derece, Birinci derece, Peppas, Higuchi, Hixon Crowel kinetik modellerine uyumları incelenmiştir (Das, Samanta, Mondal, Roy, & Nayak, 2021; Jain & Jain, 2016). Kinetik modellemede elde edilen sonuçların modele uyumunun göstergesi olan regresyon doğrusunun tanımlayıcılık katsayısı (r^2) ve modele uygunluğunu belirleyen artık kareler toplamı ve artık karelerin n-2’ye bölüm değerleri incelendi (Roy, Das, & Samanta, 2019). pH 5.5 ortamında; piyasa preparatı Birinci derece, aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu Hixon Crowel kinetiğine uyum sağlamıştır. pH 6.5 ortamında piyasa preparatı Peppas, aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom

formülasyonu Hixon Crowel kinetiğine uyum sağlamıştır. pH 7.4 ortamında ise piyasa preparatı Higuchi, aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu Peppas, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu ise Birinci derece kinetiğine uyum sağlamıştır.

Birinci derece kinetik lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerde sıkça gözlenen kinetiklerden biridir ve yapıdaki veziküllerin degradasyonu sonucunda etkin maddenin zamanla kontrollü salımını tanımlamaktadır (Harashima, Ochi, & Kiwada, 1994). pH 5.5 ortamında piyasa preparatı ve pH 7.4 ortamında aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu bu kinetiğe uyum sağlamıştır ve etkin maddenin lipozomal ilaç taşıyıcı sistemden kontrollü olarak salındığını göstermiştir.

Hixon Crowel kinetiğinde çözünme, çözünen partiküllerin yüzeyine gerçekleşir ve partiküller küreseldir (Al Sawaftah, Paul, Awad, & Hussein, 2021). pH 5.5 ve pH 6.5 ortamlarında aktif hedefli F7 lipozom formülasyonu ve aktif hedefli F7-3 prolipozom formülasyonu bu kinetiğe uyum sağlamıştır (Upadhyay, Trivedi, Pundarikakshudu, & Sheth, 2017). Lipozomların salım kinetiklerini tanımlayan Higuchi kinetiğinde ise ilaç taşıyıcı sistem çözülmez ve ilacın bu sistemden difüzyonu sabittir. pH 7.4 ortamında piyasa preparatı bu kinetiğe uyum sağlamıştır. Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerde yüzeydeki çifte tabakalı yapının sürekli salım profili olan Korsmeyer-Peppas kinetik modelini sıklıkla sergilediği görülmektedir (Jain & Jain, 2016). pH 6.5 ortamında piyasa preparatı, pH 7.4 ortamında ise aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu bu kinetiğe uyum sağlamıştır. Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerde etkin maddenin difüzyonu, lipozomun; bileşimine, yapısına ve salım koşullarına bağlıdır (Jain & Jain, 2016). Yapılan kinetiksel modellemede gerek formülasyonlarda bulunan lipit bileşenlerin farklanması, gerek salım ortam pH larının farklı olması formülasyonlardan etkin maddelerin farklı kinetiklerle salındığı sonucunu açığa çıkarmış ve lipozomal ilaç taşıyıcı sistem formülasyonundan etkin maddenin kontrollü salındığını göstermiştir (Tablo 98, Tablo 99, Tablo 100).

pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.4 ortamlarında *in vitro* salım sonuçlarına benzerlik testi olan, F2 testi uygulandı. pH 5.5 ortamında; aktif hedefli F7-3 prolipozom formülasyonu ile piyasa preparatının F2 benzerlik oranı %37.5, aktif hedefli F7 lipozom formülasyonu ile piyasa preparatının F2 benzerlik oranı %41, aktif hedefli F7 lipozom formülasyonu ile aktif hedefli F7-3 prolipozom formülasyonun F2 benzerlik oranı %77.4 bulundu. pH 6.5 ortamında; aktif hedefli F7-3 prolipozom formülasyonu ile piyasa preparatının F2 benzerlik oranı %42.0, aktif hedefli F7 lipozom formülasyonu ile piyasa

preparatının F2 benzerlik oranı %41, aktif hedefli F7 lipozom formülasyonu ile aktif hedefli F7-3 prolipozom formülasyonunun F2 benzerlik oranı %91.4 bulundu. pH 7.4 ortamında ise; aktif hedefli F7-3 prolipozom formülasyonu ile piyasa preparatının F2 benzerlik oranı %51.4, aktif hedefli F7 lipozom formülasyonu ile piyasa preparatının F2 benzerlik oranı %44.5, aktif hedefli F7 lipozom formülasyonu ile aktif hedefli F7-3 prolipozom formülasyonunun F2 benzerlik oranı %82.1 bulundu.

İki salım profili arasındaki F2 değerinin 50-100 arasında bulunması FDA tarafından benzerliği ifade etmektedir (FDA, 1997). pH 7.4 ortamında aktif hedefli F7-3 prolipozom formülasyonu ile piyasa preparatının F2 benzerlik oranı %51.4 bulunarak FDA benzerlik şartını sağlamıştır.

5.10 In vitro Sızıntı Testinin Değerlendirilmesi

In vitro sızıntı testleri; lipit çift tabakasının ve enkapsüle edilmiş Doks-HCl'ün çeşitli fizyolojik koşullar altında fiziksel durumunu karakterize etmek, in vivo koşuldaki durumu tahminlemek için araştırılmalıdır (W. Jiang et al., 2011). Bu amaçla geliştirilen aktif hedefli pegile F7 lipozom, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonları ve piyasa preparatının çeşitli koşullar altında Doks-HCl salımları incelendi. %50 yapay plazma-%50 pH 7.4 ortamı içeren 37°C koşullarında Doks-HCl'ün salım testi 24 saat boyunca gerçekleştirildi. 24. saat sonunda Doks-HCl salımı, aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonundan %96.4, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun %90.6, piyasa preparatının ise % 68.8 bulundu. In vitro sızıntı testi profilleri karşılaştırmalı olarak Şekil 58'de verildi.

37°C'de pH 5.5, pH 6.5, pH 7.4 ortamlarında 24 saat boyunca salım çalışmaları yapıldı. pH 5.5 ortamında 24.saat sonunda aktif hedefli pegile F7 lipozom, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom ve piyasa preparatı için salım yüzdeleri sırası ile %95.3, %92.8 ve %68.4 olarak bulundu. pH 6.5 ortamında 24.saat sonunda aktif hedefli pegile F7 lipozom, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom ve piyasa preparatı için bulunan salım yüzdeleri sırası ile %90.1, %89.5 ve %75.4 bulundu. pH 7.4 ortamında ise; 24.saat sonunda aktif hedefli pegile F7 lipozom, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom ve piyasa preparatı için bulunan salım yüzdeleri sırası ile %85.3, %83.7 ve %58.3 bulundu. In vitro sızıntı testi profilleri karşılaştırmalı olarak Şekil 59'da verildi.

43 °C'de pH 6.5 ortamında yapılan in vitro sızıntı testinde, salım çalışmaları 28 saat boyunca sürdürüldü ve bu saat sonunda Doks-HCl salımı F7 lipozom

formülasyonunda %99.5, F7-3 prolipozom formülasyonundan %99.1, piyasa preparatından ise %67.1 bulundu. 47 °C’de pH 6.5 ortamında yapılan in vitro sızıntı testinde, salım çalışmaları 24 saat boyunca sürdürüldü ve bu saat sonunda Doks-HCl salımı aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonunda %98.4, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonundan %96.4, piyasa preparatından ise %67.3 bulundu. 52 °C’de pH 6.5 ortamında yapılan in vitro sızıntı testinde salım çalışmaları 12 saat boyunca sürdürüldü ve bu saat sonunda Doks-HCl salımı, aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonunda %99.6, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonundan %99.0, piyasa preparatından ise %99.4 bulundu (Russell, Hultz, & Searson, 2019).

Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerde bulunan lipidlerin Tg değerleri, lipid çift katmanın sertlik ve kimyasal özelliklerini belirlemektedir. Sıcaklığın bir fonksiyonu olarak salımdaki farklılıklar lipid yapılarından etkin maddelerin sızması ile sonuçlanmaktadır, bu nedenle geliştirilecek formülasyonun orijinal ilaçla benzerliğini tartışmada önemli bir adımdır (W. Jiang et al., 2011). Tartışma 5.4’de de verildiği üzere aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonun Tg değeri 49.95 °C bulunmuştu. Bu sıcaklıktan sonra lipidlerin yapısal olarak camsı özelliklerini kaybedip viskoz hal alması etkin maddenin sızıntısının artması ile sonuçlanmaktadır (W. Chen, Duša, Witos, Ruokonen, & Wiedmer, 2018). 52 °C’de yapılan sızıntı testinde 12. saat sonunda, geliştirilen formülasyonlarda Doks-HCl’ün %100’üne yakın miktarını salması DSC analizi sonucu ile örtüşmektedir. 52°C piyasa preparatı ile aktif hedefli F7 lipozom ve aktif hedefli F7-3 prolipozom formülasyonlarından Doks-HCl benzer salım özellikleri göstermiştir. 57 °C’de yapılan çalışmalarda ise 10. saat sonunda Doks-HCl etkin maddesi aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonunda %100.6, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunda %100.5 ve piyasa preparatında %99.5 olarak bulunmuştur. Sıcaklığın artışı lipid yapıların esnekliğinin iyice artmasına ve Doks-HCl sızıntısının 3.saatten itibaren %70’lerin üzerine çıkmasına neden olmuştur. Aktif hedefli pegile F7 lipozom, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom ve piyasa preparatının karşılaştırmalı in vitro sızıntı testleri 43 °C için Şekil 60’da, 47°C için Şekil 61’de, 52°C için Şekil 62’de ve 57°C için ise Şekil 63’de verilmiştir.

Sıcaklığın lipid yapıların Tg değerleri üzerine etkisi özellikle pH 6.5 şartlarında aktif hedefli pegile F7 lipozom, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom ve piyasa preparatı

için karşılaştırılmıştır. 37°C, 43°C ve 47°C için aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom için benzer sızıntı profili gözlenirken piyasa preparatının sızıntısının daha az olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle formülasyon terkinde bulunan lipit çeşitleri, lipit oranları, pegilasyon ajanı oranı ve kolesterol oranı gözden geçilmiştir. Aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom terkinde bulunan toplam lipit, pegilasyon ajanı ve kolesterol oranı piyasa preparatı aynı tutulmuştu (lipit:peg:kolesterol mol oran yüzdeleri; 56:38:5). Fakat piyasa preparatı terkinde lipit olarak yalnızca HSPC bulunurken, enkapsülasyon kapasitesini arttırması dolayısıyla aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom terkinde HSPC-DSPC lipit karışımı yer almıştı. DSPC lipitinin Tg değerinin HSPC lipitinin Tg değerinden daha düşük olması geliştirilen formülasyonların Tg değerini düşürmekte ve ilaç sızıntısını piyasa preparatına göre arttırdığı düşünülmektedir (Spratt, Bondurant, & O'Brien, 2003).

Düşük frekanslı ultrasonik enerjiler, lipit çift katmanını bozar ve Doks-HCl salınımını, lipozom terkindeki lipitlerin bozulma hızı kontrol eder. Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerde bu test lipit yapılarının kararlılıklarının gözlenmesi adına yapılır (Food and Drug Administration (FDA), 2018). Aktif hedefli pegile F7 lipozom, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom ve piyasa preparatı; pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.4 tampon ortamlarında ultrasonik enerjiye maruz bırakıldı ve 15. dakika, 30. dakika, 1. saat ve 2. saatin sonunda Doks-HCl'ün sızıntı miktarları karşılaştırıldı. pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.4 ortamında aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonundan Doks-HCl sızıntısı sırası ile %98.2, %100.5 ve %100.8 bulunurken; aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonundan Doks-HCl sızıntısı sırası ile %95.7, %95.9 ve %98.2; piyasa preparatının ise %98.3, %98.4 ve %99.2 bulundu. Geliştirilen aktif hedefli pegile F7 lipozom ve F7-3 prolipozom formülasyonu piyasa preparatı ile benzer in vitro sızıntı sonuçları gösterdi. Karşılaştırmalı grafikler Şekil 64'de verildi.

5.11 Stabilitte Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Doks-HCl etkin maddesinin ve piyasa preparatının 2-8 °C arasında saklama koşulu bulunmasından dolayı stabilitte çalışmaları; $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 60 ± 5 , $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 65 ± 5 ve $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 75 ± 5 koşullarına ek olarak $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de yürütüldü. Aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu için görünüş, pH, PB, PDI, ZP, viskozite, ilaç yükleme kapasitesi tayini, enkapsülasyon kapasitesi, fosfolipit miktar tayini, Vit E Asetat miktar tayini çalışmaları gerçekleştirildi (Tablo 106).

Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun stabilite takibi ise iki koldan yürütüldü. İlki, flakonda bulunan liyofilize toza yapılan testler olan; görünüş, ilaç yükleme kapasitesi tayini ve nem miktarı analizlerini; ikincisi ise %5'lik dekstroz çözeltisinde 2 mg/mL Doks-HCl içeren aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun disperse edilmesinin ardından yapılan; görünüş, pH, PB, PDI, ZP, viskozite, ilaç yükleme kapasitesi tayini, Vit E Asetat miktar tayini, yeniden dağılılabılme zamanı, enkapsülasyon kapasitesi ve fosfolipit miktar tayini analizlerini içermektedir.

9 ay boyunca aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonunun görünüşü yarı saydam kırmızı renkli dispersiyon, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonun görünüşü ise kırmızı renkli toz olarak stabilitesini korudu.

Amerikan Farmakopesi (United States Pharmacopeia=USP) monografında Doks-HCl miktar tayini aralığı %90-%115 olarak verilmiştir (USP, 2017). Bu nedenle stabilite çalışmalarındaki ilaç yükleme kapasitesi tayini çalışmalarında bu aralık referans alındı. Aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu için, $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de 9 ay boyunca, $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 60 ± 5 koşullarında ise 3 ay boyunca ilaç yükleme kapasitesi limit değerler arasında bulundu, 6.ay da ilaç yükleme kapasitesi tayini %89.2 bulunarak limit değerler dışına çıktı. Bu durum buzdolabında saklanması öngörülen etkin madde ve ürünler için stabilite test koşullarında hızlandırılmış stabilite koşulu olan $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 60 ± 5 'de 6 aylık stabil kalma koşulunu sağlayamadığını gösterdi. $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 65 ± 5 koşullarında 3. ay, $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 75 ± 5 koşullarında 1. ay sonunda limit değerler arasından sapmalar gözlemlendi. Bu nedenle $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 60 ± 5 koşullarında 6. ay sonundan sonra, $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 65 ± 5 koşullarında 3. ay sonundan sonra, $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 75 ± 5 koşullarında 1. ay sonundan sonra stabilite analizlerine devam edilmemiştir.

Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunda ise $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ve $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 60 ± 5 koşullarında 9 ay boyunca ilaç yükleme kapasitesi limit değerler arasında bulundu. Bu durum aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonunun aksine buzdolabında saklanması öngörülen etkin madde ve ürünler için stabilite test koşullarında hızlandırılmış stabilite koşulu olan $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 60 ± 5 'de 6 aylık stabil kalma koşulunu sağladığını gösterdi. Fakat $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 65 ± 5 koşullarında 3.ay sonunda %82.2, $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 75 ± 5 koşullarında %84.2 bulunarak limit değerler dışına çıktı. Bu nedenle $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 65 ± 5 koşullarında 3. ay sonundan sonra, $40 \pm$

2°C % 75± 5 koşullarında 1. ay sonundan sonra stabilite analizlerine devam edilmemiştir.

Aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonunun pH değeri başlangıçta 5.9 bulunurken formülasyon geliştirme çalışmalarında tampon sistemleri kullanıldığı için stabilite çalışmaları sırasında büyük pH değişimi gözlenmedi. Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun ise %5'lik dekstroz çözeltisi içerisinde disperse edildikten sonra başlangıç pH değeri 6.5 bulundu ve stabilite takibi boyunca tüm koşullarda pH değerleri 6.1-6.5 arasında bulundu.

PB; stabiliteyi, enkapsülasyonu, ilaç salım profilini, biyodağılımı, mukoadazyonu ve hücre alımı etkileyen kritik bir parametredir (Azhar, Bahari, & Hamishehkar, 2016). Hücre alımında endositoz, fosfolipit çift tabakasını içine alarak maddelerin hücre içine aktif olarak taşınmasını sağlar. Pinositoz ve fagositoz olmak üzere iki ana endositoz mekanizmasının olduğu bildirilmektedir. (Zhao, Zhao, Liu, Chang, & Chen, 2011). PB ve PDI nanotaşıyıcı sistemleri, endositoza bağlı hücre alımı etkileyen ana fizikokimyasal özelliklerdir. Çalışmalarda 100-150 nm boyutundaki pegile nanopartikül sistemlerin plazmada uzun sirkülasyon süresine sahip olduğunu göstermektedir (Shaker, Gardouh, & Ghorab, 2017). Bu nedenle nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin PB ve PDI'i gerek formülasyon geliştirme sürecinde, gerekse stabilite de oldukça önemli olan fiziksel özelliklerdir. Geliştirilen aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonunun partikül boyutu başlangıçta 128.8 nm bulundu ve 5 ± 3 °C'de 9 ay boyunca değişim stabil kaldı, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ % 60 ± 5 koşullarında 6.ay sonunda 130.4 nm bulundu, fakat $30 \pm 2^\circ\text{C}$ % 65 ± 5 koşulunda 3. Ay sonunda 157.4 nm ye yükselirken, $40 \pm 2^\circ\text{C}$ % 75 ± 5 koşullarında 1. ay sonunda 223.4 nm ye yükseldi. Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu %5'lik dekstroz çözeltisi içerisinde disperse edildikten sonra partikül boyutu başlangıçta 120.0 nm bulundu, 5 ± 3 °C'de 9. ay sonunda 138.2 nm, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ % 60 ± 5 koşullarında 9.ay sonunda 142.3 nm, $30 \pm 2^\circ\text{C}$ % 65 ± 5 koşulunda 3. ay sonunda 144.0 nm, $40 \pm 2^\circ\text{C}$ % 75 ± 5 koşullarında 1. ay sonunda 143 nm olarak bulundu.

Stabil nanotaşıyıcı formülasyonlarının, homojen (monodisperse) olması gerekmektedir. Partikül boyutu dağılımı karakterizasyonu ile ilgili olarak, lipidik nanotaşıyıcı sistemlerin boyut aralığını ve stabilitesini tanımlamak için kullanılan parametreye “polidisperseite indeksi” (PDI) denir. PDI terimi, partiküllerin boyut dağılımının tek biçimli olmama derecesini tanımlamak için kullanılır (Clarke & Sc,

2013). PDI değeri 0.05'ten küçük olan dispersiyonlar monodispers, 0.7'den büyük olan dispersiyonlar ise çok geniş bir parçacık boyutu dağılımına sahip olarak tanımlanmıştır. Lipozom formülasyonları gibi lipid bazlı taşıyıcıların kullanıldığı ilaç taşıyıcı sistemlerde, 0.3 ve altındaki bir PDI kabul edilebilir ve homojen bir fosfolipit vezikül popülasyonunu göstermektedir (M. Chen, Liu, & Fahr, 2011). Aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonunda PDI başlangıçta 0.37 bulunarak monodisperse bir dağılım gösterdiği gözlemlendi. Aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonunda 5 ± 3 °C koşulunda 9. ay sonunda PDI 0.47 bulundu, 25 ± 2 °C % 60 ± 5 koşullarda ise 6. ay sonunda 0.52 olarak tespit edildi. 30 ± 2 °C % 65 ± 5 koşulunda 3. ay sonunda bu değer 0.52 ve 40 ± 2 °C % 75 ± 5 koşulunda ise 1. ay sonunda 0.55'e yükseldi. Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun ise PDI'si başlangıçta 0.36 bulundu, 5 ± 3 °C koşulunda 9. ay sonunda 0.38, 25 ± 2 °C % 60 ± 5 koşullarda ise 9. ay sonunda 0.40, 30 ± 2 °C % 65 ± 5 koşulunda 3. ay sonunda 0.41 ve 40 ± 2 °C % 70 ± 5 koşulunda ise 1. ay sonunda ise 0.48 bulundu.

Zeta potansiyeli, yüklü arayüzlerin elektriksel durumu hakkında bilgi sağlayan nanopartiküllerin önemli fiziksel özelliğidir. Zeta potansiyeli genellikle nanopartiküllerin yapısına ve ayrıca dağılım ortamına bağlıdır. Bu nedenle, kolloidal stabilitenin ölçüsü olarak kullanılmaktadır (Jos, Carvalho, Leite, & Pulcinelli, 2021). Genel olarak zeta potansiyel değeri < -25 mV ya da $> +25$ mV olan kolloidal sistemler stabil olarak yorumlanır. Daha düşük zeta potansiyel değerine sahip olan dağılımlar, Van der Waals çekimi nedeniyle agregasyon, flokülasyon ve koagülasyona yol açmaktadır (Jabra et al., 2019). Aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonunun zeta potansiyel değeri başlangıçta +27.05 mV bulunurken zamanla zeta potansiyel değeri düşmüş ve 5 ± 3 °C koşulunda +24.1 mV bulunurken, 25 ± 2 °C % 60 ± 5 koşulunda 9.ay sonunda +23.2 mV, 30 ± 2 °C % 65 ± 5 koşulunda 3.ay sonunda +17.3 mV, 40 ± 2 °C % 75 ± 5 koşulunda 1. ay sonunda +19.5 mV bulundu. Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun ise zeta potansiyel değeri başlangıçta +27.58 mV bulunurken 5 ± 3 °C koşulunda tüm koşullarda ve stabilite sürecinde 27.5-19.5 mV aralığında değerler bulundu.

Formülasyonların yüksek viskoziteye sahip olması, enjeksiyon sırasında hem şırıngadan geçebilirliğini hem de formülasyon performansını etkileyen bir parametredir (Q. Zhang, Fassihi, & Fassihi, 2018). Aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu başlangıçta 14.8 cP viskozite değerine sahipken, stabilite takibi yapılan

tüm koşullarda 14.8-19.1 cP aralığında sonuçlar gösterdi. Aktif hedefli pegile F7-3 formülasyonu için ise %5'lik dekstroz çözeltisi içerisinde disperse edildikten sonra tüm koşullarda viskozite değeri 14.2-10.3 cP aralığında bulundu.

Aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonlarında bulunan fosfolipitlerin oksidasyonunun önüne geçilebilmesi için formülasyonların terkiplerine antioksidan olarak Vit E Asetat dahil edilmiştir. Bu amaçla yapılan validasyon çalışmalarının sonrasında valide edilen yöntem ile stabilite boyunca Vit E Asetat miktarı takip edildi. Vit E Asetat miktarı tüm stabilite koşulları ve süresince aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu için %100.0-%95.2, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu için %100.0- %96.2 arasında bulundu.

Bir ilaç taşıyıcı sistemde optimum etkinliği elde etmek için, etkin maddenin mümkün olan maksimum miktarının enkapsülasyonunu gerçekleştirmek gerekmektedir. İlacın lipozomlardaki enkapsülasyon etkinliğinin terapötik doz ile karşılaştırılması, lipozomların bu etkin madde için bir taşıyıcı sistem olarak kullanılıp kullanılamayacağını gösterir. İlaç taşıyıcı sistemin yüksek enkapsülasyon kapasitesinin sağlamanın ardından stabilite boyunca da bu yüksek enkapsülasyonu sürdürmesi gerekmektedir. Aksi taktirde formülasyondan ilaç sızıntısı gerçekleşir. Bu nedenle stabilite takibinde yapılan enkapsülasyon kapasitesi tayini, lipozomal veziküllerde bulunan lipidal yapıların kararlılığını ve ilaç sızıntısını tahminlemekte oldukça önemlidir (Kulkarni, 1995). Bu amaçla yapılan enkapsülasyon kapasitesi tayininde aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonu başlangıçta %90.3 enkapsülasyon kapasitesine sahipken; 5 ± 3 °C de 9.ay sonunda bu değer %80.0'e, 25 ± 2 °C % 60 ± 5 koşullarında 6.ay sonunda %68.2'ye, 30 ± 2 °C % 65 ± 5 koşullarında 3.ay sonunda %62.3'e, 40 ± 2 °C % 75 ± 5 koşullarında 1.ay sonunda %60.2'ye düşmüştür. Enkapsülasyon kapasitesindeki düşüşün fosfolipit miktarı ile ilişkisi incelendiğinde ise fosfolipit miktar tayini başlangıçta %100.4 bulunurken; 5 ± 3 °C de 9.ay sonunda bu değer %93.2, 25 ± 2 °C % 60 ± 5 koşullarında 6.ay sonunda %85.2, 30 ± 2 °C % 65 ± 5 koşullarında 3.ay sonunda %80.4, 40 ± 2 °C % 75 ± 5 koşullarında 1.ay sonunda %81 bulundu. Aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonunda artan sıcaklık ve nem koşulları fosfolipit miktarının azalışı ve enkapsülasyon kapasitesinin düşmesi ile sonuçlanmıştır. Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun %5'lik dekstroz çözeltisinde seyreltilmesi sonrasında yapılan enkapsülasyon kapasitesi analizi başlangıçta %90.0 bulundu, 5 ± 3 °C de 9.ay sonunda bu değer

%89.1, $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 60 ± 5 koşulunda 9.ay sonunda %87.5, $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 65 ± 5 koşulunda 3.ay sonunda %82.2, $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 75 ± 5 koşulunda ise 1.ay sonunda %80.1 bulundu. Fosfolipit miktar tayini sonuçlarına bakıldığında ise başlangıçta %100.3, 9 ay boyunca $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ve $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 60 ± 5 koşullarında %100.3-%97.9 bulunurken, $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 65 ± 5 koşulunda 3.ay sonunda %87.4'e, $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 75 ± 5 koşulunda ise 1.ay sonunda %85.3 bulundu.

Liyofilizasyon sürecinin performans ölçütü olarak yeniden dağılılablme zamanı oldukça önemlidir, ayrıca stabilite boyunca formülasyonların nem etkisi ile partiküllerin dağılım süreleri üzerine etkileri de gözlenmelidir (Beech et al., 2015). Bu amaçla aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun %5'lik dekstrozu çözeltisi içerisinde dağılma zamanları incelendi. Başlangıçta aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu 10 saniyede homojen bir şekilde dağıldı, $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ de 9.ay sonunda bu değer 13 saniye, $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 60 ± 5 koşulunda 9 ay sonunda bu değer 16 saniye, $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 65 ± 5 koşulunda 3.ay sonunda bu değer 15 saniye, $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 75 ± 5 koşulunda ise 1.ay sonunda bu değer 19 saniye olarak bulundu.

Ayrıca aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu disperse edilmeden ilaç yükleme kapasitesi tayini çalışmaları ve nem miktarı çalışmaları yapıldı. Doks-HCl ilaç yükleme kapasitesi başlangıçta %100.0 iken, $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ koşulunda 9.ay sonunda %98.2, $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 60 ± 5 koşulunda 9.ay sonunda %92.1 bulunarak sonuçlar limit değerler arasında bulundu. $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 65 ± 5 koşulunda 3.ay sonunda bu değer %80.2, $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 75 ± 5 koşulunda ise 1.ay sonunda %83.2 bulunarak limit değerler dışında sonuçlar gösterdi. Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun farklı stabilite koşulları altında nem miktarları incelendiğinde %0.019-%0.10 aralığında sonuçlar bulundu.

Doks-HCl etkin maddesinin ve orjinal ürünün $2-8^{\circ}\text{C}$ saklanma koşulunun bulunması geliştirilen aktif hedefli pegile F7 lipozom ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonlarında bu koşullarda stabil kalması gerekliliğini göstermiştir. Buzdolabında saklanması öngörülen etkin madde ve ürünler için uzun süreli $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de 12 ay, hızlandırılmış $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 60 ± 5 'de 6 aylık sonuçlarla stabilitenin kanıtlanması gerekmektedir. Bu koşulların dışında kalan $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 65 ± 5 ve $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 75 ± 5 koşullarda da geliştirilen formülasyonlar karakterize edildi.

Aktif hedefli pegile F7 lipozom formülasyonunun ilaç yükleme kapasitesi tayini $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 60 ± 5 koşullarında 6.ay da limit dışı değerler gösterdi. Bu koşulda enkapsülasyon kapasitesinin %68.2'ye düşmesi ayrıca fosfolipit miktar tayinin de %85.2'ye düşmesi etkin maddenin sızıntıya uğradığını göstermektedir.

Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu ise $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 65 ± 5 koşullarında 3.ay sonunda, $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 75 ± 5 koşullarında ise 1.ay sonunda limit dışı değerler gösterdi. Fakat buzdolabında saklanması öngörülen etkin madde ve ürünler için uzun süreli $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de 9 ay, hızlandırılmış $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 60 ± 5 'de 6 ay stabil sonuçlar gösterdi. Ayrıca $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ koşulunda 12.ay stabilite analizleri gerçekleştirilmeye devam edilecektir.

Stabilitede gözlenen sonuçlar doğrultusunda in vitro sitotoksiste, in vitro permeabilite ve in vivo çalışmalar aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu ile sürdürüldü.

5.12 In vitro Sitotoksiste Çalışmalarının Değerlendirilmesi

MTT testi; hücrelerin canlılığını, çoğalmasını ve aktivasyonunu ölçen hassas, nicel ve güvenilir bir kolorimetrik testtir. Bu test, farklı kanser türü hücrelerinde prelinik ve klinik testlerden önce antikanser veya immünolojik ajanların in vitro değerlendirmesinde yaygın şekilde kullanılan bir yöntemdir. Birçok kemoterapötik ilaç, kanserli hücrenin ilaca direnç sorunu nedeniyle azaltılmış terapötik etki göstermektedir (Peters et al., 2002). Bu nedenle in vitro koşullarda kanserli ve sağlıklı hücre üzerinde; etkin maddenin ve formülasyonun sitotoksik etkisinin araştırılması önemlidir (Senthilraja & Kathiresan, 2015). Bu amaçla, farklı orijinlere sahip HSK hücre hatları (Hep G2, Mahlavu ve Huh-7) ve sağlıklı karaciğer hücre hattı (AML 12) üzerinde MTT sitotoksiste çalışması gerçekleştirildi. Öncelikli olarak Doks-HCl etkin maddesinin bu hücre hatları üzerinde 24.saat, 48. Saat ve 72.saat IC50 dozları belirlendi. 24., 48. ve 72. saat IC50 dozları; Hep G2 hücre hattı için sırası ile $1.45 \mu\text{M}$, $0.63 \mu\text{M}$ ve $0.74 \mu\text{M}$; Mahlavu hücre hattı için sırası ile $1.37 \mu\text{M}$, $0.73 \mu\text{M}$ ve $0.72 \mu\text{M}$; Huh 7 hücre hattı için sırası ile $0.98 \mu\text{M}$, $0.60 \mu\text{M}$ ve $1.18 \mu\text{M}$ ve AML 12 hücre hattı için ise sırası ile $5.55 \mu\text{M}$, $2 \mu\text{M}$, $0.83 \mu\text{M}$ olarak hesaplandı. Sonuçlar literatür verileri ile benzer bulundu (De, Chowdhury, & Chattapadhyay, 2016; Özkan et al., 2021).

Pegile F7-3 prolipozom formülasyonunda aktif hedefleyici olarak bulunan GA molekülünün karaciğer kanser hücrelerinde, sağlıklı hücrelere oranla 1.5-5 kat daha

fazla reseptör içermesinden dolayı, sağlıklı hücelere oranla HSK hücre hatlarında daha çok esprese edildiği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Cai et al., 2016). Bu nedenle; prolipozom formülasyonlarına enkapsüle edilen Doks-HCl'ün, HSK hücre hatları ile sağlıklı hücre hattına olan sitotoksik etkisinin karşılaştırılması önemli hale gelmiştir.

Bu amaçla, Doks-HCl etkin maddesi ile aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonu içerisine enkapsüle edilecek Doks-HCl dozunun sitotoksik etkisinin karşılaştırılacağı MTT testinde kuyucuklar arasındaki SS'nın en az olduğu ve proliferasyonun gözlenmediği değer 48.saat olarak belirlendi.

Doks-HCl içermeyen plasebo aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun Hep G2, Mahlavu, Huh-7 ve AML 12 hücre hatları üzerinde sitotoksik etkisi olmadığı gözlemlenerek hücre dizileri üzerindeki optimal dozu 100 mg/mL olarak belirlendi. Sonuç literatür verileri ile uygun bulundu (Quagliariello, 2018).

Doks-HCl'ün Hep G2 hücre hattı üzerindeki IC50 dozu olan 0.63 μ M Doks-HCl ve bu dozun aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonuna enkapsüle edilmesi ile yapılan MTT testinde hücre canlılıkları karşılaştırıldı. 0.63 μ M Doks-HCl Hep G2 hücrelerine uygulandıktan 48 saat sonra hücrelerin %44.8'i canlı bulunurken, aynı dozda Doks-HCl içeren aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonu uygulandıktan 48 saat sonra hücrelerin %36.8'i canlı bulundu. Hep G2 hücrelerinde yapılan MTT testi sonucunda gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucu, Doks-HCl'ün 48.saat IC50 dozu ile aynı dozda Doks-HCl içeren aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonun hücre canlılıkları arasında anlamlı farklanma gözlemlendi ($p < 0.05$). Kontrol grubu ile Doks-HCl'ün 48.saat IC50 dozu ve aynı dozda Doks-HCl içeren aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonunun hücre canlılıkları arasında ise istatistiksel olarak çok büyük anlamlı fark gözlemlendi ($p < 0.001$) (Şekil 68).

Doks-HCl'ün Mahlavu hücre hattı üzerindeki IC50 dozu olan 0.73 μ M Doks-HCl ve bu dozun aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonuna enkapsüle edilmesi ile yapılan MTT testinde hücre canlılıkları karşılaştırıldı. 0.73 μ M Doks-HCl Hep G2 hücrelerine uygulandıktan 48 saat sonra hücrelerin %48.9'u canlı bulunurken, aynı dozda Doks-HCl içeren aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonu uygulandıktan 48 saat sonra hücrelerin %23.07'si canlı bulundu. Mahlavu hücrelerinde yapılan MTT testi sonucunda gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucu, Doks-HCl'ün 48.saat IC50 dozu ile aynı dozda Doks-HCl içeren aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonun

hücre canlılıkları arasında ve kontrol grubunun bu uygulamalar ile arasında istatistiksel olarak çok büyük anlamlı fark gözlendi ($p<0.001$) (Şekil 73).

Doks-HCl'ün Huh 7 hücre hattı üzerindeki IC50 dozu olan 0.60 μ M Doks-HCl ve bu dozun aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonuna enkapsüle edilmesi ile yapılan MTT testinde hücre canlılıkları karşılaştırıldı. 0.60 μ M Doks-HCl Huh 7 hücrelerine uygulandıktan 48 saat sonra hücrelerin %52.3'ü canlı bulunurken, aynı dozda Doks-HCl içeren aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonu uygulandıktan 48 saat sonra hücrelerin %40.84'ü canlı bulundu. Huh 7 hücrelerinde yapılan MTT testi sonucunda gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucu, Doks-HCl'ün 48.saat IC50 dozu ile aynı dozda Doks-HCl içeren aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonun hücre canlılıkları arasında anlamlı farklanma gözlendi ($p<0.05$). Kontrol grubu ile Doks-HCl'ün 48.saat IC50 dozu ve aynı dozda Doks-HCl içeren aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonunun hücre canlılıkları arasında ise istatistiksel olarak çok büyük anlamlı fark gözlendi ($p<0.001$) (Şekil 77).

Doks-HCl'ün AML 12 hücre hattı üzerindeki IC50 dozu olan 2 μ M Doks-HCl ve bu dozun aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonuna enkapsüle edilmesi ile yapılan MTT testinde hücre canlılıkları karşılaştırıldı. 2 μ M Doks-HCl AML 12 hücrelerine uygulandıktan 48 saat sonra hücrelerin %46.34'ü canlı bulunurken, aynı dozda Doks-HCl içeren aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonu uygulandıktan 48 saat sonra hücrelerin %71.15'i canlı bulundu. AML 12 hücrelerinde yapılan MTT testi sonucunda gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucu, Doks-HCl'ün 48.saat IC50 dozu ile aynı dozda Doks-HCl içeren aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonun hücre canlılıkları arasında ve kontrol grubunun bu uygulamalar ile arasında istatistiksel olarak çok büyük anlamlı fark gözlendi ($p<0.001$) (Şekil 81).

MTT çalışması sonucu HSK hücre hatlarında (Hep G2, Mahlavu ve Huh 7) Doks-HCl içeren aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonun, Doks-HCl'e göre hücre canlılığını anlamlı derecede azalttığı gözlenirken, sağlıklı karaciğer hücre hattı olan AML 12 hücre hattı üzerinde aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonun hücre canlılığının daha yüksek bulunması aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonunda bulunan GA molekülünün HSK hücrelerinde bulunan reseptörler aracılığı ile HSK hücrelerine hedefli olduğunu göstermektedir. Çalışma verileri ile Doks-HCl içeren aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonunun sağlıklı hücreler üzerine daha düşük sitotoksik etki gösterdiği söylenebilmektedir. Benzer şekilde Tian ve arkadaşlarının

yaptığı çalışmada GA içeren lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin, GA içermeyen lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlere göre Hep G2 hücrelerinde IC50 değerini azaltarak, hücre canlılığını 1.46 kat azalttığı göstermektedir. Ayrıca Hep G2 hücre hattının hücre canlılığını, sağlıklı karaciğer hücrelerine göre 2.5 kat daha fazla azalttığını göstermektedir. Çalışma GA aktif hedefleyici molekülün, sağlıklı hücre hatlarına oranla HSK hücre hattına spesifik olarak hücre canlılığını azalttığını göstermektedir (J. Tian, Wang, Wang, & Ke, 2014).

5.13 In vitro Permeabilite Çalışmalarının Değerlendirilmesi

In vitro permeabilite çalışmaları, klinik çalışmalara geçebilme potansiyeli olan yenilikçi ilaç taşıyıcı sistemler için önemli absorpsiyon verileri sağlar. In vivo ortamda ilaç absorpsiyonu, in vitro modelin in vivo bariyerin özelliklerini ne kadar yakından taklit ettiğine bağlıdır (Sarmiento et al., 2012). İlacın, uygulama yolundan bağımsız olarak sistemik dolaşıma ulaşması için epitelyal permeasyon gereklidir. İntravenöz uygulama yolu ile uygulanan ilaçlarda ise; ilacın biyolojik hedefine ulaşması için hücre zarı bariyerlerini geçmesi gerekmektedir. Bu nedenle, in vitro permeabilite çalışmaları, formülasyon stratejisinin belirlenmesinde de önemli bir rol oynar (Shah & Agnihotri, 2011).

Biyolojik zarlardan ilaç absorpsiyonu karmaşık ve birkaç yollu süreçtir. İlaçlar pasif olarak; epitel hücrelerinin hücre zarından (transselüler yol), hücreler arasındaki bağlantılardan (paraselüler yol) veya aktif ya da kolaylaştırılmış difüzyon yoluyla absorbe olurlar. P-glikoprotein (P-gp) gibi çeşitli effluks taşıyıcılar emilimi sınırlayabilen proteinlerdir. Epitelyal enzimler, ilaçların daha fazla absorbe edilebilecek yapılara metabolize edilmesinde rol oynayabilir. İlaçların absorpsiyonunda yer alan çok değişkenli süreçler nedeniyle, in vivo permeabilite özelliklerini tek bir model kullanarak doğru tahmin etmek genellikle zordur (Martinez & Amidon, 2002). Bu nedenle Doks-HCl etkin maddesinin, geliştirilen aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun ve piyasa preparatının in vitro permeabilite özellikleri Hep G2, Mahlavu ve Huh-7 olmak üzere üç farklı HSK hücresi ile karşılaştırmalı çalışılmıştır. HSK hücre hatlarından geçiş çalışmaları iki yönlü olarak tasarlanmıştır. Bunlar; apikal yönden bazolateral yöne doğru olan, yani absorpsiyon olayının hücreden geçişini taklit eden yapı, bazolateral yönden apikal yöne doğru olan ise; eksorpsiyon olarak ifade edilen ilaçların kandan hücreye geçişini taklit eden yapıdır.

Permeabilite çalışmalarında; Hep G2, Mahlavu ve Huh-7 hücre hatlarına Doks-HCl etkin maddesinin HBSS içindeki çözeltisi, %5 lik dekstroz çözeltisi içerisinde disperse edilmiş aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun (2 mg Doks-HCl/mL) HBSS içindeki çözeltisi ve piyasa preparatının (2 mg Doks-HCl/mL) HBSS içerisindeki çözeltisi her bir hücre hattında Doks-HCl'ün 6.0 μ M (yaklaşık 0.004 mg/mL) olacak şekilde hem apikal yöne, hem de basolateral yöne uygulandı (Pangeni et al., 2020) (n=3). Tüm hücre hatlarında yapılan permeabilite çalışmalarının derişim miktarları Tablo 109, Tablo 111, Tablo 113'de; konsantrasyon zaman grafikleri ise Şekil 82, Şekil 83, Şekil 84, Şekil 85, Şekil 86, Şekil 87, Şekil 88, Şekil 89, Şekil 90, Şekil 91, Şekil 92, Şekil 93, Şekil 94, Şekil 95, Şekil 96, Şekil 97, Şekil 98 ve Şekil 99'da verilmiştir.

Hep G2 hücre hattından A→B 'e olan geçiş çalışmalarında Doks-HCl' ün bazolateral kısımdaki derişim miktarını 75. dakika sonunda % $X \pm SS$ olarak değerlendirecek olursak; apikal kısma uygulanan Doks-HCl'ün ortalama % 25.1 ± 0.01 'i, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun ortalama % 96.6 ± 0.001 'i, piyasa preparatının ortalama % 97.2 ± 1.02 ' si bazolateral kısma geçmiştir. B→A'e olan geçiş çalışmalarında Doks-HCl' ün apikal kısımdaki derişim miktarını 75. dakika sonunda % $X \pm SS$ olarak değerlendirecek olursak; bazolateral kısma uygulanan Doks-HCl'ün ortalama % 97.8 ± 0.02 'si, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun ortalama % 61.7 ± 0.002 'si, piyasa preparatının ortalama % 75.8 ± 0.04 'ü bazolateral kısma geçmiştir. Mahlavu hücre hattında yapılan permeabilite çalışmaları değerlendirilecek olursa; apikal kısma uygulanan Doks-HCl'ün ortalama % 37.6 ± 0.03 'ü, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun ortalama % 97.5 ± 0.04 'ü, piyasa preparatının ortalama % 97.5 ± 0.08 'i bazolateral kısma geçmiştir. Bazolateral kısma uygulanan Doks-HCl'ün ortalama % 95.3 ± 0.04 'ü, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun ortalama % 52.5 ± 0.01 'i, piyasa preparatının ortalama % 75.0 ± 0.06 'sı bazolateral kısma geçmiştir. Huh-7 hücre hattında ise; apikal kısma uygulanan Doks-HCl'ün ortalama % 29.2 ± 0.12 'si, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun ortalama % 90.0 ± 0.12 'si, piyasa preparatının ortalama % 97.5 ± 0.13 'ü bazolateral kısma geçmiştir. Bazolateral kısma uygulanan Doks-HCl'ün ortalama % 92.5 ± 0.14 'ü, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun ortalama % 65.0 ± 0.14 'ü, piyasa preparatının ortalama % 79.2 ± 0.13 'ü bazolateral kısma geçmiştir.

Papp $A \rightarrow B$ ve Papp $B \rightarrow A$ değerleri hesaplamış, bir maddenin effluks akışa maruz kalabilme potansiyelini değerlendirme göstergesi olan ve $Papp B \rightarrow A / Papp A \rightarrow B$ şeklinde hesaplanan effluks değerleri karşılaştırılmıştır. Bu değer >2 olduğunda formülasyonun effluks akışa maruz kalma ihtimali vardır ve bu durum permeabiliteyi azaltan bir etmendir (Gameiro et al., 2017). Doks-HCl, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu ve piyasa preparatı ile Hep G2, Mahlavu ve Huh-7 hücre hattında yapılan permeabilite çalışmalarında effluks sonuçları; Tablo 110, Tablo 112 ve Tablo 114’de verildi. Doks-HCl’ün Hep G2, Mahlavu ve Huh-7 hücre hattındaki effluks değerleri sırasıyla 2.50, 2.63 ve 2.63 bulunarak aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu ve piyasa preparatından daha yüksek bulundu. Yapılan literatür çalışmalarında da Doks-HCl’ün benzer şekilde düşük permeabilite ve yüksek effluks değerine sahip olduğu görüldü (Allahou, Madani, & Seifalian, 2021). Hep G2 hücre hattında aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu ve piyasa preparatının effluks değerleri sırası ile 0.71 ve 0.75; Mahlavu hücre hattında sırası ile 0.73 ve 0.79; Huh-7 hücre hattında ise sırası ile 0.79 ve 0.93 bulundu. Sonuçlar karşılaştırıldığında lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin Doks-HCl etkin maddesinin permeabilitesini arttırdığı gözlemlendi. Bu sonuç lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin hücre membranına benzer yapıları ile permeabiliteyi arttırdığı gösterdi. Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu ve piyasa preparatının effluks değerleri Hep G2 ve Mahlavu hücre hattında birbirlerine yakın iken, Huh-7 hücre hattında aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun piyasa preparatına göre effluks değerini azaltarak permeabiliteyi arttırdığı gözlemlendi.

Ayrıca aktif hedefli pegile F7-3 lipozom formülasyonu Doks-HCl etkin maddesi ile karşılaştırıldığında Hep G2 hücre hattında A-B permeabiliteyi 2.11 kat, Mahlavu hücre hattında permeabiliteyi 2.05 kat, Huh-7 hücre hattında ise permeabiliteyi 2.01 kat arttırdığı gözlemlendi.

Permeabilite çalışmalarında membranlar üzerinde çoğalmış epitel hücrelerinin bariyer fonksiyonunu, hücre bütünlüğünü değerlendirmek için TEER ölçümü kullanılmaktadır (S. Chen, Einspanier, & Schoen, 2015). Endotelyal ve epitelyal tek tabakaların hücre kültürü modellerinde sıkı bağlantı dinamiklerinin bütünlüğünü ölçmek için yaygın olarak kabul edilen nicel bir tekniktir. Literatürlerde hücre bütünlüğü sağlanmış hücrelerin TEER değer aralığının 500-1100 Ω aralığında bulunması gerekliliği söylenmektedir (S. Chen et al., 2015). Bu çalışma boyunca Hep G2, Mahlavu ve Huh-

7 hücre hatlarında deney öncesi ve deney sonrası tüm ölçümlerde TEER değerleri 880-1100 Ω aralığında bulunarak kabul kriterine uygun bulunmuştur.

Hep G2, Mahlavu ve Huh-7 hücre hatlarında yapılan permeabilite çalışmalarında, deney başlangıcında $A \rightarrow B$ 'e ve $B \rightarrow A$ 'e TEER değerleri ölçülerek membrandaki hücre bütünlüğü, deney sonunda $A \rightarrow B$ 'e ve $B \rightarrow A$ 'e TEER değerleri ölçülerek hücre bütünlüğünün deney boyunca sağlandığı gösterildi. Hep G2 hücre hattında $A \rightarrow B$ 'e % TEER değişimi Doks-HCl için %2.39, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu için %0.53, piyasa preparatı için %3.34; $B \rightarrow A$ ise Doks-HCl için %5.18, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu için %0.40, piyasa preparatı için %1.94 bulundu (Tablo 115). Mahlavu hücre hattında $A \rightarrow B$ 'e % TEER değişimi Doks-HCl için %0.51, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu için %0.14, piyasa preparatı için %0.32; $B \rightarrow A$ ise Doks-HCl için %0.57, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu için %1.94, piyasa preparatı için %0.40 bulundu (Tablo 116). Huh-7 hücre hattında ise; $A \rightarrow B$ 'e % TEER değişimi Doks-HCl için %0.85, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu için %0.84, piyasa preparatı için %1.38; $B \rightarrow A$ ise Doks-HCl için %0.20, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu için %0.70, piyasa preparatı için %3.18 bulundu (Tablo 117).

5.14 In vivo Çalışmaların Değerlendirilmesi

5.14.1 Biyodağılım Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi

IVIS® görüntüleme cihazı ile deney hayvanları üzerinde Biyoluminesans ve Fluoresans görüntüleme sağlanabilmektedir (Zarychta-wi et al., 2017). Biyodağılım çalışmasında nude CD 1 fareler; 1. Grup: Doks-HCl'ün %5 lik Dekstroz çözeltisi, 2. Grup: Piyasa preparatı (2 mg/mL), 3. Grup: aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun %5'lik dekstroz çözeltisi içindeki dispersiyonu (2 mg/ mL), 4. Grup: aktif hedefsiz pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun %5'lik dekstroz çözeltisi içindeki dispersiyonu (2 mg/ mL) olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. 1.saat, 3.saat, 5.saat, 7.saat, 9.saat, 12.saat ve 24.saatlerde IVIS ölçümleri alındı.

1.grup IVIS görüntüleri değerlendirildiğinde; 1.saatten başlayarak 12. saate kadar Doks-HCl'ün dağılım gösterdiği, 24.saatte ise vücuttan elimine edildiği gözlemlendi. 2. Grup IVIS görüntüleri değerlendirildiğinde; piyasa preparatının 1.saatten başlayarak dağılım gösterdiği, 24.saatte ise hala vücut sirkülasyonunda olduğu gözlemlendi. 3. ve 4.

Grup IVIS görüntüleri de piyasa preparatına benzer şekilde 24.saatte vücut sirkülasyonunda olduğu gözlemlendi. Lu ve arkadaşlarının farelerde yaptığı çalışmada; serbest Doks-HCl 12-24 saat aralığında vücuttan elimine edilirken, pegile lipozomal Doks-HCl formülasyonu 24 saat üzerinde vücuttan elimine olmuştur (W. L. Lu et al., 2004). Bulunan sonuçlar literatür verileri ile benzerlik göstermiştir.

24. Saat sonunda yapılan ex vivo çalışmalarda; akciğer, dalak, kalp, karaciğer ve böbreklerin IVIS görüntüleri incelendiğinde ise 1. Grup da Doks-HCl'ün az miktarda karaciğerde ve yüksek miktarda böbreklerde birikim gösterdiği; 2. Grup da piyasa preparatının karaciğer ve böbreklerde birikim gösterdiği, 3. Grup da aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun yüksek miktarda karaciğer de birikim gösterdiği; 4. Grup da aktif hedefsiz pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun çok düşük miktarlarda karaciğerde olmak üzere böbreklerde de birikim gösterdiği gözlemlendi (Şekil 146, Şekil 147, Şekil 148 ve Şekil 149).

Kenneth J. Longmuir ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada serbest Doks-HCl ve Doks-HCl içeren karaciğere aktif hedefli lipozomal ilaç taşıyıcı sistem formülasyonları kuyruk veninden farelere uygulanmış ve serbest Doks-HCl uygulanan farelerdeki Doks-HCl'ün yüksek miktarda böbrek ve karaciğerde bulunduğu gösterilmiştir (Longmuir, Haynes, Baratta, Natasha, & Robertson, 2010). Buna karşılık karaciğere aktif hedefli lipozomal ilaç taşıyıcı sistemin yüksek miktarda karaciğerde ve az miktarda da böbreklerde birikim gösterdiği görülmüştür.

Guixiang Tian ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise serbest Doks-HCl ile GA aktif hedeflendirilmiş Doks-HCl içeren nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem formülasyonunun fareler üzerinde biyodağılım çalışması incelenmiş ve 24.saate sonunda yapılan ex vivo çalışma ile GA aktif hedefli nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemin büyük ölçüde karaciğerde biriktiği, serbest Doks-HCl'ün ise yüksek miktarda böbreklerde olmak üzere bir kısım da karaciğerde biriktiği gösterilmiştir (G. Tian et al., 2019).

5.14.2 Etkinlik Çalışmasına ait Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Etkinlik çalışmasında nude CD 1 fareler, negatif kontrol grubu (1. Grup), aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu uygulanan grup (2.grup) ve piyasa preparatı uygulanan grup olmak üzere üç gruba ayrılmıştır.

Kanser modeli olarak ortotropik ksenograft modelini oluşturmak için iki yaklaşım vardır. Biri intrahepatik implantasyon modeli olarak adlandırılır ve hastalardan alınan

tümör parçaları, 1 x 1 x 1 mm³ boyutlu parçalar halinde kesilir, farelerin karaciğerine implante edilir. Daha yaygın olarak kullanılan diğer yaklaşımda ise, süspansiyon edilen tümör hücrelerinin doğrudan farenin hepatik lobuna enjekte edilmesiyle oluşturulur. Bu yaklaşımda ihtiyaç duyulan hücre sayısı yaklaşık 1x10⁶-5x10⁶ arasındadır (He, Tian, Li, & He, 2015). Bu amaçla karaciğer kanser modeli oluşturmak için tümör hücrelerinin süspansiyon Hep G2 hücreleri nude farelerin karaciğer lobuna enjekte edilmiştir.

Çalışmada tümör görüntülemek için glikoz probun enjeksiyonu kullanıldı. Bu prob glikoz molekülüne konjuge edilmiş bir floresan boyadan oluşur, böylece çevre dokulara kıyasla çoğu tümörün yüksek glikoz alım hızından yararlanarak tümör görüntülenmesini başarılı olarak sağlar (Pleijhuis, Crane, Oosten, & Dam, 2014). Glikoz probu enjeksiyonu sonrası IVIS görüntülenmesi yapıldı (1. görüntüleme) ve başarılı bir şekilde karaciğer tümörü oluşturulduktan sonra 2. ve 3. Grupta tedavi enjeksiyonlarına başlandı. 1. ve 2. Tedavi enjeksiyonu sonrası glikoz prob ile IVIS görüntülenmesi yapıldı (2. görüntüleme), 3. Tedavi enjeksiyonu sonrası glikoz prob ile son IVIS görüntülenmesi yapıldı (3. görüntüleme) ve fareler sakrefiye edilerek organları patolojik inceleme için çıkarıldı.

Yapılan IVIS görüntüleri incelendiğinde, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu uygulanan 2.grup farelerde iki tedavi enjeksiyonu sonrası tümör boyutunun küçüldüğü ve üçüncü tedavi enjeksiyonu sonrası tamamen yok olduğu gözlemlendi (Şekil 153), piyasa preparatı uygulamasında ise F7-3 prolipozom uygulamasının etkinliğine üçüncü tedavi enjeksiyonu sonunda ulaşıldığı gözlemlendi (Şekil 154). Bu sonuçlar aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunda bulunan aktif hedefleyici GA molekülünün formülasyonun karaciğere hedefleme potansiyelini arttırarak daha etkin bir tedavi sağladığı gösterdi.

Jiang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; DSPE-PEG molekülüne GA konjugasyonunu sağlanmış, lipozomal ilaç taşıyıcı sistem formülasyonu geliştirilmiş ve karaciğer kanseri üzerine etkinliği araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmada GA içermeyen formülasyona oranla, GA içeren aktif hedefli lipozomal ilaç taşıyıcı sistem formülasyonunun etkinliğinin daha yüksek olduğu kanıtlanmıştır (H. Jiang et al., 2019).

Tian ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise; DSPE-PEG molekülüne GA konjugasyonu sağlanmış ve Doks-HCl içeren nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem formülasyonu tasarlanmıştır. Karaciğer kanseri oluşturulmuş farelerde etkinlik üzerine çalışılmış ve serbest Doks-HCl'e kıyasla Doks-HCl içeren DSPE-PEG-GA konjugasyonlu nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem formülasyonunun etkinliği daha yüksek bulunmuştur (H. Jiang et al., 2019).

5.14.3 Patolojik Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi

IVIS görüntülerini desteklemek, kanser oluşumu ve tedavi sonrası organlardaki hücresel farklanmaları gözlemek adına patolojik çalışma yapmak oldukça önemlidir. Çalışma sonunda, 1. Gruptaki (Negatif Kontrol Grubu) farelerin karaciğerinde kanser hücrelerine rastlanırken, 2. Gruptaki (Pozitif Kontrol Grubu= Aktif Hedefli Pegile F7-3 Prolipozom Formülasyonu Tedavisi Uygulanmış Grup) ve 3. Gruptaki (Pozitif Kontrol Grubu= Piyasa Preparatı Tedavisi Uygulanmış Grup) farelerin karaciğerlerinde kanser hücrelerine rastlanmadı (Şekil 155, Şekil 157, Şekil 159). Bu durum her iki grupta bulunan farelerde aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu ve piyasa preparatı ile etkin bir tedavi sağlandığını gösterdi. 2. Grupta bulunan hiç bir farenin karaciğerlerinde nekroz görülmezken, 3. Gruptaki farelerin karaciğerlerinde şiddetli nekroz bulgularının gözlenmesi; aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun karaciğerdeki sağlıklı karaciğer hücreleri üzerinde nekroz yaratmadığını ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun yapısında aktif hedefleyici olarak bulunan GA molekülünün karaciğer kanser hücrelerine spesifik olduğunu gösterdi (Yuqi et al., 2018). Benzer şekilde, Wu ve arkadaşları, GA aktif hedefli nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemin karaciğer kanseri üzerine etkisini incelemişler ve tümör hücrelerinde GA reseptörlerinin normal hücrelere göre daha yüksek mevcudiyeti nedeniyle sağlıklı karaciğer hücrelerindeki dokularda yan etkilerin daha az gözlemlendiğini göstermişlerdir (Wu et al., 2020).

2. grup ve 3. Grupta bulunan farelerin dalak, kalp ve böbrek organ dokularının 1. Grup farelerin organ dokularıyla benzer bulunması, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu ve piyasa preparatının bu dokularda herhangi bir doku farklanması yaratmadığını gösterdi. Ayrıca serbest Doks-HCl'ün yan etki olarak, yüksek derecede kardiyotoksisite gösterdiği fakat lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlere enkapsüle edildiklerinde kardiyotoksisitenin önüne geçildiği yapılan literatür çalışmalarında gösterilmiştir (A. A. Gabizon, Lyass, Berry, & Wildgust, 2004; H. Wang et al., 2020).

Gerçekleştirilen patoloji çalışmaları, aktif hedefli F7-3 prolipozom formülasyonunun piyasa preparatına benzer şekilde farelerde kardiyotoksisite yaratmamış olduğunu göstermektedir.

Doks-HCl etkin maddesi nadir de olsa akciğerlerde pnömani yan etkisi yaratabilmektedir (Daemen, Hofstede, Ten Kate, Bakker-Woudenberg, & Scherphof, 1995). Akciğerde alveoler boşlukların azalması pnömani göstergesidir (Torres et al., 2021). Bu amaçla, akciğer organının patolojik incelemesinde alveoler boşluklar izlendi. 1. Grupta bulunan farelerin akciğerlerindeki alveoler boşluklar normal düzeyde gözlemlendi. 2. Grupta bulunan bir farenin akciğerinde normal düzeyde alveoler boşluklar gözlenirken, iki farenin akciğerinde hafif düzeyde alveoler boşluk azalması gözlemlendi. 3. Grupta bulunan bir farenin akciğerinde hafif alveoler boşluk azalması gözlenirken, iki farenin akciğerinde şiddetli düzeyde alveoler boşluk azalması gözlemlendi (Şekil 156, Şekil 158, Şekil 160).

Yapılan patolojik incelemeler sonrasında aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu piyasa preparatına ile karşılaştırıldığında; aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunun karaciğer kanser hücrelerine spesifik olduğu ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu hafif düzeyde pnömani yan etkisi yaratırken, piyasa preparatının şiddetli düzeyde pnömani yan etkisi yarattığı gözlemlendi.

5.14.4 Organlarda Bulunan Doks-HCl Tayini için Metot Geliştirme Çalışmasının Değerlendirilmesi

Özellikle aktif hedefli formülasyonların etkinlik çalışmaları sonrası organlarda miktar tayini çalışması gerçekleştirmek oldukça önemlidir. Bu amaçla, etkinlik çalışması sonrası aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu ve piyasa preparatı ile tedavileri yapılmış nude CD 1 fareler kurban edilmiş ve akciğer, dalak, kalp, karaciğer ve böbrek organlarında Doks-HCl'ün miktar tayini için HPLC-FLD cihazında metot geliştirilmiştir. Ayrıca negatif kontrol grubu olan karaciğer kanseri geliştirilmiş ve tedavi uygulanmamış nude CD 1 farelerin, akciğer, dalak, kalp, karaciğer ve böbrek organlarının matriks çözeltileri de metot geliştirme aşamasında matriksten gelebilecek girişimlerin gözlenmesi adına çalışılmıştır. Özgünlük ve seçicilik parametresi için matriks çözeltisi üzerine ekim yapılan Doks-HCl standart çözeltisi ve Dau iç standart çözeltisi ile matriks çözeltisi kromatogramları karşılaştırılmış ve her iki maddenin alıkonma zamanlarında matriks çözeltisinden herhangi bir girişimin olmadığı gözlemlendi. Çalışma aralığı parametresinde %20 ve %200

konsantrasyonlarda bulunan Doks-HCl'ün ve 100 ng/mL derişimde bulunan Dau iç standart çözeltisinin 6'şar enjeksiyonu sonrası %RSS %2'den küçük bulundu. Doğrusallık çalışması için 100 ng/mL Dau iç standardını içeren %20, %50, %100, %150, %200 derişimdeki Doks-HCl ile çizilen kalibrasyon eğrisinin r^2 değeri, 0.9974 bulundu. Ayrıca %100 derişimdeki Doks-HCl ve 100 ng/mL derişimde bulunan Dau iç standart enjeksiyonları ile sistem uygunluk parametreleri kontrol edildi. Doks-HCl'e ait LOD değeri 0.314 ng/mL, LOQ değeri 1.04 ng/mL bulundu (International Conference on Harmonization, 2019). Geliştirilen HPLC-FLD yöntemi sonrası tedavi uygulaması yapılmayan negatif kontrol grubunda Doks-HCl'e rastlanmazken, piyasa preparatı uygulaması yapılan grupta akciğerde 32.0 ng/g, dalakta 895.5 ng/g, kalpte 94.7 ng/g, karaciğerde 79.1 ng/g, böbrekte 12.6 ng/g Doks-HCl birikimi olduğu bulundu. Aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu tedavisi uygulanmış grupta ise akciğerde 29.3 ng/g, dalakta 827.2 ng/g, kalpte 66.1 ng/g, karaciğerde 195.8 ng/g, böbrekte 16.4 ng/g Doks-HCl birikimi olduğu bulundu. Yapılan çalışma sonucunda, aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunda bulunan aktif hedefleyici molekül GA'in karaciğerde Doks-HCl birikimini piyasa preparatına göre 2.47 kat arttırdığı söylenebilir. Zhang ve arkadaşlarının yaptığı organlarda dağılım çalışmasında, aktif hedefleci olarak GA içeren Doks-HCl yüklü nanopartiküllerin, GA içermeyen nanopartiküllere oranla karaciğerde 1.79 kat daha fazla biriktiği gözlenmiştir (C. Zhang et al., 2012).

Doks-HCl etkin maddesi kalpte birikim göstererek kardiyotoksisite yaratması bilinen en yaygın yan etkilerden biridir (De Angelis et al., 2016). Bu nedenle Doks-HCl'ün kalpte birikiminin azaltılması çok önemlidir. Geliştirilen aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu, piyasa preparatına göre Doks-HCl'ün kalpte birikimini 1.43 kat azaltmıştır.

Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin dalak fagositlerinde yüksek derecede lokalize olduğu bilinmektedir (Smits, Vromans, Pieters, Smits, & Wijs-rot, 2018). Benzer şekilde bu çalışmada da, dalakta Doks-HCl birikimi hem piyasa preparatında ve hem de aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonunda diğer organlara göre yüksek birikim göstermiştir. Akciğer ve böbrek organlarında ise piyasa preparatı ve aktif hedefli pegile F7-3 prolipozom formülasyonu benzer Doks-HCl birikimi göstermiştir.

Sonuç ve Öneriler

Karaciğer kanseri son beş yılda sağ kalım oranı %9'un altında olan ve ciddi hayati risk yaratan kanser çeşitlerinden biri olduğu için karaciğer kanserinde etkili ve güvenli bir tedavi profili oluşturmak oldukça önemlidir. Bu amaçla tezimizde, klasik kemoterapi uygulamalarında sıklıkla kullanılan etkin maddelerden Doksorusin Hidroklorür model etkin madde olarak kullanılmıştır. Klasik kemoterapi uygulamalarında görülen yan etkilen önüne geçmek adına aktif hedefli nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerden, glisirretinik asit aktif hedefli pegile lipozomal ve prolipozomal formülasyonları başarılı bir şekilde geliştirilmiştir. Geliştirilen bu formülasyonların in vitro çalışmaları piyasa preparatı ile karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilmiştir. In vitro karakterizasyon ve stabilite çalışmaları sonucunda geliştirilen aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonu ile in vivo biyodağılım ve etkinlik çalışmaları, piyasa preparatı ile karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonunun karaciğer kanseri üzerinde daha etkin bir tedavi gerçekleştirdiği yapılan etkinlik çalışması ile gösterilmiştir. Ayrıca patolojik çalışmalar, piyasa preparatına oranla geliştirilen aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonunun karaciğerdeki sağlıklı hücreler üzerinde nekroz etkisi yaratmadığı ve akciğerlerde pnömani yan etkisini yaratmadığını göstermiştir. Tüm bu bulgular, tez çalışması kapsamında geliştirilen aktif hedefli pegile prolipozom formülasyonun karaciğer kanseri tedavisinde umut vaat eden sonuçlara ulaşıldığını göstermektedir.

Kaynaklar

- (IARC), I. A. for R. on C. (2010). *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* (Vol. 93). <https://doi.org/10.1136/jcp.48.7.691-a>
- Abdalla, E. K., Denys, A., Hasegawa, K., Leung, T. W. T., Makuuchi, M., Murthy, R., ... Torzilli, G. (2008). Treatment of large and advanced hepatocellular carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, 15(4), 979–985. <https://doi.org/10.1245/s10434-007-9727-7>
- Abe, R. A. M., Masroor, A., Khorochkov, A., Prieto, J., Singh, K. B., Nnadozie, M. C., ... Mohammed, L. (2021). The Role of Vitamins in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review. *Cureus*, 13(8). <https://doi.org/10.7759/cureus.16855>
- Abuwatfa, W. H., Awad, N. S., Pitt, W. G., & Hussein, G. A. (2022). Thermosensitive Polymers and Thermo-Responsive Liposomal Drug Delivery Systems. *Polymers*, 14(5). <https://doi.org/10.3390/polym14050925>
- Agrawal, K. (2007). Doxorubicin, (1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.11.045>
- Akbarzadeh, A., Rezaei-sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., & Zarghami, N. (2013). Liposome : classification , preparation , and applications, 1–9.
- Al Sawaftah, N., Paul, V., Awad, N., & Hussein, G. A. (2021). Modeling of anti-cancer drug release kinetics from liposomes and micelles: A review. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 20(4), 565–576. <https://doi.org/10.1109/TNB.2021.3097909>
- Alavi, M., & Hamidi, M. (2019). Passive and active targeting in cancer therapy by liposomes and lipid nanoparticles. *Drug Metabolism and Personalized Therapy*, 34(1), 1–8. <https://doi.org/10.1515/dmpt-2018-0032>
- Alfarouk, K. O., Stock, C. M., Taylor, S., Walsh, M., Muddathir, A. K., Verduzco, D., ... Rauch, C. (2015). Resistance to cancer chemotherapy: Failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer Cell International*, 15(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0221-1>
- Allahou, L. W., Madani, S. Y., & Seifalian, A. (2021). Investigating the Application

of Liposomes as Drug Delivery Systems for the Diagnosis and Treatment of Cancer. *International Journal of Biomaterials*, 2021.

Allawadi, D., Singh, N., Singh, S., & Arora, S. (2014). ChemInform Abstract: Solid Dispersions: A Review on Drug Delivery System and Solubility Enhancement. *ChemInform*, 45(18), no-no. <https://doi.org/10.1002/chin.201418290>

Allemann, P., Demartines, N., Bouzourene, H., Tempia, A., & Halkic, N. (2013). Long-term outcome after liver resection for hepatocellular carcinoma larger than 10 cm. *World Journal of Surgery*, 37(2), 452–458. <https://doi.org/10.1007/s00268-012-1840-5>

Almgren, M., Edwards, K., & Karlsson, G. (2000). Cryo transmission electron microscopy of liposomes and related structures. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 174(1–2), 3–21. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(00\)00516-1](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(00)00516-1)

Alves, A. D. C. (2017). *Development of a proliposome formulation as a drug carrier for a novel antitumor drug*.

Amarnath Sharma, U. S. S. (1997). sharma1997.pdf. *International Journal of Pharmaceutics*, 157, 123–140.

Anderson, M., & Omri, A. (2004). The Effect of Different Lipid Components on the In Vitro Stability and Release Kinetics of Liposome Formulations, 33–39. <https://doi.org/10.1080/10717540490265243>

Annakula, D., Errabelli, M. R., Jukanti, R., Bandari, S., & Reddy Veerareddy, P. (2010). Provesicular drug delivery systems: An overview and appraisal. *Archives of Applied Science Research*, 2(4), 135–146. Retrieved from <http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>

Arun K. Katragadda, M. S. & G. V. B. (1999). Encapsulation, Stability, and In Vitro Release Characteristics of Liposomal Formulations of Stavudine. *Drug Delivery*, 6, 31–37.

Asham, E. H., Kaseb, A., & Ghobrial, R. M. (2013). Management of Hepatocellular Carcinoma. *Surgical Clinics of North America*, 93(6), 1423–1450. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2013.08.008>

- Astefanei, A., Núñez, O., & Galceran, M. T. (2015). Characterisation and determination of fullerenes: A critical review. *Analytica Chimica Acta*, 882, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.03.025>
- Azhar, L., Bahari, S., & Hamishehkar, H. (2016). The Impact of Variables on Particle Size of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers ; A Comparative Literature Review. *Tabriz University of Medical Sciences*, 6(2), 143–151. <https://doi.org/10.15171/apb.2016.021>
- Bahrami, B., Hojjat-Farsangi, M., Mohammadi, H., Anvari, E., Ghalamfarsa, G., Yousefi, M., & Jadidi-Niaragh, F. (2017). Nanoparticles and targeted drug delivery in cancer therapy. *Immunology Letters*, 190(April), 64–83. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.015>
- Balogh, J. (2016). Hepatocellular carcinoma: a review, (October). <https://doi.org/10.2147/JHC.S61146>
- Bansal, R., Singh, R., & Kaur, K. (2021). Quantitative analysis of doxorubicin hydrochloride and arterolane maleate by mid IR spectroscopy using transmission and reflectance modes. *BMC Chemistry*, 15(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13065-021-00752-3>
- Barenholz, Y., & Haran, G. (1994). Loading and controlled release of amphiphilic molecules to and from liposomes. *European Patent Specification*.
- Bastos, M., & Aguas, A. C. P. (2016). Using DSC to characterize thermotropic phase transitions in lipid bilayer membranes The basics of liposome sample preparation and DSC studies. *Malvern Instruments Limited*. Retrieved from www.malvern.com/contact
- Beech, K. E., Biddlecombe, J. G., Walle, C. F. Van Der, Stevens, L. A., Rigby, S. P., Burley, J. C., & Allen, S. (2015). Insights into the influence of the cooling profile on the reconstitution times of amorphous lyophilized protein formulations. *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS*, 96, 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.07.029>
- Beier, J. I., & Arteel, G. E. (2021). Environmental exposure as a risk-modifying factor in liver diseases: Knowns and unknowns. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11(12), 3768–3778. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.09.005>

- Benjamin D. Granta, Chelsey A. Smithb, Philip E. Castlec, Michael E. Scheurere, and R. R.-K. (2017). HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(5), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.02.001>. Biliverdin
- Berginc, K., & Kristl, A. (2010). Transwell-Grown HepG2 Cell Monolayers as In Vitro Permeability Model to Study Drug–Drug or Drug–Food Interactions . *Journal of Medicinal Food*, 14(1–2), 135–139. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0041>
- Bertot, L. C., Sato, M., Tateishi, R., Yoshida, H., & Koike, K. (2011). Mortality and complication rates of percutaneous ablative techniques for the treatment of liver tumors: A systematic review. *European Radiology*, 21(12), 2584–2596. <https://doi.org/10.1007/s00330-011-2222-3>
- Beuvery, E. C. (n.d.). *Preparation of liposomes via detergent removal from mixed micelles by dilution The effect of bilayer composition and process parameters on liposome characteristics* (Vol. 8).
- Biochemistry, A. O. F. (1981). Liposomes with a Large Trapping Thawing of Sonicated Capacity Prepared by Freezing Phospholipid Mixtures mostly unilamellar liposomes were formed by this procedure . In this paper we demonstrate that li- posomes obtained by this simple proce- dure have a , 212(1).
- Blidisel, A., Marcovici, I., Coricovac, D., Hut, F., Dehelean, C. A., & Cretu, O. M. (2021). Experimental models of hepatocellular carcinoma—a preclinical perspective. *Cancers*, 13(15). <https://doi.org/10.3390/cancers13153651>
- Blomme, S. (2008). International Journal of Pharmaceutics. *International Journal of Pharmaceutics*, 358, 278–284.
- Bozzuto, G. (2015). Liposomes as nanomedical devices, 975–999.
- Briuglia, Maria-Lucia, Lamprou, C. R., & A., A. M. & D. (2015). kolesterolün ilaç taşıma etkisi.pdf. *Drug Deliv. and Transl. Res.*, 5, 231–242. <https://doi.org/10.1007/s13346-015-0220-8>
- Bruix, J., Raoul, J. L., Sherman, M., Mazzaferro, V., Bolondi, L., Craxi, A., ... Llovet, J. M. (2012). Efficacy and safety of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: Subanalyses of a phase III trial. *Journal of Hepatology*,

57(4), 821–829. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.06.014>

Bruix, J., & Sherman, M. (2011). Management of hepatocellular carcinoma: An update. *Hepatology*, 53(3), 1020–1022. <https://doi.org/10.1002/hep.24199>

Buckner, C. A., Lafrenie, R. M., Dénommée, J. A., Caswell, J. M., Want, D. A., Gan, G. G., ... Mathijssen, R. H. J. (2016). Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery. *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*, 11, 13. Retrieved from <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>

Bulbake, U., Doppalapudi, S., Kommineni, N., & Khan, W. (2017). Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review development, 1–33. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012>

Cai, Y., Xu, Y., Chan, H. F., Fang, X., He, C., & Chen, M. (2016). Glycyrrhetic Acid Mediated Drug Delivery Carriers for Hepatocellular Carcinoma Therapy. *Molecular Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00677>

Cao, M., Gao, Y., Zhan, M., Qiu, N., Piao, Y., Zhou, Z., & Shen, Y. (2019). Glycyrrhizin acid and glycyrrhetic acid modified polyethyleneimine for targeted DNA delivery to hepatocellular carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20). <https://doi.org/10.3390/ijms20205074>

Cha, C. H., Ruo, L., Fong, Y., Jarnagin, W. R., Shia, J., Blumgart, L. H., ... Bismuth, H. (2003). Resection of Hepatocellular Carcinoma in Patients Otherwise Eligible for Transplantation. *Annals of Surgery*, 238(3), 315–323. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000086548.84705.ef>

Chabner, B., Allegra, C., & Curt, G. (2001). *Antineoplastic Agents. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Vol. 10). Retrieved from <http://www.elsevier.com/locate/scp>

Chai, F., Sun, L., He, X., Li, J., Liu, Y., Xiong, F., ... Zheng, C. (2017). Doxorubicin-loaded poly (Lactic-co-glycolic acid) nanoparticles coated with chitosan/alginate by layer by layer technology for antitumor applications. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 1791–1802. <https://doi.org/10.2147/IJN.S130404>

Chang, H.-S. (2012). Study of Nutrient Intakes , Blood Lipids and Bone Mineral

- Density and Female Teacher in Jeonbuk Province , Korea, 17(1).
<https://doi.org/10.5720/kjcn.2012.17.1.49>
- Chelliah, R., Khan, I., Daliri, E. B. M., Tamizhini, L., Pravitha, K. S., Begum, M., ... Oh, D. H. (2021). Engineering Liposomes for Drug Delivery: Progress and Problems. *Nanotechnology in the Life Sciences*, 13(December), 425–447.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-84262-8_15
- Chemical, C. (2013). Product Information.
- Chen, M., Liu, X., & Fahr, A. (2011). Skin penetration and deposition of carboxyfluorescein and temoporfin from different lipid vesicular systems : In vitro study with finite and infinite dosage application. *International Journal of Pharmaceutics*, 408(1–2), 223–234.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.02.006>
- Chen, S., Einspanier, R., & Schoen, J. (2015). Transepithelial electrical resistance (TEER): a functional parameter to monitor the quality of oviduct epithelial cells cultured on filter supports. *Histochemistry and Cell Biology*, 144(5), 509–515.
<https://doi.org/10.1007/s00418-015-1351-1>
- Chen, W., Duša, F., Witos, J., Ruokonen, S., & Wiedmer, S. K. (2018). Determination of the Main Phase Transition Temperature of Phospholipids by Nanoplasmonic Sensing, (September), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33107-5>
- Cherqui, D., Laurent, A., Tayar, C., Chang, S., Tran Van Nhieu, J., Loriau, J., ... Fagniez, P. L. (2006). Laparoscopic liver resection for peripheral hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: Midterm results and perspectives. *Annals of Surgery*, 243(4), 499–506.
<https://doi.org/10.1097/01.sla.0000206017.29651.99>
- Chiang, C. J., Yang, Y. W., You, S. L., Lai, M. S., & Chen, C. J. (2013). Thirty-year outcomes of the national hepatitis B immunization program in Taiwan. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 310(9), 974–976.
<https://doi.org/10.1001/jama.2013.276701>
- Choo, Q. L., Richman, K. H., Han, J. H., Berger, K., Lee, C., Dong, C., ... Houghton, M. (1991). Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,

88(6), 2451–2455. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.6.2451>

Chountoulesi, M., Naziris, N., Pippa, N., & Demetzos, C. (2018). The significance of drug-to-lipid ratio to the development of optimized liposomal formulation. *Journal of Liposome Research*, 28(3), 249–258. <https://doi.org/10.1080/08982104.2017.1343836>

Christian Isalomboto Nkanga, Alain Murhimalika Bapolisi, N. I. O. and R. W. M. K. (2019). *General Perception of Liposomes: Formation, Manufacturing and Applications. Liposomes Advaced and Perspective.*

Clarke, S. P., & Sc, B. (2013). *Development of Hierarchical Magnetic Nanocomposite Materials for Biomedical Applications Thesis submitted for the Degree of Doctor of Philosophy.*

Coluccini, C., Ng, Y. M., Reyes, Y. I. A., Chen, H. Y. T., & Khung, Y. L. (2020). Functionalization of Polyethyleneimine with Hollow Cyclotrimeratrylene and Its Subsequent Supramolecular Interaction with Doxorubicin. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(22), 7–10. <https://doi.org/10.3390/molecules25225455>

Cruz, L. J., Tacken, P. J., Rueda, F., Domingo, J. C., Albericio, F., & Figdor, C. G. (2012). *Targeting Nanoparticles to Dendritic Cells for Immunotherapy. Nanomedicine* (1st ed., Vol. 509). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391858-1.00008-3>

Daeihamed, M., Haeri, A., & Dadashzadeh, S. (2015). A simple and sensitive HPLC method for fluorescence quantitation of doxorubicin in micro-volume plasma: Applications to pharmacokinetic studies in rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 14(December), 33–42.

Daemen, T., Hofstede, G., Ten Kate, M. T., Bakker-Woudenberg, I. A. J. M., & Scherphof, G. L. (1995). Liposomal doxorubicin-induced toxicity: Depletion and impairment of phagocytic activity of liver macrophages. *International Journal of Cancer*, 61(5), 716–721. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910610520>

Damari, S. P. (2014). *Liposome Size Distribution and Morphology Analysis by Cryogenic Transmission Electron Microscopy.*

Dang, Y., & Guan, J. (2020). Smart Materials in Medicine Nanoparticle-based drug

- delivery systems for cancer therapy. *Smart Materials in Medicine*, 1(February), 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.smaim.2020.04.001>
- Das, S., Samanta, A., Mondal, S., Roy, D., & Nayak, A. K. (2021). Design and release kinetics of liposomes containing abiraterone acetate for treatment of prostate cancer. *Sensors International*, 2(September 2020), 100077. <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2020.100077>
- Date, A. A., & Nagarsenker, M. S. (2008). Design and Evaluation of Microemulsions for Improved Parenteral Delivery of Propofol, 9(1), 138–145. <https://doi.org/10.1208/s12249-007-9023-7>
- De, A. K., Chowdhury, P. P., & Chattapadhyay, S. (2016). Simultaneous Quantification of Dexpanthenol and Resorcinol from Hair Care Formulation Using Liquid Chromatography: Method Development and Validation. *Scientifica*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1537952>
- De Angelis, A., Urbanek, K., Cappetta, D., Piegari, E., Ciuffreda, L. P., Rivellino, A., ... Berrino, L. (2016). Doxorubicin cardiotoxicity and target cells: a broader perspective. *Cardio-Oncology*, 2(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40959-016-0012-4>
- Demetzos, C., Tzani, A., Naziris, N., Pippa, N., & Pispas, S. (2017). Innovative drug nanocarriers by incorporating thermoresponsive polymer in phospholipid bilayers. *Global Drugs and Therapeutics*, 2(6), 1–5. <https://doi.org/10.15761/gdt.1000133>
- Dillon, E. H. (n.d.). Portal Venous and Segmental Anatomy of the Right Hemiliver : Spiral CT Renderings.
- Dorrani, M., Garbuzenko, O. B., Minko, T., & Michniak-kohn, B. (2016). Development of edge-activated liposomes for siRNA delivery to human basal epidermis for melanoma therapy. *Journal of Controlled Release*, 228, 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.03.010>
- Dua, J. . (2012). Review Article LIPOSOME : METHODS OF PREPARATION AND APPLICATIONS. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*, 3(2), 14–20.

- Dumindika, A. (2021). *Exploring an Electroanalytical Method to Determine Drug Release from Liposomal Doxorubicin HCl*.
- Einfal, T., Planinšek, O., & Hrovat, K. (2013). Methods of amorphization and investigation of the amorphous state. *Acta Pharmaceutica*, 63(3), 305–334. <https://doi.org/10.2478/acph-2013-0026>
- Fahmy, T. M., Fong, P. M., Goyal, A., & Saltzman, W. M. (2005). Targeted for drug delivery. *Materials Today*, 8(8), 18–26. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(05\)71033-6](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(05)71033-6)
- Fan, S. T., Lo, C. M., Liu, C. L., Lam, C. M., Yuen, W. K., Yeung, C., & Wong, J. (1999). Hepatectomy for hepatocellular carcinoma: Toward zero hospital deaths. *Annals of Surgery*, 229(3), 322–330. <https://doi.org/10.1097/00000658-199903000-00004>
- Fazel, M., Daeihamed, M., Osouli, M., Almasi, A., Haeri, A., & Dadashzadeh, S. (2018). Preparation, in-vitro characterization and pharmacokinetic evaluation of brij decorated doxorubicin liposomes as a potential nanocarrier for cancer therapy. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 17(Special Issue 2), 33–43. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2018.2373>
- FDA. (1997). *FDA guidance for industry. Dissolution Technologies* (Vol. 4). <https://doi.org/10.14227/DT040497P15>
- Fong, C. (2021). Caco-2 : Predicting drug permeability and relationship with COVID-19 infected Caco-2 cells To cite this version : HAL Id : hal-03147823.
- Food and Drug Administration (FDA). (2018). *Draft Guidance on Doxorubicin Hydrochloride. Draft Guidance on Doxorubicin Hydrochloride* (Vol. 1). Retrieved from <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM199635.pdf>
- Forner, A., Reig, M. E., Rodriguez De Lope, C., & Bruix, J. (2010). Current strategy for staging and treatment: The BCLC update and future prospects. *Seminars in Liver Disease*, 30(1), 61–74. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1247133>
- Francis, Y. Yao, Robert K., Kerlan Jr, Ryutaro Hirose, Timothy J. Davern, N. M. B.

- (2008). Excellent Outcome Following Down-Staging of Hepatocellular Carcinoma Prior to Liver Transplantation: An Intention-to-Treat Analysis. *Gerontology*, 61(6), 515–525. <https://doi.org/10.1002/hep.22412>.Excellent
- Francisco, S., & Francisco, S. (1979). PREPARATION OF LIPOSOMES OF DEFINED SIZE DISTRIBUTION BY EXTRUSION THROUGH POLYCARBONATE MEMBRANES Summary Liposomes of defined size and homogeneity have been prepared by sequential extrusion of the usual multilamellar vesicles through polycarbonate mem- , 557.
- Franz, S., & Selmin, F. (2018). Lyophilization of Liposomal Formulations : Still Necessary , Still Challenging. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030139>
- Fritze, A., Hens, F., Kimpf, A., Schubert, R., & Peschka-süss, R. (2006). Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate gradient, 1758, 1633–1640. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.05.028>
- Fungizone, A. B. F., Clemons, K. V, Stevens, D. A., Clemons, K. V, & Stevens, D. A. (2004). Comparative Efficacies of Four Amphotec (Amphocil), AmBisome , and Abelcet — against Systemic Murine Aspergillosis Comparative Efficacies of Four Amphotericin B Formulations — Fungizone , Amphotec (Amphocil), AmBisome , and Abelcet — against Systemic. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.3.1047>
- Gabizon, A. A., Lyass, O., Berry, G. J., & Wildgust, M. (2004). Cardiac safety of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil®/Caelyx®) demonstrated by endomyocardial biopsy in patients with advanced malignancies. *Cancer Investigation*, 22(5), 663–669. <https://doi.org/10.1081/CNV-200032899>
- Gabizon, A., Goren, D., Horowitz, A. T., & Tzemach, D. (1997). Long-circulating liposomes for drug delivery in cancer therapy : a review of biodistribution studies in tumor-bearing animals, 24, 337–344.
- Gameiro, M., Silva, R., Rocha-Pereira, C., Carmo, H., Carvalho, F., Bastos, M. D. L., & Remião, F. (2017). Cellular models and in vitro assays for the screening of modulators of P-gp, MRP1 and BCRP. *Molecules*, 22(4), 4–6. <https://doi.org/10.3390/molecules22040600>
- Gandini, Sara , Botter, Edoardo, Iodice, Simona, Boniol, M. (2007). Tobacco smoking

- and cancer: A meta-analysis - Gandini - 2008 - International Journal of Cancer - Wil.pdf, 155–164. <https://doi.org/10.1002/ijc.23033>
- Gao, C., Fang, L., Zhao, H. C., Li, J. T., & Yao, S. K. (2013). Potential role of diabetes mellitus in the progression of cirrhosis to hepatocellular carcinoma: A cross-sectional case-control study from Chinese patients with HBV infection. *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International*, 12(4), 385–393. [https://doi.org/10.1016/S1499-3872\(13\)60060-0](https://doi.org/10.1016/S1499-3872(13)60060-0)
- García-Pinel, B., Porras-Alcalá, C., Ortega-Rodríguez, A., Sarabia, F., Prados, J., Melguizo, C., & López-Romero, J. M. (2019). Lipid-based nanoparticles: Application and recent advances in cancer treatment. *Nanomaterials*, 9(4), 1–23. <https://doi.org/10.3390/nano9040638>
- Garjani, A. (2016). Pharmaceutical sciences. *Pharmaceutical Sciences*, 22(1), 1. <https://doi.org/10.15171/PS.2016.01>
- Ge, P. L., Du, S. Da, & Mao, Y. L. (2014). Advances in preoperative assessment of liver function. *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International*, 13(4), 361–370. [https://doi.org/10.1016/S1499-3872\(14\)60267-8](https://doi.org/10.1016/S1499-3872(14)60267-8)
- Gim, S., Ong, M., Chitneni, M., Lee, K. S., & Ming, L. C. (2016). Evaluation of Extrusion Technique for Nanosizing Liposomes. *Pharmaceutics*, 8(36), 1–12. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8040036>
- Glück, R., & Metcalfe, I. C. (2002). New technology platforms in the development of vaccines for the future, 20, 10–16.
- Gregoriadis, G. (1991). Overview of liposomes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 28(SUPPL. B), 39–48. https://doi.org/10.1093/jac/28.suppl_b.39
- Gregoriadis, G., & Florence, A. T. (1993). Liposomes in Drug Delivery. *Drugs*, 45(1), 15–28. <https://doi.org/10.2165/00003495-199345010-00003>
- Gregory Gregoriadis, C. D. (1979). IN VITRO IS PROMOTED BY THEIR CHOLESTEROL CONTENT AND THE PRESENCE OF BLOOD CELLS. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS*, 89(4), 1287–1293.
- Grit, M., & Crommelin, D. J. A. (1993). Chemical-stability-of-liposomes-

implications-for-their-physical-stability_1993_Chemistry-and-Physics-of-Lipids. *Chemistry and Physics of Lipids*, 64, 3–18.

Guoliang, L., Wangi, M., & Li, H. H. (2021). Doxorubicin-Loaded Tumor-Targeting Peptide-Decorated Polypeptide Nanoparticles for Treating Primary Orthotopic Colon Cancer. *Targeted Treatment for Colon Cancer*. <https://doi.org/doi.org/10.3389/fphar.2021.744811>

Guoqin, N., Brian, C., & Jeffrey, H. (2010). Preparation and Characterization of Doxorubicin Liposomes.

Gupta, V., Bhavanasi, S., Quadir, M., Singh, K., Ghosh, G., Vasamreddy, K., ... Banerjee, S. K. (2019). Protein PEGylation for cancer therapy: bench to bedside. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 13(3), 319–330. <https://doi.org/10.1007/s12079-018-0492-0>

Haghiralsadat, F., Amoabediny, G., Helder, M. N., Sheikhha, M. H., Forouzanfar, T., & Zandieh-doulabi, B. (2017). A comprehensive mathematical model of drug release kinetics from nano-liposomes , derived from optimization studies of cationic PEGylated liposomal doxorubicin formulations for drug-gene delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 0(0), 000. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1304403>

Han, J., Zhang, J., Zhao, H., Li, Y., & Chen, Z. (2016). Simultaneous determination of doxorubicin and its dipeptide prodrug in mice plasma by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(3), 199–202. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.12.005>

Harashima, H., Ochi, Y., & Kiwada, H. (1994). Kinetic modelling of liposome degradation in serum: Effect of size and concentration of liposomes in vitro. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 15(3), 217–225. <https://doi.org/10.1002/bdd.2510150304>

Has, C., & Sunthar, P. (2020). A comprehensive review on recent preparation techniques of liposomes A comprehensive review on recent preparation techniques of liposomes. *Journal of Liposome Research*, 30(4), 336–365. <https://doi.org/10.1080/08982104.2019.1668010>

Hauser, H., & Gains, N. (1982). Spontaneous vesiculation of phospholipids : A simple

- and quick method of forming unilamellar vesicles, 79(March), 1683–1687.
<https://doi.org/10.1073/pnas.79.6.1683>
- He, L., Tian, D., Li, P., & He, X. (2015). Mouse models of liver cancer : Progress and recommendations, 6(27).
- Hiremath, R., Gowda, D. V., Raj, A., Shamant, B. S., Srivastava, A., & Moin, A. (2016). Proliposomes: A novel approach to carrier drug delivery system. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(2), 348–354.
- Hope, M. J. (1991). pH gradients and membrane transport in liposomal systems, 9(August), 268–272.
- Hosaka, Tetsuya, Suzuki, Fumitaka, Kobayashi, M. (2013). Hepatology - 2012 - Hosaka - Long-term entecavir treatment reduces hepatocellular carcinoma incidence in patients with.pdf. *Hepatology*, 58.
<https://doi.org/10.1002/hep.26180>
- Hua, S., & Wu, S. Y. (2013). The use of lipid-based nanocarriers for targeted pain therapies, 4(November), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00143>
- Humboldt Universitat zu Berlin. (2009). *Investigation of polymers with differential scanning calorimetry. Advanced Lab: DSC Investigation of Polymers.*
- Iavarone, M., Cabibbo, G., Piscaglia, F., & Zavaglia, C. (2011). Field-practice study of sorafenib therapy for hepatocellular carcinoma A prospective.pdf. *Hepatology*, 2055–2063.
- Ibrahim, M. M. A., Sammour, O. A., Hammad, M. A., & Megrab, N. A. (2008). In vitro evaluation of proniosomes as a drug carrier for flurbiprofen. *AAPS PharmSciTech*, 9(3), 782–790. <https://doi.org/10.1208/s12249-008-9114-0>
- ICH. (1995). International Conference on Harmonisation. *NOTE FOR GUIDANCE ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00861-7>
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (1994). *Hepatitis Viruses*.
- International Conference on Harmonization, I. (2019). *M10 Bioanalytical Method Validation*.

- Ishizawa, T., Hasegawa, K., Aoki, T., Takahashi, M., Inoue, Y., Sano, K., ... Makuuchi, M. (2008). Neither Multiple Tumors Nor Portal Hypertension Are Surgical Contraindications for Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, 134(7), 1908–1916. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.02.091>
- Jabra, A., Hamad, I., Abdo, R. W., Qadumii, L., Jaber, A. Y., Salim, H., & Alkelany, S. Z. (2019). *Applications of Metal Nanoparticles*. *Biomaterials and Bionanotechnology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814427-5.00015-9>
- Jain, A., & Jain, S. K. (2016). In vitro release kinetics model fitting of liposomes: An insight. *Chemistry and Physics of Lipids*, 201, 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2016.10.005>
- Janga, K. Y., Jukanti, R., Velpula, A., Sunkavalli, S., Bandari, S., Kandadi, P., & Veerareddy, P. R. (2012). Bioavailability enhancement of zaleplon via proliposomes: Role of surface charge. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80(2), 347–357. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.10.010>
- Jiang, H., Li, Z.-P., Tian, G.-X., Pan, Wu, R.-Y., Xu, C.-M., Zhang, B., & Wu, J. (2019). Liver-targeted liposomes for codelivery of curcumin and combretastatin A4 phosphate: preparation, characterization, and antitumor effects. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 1789–1804.
- Jiang, W., Lionberger, R., & Yu, L. X. (2011). In vitro and in vivo characterizations of PEGylated liposomal doxorubicin. *Bioanalysis*, 3(3), 333–344. <https://doi.org/10.4155/bio.10.204>
- Johnston, M. J. W., Edwards, K., Karlsson, G., & Cullis, P. R. (2008). Influence of drug-to-lipid ratio on drug release properties and liposome integrity in liposomal doxorubicin formulations. *Journal of Liposome Research*, 18(2), 145–157. <https://doi.org/10.1080/08982100802129372>
- Jordan, A., Whymark, K. D., Sydenham, J., & Sneddon, H. F. (2021). A solvent-reagent selection guide for Steglich-type esterification of carboxylic acids. *Green Chemistry*, 23(17), 6405–6413. <https://doi.org/10.1039/d1gc02251b>
- Jos, D., Carvalho, C., Leite, G. W., & Pulcinelli, S. H. (2021). Zeta Potential and Colloidal Stability Predictions for Inorganic Nanoparticle Dispersions: Effects

- of Experimental Conditions and Electrokinetic Models on the Interpretation of Results. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c02056>
- Juan C. Stockert, Richard W. Horobin, Lucas L. Colombo, A. B.-C. (2018). [Http://eprints.Gla.Ac.Uk/158899/](http://eprints.gla.ac.uk/158899/). *Acta Histochemica*, 120(April), 159–167.
- Kalra, A., Yetiskul, E., & Wehrle, C. (2022). Physiology , Liver Organ Systems Involved. *NCBI Bookshelf*, 1–6.
- Kanášová, M., & Nesměrák, K. (2017). Systematic review of liposomes' characterization methods. *Monatshefte Fur Chemie*, 148(9), 1581–1593. <https://doi.org/10.1007/s00706-017-1994-9>
- Kaneshina, S., Ichimori, H., Hata, T., & Matsuki, H. (1998). Barotropic phase transitions of dioleoylphosphatidylcholine and stearyl-oleoylphosphatidylcholine bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1374(1–2), 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(98\)00122-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(98)00122-9)
- Karthikeyan K, Saravanan R., Rajeswari R., C. P. K. (2009). Validation of Single Isocratic HPLC Method for the Assay of Valdecixib and Determination of Metaisomer Impurity. *Journal of Chromatographic Science*, 47, 309–314.
- Katare, O. P., Vyas, S. P., & Dixit, V. K. (1991). Proliposomes of indomethacin for oral administration. *Journal of Microencapsulation*, 8(1), 1–7. <https://doi.org/10.3109/02652049109021852>
- Kawamoto, M., Yamaji, T., Saito, K., Shirasago, Y., Satomura, K., Endo, T., ... Osada, N. (2020). Identification of Characteristic Genomic Markers in Human Hepatoma HuH-7 and Huh7.5.1-8 Cell Lines. *Frontiers in Genetics*, 11(October), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.546106>
- Khan, Ibrahim, Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908–931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
- Khan, Iftikhar, Elhissi, A., Shah, M., Alhnan, M. A., & Ahmed, W. (2013). Liposome-based carrier systems and devices used for pulmonary drug delivery. *Biomaterials and Medical Tribology: Research and Development*, (May 2020), 395–443.

<https://doi.org/10.1533/9780857092205.395>

- Khan, O., & Chaudary, N. (2020). The Use of Amikacin Liposome Inhalation Suspension (Arikayce) in the Treatment of Refractory Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease in Adults, 2287–2294.
- Koleini, N., Nickel, B. E., Edel, A. L., Fandrich, R. R., Ravandi, A., & Kardami, E. (2019). Oxidized phospholipids in Doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 303(January), 35–39. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.01.032>
- Kotsifa, E., Vergadis, C., Vailas, M., Machairas, N., Kykalos, S., Damaskos, C., ... Schizas, D. (2022). Transarterial Chemoembolization for Hepatocellular Carcinoma : Why , When , How ?
- Kulkarni, S. B. (1995). Study of liposomal drug delivery systems . Encapsulation efficiencies of some steroids in MLV liposomes, (Mlv).
- Kulkarni, S. B., Betageri, G. V., & Singh, M. (1995). Factors affecting microencapsulation of drugs in liposomes. *Journal of Microencapsulation*, 12(3), 229–246. <https://doi.org/10.3109/02652049509010292>
- Kumar, C. S., Rao, P. R., Sharavanan, P., Beniwal, V. S., Suganya, G., Selvamani, P., & Latha, S. (2009). Formulation development and evaluation of metronidazole magnetic nanosuspension as a magnetic-targeted and polymeric-controlled drug delivery system. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321(10), 1580–1585. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2009.02.089>
- Kumar, K. N., Mallik, S., & Sarkar, K. (2017). Role of freeze-drying in the presence of mannitol on the echogenicity of echogenic liposomes. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 142(6), 3670–3676. <https://doi.org/10.1121/1.5017607>
- Lee, H. S., Morrison, E. D., Zhang, Q., & McCormick, A. V. (2016). Cryogenic transmission electron microscopy study: preparation of vesicular dispersions by quenching microemulsions. *Journal of Microscopy*, 263(3), 293–299. <https://doi.org/10.1111/jmi.12392>
- Lemarchand, C., Gref, R., & Couvreur, P. (2004). Polysaccharide-decorated

nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58, 327–341. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.02.016>

Lencioni, R., Cioni, D., Crocetti, L., Franchini, C., Della Pina, C., Lera, J., & Bartolozzi, C. (2005). Early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: Long-term results of percutaneous image-guided radiofrequency ablation. *Radiology*, 234(3), 961–967. <https://doi.org/10.1148/radiol.2343040350>

Lewandowski, R., Geschwind, Jean, F., Liapi, E., & Salem, R. (2011). Transcatheter intraarterial therapies: Rationale and overview. *Radiology*, 259(3), 641–657. <https://doi.org/10.1148/radiol.11081489>

Li, G. L., Chen, G., Liu, Y. Q., Jing, N. H., & You, J. M. (2012). A sensitive and selective HPLC-FLD method with fluorescent labeling for simultaneous detection of bile acid and free fatty acid in human serum. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 895–896, 191–195. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.03.029>

Li, Xiaocheng, Diao, W., Xue, H., Wu, F., Wang, W., Jiang, B., ... Gao, Z. (2020). Improved efficacy of doxorubicin delivery by a novel dual-ligand-modified liposome in hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*, 489(February), 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.06.017>

Li, Xingong, Hirsh, D. J., Cabral-lilly, D., & Zirkel, A. (1998). Doxorubicin physical state in solution and inside liposomes loaded via a pH gradient, 1415, 23–40.

Li, Z., Tan, S., Li, S., Shen, Q., & Wang, K. (2017). Cancer drug delivery in the nano era: An overview and perspectives (Review), 611–624. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5718>

Llovet, J. M., & Bruix, J. (2003). Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology*, 37(2), 429–442. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50047>

Llovet, J. M., Ducreux, M., Lencioni, R., Di Bisceglie, A. M., Galle, P. R., Dufour, J. F., ... Zhu, A. (2012). EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 56(4), 908–943. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.12.001>

- Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J.-F., ... Bruix, J. (2008). Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 359(4), 378–390. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0708857>
- Llovet, J. M., Schwartz, M., & Fuster, et al. (2006). Expanded criteria for hepatocellular carcinoma through down-staging prior to liver transplantation: Not yet there. *Seminars in Liver Disease*, 26(3), 248–253. <https://doi.org/10.1055/s-2006-947296>
- Longmuir, K. J., Haynes, S. M., Baratta, J. L., Natasha, K., & Robertson, R. T. (2010). NIH Public Access. *Int J Pharm.*, 382(949), 222–233. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.07.030>.Liposomal
- Lu, W. L., Qi, X. R., Zhang, Q., Li, R. Y., Wang, G. L., Zhang, R. J., & Wei, S. L. (2004). A pegylated liposomal platform: Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and toxicity in mice using doxorubicin as a model drug. *Journal of Pharmacological Sciences*, 95(3), 381–389. <https://doi.org/10.1254/jphs.FPJ04001X>
- Lu, Y., Kashida, Y., Kulp, S. K., Wang, Y., Wang, D., Hung, J., ... Chen, C. (2007). Efficacy of a Novel Histone Deacetylase Inhibitor in Murine Models of Hepatocellular Carcinoma, (614). <https://doi.org/10.1002/hep.21804>
- Luu, A. Z., Chowdhury, B., Al-Omran, M., Teoh, H., Hess, D. A., & Verma, S. (2018). Role of Endothelium in Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. *JACC: Basic to Translational Science*, 3(6), 861–870. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2018.06.005>
- Malinchoc, M., Kamath, P. S., Gordon, F. D., Peine, C. J., Rank, J., & Ter Borg, P. C. J. (2000). A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology*, 31(4), 864–871. <https://doi.org/10.1053/he.2000.5852>
- Mancuso, A. (2013). Management of hepatocellular carcinoma: Enlightening the gray zones. *World Journal of Hepatology*, 5(6), 302–310. <https://doi.org/10.4254/wjh.v5.i6.302>
- Mani Sharma, Jyoti Joshi, Neeraj Kumar Chouhan, Mamta N. Talati, S. V. and A. K. (2020). Liposome-A Comprehensive Approach for Researchers. In *Molecular*

- Pharmacology* (p. 13). Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1039/C7RA00172J><https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics><http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.12.014>
- Mansha, M., Khan, I., Ullah, N., & Qurashi, A. (2017). Synthesis, characterization and visible-light-driven photoelectrochemical hydrogen evolution reaction of carbazole-containing conjugated polymers. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(16), 10952–10961. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.02.053>
- Martínez-Edo, G., Fornaguera, C., Borrós, S., & Sánchez-García, D. (2020). Glycyrrhetic acid-functionalized mesoporous silica nanoparticles for the co-delivery of dox/cpt-peg for targeting hepg2 cells. *Pharmaceutics*, 12(11), 1–17. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111048>
- Martinez, M. N., & Amidon, G. L. (2002). A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: A review of fundamentals. *Journal of Clinical Pharmacology*, 42(6), 620–643. <https://doi.org/10.1177/00970002042006005>
- Matejtschuk, P., Duru, C., Malik, K., Ezeajughi, E., Gray, E., Raut, S., & Mawas, F. (2016). Use of Thermogravimetric Analysis for Moisture Determination in Difficult Lyophilized Biological Samples. *American Journal of Analytical Chemistry*, 07(03), 260–265. <https://doi.org/10.4236/ajac.2016.73023>
- Mayer, L. D., Cullis, P. R., & Bally, M. B. (1994). The Use of Transmembrane pH Gradient-Driven Drug Encapsulation in the Pharmacodynamic Evaluation of Liposomal Doxorubicin. *Journal of Liposome Research*, 4(1), 529–553.
- Meindl, C., Stranzinger, S., Dzidic, N., Salar-Behzadi, S., Mohr, S., Zimmer, A., & Fröhlich, E. (2015). Permeation of therapeutic drugs in different formulations across the airway epithelium in vitro. *PLoS ONE*, 10(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135690>
- Melinda, K. Kauffman, Megan, E. K., Hong, Z., Zhenquan, J., Robert, Y., & Li. (2016). HHS Public Access. *React Oxyg Species*, 2(6), 432–439. <https://doi.org/10.20455/ros.2016.873>. Fluorescence-Based
- Muneer, S., Masood, Z., & Ahmad, N. (2017). Proliposomes as Pharmaceutical Drug

- Delivery System: A Brief Review. *J Nanomed Nanotechnol*, 08(03).
<https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000448>
- Muselík, J., Komersová, A., Kubová, K., Matzick, K., & Skalická, B. (2021). A critical overview of FDA and EMA statistical methods to compare in vitro drug dissolution profiles of pharmaceutical products. *Pharmaceutics*, 13(10).
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101703>
- Naganuma, H. (2000). Current Management of Hepatocellular Carcinoma. *Ryōikibetsu Shōkōgun Shirizu*, 10(28 Pt 3), 245–247.
<https://doi.org/10.9783/9781512802900-024>
- Nakabayashi, H., Miyano, K., Sato, J., Yamane, T., & Taketa, K. (1982). Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Research*, 42(9), 3858–3863.
- Nakhaei, P., Margiana, R., Bokov, D. O., Abdelbasset, W. K., Jadidi Kouhbanani, M. A., Varma, R. S., ... Beheshtkhoo, N. (2021). Liposomes: Structure, Biomedical Applications, and Stability Parameters With Emphasis on Cholesterol. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(September), 1–23.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.705886>
- Nalla, P., Bagam, S., Eedara, B. B., & Dhurke, R. (2015). Formulation and evaluation of domperidone oral proliposomal powders. *International Journal of PharmTech Research*, 7(1), 108–118.
- Niu, M., Naguib, Y. W., Aldayel, A. M., Shi, Y. C., Hursting, S. D., Hersh, M. A., & Cui, Z. (2014). Biodistribution and in Vivo activities of tumor-associated macrophage-targeting nanoparticles incorporated with doxorubicin. *Molecular Pharmaceutics*, 11(12), 4425–4436. <https://doi.org/10.1021/mp500565q>
- Noble, G. T., Stefanick, J. F., Ashley, J. D., Kiziltepe, T., & Bilgicer, B. (2014). Ligand-targeted liposome design : challenges and fundamental considerations. *Trends in Biotechnology*, 32(1), 32–45.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.09.007>
- Omer, H. K. (2014). Spray-dried bioadhesive formulations for pulmonary delivery.
- Özkan, A., Stolley, D. L., Cressman, E. N. K., McMillin, M., DeMorrow, S.,

- Yankeelov, T. E., & Rylander, M. N. (2021). Tumor Microenvironment Alters Chemoresistance of Hepatocellular Carcinoma Through CYP3A4 Metabolic Activity. *Frontiers in Oncology*, 11(June), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.662135>
- Pangeni, R., Subedi, L., Jha, S. K., Kweon, S., Kang, S., Chang, K., ... Park, J. W. (2020). Improvements in the Oral Absorption and Anticancer Efficacy of an Oxaliplatin-Loaded Solid Formulation : Pharmacokinetic Properties in Rats and Nonhuman Primates and the Effects of Oral Metronomic Dosing on Colorectal Cancer, 7719–7743.
- Pascale, F., Bedouet, L., Baylatry, M., Namur, J., & Laurent, A. (2015). Comparative chemosensitivity of VX2 and HCC cell lines to drugs used in TACE. *Anticancer Research*, 35(12), 6497–6504.
- Patel, J. D., O'Carra, R., Jones, J., Woodward, J. G., & Mumper, R. J. (2007). Preparation and characterization of nickel nanoparticles for binding to his-tag proteins and antigens. *Pharmaceutical Research*, 24(2), 343–352. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9154-7>
- Patil-Gadhe, A., & Pokharkar, V. (2014). Single step spray drying method to develop proliposomes for inhalation: A systematic study based on quality by design approach. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 27(2), 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2013.07.006>
- Paula, A., Julia, M., Schilrreff, P., Apezteguia, G., Santana, F., Zacchino, S., ... Jose, M. (2016). Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Topical amphotericin B in ultradeformable liposomes : Formulation , skin penetration study , antifungal and antileishmanial activity in vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 139, 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.12.003>
- Payne, N. I., Timmins, P., Ambrose, C. V., Ward, M. D., & Ridgway, F. (1986). Proliposomes: A novel solution to an old problem. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(4), 325–329. <https://doi.org/10.1002/jps.2600750402>
- Peng, L., Guiliang, C., & Jingchen, Z. (2022). A Review of Liposomes as a Drug Delivery System : Current. *Molecules*, 27(1372), 1–23.
- Peng, Y., Zhu, L., Wang, L., Liu, Y., Fang, K., Lan, M., ... Guo, Y. (2019). Preparation

- of nanobubbles modified with a small-molecule CXCR4 antagonist for targeted drug delivery to tumors and enhanced ultrasound molecular imaging. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 9139–9157. <https://doi.org/10.2147/IJN.S210478>
- Peters, G. J., Backus, H. H. J., Freemantle, S., Van Triest, B., Codacci-Pisanelli, G., Van der Wilt, C. L., ... Pinedo, H. M. (2002). Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1587(2–3), 194–205. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(02\)00082-0](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(02)00082-0)
- Pharmacopoeia, E. (2008a). DOXORUBICIN HYDROCHLORIDE, 11(1), 1897–1898.
- Pharmacopoeia, E. (2008b). Solutions: Buffer solutions. *European Pharmacopeia*, 7(3), 489–494.
- Pipicz, M., Demján, V., Sárközy, M., & Csont, T. (2018). Effects of cardiovascular risk factors on cardiac STAT3. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 1–29. <https://doi.org/10.3390/ijms19113572>
- Piver, M. S., Marchetti, D. L., Parthasarathy, K. L., Bakshi, S., & Reese, P. (1985). Doxorubicin hydrochloride (adriamycin) cardiotoxicity evaluated by sequential radionuclide angiocardiology. *Cancer*, 56(1), 76–80. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19850701\)56:1<76::AID-CNCR2820560113>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19850701)56:1<76::AID-CNCR2820560113>3.0.CO;2-S)
- Pleijhuis, R., Crane, L., Oosten, M. Van, & Dam, G. Van. (2014). *Optical Imaging Applications in Cancer Research and Treatment Optical Imaging Applications in Cancer Research and Treatment*.
- Pradesh, A. (2013). a Review on Solid Dispersion, 2(2), 21187–21189.
- Primo, M. (2020). Sustainable technologies for liposome preparation. *The Journal of Supercritical Fluids*, 165, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104984>
- Profile, D. (2008). Extended-release epidural morphine (DepoDur TM): review and safety analysis, 1641–1648.
- Puoti, M., Bruno, R., Soriano, V., Donato, F., Gaeta, G. B., Quinzan, G. P., ...

- Vaccher, E. (2004). Hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients: Epidemiological features, clinical presentation and outcome. *Aids*, 18(17), 2285–2293. <https://doi.org/10.1097/00002030-200411190-00009>
- Qiu, S. L., Xiao, Z. C., Piao, C. M., Xian, Y. L., Jia, L. X., Qi, Y. F., ... Du, J. (2014). AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ protects against liver injury from metastasized tumors via reduced glucose deprivation-induced oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 289(13), 9449–9459. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.543447>
- Quagliariello, V. (2018). *IC50 Liposom.pdf. ONCOLOGY REPORTS*.
- Raoul, Jean Luc, Guyader, D. (1997). Prospective Randomized Trial of Chemoembolization Versus Intra-Arterial Injection of ¹³¹I-Labeled – Iodized Oil in the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, 26(5), 1156–1161.
- Rehman, A. U., Omran, Z., Anton, H., Mély, Y., Akram, S., Vandamme, T., ... Akram, S. (2019). Development of doxorubicin hydrochloride loaded pH-sensitive liposomes : Investigation on the impact of chemical nature of lipids and liposome composition on pH-sensitivity. *Hal Open Science*.
- Riaz, A., Kulik, L., Lewandowski, R. J., Ryu, R. K., Spear, G. G., Mulcahy, M. F., ... Nayar. (2009). Radiologic-pathologic correlation of hepatocellular carcinoma treated with internal radiation using Yttrium-90 microspheres. *Hepatology*, 49(4), 1185–1193. <https://doi.org/10.1002/hep.22747>
- Riaz, M. K., Riaz, M. A., Zhang, X., Lin, C., Wong, K. H., Chen, X., ... Yang, Z. (2018). Surface functionalization and targeting strategies of liposomes in solid tumor therapy: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1). <https://doi.org/10.3390/ijms19010195>
- Robson, A., Dastoor, P. C., Flynn, J., Palmer, W., Martin, A., Smith, D. W., ... Hua, S. (2018). Advantages and Limitations of Current Imaging Techniques for Characterizing Liposome Morphology, 9(February), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00080>
- Roethlisberger, D., Mahler, H., Altenburger, U., & Pappenberger, A. (2016). If Euhydic and Isotonic Do Not Work , What Are Acceptable pH and Osmolality for Parenteral Drug Dosage Forms ? If Euhydic and Isotonic Do Not Work ,

What Are Acceptable pH and Osmolality for Parenteral Drug Dosage Forms ?
Journal of Pharmaceutical Sciences, 106(2), 446–456.
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.09.034>

Rojanarat, W. (2012). *Preparation of Pyrazinamide and Levofloxacin Proliposomes and Feasibility in Tuberculosis Treatments*.

Rojanarat, W., Changsan, N., Tawithong, E., Pinsuwan, S., Chan, H. K., & Srichana, T. (2011). Isoniazid proliposome powders for inhalation-preparation, characterization and cell culture studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(7), 4414–4434. <https://doi.org/10.3390/ijms12074414>

Roy, D., Das, S., & Samanta, A. (2019). Original Article DESIGN AND IN VITRO RELEASE KINETICS OF LIPOSOMAL FORMULATION OF ACYCLOVIR, 11(6), 7–11.

Russell, L. M., Hultz, M., & Searson, P. C. (2019). HHS Public Access, 171–176.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.007>.Leakage

Saadat, M., Mostafaei, F., Mahdinloo, S., & Abdi, M. (2021). Journal of Drug Delivery Science and Technology Drug delivery of pH-Sensitive nanoparticles into the liver cancer cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 63(February), 102557. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102557>

Sangro, B., Carpanese, L., & Cianni, R. (2011). Survival after yttrium-90 resin microsphere radioembolization of hepatocellular carcinoma.

Sarmiento, B., Andrade, F., Da Silva, S. B., Rodrigues, F., Das Neves, J., & Ferreira, D. (2012). Cell-based in vitro models for predicting drug permeability. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 8(5), 607–621.
<https://doi.org/10.1517/17425255.2012.673586>

Scherphof, G. L. (1987). *Scherphof1987_Article_LiposomesInChemo-AndImmunother.pdf*.

Schmelzer, A. E., Vivian, M., & Miller, W. M. (2000). Considerations for Osmolality Measurement Under Elevated pCO₂: Comparison of Vapor Pressure and Freezing Point Osmometry.

Senthilraja, P., & Kathiresan, K. (2015). In vitro cytotoxicity MTT assay in vero,

- HepG2 and MCF-7 cell lines study of marine yeast. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(3), 80–84. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50313>
- Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., & Wu, S. Y. (2015). Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery, (December). <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286>
- Shah, A. K., & Agnihotri, S. A. (2011). Recent advances and novel strategies in pre-clinical formulation development: An overview. *Journal of Controlled Release*, 156(3), 281–296. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.003>
- Shaji, J., & Bhatia, V. (2013). Proliposomes: A brief overview of novel delivery system. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(1), 150–160.
- Shaker, S., Gardouh, A. R., & Ghorab, M. M. (2017). Factors affecting liposomes particle size prepared by ethanol injection method, 12(April), 346–352.
- Sharma, A., & Jain, C. P. (2011). Solid dispersion: A promising technique to enhance solubility of poorly water soluble drug. *International Journal of Drug Delivery*, 1(2), 149–170.
- Sherwood, P. M. A. (2001). Carbons and Graphites: Surface Properties of. *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, 985–995. <https://doi.org/10.1016/b0-08-043152-6/00183-2>
- Sheth, M., Jadhav, D., Jain, H., & Meshram, D. B. (2019). Pre-Liposomes : A novel drug delivery system, 9, 525–528.
- Shew, R. L., & Deamer, D. W. (1985). Hemoglobin and alkaline phosphatase were each encapsulated in phosphatidylcholine liposomes using a dehydration-rehydration cycle for liposome formation . In this method , iiposomes prepared by sonication are mixed in aqueous solution with the solute desi, 816, 1–8.
- Shi, L., Zhang, J., Zhao, M., Tang, S., Cheng, X., Zhang, W., ... Wang, Q. (2021). Effects of polyethylene glycol on the surface of nanoparticles for targeted drug delivery. *Nanoscale*, 13(24), 10748–10764. <https://doi.org/10.1039/d1nr02065j>
- Shyla, B., Mahadevaiah, & Nagendrappa, G. (2011). A simple spectrophotometric method for the determination of phosphate in soil, detergents, water, bone and food samples through the formation of phosphomolybdate complex followed by

- its reduction with thiourea. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78(1), 497–502.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2010.11.017>
- Si-Tayeb, K., Lemaigre, F. P., & Duncan, S. A. (2010). Organogenesis and Development of the Liver. *Developmental Cell*, 18(2), 175–189.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.01.011>
- Singal, A. K., & Anand, B. S. (2007). Mechanisms of synergy between alcohol and hepatitis C virus. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 41(8), 761–772.
<https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e3180381584>
- Singh, D. J. S., Parmar, J. J., Hegde, D. D., Lohade, A. A., Soni, P., Samad, A., & Menon, M. D. (2010). Development and evaluation of dry powder inhalation system of terbutaline sulphate for better management of asthma. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*, 1(2), 133–141.
<https://doi.org/10.5138/ijaps.2010.0976.1055.01015>
- Singh, P., Travers, B., Tatarkiewicz, K., Travers, S., Matyas, G. R., & Beck, Z. (2019). Particle size analyses of polydisperse liposome formulations with a novel multispectral advanced nanoparticle tracking technology, 566(March), 680–686.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.06.013>
- Smithuis, Robin, E. E. de L. (2010). Liver : Segmental Anatomy Segmental anatomy. *Portal*, 1–5.
- Smits, E. A. W., Vromans, H., Pieters, E. H. E., Smits, C. J. P., & Wijs-rot, N. De. (2018). The availability of drug by liposomal drug delivery.
- Soiza, R. L., Donaldson, A. I. C., & Myint, P. K. (2018). Vaccine against arteriosclerosis: an update. *Therapeutic Advances in Vaccines*, 9(6), 259–261.
<https://doi.org/10.1177/https>
- Song, K. H., Chung, S. J., & Shim, C. K. (2005). Enhanced intestinal absorption of salmon calcitonin (sCT) from proliposomes containing bile salts. *Journal of Controlled Release*, 106(3), 298–308.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.05.016>
- Sonje, J. (2019). *Mannitol - A Potential Cryoprotectant In Frozen and Freeze-Dried*

Formulations.

- Sopyan, I., K, I. S., & Gozali, D. (2020). A Review : A Novel of Efforts to Enhance Liposome Stability as Drug Delivery A Review : A Novel of Efforts to Enhance Liposome Stability as Drug Delivery Approach, (June). <https://doi.org/10.31838/srp.2020.6.85>
- Sousa, A. F., Gandini, A., Silvestre, A. J. D., & Neto, C. P. (2009). Determination of the hydroxy and carboxylic acid groups in natural complex mixtures of hydroxy fatty acids by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 63(8), 873–878. <https://doi.org/10.1366/000370209788964557>
- Speciale, A., Muscarà, C., Molonia, M. S., Cristani, M., Cimino, F., & Saija, A. (2022). Recent Advances in Glycyrrhetic Acid-Functionalized Biomaterials for Liver Cancer-Targeting Therapy. *Molecules*, 27(6). <https://doi.org/10.3390/molecules27061775>
- Spratt, T., Bondurant, B., & O'Brien, D. F. (2003). Rapid release of liposomal contents upon photoinitiated destabilization with UV exposure. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1611(1–2), 35–43. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00602-8](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00602-8)
- Srinivasan, B., Shuler, L., & Hickman, J. J. (2015). *TEER measuments in cells. Journal of Laboratory Automation* (Vol. 20). <https://doi.org/10.1177/2211068214561025>
- Stark, B., Pabst, G., & Prassl, R. (2010). Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying : Effects of cryoprotectants on structure. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(3–4), 546–555. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.08.010>
- Stec, D. E., John, K., Trabbic, C. J., Luniwal, A., Hankins, M. W., Baum, J., & Hinds, T. D. (2016). Bilirubin Binding to PPAR α Inhibits Lipid Accumulation. *PLoS ONE*, 11(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153427>
- Steglich, W., & Neises, B. (1978). Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 17(7), 522–524. <https://doi.org/10.1002/anie.197805221>

- Stone, W. L., Mu, S., Smith, M., & Salil, K. D. (n.d.). *Therapeutic Uses of Antioxidant Liposomes* (Vol. 199).
- Šturm, L. (2021). Basic Methods for Preparation of Liposomes and Studying Their Interactions with Different Compounds , with the Emphasis on Polyphenols.
- Subramanian, P. (2021). Lipid-based nanocarrier system for the effective delivery of nutraceuticals. *Molecules*, 26(18). <https://doi.org/10.3390/molecules26185510>
- Sugiki, T., Furuita, K., Fujiwara, T., & Kojima, C. (2018). Current NMR techniques for structure-based drug discovery. *Molecules*, 23(1), 1–27. <https://doi.org/10.3390/molecules23010148>
- Sun, Y., Lu, J., Yan, D., Shen, L., Hu, H., & Chen, D. (2017). Cellular uptake mechanism and clearance kinetics of fluorescence-labeled glycyrrhetic acid and glycyrrhetic acid – modified liposome in hepatocellular carcinoma cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 53(103), 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.05.003>
- Sundar, S. K., & Tirumkudulu, M. S. (2014). Synthesis of Sub-100-nm Liposomes via Hydration in a Packed Bed of Colloidal Particles.
- Szoka, F. (1978). Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation *Biochemistry* :, 75(9), 4194–4198. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.9.4194>
- Tahir, N., Madni, A., Correia, A., Rehman, M., Balasubramanian, V., Khan, M. M., & Santos, H. A. (2019). Lipid-polymer hybrid nanoparticles for controlled delivery of hydrophilic and lipophilic doxorubicin for breast cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 4961–4974. <https://doi.org/10.2147/IJN.S209325>
- Takayasu, K., Arie, S., Ikai, I., Omata, M., Okita, K., Ichida, T., ... Yamaoka, Y. (2006). Prospective Cohort Study of Transarterial Chemoembolization for Unresectable Hepatocellular Carcinoma in 8510 Patients. *Gastroenterology*, 131(2), 461–469. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.05.021>
- Tantari, M., Barra, F., Di Domenico, S., Ferraioli, D., Vellone, V. G., De Cian, F., & Ferrero, S. (2019). Current state of the art and emerging pharmacotherapy for uterine leiomyosarcomas. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 20(6), 713–723.

<https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1571042>

- Tian, G., Pan, R., Zhang, B., Qu, M., Lian, B., & Jiang, H. (2019). Liver-Targeted Combination Therapy Basing on Glycyrrhizic Acid-Modified DSPE-PEG-PEI Nanoparticles for Co-delivery of Doxorubicin and Bcl-2 siRNA, *10*(January), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00004>
- Tian, J., Wang, L., Wang, L., & Ke, X. (2014a). A wogonin-loaded glycyrrhetinic acid-modified liposome for hepatic targeting with anti-tumor effects. *Drug Delivery*, *21*(7), 553–559. <https://doi.org/10.3109/10717544.2013.853850>
- Tian, J., Wang, L., Wang, L., & Ke, X. (2014b). A wogonin-loaded glycyrrhetinic acid-modified liposome for hepatic targeting with anti-tumor effects targeting with anti-tumor effects, *7544*. <https://doi.org/10.3109/10717544.2013.853850>
- Tokudome, Y., Saito, Y., Sato, F., Kikuchi, M., Hinokitani, T., & Goto, K. (2009). Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Preparation and characterization of ceramide-based liposomes with high fusion activity and high membrane fluidity, *73*, 92–96. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.05.002>
- Torres, A., Cilloniz, C., Niederman, M. S., Menéndez, R., Chalmers, J. D., Wunderink, R. G., & van der Poll, T. (2021). Pneumonia. *Nature Reviews Disease Primers*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00259-0>
- Torzilli, G., Makuuchi, M., Inoue, K., Takayama, T., Sakamoto, Y., Sugawara, Y., ... Zucchi, A. (1999). No-mortality liver resection for hepatocellular carcinoma in cirrhotic and noncirrhotic patients: Is there a way? A prospective analysis of our approach. *Archives of Surgery*, *134*(9), 984–992. <https://doi.org/10.1001/archsurg.134.9.984>
- Trevisan, J. E., Cavalcanti, L. P., Oliveira, C. L. P., Torre, L. G. D. La, & Santana, M. H. A. (2011). Technological Aspects of Scalable Processes for the Production of Functional Liposomes for Gene Therapy, (November). <https://doi.org/10.5772/17869>
- Umadevi, S., Sasidharan, K., Nithyapriya, K., & Venkatanarayanan, R. (2012). A review ; Vesicular drug delivery-an novel approach, *2*(8), 833–843.
- Unit, K. (1991). Specific binding of glycyrrhetinic acid to the rat liver membrane,

1066, 77–82.

Upadhyay, P., Trivedi, J., Pundarikakshudu, K., & Sheth, N. (2017). Direct and enhanced delivery of nanoliposomes of anti schizophrenic agent to the brain through nasal route. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(3), 346–358. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.07.003>

USP. (n.d.). Trade Name ® Container R x only. In *5% DEXTROSE Injection* (pp. 1–44).

USP. (2017). Doxorubicin Hydrochloride Injection. Retrieved from www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/iras/doxorubicin_hcl_injection.pdf

USP 785. (2022). USP. *USP*, 31(3), 845–848.

Uster, P. S. (1989). Liposomes as Drug Carriers: Recent Trends and Progress. In *American Pharmaceutical Association* (Vol. 78, p. 693). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1002/jps.2600780819>

van der Schoot, S. C., Nuijen, B., Flesch, F. M., Gore, A., Mirejovsky, D., Lenaz, L., & Beijnen, J. H. (2007). Development of a bladder instillation of the indoloquinone anticancer agent EO-9 using tert-butyl alcohol as lyophilization vehicle. *AAPS PharmSciTech*, 8(3), 1–10. <https://doi.org/10.1208/pt0803061>

Van Winden, E. C. A., & Crommelin, D. J. A. (1997). Long term stability of freeze-dried, lyoprotected doxorubicin liposomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(97\)00058-1](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(97)00058-1)

Vemuri, S., & Rhodes, C. T. (1995). Preparation and characterization of liposomes as therapeutic systems : a review delivery N ,/?, 70, 95–111.

Venturoli, D., & Rippe, B. (2005). Ficoll and dextran vs. globular proteins as probes for testing glomerular permselectivity: Effects of molecular size, shape, charge, and deformability. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 288(4 57-4), 605–613. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00171.2004>

Wang, H., Zheng, M., Gao, J., Wang, J., Zhang, Q., Fawcett, J. P., ... Gu, J. (2020). Uptake and release profiles of PEGylated liposomal doxorubicin nanoparticles: A comprehensive picture based on separate determination of encapsulated and

- total drug concentrations in tissues of tumor-bearing mice. *Talanta*, 208(September 2019), 120358. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120358>
- Wang, W. (2015). Tolerability of hypertonic injectables. *International Journal of Pharmaceutics*, 490(1–2), 308–315. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.05.069>
- Webb, M. S., Harasym, T. O., Masin, D., Bally, M. B., & Mayer, L. D. (1995). Sphingomyelin-cholesterol liposomes significantly enhance the pharmacokinetic and therapeutic properties of vincristine in murine and human tumour models, 904, 896–904.
- Werk, T., Huwyler, J., Hafner, M., Luemkemann, J., & Mahler, H. C. (2015). An Impedance-Based Method to Determine Reconstitution Time for Freeze-Dried Pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(9), 2948–2955. <https://doi.org/10.1002/jps.24443>
- Wong, K. C. (2014). Review of NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry . *Journal of Chemical Education*, 91(8), 1103–1104. <https://doi.org/10.1021/ed500324w>
- Wong, L. L., & Tsai, N. (2007). Updates in the Management of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology & Hepatology Volume*, 7(1), 16–24. <https://doi.org/10.1111/j.1743-7563.2007.00091.x>
- Wong, R. J., Cheung, R., & Ahmed, A. (2014). Nonalcoholic steatohepatitis is the most rapidly growing indication for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the U.S. *Hepatology*, 59(6), 2188–2195. <https://doi.org/10.1002/hep.26986>
- Wu, F., Xue, H., Li, X., Diao, W., Jiang, B., Wang, W., ... Gao, Z. (2020). Enhanced targeted delivery of adenine to hepatocellular carcinoma using glycyrrhetic acid-functionalized nanoparticles in vivo and in vitro. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 131(June), 110682. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110682>
- Xia, F., Jin, H., Zhao, Y., & Guo, X. (2011). Supercritical antisolvent-based technology for preparation of vitamin D 3 proliposome and its characteristics. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 19(6), 1039–1046.

[https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(11\)60089-X](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(11)60089-X)

- Xu, B., Wu, G., Zhang, X., Yan, M., Zhao, R., Xue, N., & Fang, K. (2017). *An Overview of Structurally Modified Glycyrrhetic Acid Derivatives as Antitumor Agents*. *Molecules* (Vol. 22). <https://doi.org/10.3390/molecules22060924>
- Yadav, D., Sandeep, K., Pandey, D., & Dutta, R. K. (2017). Liposomes for Drug Delivery. *Journal of Biotechnology & Biomaterials*, 07(04). <https://doi.org/10.4172/2155-952x.1000276>
- Yamada, Y. (2020). Dimerization of Doxorubicin Causes Its Precipitation. *ACS Omega*, 5(51), 33235–33241. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04925>
- Yang, R., Xu, J., Xu, L., Sun, X., Chen, Q., Zhao, Y., ... Liu, Z. (2018). Cancer Cell Membrane-Coated Adjuvant Nanoparticles with Mannose Modification for Effective Anticancer Vaccination. *ACS Nano*, 12(6), 5121–5129. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b09041>
- Yang, S., Cai, C., Wang, H., Ma, X., Shao, A., Sheng, J., & Yu, C. (2022). Drug delivery strategy in hepatocellular carcinoma therapy. *Cell Communication and Signaling*, 20(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00796-x>
- Yang, T., Cui, F., Choi, M., Lin, H., Chung, S., Kim, D., ... Kim, D. (2008). Liposome Formulation of Paclitaxel with Enhanced Solubility and Stability Liposome Formulation of Paclitaxel with Enhanced, 7544. <https://doi.org/10.1080/10717540601098799>
- Yao, Y., Zhou, Y., & Liu, L. (2020). Nanoparticle-Based Drug Delivery in Cancer Therapy and Its Role in Overcoming Drug Resistance, 7(August), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00193>
- Ye, J., Yang, Y., Dong, W., Gao, Y., Meng, Y., Wang, H., ... Liu, Y. (2019). Drug-free mannosylated liposomes inhibit tumor growth by promoting the polarization of tumor-associated macrophages. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 3203–3220. <https://doi.org/10.2147/IJN.S207589>
- Yuqi, S., Dai, C., Yin, M., Lu, J., Hu, H., & Chen, D. (2018). Hepatocellular carcinoma-targeted effect of configurations and groups of glycyrrhetic acid by evaluation of its derivative-modified liposomes. *International Journal of*

Nanomedicine, 1621–1632.

- Zarychta-wi, W., Burdzinska, A., Zagozdzon, R., Dybowski, B., Butrym, M., Gajewski, Z., & Paczek, L. (2017). In vivo imaging system for explants analysis — A new approach for assessment of cell transplantation effects in large animal models, 1–21.
- Zeng, X. M., Martin, G. P., & Marriott, C. (1995). The controlled delivery of drugs to the lung. *International Journal of Pharmaceutics*, 124(2), 149–164. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(95\)00104-Q](https://doi.org/10.1016/0378-5173(95)00104-Q)
- Zhang, C., Wang, W., Liu, T., Wu, Y., Guo, H., Wang, P., ... Yuan, Z. (2012). Biomaterials Doxorubicin-loaded glycyrrhetic acid-modified alginate nanoparticles for liver tumor chemotherapy. *Biomaterials*, 33(7), 2187–2196. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.045>
- Zhang, G., & Sun, J. (2021). Lipid in chips: A brief review of liposomes formation by microfluidics. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 7391–7416. <https://doi.org/10.2147/IJN.S331639>
- Zhang, J., Leifer, F., Rose, S., Chun, D. Y., Thaisz, J., Herr, T., ... Dick, T. (2018). Amikacin Liposome Inhalation Suspension (ALIS) Penetrates Non-tuberculous Mycobacterial Biofilms and Enhances Amikacin Uptake Into Macrophages, 9(May), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00915>
- Zhang, Q., Fassihi, M. A., & Fassihi, R. (2018). Delivery Considerations of Highly Viscous Polymeric Fluids Mimicking Concentrated Biopharmaceuticals : Assessment of Injectability via Measurement of Total Work Done $BWT^{\wedge}$, (9), 0–8. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-0963-x>
- Zhao, F., Zhao, Y., Liu, Y., Chang, X., & Chen, C. (2011). Cellular Uptake , Intracellular Trafficking , and Cytotoxicity of Nanomaterials, (10), 1322–1337. <https://doi.org/10.1002/sml.201100001>
- Zylberberg, C., Matosevic, S., Zylberberg, C., & Matosevic, S. (2016). Pharmaceutical liposomal drug delivery : a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape Pharmaceutical liposomal drug delivery : a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape, 7544. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1177136>



Ekler

EGE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

SAYI: 2021-009
KONU: Onay

24.02.2021

Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda "KARACİĞER KANSERİ TEDAVİSİNE YÖNELİK GLİSİRRETİNİK ASİT RESEPTÖRLÜ AKTİF HEDEFLENDİRİLMİŞ DOKSORUBİSİN İÇEREN PEGİLE PROLIPOZOM FORMÜLASYONU HAZIRLANMASI VE İN VİTRO-İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ" isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.

Yürütücü: Prof. Dr. Hatice Yeşim KARASULU, E.Ü. Eczacılık Fakültesi
Dr. Öğrecisi Mine DİRİL, E.Ü. Sağlık Bilimleri Enst. Farmasötik Teknoloji AD

Proje başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda 18 adet erkek/dişi CD1 nude fare ve 48 adet wistar albino sıçan kullanılması deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurumunuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU
(E.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı)

Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU

Prof. Dr. Hüseyin TEZEL

Prof. Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN

Dr. Öğr. Üyesi Sumru SÖZER KARADAĞLI

Özcan NALBANTOĞLU

Prof. Dr. Aytül ONAL

Prof. Dr. Figen KIRKPINAR

Prof. Dr. Uğur KAYA

Vet. Hek. F. Emrah SOYLU

Melek Merve AFSAROĞLU

Tezden Yapılan Yayın ve Bildiriler

1. Development and Validation of High Performance Liquid Chromatography Method for Pro-Liposome Formulation Containing Doxorubicin Containing Doxorubicin, Mine Diril¹, H. Yeşim Karasulu², Poster presentation, BBBB2019.
2. Preparation and In Vitro-In Vivo Evaluation of Liver Targeted Proliposomal Systems Containing Doxorubicin, Mine Diril, Oral Presentation, BPSS2021.
3. Preparation and In Vitro-In Vivo Evaluation of Active Targeted Proliposomal Systems For Liver Cancer Containing Doxorubicin, Mine Diril¹, K. Volkan Ozdokur², Yeliz Yıldırım³, H. Yeşim Karasulu¹, Poster presentation, IPTS2022.
4. Karaciğer kanseri tedavisine yönelik doksorubisin içeren pegile glisirretinik asit aktif hedefli prolipozomal formülasyonun hazırlanması, H.Yeşim Karasulu, K. Volkan Özdokur, Mine Diril , Patent başvurusu No: 2020/21009.

Teşekkür

Yüksek lisans ve doktora çalışmalarım boyunca beni her zaman yüreklendiren, değerli tecrübelerini benimle paylaşan, hayatımda danışman hocam olması ötesinde çok büyük bir yer kaplayan; bilime olan inancı, azmi ve kararlılığından öğrendiklerimin yolumdaki en büyük ışık olacağına inandığım tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. H. Yeşim Karasulu'ya,

Yüksek lisans ve doktora çalışmalarım boyunca her zaman ve her konuda desteğini gördüğüm ve başarımlarım konusunda inancımı her zaman hissettiren Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Özgen Özer'e,

Yüksek lisans ve doktora eğitimim sürecinde yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine,

Tezimin yazım ve istatistiksel değerlendirme aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Ecz. Mehmet Ali Ege'ye,

Tez çalışmamın hücre kültürü kısmında laboratuvarının tüm imkanlarını sunun Sayın Prof. Dr. Erdem Göker'e,

Çalışmamın kimyasal sentez kısmını birlikte yürüttüğümüz, tüm süreç boyunca çok değerli bilgi ve katkılarını esirgmeden paylaşan Sayın Doç. Dr. Kemal Volkan Özdokur'a,

Tez çalışmamın in vivo IVIS görüntüleme aşamasındaki emekleri, değerli yönlendirme ve katkılarından dolayı Sayın Doç. Dr. Yeliz Yıldırım'a,

Sitotoksikite çalışmalarında tezime yaptığı değerli katkılarından ve emeğinden dolayı Sayın Prof. Dr. Petek Ballar Kırmızıbayrak'a,

Doktora çalışmalarım sırasında karşılaştığım her türlü problemde her zaman yanımda olup çözüm üreten, manevi destekleri ile ailem olan Dr. Ecz. Gülbeyaz Yıldız Türkyılmaz'a, Uzm. Ecz. Tuğçe Turgay'a, Yük. Kim. Tuğba Keskin'e, Yük. Kim. Leyla Özpolat'a, Yük. Kim Ayça Mehmetoğlu'na ve Kim. Aycan Kavas'a,

Tüm kararlarımda beni destekleyen, fedakarlık ve sevgileri ile hep yanımda olan, her zorlu sürecimi benimle birlikte göğüsleyen; canım anneme, canım babama, ablalarım; Özlem Büyükbaş'a, Merve Başar'a, kardeşim İrem Diril'e, abilerim; Alper Büyükbaş'a ve Koray Başar'a,

Hayatımdaki en büyük manevi destekçilerim, yeğenlerim; Çınar, Öykü, Miralp, Defne ve Derin'e çok teşekkür ederim.

İzmir, 2022

Mine DİRİL

Özgeçmiş

2007 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde lisans eğitimime başladım ve 2012 yılının haziran ayında mezun oldum. 2013 yılı Şubat ayında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. Yüksek lisans tez sürecimde 112S637 no'lu 1001 projesi kapsamında, 3 ay süre boyunca Aristoteles Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda bulundum. 2016 yılı temmuz ayında yüksek lisanstan mezun oldum. 2016 yılı eylül ayında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım. Doktora eğitimim sırasında “Mikro ve Nanoteknolojiler” konusu kapsamında YÖK 100/2000 öncelikli alanlar bursunu almaya hak kazandım. Bu süreçte 5180004 no'lu 1505 projesi kapsamında Sedef İlaç ve Medikal Ürünleri Ltd. Şti'de çalışmaya başladım. Doktora eğitimime halen devam etmekteyim.