

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

**SERM (Selective Estrogen Receptor Modulators) RALOKSİFEN VE TAMOKSİFEN
İÇEREN YENİ İLAÇ ŞEKİLLERİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

DOKTORA TEZİ

N.Başaran MUTLU AĞARDAN

Tez Danışmanı
Prof.Dr. Zelihagül DEĞİM

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 02/20210-39 proje numarası ile, TÜBİTAK tarafından 109S221 proje numarası ile ve Novartis tarafından desteklenmiştir.

ANKARA
Mart 2013

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

**SERM (Selective Estrogen Receptor Modulators) GRUBU RALOKSİFEN VE
TAMOKSİFEN İÇEREN YENİ İLAÇ ŞEKİLLERİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

DOKTORA TEZİ

N.Başaran MUTLU AĞARDAN

Tez Danışmanı
Prof.Dr. Zelihagül DEĞİM

ANKARA
Mart 2013

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Teknoloji Ana Bilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 19/03/2013



Prof.Dr. Nevin ÇELEBİ
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof.Dr. Füsün ACARTÜRK
Gazi Üniversitesi



Prof.Dr. Zelihağöl DEĞİM
Gazi Üniversitesi



Prof.Dr. Asuman BOZKIR
Ankara Üniversitesi



Prof.Dr. İmran VURAL
Hacettepe Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİLER	XVIII
TABLolar	XXXVI
ŞEMALAR	XXXLII
RESİMLER	XLIII
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser Olgusu	4
2.2. Meme Kanseri	7
2.2.1. Meme Kanseri Tipleri	8
2.2.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri	10
2.2.3. Meme Kanseri Yayılım Yolları	11
2.2.4. Meme Kanseri Tanısı	12
2.2.5. Meme Kanseri Tedavisi	13
2.2.6. Selektif Östrojen Reseptör Modölatörleri (SERM)	18
2.2.6.1. Tamoksifen Sitrat	21
2.2.6.1.1. Tamoksifen Yapısı ve Özellikleri	21
2.2.6.1.2.Kullanıldığı Yerler ve Etki Mekanizması	22
2.2.6.1.3. Tamoksifenin Farmakokinetik Özellikleri	24
2.2.6.1.4. Tamoksifen ile İlgili Yapılan Çalışmalar	26
2.2.6.1.5. Tamoksifen İçeren Piyasa Preparatları	28
2.2.6.1.6.Tamoksifenin Yan Etkileri	28
2.2.6.2. Raloksifen Hidroklorür	29
2.2.6.2.1. Raloksifenin Yapısı ve Özellikleri	29

2.2.6.2.2. Raloksifenin Kullanıldığı Yerler ve Etki Mekanizması	30
2.2.6.2.3. Raloksifenin Farmakokinetik Özellikleri	31
2.2.6.2.4. Raloksifen ile İlgili Yapılan Çalışmalar	34
2.2.6.2.5. Raloksifen İçeren Piyasa Preparatları	35
2.2.6.2.6. Raloksifenin Yan Etkileri	35
2.3. Meme Kanserinde Matriks Metalloproteinaz Enzimleri	35
2.4. Kanser Tedavisinde Nanopartiküller	37
2.5. Kanser Tedavisinde Lipozomlar	40
2.6. Kohleatlar	41
2.7. Hücre Kültürleri	42
2.7.1. Hücre Kültür Sistemlerinin Hayvan Deneylerine Üstünlükleri	43
2.7.2. Hücre Kültürü Çalışmalarında Genel Olarak Önemli Olan Noktalar	43
2.7.3. Hücre Kültür Çalışmalarında Ortam Seçimi	44
2.7.4. Kültür Ortamının Fizikokimyasal Özellikleri	45
2.7.5. Hücre Kültür Ortamlarının Bileşenleri	46
2.7.6. Hücre Kültürlerinde Kullanılan Membranlar	48
2.7.7. Caco-2 Hücre Serisinin Özellikleri	49
2.7.8. MCF-7 Hücre Serilerinin Özellikleri	50
2.7.9. MDA-MB-231 Hücre Serilerinin Özellikleri	51
3. GEREÇ VE YONTEM	52
3.1. GEREÇ	52
3.1.1. Etkin Maddeler	52
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	52
3.1.3. Kullanılan Alet ve Malzemeler	52
3.2. YÖNTEM	56

3.2.1. Raloksifen hidroklorür Etkin Maddesi ile Yapılan Çalışmalar	56
3.2.1.1. Raloksifen hidroklorür Etkin Maddesi ile Yapılan İn Vitro Çalışmalar	56
3.2.1.1.1. Raloksifen Hidroklorürün Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi	56
3.2.1.1.1.1. Raloksifen Hidroklorürün HPLC ile Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu	57
3.2.1.1.1.1.1 Doğrusallık	58
3.2.1.1.1.1.2. Doğruluk ve Geri Elde	59
3.2.1.1.1.1.3. Kesinlik	60
3.2.1.1.1.1.4. Özgünlük ve Seçicilik	61
3.2.1.1.1.1.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı	62
3.2.1.1.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Analizi	62
3.2.1.1.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	63
3.2.1.1.3.1. MTT (Sitotoksite) Testleri	63
3.2.1.1.4. Çalışmalarda Kullanılan Raloksifen Formülasyonları	68
3.2.1.1.4.1. Raloksifen İçeren Lipozomların Hazırlanması	69
3.2.1.1.4.2. Raloksifen İçeren Nanopartiküllerin Hazırlanması	71
3.2.1.1.4.3. Raloksifen İçeren Kohleatların Hazırlanması	72
3.2.1.1.4.4. Raloksifen İçeren Lipozom, Nanopartikül ve Kohleatların Karakterizasyonu	73
3.2.1.1.5. İn Vitro Geçiş Çalışmaları	74
3.2.1.1.5.1. Hücre Tek Tabakası İçermeyen Filtrelerden Geçiş Çalışmaları	74
3.2.1.1.5.2. Geçiş Çalışmalarında Kullanılmak Üzere Caco-2 Hücrelerinin Üretilmesi	76
3.2.1.1.5.2.1. Caco-2 Hücrelerinden Geçiş Çalışmaları Geçiş Çalışmaları	76
3.2.1.1.5.2.2. Raloksifen Hidroklorürün Geçirgenlik Katsayısının ($k=P_{app}$) Hesaplanması	78

3.2.1.1.5.2.3. Caco-2 Hücrelerinin Bütünlüklerinin Değerlendirilmesi	78
3.2.1.1.5.3. Diyaliz Membran Geçişleri	79
3.2.1.1.6. MCF-7 ve MDA MB-231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan Antitümoral Aktivite Tayini	81
3.2.1.1.7. MCF-7 ve MDA MB-231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan MMP-2 Enzim İnhibisyonu Çalışmaları	81
3.2.1.2. Raloksifen Hidroklorür ile Yapılan İn Vivo Çalışmalar	82
3.2.1.2.1. Raloksifen Hidroklorür Formülasyonları ile Balb-C tipi Sağlıklı Dişi Farelerle Yapılan İn Vivo Çalışmalar	83
3.2.1.2.1.1.Çalışmalarda Kullanılan Hayvanlar	83
3.2.1.2.1.2. Deneyin Yapılışı	86
3.2.1.2.2. Raloksifen Hidroklorür Formülasyonları ile Sprague Dawley Cinsi Dişi Sıçanlarla Yapılan İn Vivo Çalışmalar	86
3.2.1.2.2.1.Histopatoloji Çalışmaları	90
3.2.1.2.2.2. Histopatolojik Doku Hazırlığı	92
3.2.1.3. Raloksifen hidroklorür Etkin Maddesi ile Yapılan Stabilitate Çalışmaları	93
3.2.1.3.1. Formülasyonlarda Raloksifen Miktar Tayini	93
3.2.1.3.2. Formülasyonların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımları	93
3.2.1.3.3. Formülasyonların Zeta Potansiyelleri	93
3.2.1.3.4. Formülasyonların TEM Görüntüleri	94
3.2.1.4. İn Vitro-İn Vivo Korelasyon Çalışmaları	94
3.2.1.5. Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	94
3.2.2. Tamoksifen Sitrat Etkin Maddesi İle Yapılan Çalışmalar	95
3.2.2.1. Tamoksifen Sitrat Etkin Maddesi İle Yapılan İn Vitro Çalışmalar	95
3.2.2.1.1. Tamoksifen Sitratin Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi	95
3.2.2.1.1.1.Tamoksifen Sitratin HPLC ile Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu	96

3.2.2.1.1.1.1. Doğrusallık	96
3.2.2.1.1.1.2. Doğruluk ve Geri Elde	97
3.2.2.1.1.1.3. Kesinlik	98
3.2.2.1.1.1.4. Özgünlük ve Seçicilik	99
3.2.2.1.1.1.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı	99
3.2.2.1.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Analizi	99
3.2.2.1.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	100
3.2.2.1.3.1. MTT Testi	100
3.2.2.1.4. Çalışmalarda Kullanılan Tamoksifen Formülasyonları	100
3.2.2.1.4.1. Tamoksifen İçeren Lipozomların Hazırlanması	101
3.2.2.1.4.2. Tamoksifen İçeren Nanopartiküllerin Hazırlanması	101
3.2.2.1.4.3. Tamoksifen İçeren Kohleatların Hazırlanması	101
3.2.2.1.4.4. Tamoksifen İçeren Lipozom, Nanopartikül ve Kohleatların Karakterizasyonu	102
3.2.2.1.5. İn Vitro Geçiş Çalışmaları	102
3.2.2.1.6. MCF-7 ve MDA MB-231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan Antitümoral Aktivite Tayini	102
3.2.2.1.7. MCF-7 ve MDA MB-231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan MMP-2 Enzim İnhibisyonu Çalışmaları	103
3.2.2.2. Tamoksifen Sitrat Etkin Maddesi ile Yapılan İn Vivo Çalışmalar	103
3.2.2.2.1. Tamoksifen Sitrat Formülasyonları ve Balb-C tipi Sağlıklı Dişi Farelerle Yapılan İn Vivo Çalışmalar	103
3.2.2.2.2. Tamoksifen Sitrat Formülasyonları ve Sprague Dawley Cinsi Dişi Sıçanlarla Yapılan İn Vivo Çalışmalar	105
3.2.2.3. Tamoksifen Sitrat Etkin Maddesi ile Yapılan Stabilitite Çalışmaları	105
3.2.2.3.1. Formülasyonlarda Tamoksifen Miktar Tayini	106
3.2.2.3.2. Formülasyonların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımları	106
3.2.2.3.3. Formülasyonların Zeta Potansiyelleri	106

3.2.2.3.4. Formülasyonların TEM Görüntüleri	106
3.2.2.4. İn Vitro-İn Vivo Korelasyon Çalışmaları	106
3.2.2.5. Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	107
4. BULGULAR	108
4.1. Raloksifen Hidroklorüre Ait Çalışmalarla İlgili Bulgular	108
4.1.1. Raloksifen Hidroklorür Etkin Maddesi ile Yapılan İn Vitro Çalışmalar	108
4.1.1.1. Raloksifen Hidroklorürün Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesine Ait Bulgular	108
4.1.1.1.1. UV Spektrumuna Ait Bulgular	108
4.1.1.1.2. FT-IR Spektrumuna Ait Bulgular	110
4.1.1.1.3. Raloksifen Hidroklorürün HPLC ile Miktar Tayini Yönteminin Validasyonuna Ait Bulgular	110
4.1.1.1.3.1. Raloksifen Hidroklorürün PG/DMEM (%60/%40) İçinde Validasyonuna Ait Bulgular	110
4.1.1.1.3.1.1. Doğrusallık	111
4.1.1.1.3.1.2. Doğruluk ve Geri Elde	112
4.1.1.1.3.1.3. Kesinlik	113
4.1.1.1.3.1.4. Özgünlük ve Seçicilik	114
4.1.1.1.3.1.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı	115
4.1.1.1.3.2. Raloksifen Hidroklorürün pH 7.4 Fosfat Tamponu İçinde Validasyonuna Ait Bulgular	115
4.1.1.1.3.2.1. Doğrusallık	115
4.1.1.1.3.2.2. Doğruluk ve Geri Elde	116
4.1.1.1.3.2.3. Kesinlik	117
4.1.1.1.3.2.4. Özgünlük ve Seçicilik	118
4.1.1.1.3.2.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı	119
4.1.1.1.3.3. Raloksifen Hidroklorürün Fare Plazması İçinde Validasyonuna Ait Bulgular	119
4.1.1.1.3.3.1. Doğrusallık	119

4.1.1.1.3.3.2. Doğruluk ve Geri Elde	120
4.1.1.1.3.3.3. Kesinlik	121
4.1.1.1.3.3.4. Özgünlük ve Seçicilik	122
4.1.1.1.3.3.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı	123
4.1.1.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizine Ait Bulgular	123
4.1.1.3. MTT Testine Ait Bulgular	126
4.1.1.3.1. Caco-2 Hücreleriyle Yapılan MTT Testine Ait Bulgular	127
4.1.1.3.2. MDA-MB 231 Hücreleriyle Yapılan MTT Testine Ait Bulgular	131
4.1.1.3.3. MCF-7 Hücreleriyle Yapılan MTT Testine Ait Bulgular	134
4.1.1.4. Raloksifen İçeren Formülasyonlara Ait Bulgular	138
4.1.1.4.1. Raloksifen İçeren Lipozomların Karakterizasyonuna Ait Bulgular	138
4.1.1.4.1.1. Lipozomların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular	138
4.1.1.4.1.2. Lipozomların Şekline Ait Bulgular	138
4.1.1.4.1.3. Lipozomların İçine Hapsedilen Raloksifen Hidroklorür Miktar Tayinine Ait Bulgular	140
4.1.1.4.1.4. Lipozomların Zeta Potansiyeli Ölçümlerine Ait Bulgular	140
4.1.1.4.2. Raloksifen İçeren Nanopartiküllerin Karakterizasyonuna Ait Bulgular	140
4.1.1.4.2.1. Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular	140
4.1.1.4.2.2. Nanopartiküllerin Şekline Ait Bulgular	140
4.1.1.4.2.3. Nanopartiküllerin İçine Hapsedilen Raloksifen Hidroklorür Miktar Tayinine Ait Bulgular	142
4.1.1.4.2.4. Nanopartiküllerin Zeta Potansiyeli Ölçümlerine Ait Bulgular	142

4.1.1.4.3. Raloksifen İçeren Kohleatların Karakterizasyonuna Ait Bulgular	142
4.1.1.4.3.1. Kohleatların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular	142
4.1.1.4.3.2. Kohleatların Şekline Ait Bulgular	142
4.1.1.4.3.3. Kohleatların İçine Hapsedilen Raloksifen Hidroklorür Miktar Tayinine Ait Bulgular	144
4.1.1.4.3.4. Kohleatların Zeta Potansiyeli Ölçümlerine Ait Bulgular	144
4.1.1.5. İn Vitro Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular	146
4.1.1.5.1. Hücre Tek Tabakası İçermeyen Filtrelerden Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular	146
4.1.1.5.2. Caco-2 Hücrelerinden Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular	148
4.1.1.5.2.1. Raloksifenin Caco-2 Hücrelerinden Geçirgenlik Katsayısının ($k=P_{app}$) Hesaplanmasına Ait Bulgular	151
4.1.1.5.2.2. Caco-2 Hücrelerinin Bütünlüklerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular	156
4.1.1.5.3. Diyaliz Membran Geçişlerine Ait Bulgular	157
4.1.1.5.3.1. Diyaliz Membran Geçişlerinden Elde Edilen Sonuçların Kinetik Olarak Değerlendirilmesine Ait Bulgular	160
4.1.1.6. MCF-7 ve MDA MB-231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan Antitümoral Aktivite Tayinine Ait Bulgular	164
4.1.1.6.1. MCF-7 Hücreleri Kullanılarak Yapılan Antitümoral Aktivite Tayinine Ait Bulgular	164
4.1.1.6.2. MDA MB-231 Kullanılarak Yapılan Antitümoral Aktivite Tayinine Ait Bulgular	167
4.1.1.7. MCF-7 ve MDA MB-231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan MMP-2 Enzim İnhibisyonu Çalışmalarına Ait Bulgular	169
4.1.1.7.1. MCF-7 Hücreleri Kullanılarak Yapılan MMP-2 Enzim İnhibisyonu Çalışmalarına Ait Bulgular	170
4.1.1.7.2. MDA MB-231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan MMP-2 Enzim İnhibisyonu Çalışmalarına Ait Bulgular	171

4.1.2. Raloksifen Hidroklorür Etkin Maddesi ile Yapılan İn Vivo Çalışmalara Ait Bulgular	172
4.1.2.1. Balb-C tipi Sağlıklı Dişi Farelerle Yapılan İn Vivo Çalışmalara Ait Bulgular	172
4.1.2.2. Sprague Dawley Cinsi Meme Tümörü Oluşturulmuş Dişi Sıçanlarla Yapılan İn Vivo Çalışmalara Ait Bulgular	185
4.1.2.3. Histopatoloji Çalışmalarına Ait Bulgular	186
4.1.3. İn Vitro-İn Vivo Korelasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	189
4.1.4. Stabilitate Çalışmalarına Ait Bulgular	196
4.1.4.1. Formülasyonların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımlarına Ait Bulgular	196
4.1.4.1.1 Raloksifen Dimetil- β -CD Lipozomlarının Partikül Büyüklüğü ve Dağılımlarına Ait Bulgular	196
4.1.4.1.2. Raloksifen Dimetil- β -CD Kohleatlarının Partikül Büyüklüğü ve Dağılımlarına Ait Bulgular	197
4.1.4.2. Formülasyonların Zeta Potansiyelleri Ait Bulgular	198
4.1.4.2.1. Raloksifen Dimetil- β -CD Lipozomlarının Zeta Potansiyel Ölçümlerine Ait Bulgular	198
4.1.4.2.2. Raloksifen Dimetil- β -CD Kohleatlarının Zeta Potansiyel Ölçümlerine Ait Bulgular	199
4.1.4.3. Raloksifenin Formülasyonlar İçindeki Stabilitesine Ait Bulgular	201
4.1.4.3.1. Raloksifenin, Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin Lipozom Formülasyonu İçindeki Stabilitesine Ait Bulgular	201
4.1.4.3.2. Raloksifenin, Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin Kohleat Formülasyonu İçindeki Stabilitesine Ait Bulgular	202
4.1.4.3.3. Raloksifenin, Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin Çözelti Formülasyonu İçindeki Stabilitesine Ait Bulgular	204
4.1.4.4. Formülasyonların TEM Görüntülerine Ait Bulgular	206

4.1.4.4.1. Stabilite Süresi Başlangıcında ve Sonunda Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin Lipozomlarının TEM Mikroskobu Görüntüleri	207
4.1.4.4.2. Stabilite Süresi Başlangıcında ve Sonunda Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin Kohleatlarının TEM Mikroskobu Görüntüleri	208
4.1.4.4.3. Stabilite Süresi Başlangıcında ve Sonunda Etkin Madde İçermeyen Nanopartiküllerinin TEM Mikroskobu Görüntüleri	210
4.1.4.4.4. Stabilite Süresi Başlangıcında ve Sonunda Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin Nanopartiküllerinin TEM Mikroskobu Görüntüleri	212
4.2. Tamoksifen Sitrata Ait Çalışmalarla İlgili Bulgular	214
4.2.1. Tamoksifen Sitrat Etkin Maddesi ile Yapılan İn Vitro Çalışmalar	214
4.2.1.1. Tamoksifen Sitratın Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesine Ait Bulgular	214
4.2.1.1.1. UV Spektrumuna Ait Bulgular	214
4.2.1.1.2. FT-IR Spektrumuna Ait Bulgular	215
4.2.1.1.3. Tamoksifen Sitratın HPLC ile Miktar Tayini Yönteminin Validasyonuna Ait Bulgular	216
4.2.1.1.3.1. Tamoksifen Sitratın PG/DMEM (%60/%40) İçinde Validasyonuna Ait Bulgular	216
4.2.1.1.3.1.1. Doğrusallık	216
4.2.1.1.3.1.2. Doğruluk ve Geri Elde	217
4.2.1.1.3.1.3. Kesinlik	218
4.2.1.1.3.1.4. Özgünlük ve Seçicilik	219
4.2.1.1.3.1.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı	220
4.2.1.1.3.2. Tamoksifen Sitratın pH 7.4 Fosfat Tamponu İçinde Validasyonuna Ait Bulgular	220
4.2.1.1.3.2.1. Doğrusallık	220
4.2.1.1.3.2.2. Doğruluk ve Geri Elde	221

4.2.1.1.3.2.3. Kesinlik	222
4.2.1.1.3.2.4. Özgünlük ve Seçicilik	223
4.2.1.1.3.2.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı	224
4.2.1.1.3.3. Tamoksifen Sitratın Fare Plazması İçinde Validasyonuna Ait Bulgular	224
4.2.1.1.3.3.1. Doğrusallık	224
4.2.1.1.3.3.2. Doğruluk ve Geri Elde	225
4.2.1.1.3.3.3. Kesinlik	226
4.2.1.1.3.3.4. Özgünlük ve Seçicilik	227
4.2.1.1.3.3.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı	228
4.2.1.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizine Ait Bulgular	228
4.2.1.3. MTT Testine Ait Bulgular	231
4.2.1.3.1. Caco-2 Hücreleriyle Yapılan MTT Testine Ait Bulgular	232
4.2.1.3.2.MDA-MB 231 Hücreleriyle Yapılan MTT Testine Ait Bulgular	232
4.2.1.3.3. MCF-7 Hücreleriyle Yapılan MTT Testine Ait Bulgular	232
4.2.1.4. Çalışmalarda Kullanılan Tamoksifen Formülasyonlarına Ait Bulgular	234
4.2.1.4.1. Çalışmalarda Kullanılan Tamoksifen Lipozomlarının Karakterizasyonuna Ait Bulgular	234
4.2.1.4.1.1. Lipozomların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular	234
4.2.1.4.1.2. Lipozomların Şekline Ait Bulgular	234
4.2.1.4.1.3. Lipozomların İçine Hapsedilen Tamoksifen Sitrat Miktar Tayinine Ait Bulgular	236
4.2.1.4.1.4. Lipozomların Zeta Potansiyeli Ölçümlerine Ait Bulgular	236
4.2.1.4.2. Çalışmalarda Kullanılan Tamoksifen Nanopartiküllerinin Karakterizasyonuna Ait Bulgular	236

4.2.1.4.2.1. Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular	236
4.2.1.4.2.2. Nanopartiküllerin İçine Hapsedilen Tamoksifen Sitrat Miktar Tayinine Ait Bulgular	236
4.2.1.4.2.3. Nanopartiküllerin Zeta Potansiyeli Ölçümlerine Ait Bulgular	237
4.2.1.4.3. Çalışmalarda Kullanılan Tamoksifen Kohleatlarının Karakterizasyonuna Ait Bulgular	237
4.2.1.4.3.1. Kohleatların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular	237
4.2.1.4.3.2. Kohleatların Şekline Ait Bulgular	237
4.2.1.4.3.3. Kohleatların İçine Hapsedilen Tamoksifen Sitrat Miktar Tayinine Ait Bulgular	238
4.2.1.4.3.4. Kohleatların Zeta Potansiyeli Ölçümlerine Ait Bulgular	238
4.2.1.5. İn Vitro Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular	240
4.2.1.5.1. Hücre Tek Tabakası İçermeyen Filtrelerden Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular	240
4.2.1.5.2. Tamoksifenin Caco-2 Hücrelerinden Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular	242
4.2.1.5.2.1. Caco-2 Hücrelerinden Geçirgenlik Katsayısının ($k=P_{app}$) Hesaplanmasına Ait Bulgular	245
4.2.1.5.2.2. Caco-2 Hücrelerinin Bütünlüklerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular	250
4.2.1.5.3. Diyaliz Membran Geçişlerine Ait Bulgular	251
4.2.1.5.3.1. Diyaliz Membran Geçişlerinden Elde Edilen Sonuçların Kinetik Olarak Değerlendirilmesine Ait Bulgular	254
4.2.1.6. MCF-7 ve MDA MB-231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan Antitümoral Aktivite Tayinine Ait Bulgular	258
4.2.1.6.1. MCF-7 Hücreleri Kullanılarak Yapılan Antitümoral Aktivite Tayinine Ait Bulgular	258

4.2.1.6.2. MDA MB-231 Kullanılarak Yapılan Antitümoral Aktivite Tayinine Ait Bulgular	261
4.2.1.7. MCF-7 ve MDA MB-231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan MMP-2 Enzim İnhibisyonu Çalışmalarına Ait Bulgular	263
4.2.1.7.1. MCF-7 Hücreleri Kullanılarak Yapılan MMP-2 Enzim İnhibisyonu Çalışmalarına Ait Bulgular	263
4.2.1.7.2. MDA MB-231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan MMP-2 Enzim İnhibisyonu Çalışmalarına Ait Bulgular	264
4.2.2. Tamoksifen Sitrat Etkin Maddesi ile Yapılan İn Vivo Çalışmalara Ait Bulgular	265
4.2.2.1. Balb-C tipi Sağlıklı Dişi Farelerle Yapılan İn Vivo Çalışmalara Ait Bulgular	265
4.2.2.2. Sprague Dawley Cinsi Meme Tümörü Oluşturulmuş Dişi Sıçanlarla Yapılan İn Vivo Çalışmalara	278
4.2.2.3. Histopatoloji Çalışmalarına Ait Bulgular	279
4.2.3. İn Vitro-İn Vivo Korelasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	281
4.2.4. Stabilitate Çalışmalarına Ait Bulgular	287
4.2.4.1. Formülasyonların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımlarına Ait Bulgular	288
4.2.4.1.1 Tamoksifen Dimetil- β -CD Lipozomlarının Partikül Büyüklüğü ve Dağılımlarına Ait Bulgular	288
4.2.4.1.2. Tamoksifen Dimetil- β -CD Kohleatlarının Partikül Büyüklüğü ve Dağılımlarına Ait Bulgular	289
4.2.4.2. Formülasyonların Zeta Potansiyelleri Ait Bulgular	290
4.2.4.2.1. Tamoksifen Dimetil- β -CD Lipozomlarının Zeta Potansiyel Ölçümlerine Ait Bulgular	290
4.2.4.2.2. Tamoksifen Dimetil- β -CD Kohleatlarının Zeta Potansiyel Ölçümlerine Ait Bulgular	291
4.2.4.3. Tamoksifenin Formülasyonlar İçindeki Stabilesine Ait Bulgular	292

4.2.4.3.1. Tamoksifenin, Tamoksifen Dimetil- β -Siklodekstrin Lipozom Formülasyonu İçindeki Stabilitesine Ait Bulgular	292
4.2.4.3.2. Tamoksifenin, Tamoksifen Dimetil- β -Siklodekstrin Kohleat Formülasyonu İçindeki Stabilitesine Ait Bulgular	294
4.2.4.3.3. Tamoksifenin, Tamoksifen Dimetil- β -Siklodekstrin Çözelti Formülasyonu İçindeki Stabilitesine Ait Bulgular	296
4.2.4.4. Formülasyonların TEM Görüntülerine Ait Bulgular	298
4.2.4.4.1. Stabilite Süresi Başlangıcında ve Sonunda Tamoksifen Dimetil- β -Siklodekstrin Lipozomlarının TEM Mikroskobu Görüntüleri	298
4.2.4.4.2. Stabilite Süresi Başlangıcında ve Sonunda Tamoksifen Dimetil- β -Siklodekstrin Kohleatlarının TEM Mikroskobu Görüntüleri	301
5. TARTIŞMA	305
5. 1. In Vitro Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi	305
5.1.1. Analiz Yöntemlerinin Seçimi	305
5.1.1.1. Raloksifen Hidroklorür için Analiz Yönteminin Seçimi	305
5.1.1.2. Tamoksifen Sitrat için Analiz Yönteminin Seçimi	306
5.1.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	307
5.1.3. MTT Testine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	308
5.1.4. İn vitro ve İn vivo Çalışmalarda Kullanılan Formülasyonların Lipozomların Karakterizasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi	313
5.1.4.1. İn vitro ve İn vivo Çalışmalarda Kullanılan Lipozomların Karakterizasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi	313
5.1.4.2. İn vitro ve İn vivo Çalışmalarda Kullanılan Nanopartiküllerin Karakterizasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi	314
5.1.4.3. İn vitro ve İn vivo Çalışmalarda Kullanılan Kohleatların Karakterizasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi	316

5.1.5. İn Vitro Geçiş Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	318
5.1.5.1. Hücre Tek Tabakası İçermeyen Filtrelerden Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular	318
5.1.5.2. Caco-2 Hücrelerinden Geçiş Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	320
5.1.5.2.1. Caco-2 Hücrelerinden Geçirgenlik Katsayılarının ($k=P_{app}$) Hesaplanmasına Ait Bulgular	322
5.1.5.2.2. Caco-2 Hücrelerinin Elektriksel Dirençlerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	324
5.1.5.3. Diyaliz Membran Geçişlerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	325
5.1.6. MCF-7 ve MDA MB-231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan Antitümoral Aktivite Tayinine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	327
5.1.6.1. MCF-7 Hücreleri Kullanılarak Yapılan Antitümoral Aktivite Tayinine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	327
5.1.6.2. MDA-MB 231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan Antitümoral Aktivite Tayinine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	328
5.1.7. MCF-7 ve MDA MB-231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan MMP-2 Enzim İnhibisyonu Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	329
5.1.7.1. MCF-7 Hücreleri Kullanılarak Yapılan MMP-2 Enzim İnhibisyonu Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	329
5.1.7.2. MDA-MB 231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan MMP-2 Enzim İnhibisyonu Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	330
5.2. İn Vivo Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi	331
5.2.1. Balb-C tipi Sağlıklı Dişi Farelerle Yapılan İn Vivo Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi	331
5.2.2. Sprague Dawley Cinsi Meme Tümörü Oluşturulmuş Dişi Sıçanlarla Yapılan İn Vivo Çalışmalara Ait Bulgular	333

5.3. İn Vitro-İn Vivo Korelasyon Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	336
5.4. Stabilité Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	337
6. SONUÇ	341
7. ÖZET	346
8. SUMMARY	348
9. KAYNAKLAR	350
10. EKLER	380
10.1 TEŞEKKÜR	382
11. ÖZGEÇMİŞ	384

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa No
1. Kanser hücrelerinin özellikleri	7
2. Kadın meme anatomisinin şematik görüntüsü	8
3. Tümör yayılım yolları	12
4. Aromataz inhibitörlerinin şematik görünümü	15
5. Aromataz inhibitörleri ile tamoksifenin etki mekanizması arasındaki fark	17
6. SERM grubu bileşiklerin östrojen agonist ve antagonist etki mekanizmaları	19
7. Tamoksifenin kimyasal yapısı	21
8. Tamoksifenin metabolizasyonu	24
9. Raloksifen HCl ve 17- β -östradiol'ün kimyasal yapıları	29
10. Vasküler sistemde hücre içine geçiş yolları	39
11. Lipozom ve kohleatların şematik görüntüsü	42
12. MTT reaksiyonunun kimyasal gösterimi	65
13. Franz difüzyon hücresinin şematik görüntüsü	81
14. Raloksifen hidroklorüre ait PG/DMEM (%60/%40) içindeki 200-550 nm arası dalga boyu taraması	110
15. Raloksifen hidroklorüre ait pH 7.4 fosfat tamponu içindeki 200-400 nm arası dalga boyu taraması	110
16. Raloksifen hidroklorüre ait FT-IR spektrumu	111
17. PG/DMEM içerisinde 6.25 μ g/mL'nin raloksifen piki	112
18. Raloksifenin PG/DMEM'li ortamda HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği (n=6)	113
19. Sodyum taurokolat enjeksiyonu ile elde edilen pik	115
20. Dimetil- β -CD enjeksiyonu ile elde edilen pik	115
21. pH 7.4 fosfat tamponu içerisinde 6.25 μ g/mL'nin raloksifen piki	116

22. Raloksifenin pH 7.4 fosfat tamponunda HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği (n=6)	117
23. Sodyum taurokolat enjeksiyonu ile elde edilen pik	119
24. Dimetil-β-CD enjeksiyonu ile elde edilen pik	119
25. Plazmada 12.5 µg/mL derişimde raloksifen piki	120
26. Raloksifenin plazmada HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği (n=6)	121
27. Sodyum taurokolat enjeksiyonu ile elde edilen pik	123
28. Dimetil-β-CD enjeksiyonu ile elde edilen pik	123
29. Raloksifen, PEG 8000 ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı	124
30. Raloksifen, TPP ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı	125
31. Raloksifen, CaCl ₂ ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı	125
32. Raloksifen, Dekstran ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı	125
33. Raloksifen, Dimetil-β-siklodekstrin ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı	126
34. Raloksifen, DOPS ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı	126
35. Raloksifen, DPPC ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı	126
36. Raloksifen, Kitozan ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı	127
37. Raloksifen, Sodyum taurokolat ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı	127
38. Raloksifenin Caco-2 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	128
39. Sodyum taurokolatın Caco-2 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	129

40. Dimetil- β -siklodekstrinin Caco-2 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	129
41. Lipozomların Caco-2 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	130
42. Nanopartiküllerin Caco-2 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	130
43. Kohleatların Caco-2 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	131
44. PG/DMEM (%60/%40)'ın Caco-2 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	131
45. Raloksifenin MDA-MB 231 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	132
46. Sodyum taurokolatın MDA-MB 231 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	132
47. Dimetil- β -siklodekstrinin MDA-MB 231 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	133
48. Lipozomların MDA-MB 231 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	133
49. Nanopartiküllerin MDA-MB 231 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	134
50. Kohleatların MDA-MB 231 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	134
51. PG/DMEM (%60/%40)'ın MDA-MB 231 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	135
52. Raloksifenin MCF-7 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	135
53. Sodyum taurokolatın MCF-7 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	136
54. Dimetil- β -siklodekstrinin MCF-7 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	136

55. Lipozomların MCF-7 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi Sonuçları	137
56. Nanopartiküllerin MCF-7 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	137
57. Kohleatların MDA-MB 231 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	138
58. PG/DMEM (%60/%40)'ın MCF-7 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	138
59. Raloksifen içeren çözeltilerin boş polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik	147
60. Raloksifen içeren lipozomların boş polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik	148
61. Raloksifen içeren nanopartiküllerin boş polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik	148
62. Raloksifen içeren kohleatların boş polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik	149
63. Raloksifen içeren çözeltilerin üzerinde Caco-2 tek tabakası üretilen polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik	150
64. Raloksifen içeren lipozomların üzerinde Caco-2 tek tabakası üretilen polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik	150
65. Raloksifen içeren nanopartiküllerin üzerinde Caco-2 tek tabakası üretilen polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik	151
66. Raloksifen içeren kohleatların üzerinde Caco-2 tek tabakası üretilen polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik	152
67. Raloksifen çözeltisi ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik	152

68. Raloksifen ve dimetil- β -siklodekstrin çözeltisi ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik	153
69. Raloksifen ve sodyum taurokolat çözeltisi ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik	153
70. Raloksifen lipozom ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik	153
71. Raloksifen ve dimetil- β -siklodekstrin içeren lipozomlar ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik	154
72. Raloksifen ve sodyum taurokolat içeren lipozomlar ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik	154
73. Raloksifen nanopartikülleri ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik	154
74. Raloksifen ve dimetil- β -siklodekstrin içeren nanopartiküller ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik	155
75. Raloksifen ve sodyum taurokolat içeren nanopartiküller ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik	155
76. Raloksifen içeren kohleatlar ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik	155
77. Raloksifen ve dimetil- β -siklodekstrin içeren kohleatlar ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik	156

78. Raloksifen ve sodyum taurokolat içeren kohleatlar ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik	156
79. Raloksifen içeren çözeltilerin pH 7.4 fosfat tamponunda $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 'deki geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik	159
80. Raloksifen içeren lipozomların pH 7.4 fosfat tamponunda $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 'deki geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik	159
81. Raloksifen içeren nanopartiküllerin pH 7.4 fosfat tamponunda $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 'deki geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik (n=3)	160
82. Raloksifen içeren kohleatların pH 7.4 fosfat tamponunda $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 'deki geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik	160
83. Raloksifen çözelti formülasyonları ile MCF-7 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları	166
84. Raloksifen lipozom formülasyonları ile MCF-7 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları	166
85. Raloksifen nanopartikül formülasyonları MCF-7 hücre serisinde ile elde edilen antitümöral aktivite sonuçları	167
86. Raloksifen kohleat formülasyonları ile MCF-7 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları	167
87. Raloksifen çözelti formülasyonları ile MDA MB-231 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları	168
88. Raloksifen lipozom formülasyonları ile MDA MB-231 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları	169
89. Raloksifen nanopartikül formülasyonları ile MDA MB-231 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları	169
90. Raloksifen kohleat formülasyonları ile MDA MB-231 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları	170
91. MMP-2 miktar tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu	171
92. Raloksifen çözeltisinin ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	174

93. Raloksifen çözeltisinin oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	174
94. Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin çözeltisinin ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	175
95. Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin çözeltisinin oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	175
96. Raloksifen sodyum tauroklat çözeltisinin ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	176
97. Raloksifen sodyum tauroklat çözeltisinin oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	176
98. Raloksifen lipozomlarının ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	177
99. Raloksifen lipozomlarının oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	177
100. Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin lipozomlarının ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	178
101. Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin lipozomlarının oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	178
102. Raloksifen sodyum taurokolat lipozomlarının ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	179
103. Raloksifen sodyum taurokolat lipozomlarının oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	179

104. Raloksifen nanopartiküllerinin ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	180
105. Raloksifen nanopartiküllerinin oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	180
106. Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin nanopartiküllerinin ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	181
107. Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin nanopartiküllerinin oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	181
108. Raloksifen sodyum taurokolat nanopartiküllerinin ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	182
109. Raloksifen sodyum taurokolat nanopartiküllerinin oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	182
110. Raloksifen kohleatlarının ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	183
111. Raloksifen kohleatlarının oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	183
112. Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin kohleatlarının ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	184
113. Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin kohleatlarının oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	184
114. Raloksifen sodyum taurokolat kohleatlarının ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	185

115. Raloksifen sodyum taurokolat kohleatlarının oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	185
116. 8 hafta süresince oral uygulama yapılan sıçanların ağırlıklarındaki değişim (n=3)	186
117. 8 hafta süresince oral uygulama yapılan sıçanların tümör alanlarındaki değişim (n=3)	187
118. Raloksifen çözeltisi için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	191
119. Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin çözeltisi için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	191
120. Raloksifen Sodyum Taurokolat çözeltisi için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	192
121. Raloksifen lipozom için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	192
122. Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin lipozom için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	193
123. Raloksifen Sodyum Taurokolat lipozom için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	193
124. Raloksifen nanopartikül için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	194
125. Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin nanopartikül için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	194
126. Raloksifen Sodyum Taurokolat nanopartikül için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	195
127. Raloksifen kohleat için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	195
128. Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin kohleat için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	196
129. Raloksifen sodyum taurokolat kohleat için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	196
130. Raloksifen Dimetil- β -CD lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçlarının 6 aylık süre içindeki değişimi	198
131. Raloksifen Dimetil- β -CD kohleatlarına ait partikül büyüklüğü sonuçlarının 6 aylık süre içindeki değişimi	199

132. Raloksifen Dimetil- β -CD lipozomlarına ait zeta potansiyel sonuçlarının 6 aylık süre içindeki değişimi	200
133. Raloksifen Dimetil- β -CD kohleatlarına ait zeta potansiyel sonuçlarının 6 aylık süre içindeki değişimi	201
134. Stabilite çalışmalarında raloksifen ve dimetil- β -siklodekstrin içeren lipozomların içindeki raloksifen miktarının zamana göre değişimi	202
135. Stabilite çalışmalarında raloksifen ve dimetil- β -siklodekstrin içeren kohleatların içindeki raloksifen miktarının zamana göre değişimi	204
136. Stabilite çalışmalarında raloksifen ve dimetil- β -siklodekstrin içeren çözelti içindeki raloksifen miktarının zamana göre değişimi	206
137. Tamoksifen sitrata ait PG/DMEM (%60/%40) içindeki 200-400 nm arası dalga boyu taraması	215
138. Tamoksifen sitrata ait pH 7.4 fosfat tamponu içindeki 200-400 nm arası dalga boyu taraması	216
139. Tamoksifen sitrata ait FT-IR spektrumu	216
140. PG/DMEM içerisinde 6.25 μ g/mL'nin tamoksifen piki	217
141. Tamoksifenin PG/DMEM (%60/%40) içinde HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği (n=6)	218
142. Sodyum taurokolat enjeksiyonu ile elde edilen pik	220
143. Dimetil- β -CD enjeksiyonu ile elde edilen pik	220
144. pH 7.4 fosfat tamponu içerisinde 6.25 μ g/mL'nin tamoksifen piki	221
145. Tamoksifenin pH 7.4 fosfat tamponunda HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği (n=6)	222
146. Sodyum taurokolat enjeksiyonu ile elde edilen pik	224
147. Dimetil- β -CD enjeksiyonu ile elde edilen pik	224
148. Plazmada 6.25 μ g/mL derişimde tamoksifen piki	225

149. Tamoksifenin plazmada HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği (n=6)	226
150. Sodyum taurokolat enjeksiyonu ile elde edilen pik	228
151. Dimetil-β-CD enjeksiyonu ile elde edilen pik	228
152. Tamoksifen, PEG 8000 ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı	229
153. Tamoksifen, TPP ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı	230
154. Tamoksifen, CaCl ₂ ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı	230
155. Tamoksifen, Dekstran ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı	230
156. Tamoksifen, Dimetil-β-siklodekstrin ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı	231
157. Tamoksifen, DOPS ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı	231
158. Tamoksifen, DPPC ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı	231
159. Tamoksifen, Kitozan ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı	232
160. Tamoksifen, Sodyum taurokolat ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı	232
161. Tamoksifenin Caco-2 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi Sonuçları	233
162. Tamoksifenin MDA-MB 231 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları	234
163. Tamoksifenin MCF-7 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi Sonuçları	235
164. Tamoksifen içeren çözeltilerin boş polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik	241

165. Tamoksifen içeren lipozomların boş polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik	242
166. Tamoksifen içeren nanopartiküllerin boş polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik	242
167. Tamoksifen içeren kohleatların boş polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik	243
168. Tamoksifen içeren çözeltilerin üzerinde Caco-2 tek tabakası üretilen polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik	244
169. Tamoksifen içeren lipozomların üzerinde Caco-2 tek tabakası üretilen polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik	244
170. Tamoksifen içeren nanopartiküllerin üzerinde Caco-2 tek tabakası üretilen polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik	245
171. Tamoksifen içeren kohleatların üzerinde Caco-2 tek tabakası üretilen polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik	246
172. Tamoksifen çözeltisi ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik	246
173. Tamoksifen ve dimetil- β -siklodekstrin çözeltisi ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik	247
174. Tamoksifen ve sodyum taurokolat çözeltisi ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik	247
175. Tamoksifen lipozom ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik	247

176. Tamoksifen ve dimetil- β -siklodekstrin içeren lipozomlar ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik	248
177. Tamoksifen ve sodyum taurokolat içeren lipozomlar ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik	248
178. Tamoksifen nanopartikülleri ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik	248
179. Tamoksifen ve dimetil- β -siklodekstrin içeren nanopartiküller ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik	249
180. Tamoksifen ve sodyum taurokolat içeren nanopartiküller ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik	249
181. Tamoksifen içeren kohleatlar ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik	249
182. Tamoksifen ve dimetil- β -siklodekstrin içeren kohleatlar ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik	250
183. Tamoksifen ve sodyum taurokolat içeren kohleatlar ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik	250
184. Tamoksifen içeren çözeltilerin pH 7.4 fosfat tamponunda $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 'deki geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik	253
185. Tamoksifen içeren lipozomların pH 7.4 fosfat tamponunda $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 'deki geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik	253
186. Tamoksifen içeren nanopartiküllerin pH 7.4 fosfat tamponunda $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 'deki geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik	254

187. Tamoksifen içeren kohleatların pH 7.4 fosfat tamponunda 37±0.5°C'deki geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik	254
188. Tamoksifen çözelti formülasyonları ile MCF-7 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları	260
189. Tamoksifen lipozom formülasyonları ile MCF-7 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları	260
190. Tamoksifen nanopartikül formülasyonları ile MCF-7 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları	261
191. Tamoksifen kohleat formülasyonları ile MCF-7 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları	261
192. Tamoksifen çözelti formülasyonları ile MDA MB-231 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları	262
193. Tamoksifen lipozom formülasyonları ile MDA MB-231 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları	263
194. Tamoksifen nanopartikül formülasyonları ile MDA MB-231 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları	263
195. Tamoksifen kohleat formülasyonları ile MDA MB-231 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları	264
196. Tamoksifen çözeltisinin ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	267
197. Tamoksifen çözeltisinin oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	267
198. Tamoksifen Dimetil-β-Siklodekstrin çözeltisinin ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	268
199. Tamoksifen Dimetil-β-Siklodekstrin çözeltisinin oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	268
200. Tamoksifen Sodyum Taurokolat çözeltisinin ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	269

201. Tamoksifen Sodyum Taurokolat çözeltisinin oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	269
202. Tamoksifen lipozomlarının ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	270
203. Tamoksifen lipozomlarının oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	270
204. Tamoksifen Dimetil- β -Siklodekstrin lipozomlarının ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	271
205. Tamoksifen Dimetil- β -Siklodekstrin lipozomlarının oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	271
206. Tamoksifen Sodyum taurokolat lipozomlarının ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	272
207. Tamoksifen Sodyum taurokolat lipozomlarının oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	272
208. Tamoksifen nanopartiküllerinin ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	273
209. Tamoksifen nanopartiküllerinin oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	273
210. Tamoksifen Dimetil- β -Siklodekstrin nanopartiküllerinin ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	274
211. Tamoksifen Dimetil- β -Siklodekstrin nanopartiküllerinin oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	274

212. Tamoksifen Sodyum taurokolat nanopartiküllerinin ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	275
213. Tamoksifen Sodyum taurokolat nanopartiküllerinin oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	275
214. Tamoksifen kohleatlarının ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	276
215. Tamoksifen kohleatlarının oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	276
216. Tamoksifen Dimetil- β -Siklodekstrin kohleatlarının ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	277
217. Tamoksifen Dimetil- β -Siklodekstrin kohleatlarının oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	277
218. Tamoksifen Sodyum taurokolat nanopartiküllerinin ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	278
219. Tamoksifen Sodyum taurokolat nanopartiküllerinin oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği	278
220. 8 hafta süresince oral uygulama yapılan sıçanların ağırlıklarındaki değişim (n=3)	279
221. 8 hafta süresince oral uygulama yapılan sıçanların tümör alanlarındaki değişim (n=3)	280
222. Tamoksifen çözeltisi için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	283
223. Tamoksifen Dimetil- β -Siklodekstrin çözeltisi için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	283
224. Tamoksifen Sodyum Taurokolat çözeltisi için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	284

225. Tamoksifen lipozom için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	284
226. Tamoksifen Dimetil- β -Siklodekstrin lipozom için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	285
227. Tamoksifen Sodyum Taurokolat lipozom için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	285
228. Tamoksifen nanopartikül için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	286
229. Tamoksifen Dimetil- β -Siklodekstrin nanopartikül için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	286
230. Tamoksifen Sodyum Taurokolat nanopartikül için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	287
231. Tamoksifen kohleat için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	287
232. Tamoksifen Dimetil- β -Siklodekstrin kohleat için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	288
233. Tamoksifen sodyum taurokolat kohleat için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	288
234. Tamoksifen Dimetil- β -CD lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçlarının 6 aylık süre içindeki değişimi	290
235. Tamoksifen Dimetil- β -CD kohlaetlerine ait partikül büyüklüğü sonuçlarının 6 aylık süre içindeki değişimi	291
236. Tamoksifen Dimetil- β -CD lipozomlarına ait zeta potansiyel sonuçlarının 6 aylık süre içindeki değişimi	292
237. Tamoksifen Dimetil- β -CD kohlaetlerine ait zeta potansiyel sonuçlarının 6 aylık süre içindeki değişimi	293
238. Stabilité çalışmalarında tamoksifen ve dimetil- β -siklodekstrin içeren lipozomların içindeki tamoksifen miktarının zamana göre değişimi	294
239. Stabilité çalışmalarında tamoksifen ve dimetil- β -siklodekstrin içeren kohleatların içindeki tamoksifen miktarının zamana göre değişimi	296

240. Stabilite çalışmalarında tamoksifen ve dimetil- β -siklodekstrin içeren çözeltiler içindeki tamoksifen miktarının zamana göre değişimi

298

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa No
1. Meme tümörleri histopatolojik sınıflandırılması (WHO)	9
2. Meme kanseri alt tipleri (östrojen reseptör özelliklerine göre)	10
3. Meme kanseri risk faktörleri	11
4. Meme kanseri tedavi yaklaşımları	14
5. Raloksifenin farklı dokulardaki agonistik ve antagonistik etkileri	31
6. Farklı uyaranlara cevap veren polimerlere örnekler	38
7. Raloksifen hidroklorürün HPLC ile miktar tayini koşulları	57
8. Farelere uygulanan raloksifen formülasyonları, uygulama yolları ve deney grupları	84
9. Meme tümörlü sıçanlara oral yolla uygulanan raloksifen formülasyonları	89
10. Tamoksifen sitratın HPLC ile miktar tayini koşulları	95
11. Farelere uygulanan tamoksifen formülasyonları, uygulama yolları ve deney grupları	104
12. Meme tümörlü sıçanlara oral yolla uygulanan tamoksifen formülasyonları	105
13. Raloksifenin PG/DMEM içindeki çözeltisinden geri elde ile hesaplanan miktarları (n=3)	112
14. Raloksifenin PG/DMEM içindeki deney içi kesinlik sonuçları	113
15. Raloksifenin PG/DMEM (%60/%40) içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları	113
16. Raloksifenin pH 7.4 fosfat tamponu içindeki çözeltisinden geri elde ile hesaplanan miktarları (n=3)	116
17. Raloksifenin pH 7.4 fosfat tamponu içindeki deney içi kesinlik sonuçları	117
18. Raloksifenin pH 7.4 fosfat tamponu içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları	117

19. Raloksifenin plazma içindeki çözeltisinden geri elde ile hesaplanan miktarları (n=3)	120
20. Raloksifenin plazma içindeki deney içi kesinlik sonuçları	121
21. Raloksifenin plazma içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları	121
22. Raloksifen içeren formülasyonların karakterizasyon parametreleri	145
23. Raloksifen formülasyonları için hesaplanan permeabilite katsayıları	156
24. Raloksifen formülasyonları ile yapılan hücre geçişlerinden sonra elde edilen TEER değerleri	157
25. Raloksifen çözelti formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, raloksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	160
26. Raloksifen ve dimetil- β -siklodekstrin çözelti formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, raloksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	160
27. Raloksifen ve sodyum taurokolat çözelti formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, raloksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	161
28. Raloksifen lipozom formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, raloksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	161
29. Raloksifen ve dimetil- β -siklodekstrin lipozom formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, raloksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	161
30. Raloksifen ve sodyum taurokolat lipozom formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, raloksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	162
31. Raloksifen nanopartikül formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, raloksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	162

32. Raloksifen ve dimetil- β -siklodekstrin nanopartikül formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, raloksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	162
33. Raloksifen ve sodyum taurokolat nanopartikül formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, raloksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	163
34. Raloksifen kohleat formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, raloksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	163
35. Raloksifen ve dimetil- β -siklodekstrin kohleat formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, raloksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	163
36. Raloksifen ve sodyum taurokolat kohleat formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, raloksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	164
37. Raloksifen formülasyonlarının MCF 7 hücrelerindeki % MMP-2 inhibisyonu değerleri	171
38. Raloksifen formülasyonlarının MDA MB-231 hücrelerindeki % MMP-2 inhibisyonu değerleri	172
39. Raloksifen Dimetil- β -CD lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları	196
40. Raloksifen Dimetil- β -CD kohleatlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları	197
41. Raloksifen Dimetil- β -CD lipozomlarına ait zeta potansiyel sonuçları	199
42. Raloksifen Dimetil- β -CD kohleatlarına ait zeta potansiyel sonuçları	204
43. Raloksifenin dimetil- β -CD içeren lipozom formülasyonu içindeki stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri	202
44. Raloksifenin dimetil- β -CD içeren lipozom formülasyonu içindeki stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri	204

45. Raloksifenin dimetil-β-CD içeren çözelti formülasyonu içindeki stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri	205
46. Tamoksifenin PG/DMEM (%60/%40) içindeki çözeltisinden geri elde ile hesaplanan miktarları (n=3)	217
47. Tamoksifenin PG/DMEM içindeki deney içi kesinlik sonuçları	218
48. Tamoksifenin PG/DMEM (%60/%40) içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları	218
49. Tamoksifenin pH 7.4 fosfat tamponu içindeki çözeltisinden geri elde ile hesaplanan miktarları (n=3)	221
50. Tamoksifenin pH 7.4 fosfat tamponu içindeki deney içi kesinlik sonuçları	222
51. Tamoksifenin pH 7.4 fosfat tamponu içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları	222
52. Tamoksifenin plazma içindeki çözeltisinden geri elde ile hesaplanan miktarları (n=3)	225
53. Raloksifenin plazma içindeki deney içi kesinlik sonuçları	226
54. Tamoksifenin plazma içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları	226
55. Tamoksifen içeren formülasyonların karakterizasyon parametreleri	239
56. Tamoksifen formülasyonları için hesaplanan permeabilite katsayıları	250
57. Tamoksifen formülasyonları ile yapılan hücre geçişlerinden sonra elde edilen TEER değerleri	251
58. Tamoksifen çözelti formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, tamoksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	254
59. Tamoksifen ve dimetil-β-siklodekstrin çözelti formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, tamoksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	254

60. Tamoksifen ve sodyum taurokolat çözelti formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, raloksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	255
61. Tamoksifen lipozom formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, tamoksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	255
62. Tamoksifen ve dimetil- β -siklodekstrin lipozom formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, tamoksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	255
63. Tamoksifen ve sodyum taurokolat lipozom formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, tamoksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	256
64. Tamoksifen nanopartikül formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, tamoksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	256
65. Tamoksifen ve dimetil- β -siklodekstrin nanopartikül formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, tamoksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	256
66. Tamoksifen ve sodyum taurokolat nanopartikül formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, tamoksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	257
67. Tamoksifen kohleat formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, tamoksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	257
68. Tamoksifen ve dimetil- β -siklodekstrin kohleat formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, tamoksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	257
69. Tamoksifen ve sodyum taurokolat kohleat formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, tamoksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	258

70. Tamoksifen formülasyonlarının MCF 7 hücrelerindeki % MMP 2 inhibisyonu değerleri	264
71. Tamoksifen formülasyonlarının MDA-MB 231 hücrelerindeki % MMP 2 inhibisyonu değerleri	265
72. Tamoksifen lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları	288
73. Tamoksifen kohleatlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları	289
74. Tamoksifen lipozomlarına ait zeta potansiyel sonuçları	290
75. Tamoksifen kohleatlarına ait zeta potansiyel sonuçları	291
76. Tamoksifenin dimetil-β-CD içeren lipozom formülasyonu içindeki stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri	294
77. Tamoksifenin dimetil-β-CD içeren kohleat formülasyonu içindeki stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri	296
78. Tamoksifenin dimetil-β-CD içeren çözelti formülasyonu içindeki stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri	297

ŞEMALAR

Şema	Sayfa No
1. Raloksifen lipozomlarının hazırlanışı	70
2. Raloksifen içeren nanopartiküllerin hazırlanışı	71
3. Raloksifen içeren kohleatların hazırlanışı	72
4. MMP-2 enzim inhibisyonu çalışması basamakları	82

RESİMLER

Resim	Sayfa No
1. Caco-2 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görüntüsü	64
2. MCF-7 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görüntüsü	65
3. MDA MB-231 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görüntüsü	65
4. 96 kuyucuklu plakalara formülasyonlar uygulandıktan sonra çekilen fotoğraf	68
5. Hücre geçiş çalışmalarında kullanılan dikey difüzyon hücresi	75
6. Dikey difüzyon hücreleriyle kullanılan polikarbonat membranlar	75
7. Evom Voltmeter® aleti ile TEER ölçümü sırasında çekilen fotoğraf	79
8. Farelere oral yolla formülasyonların uygulanışı	85
9. Farelere intraperitoneal yolla formülasyonların uygulanışı	85
10. Farelerden intrakardiyak olarak kan alınması	86
11. Meme tümörlü sıçanlara oral yolla fomülasyonların uygulanışı	88
12. Sıçanda oluşturulmuş meme tümörü örneği	88
13. Meme tümörü oluşturulmuş bir sıçan	89
14. Tümör ölçümleri sırasında çekilmiş fotoğraf	90
15. Tümörlü sıçanın tümör dokusunun çıkarılması	91
16. 8 haftalık uygulama sonrasında tümör dokusu çıkarılmış bir sıçan	91
17. Patolojiye gönderilen tümör dokuları ve sağlıklı meme dokusu	92
18. MTT testi sonucunda platelerdeki değişim	127
19. Etkin madde içermeyen lipozomların TEM görüntüsü	138

20. Raloksifen ve dimetil-β-CD içeren lipozomların TEM görüntüsü	139
21. Etkin madde içermeyen nanopartiküllerin TEM görüntüsü	141
22. Raloksifen ve dimetil-β-siklodekstrin içeren nanopartiküllerin TEM görüntüsü	141
23. Etkin madde içermeyen kohleatların TEM görüntüsü	143
24. Raloksifen içeren kohleatların TEM görüntüsü	143
25. Raloksifen ve dimetil-β-siklodekstrin içeren kohleatların TEM görüntüsü	144
26. Sağlıklı sıçan meme dokusu görüntüsü (x100)	186
27. Hiçbir ilaç uygulaması yapılamamış meme tümörlü sıçanlardan alınan meme tümörü görüntüsü	187
28. Raloksifen dimetil-β-CD lipozom uygulanan sıçanlardan alınan meme dokusunun görüntüsü (x100)	188
29. Raloksifen dimetil-β-CD lipozom uygulanan sıçanlardan alınan meme dokusunun görüntüsü (x400)	188
30. Raloksifen dimetil-β-CD kohleat uygulanan sıçanlardan alınan meme dokusunun görüntüsü (x100)	189
31. 6 aylık stabilite çalışması süresinin başlangıcında, raloksifen dimetil-β-siklodekstrin lipozomlarının TEM görüntüleri	207
32. 6 aylık stabilite çalışması süresinin sonunda, +4°C'de saklanan raloksifen dimetil-β-siklodekstrin lipozomlarının TEM görüntüleri	207
33. 6 aylık stabilite çalışması süresinin sonunda, +25°C'de saklanan raloksifen dimetil-β-siklodekstrin lipozomlarının TEM görüntüleri	208
34. 6 aylık stabilite çalışması süresinin başlangıcında, raloksifen dimetil-β-siklodekstrin kohleatlarının TEM görüntüleri	209
35. 6 aylık stabilite çalışması süresinin sonunda, +4°C'de saklanan raloksifen dimetil-β-siklodekstrin kohleatlarının TEM görüntüleri	209

36. 6 aylık stabilite çalışması süresinin sonunda, +25°C'de saklanan Raloksifen dimetil-β-siklodekstrin kohleatlarının TEM görüntüleri	210
37. 6 aylık stabilite çalışması süresinin başlangıcında etkin madde içermeyen nanopartiküllerin TEM görüntüleri	210
38. 6 aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +4°C'de saklanan etkin madde içermeyen nanopartiküllerin TEM görüntüleri	211
39. 6 aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +25°C'de saklanan etkin madde içermeyen nanopartiküllerin TEM görüntüleri	211
40. 6 aylık stabilite çalışması süresinin başlangıcında raloksifen dimetil-β-siklodekstrin nanopartiküllerin TEM görüntüleri	212
41. 6 aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +4°C'de saklanan raloksifen dimetil-β-siklodekstrin nanopartiküllerinin TEM görüntüleri	213
42. 6 aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +25°C'de saklanan raloksifen dimetil-β-siklodekstrin nanopartiküllerinin TEM görüntüleri	213
43. Tamoksifen ve dimetil-β-CD içeren lipozomların TEM görüntüleri	235
44. Tamoksifen ve dimetil-β-CD içeren kohleatların TEM görüntüleri	237
45. Tamoksifen dimetil-β-CD çözelti uygulanan sıçanlardan alınan meme dokusunun görüntüleri (x100)	280
46. Tamoksifen dimetil-β-CD lipozom uygulanan sıçanlardan alınan meme dokusunun görüntüsü (x100)	280
47. Tamoksifen dimetil-β-CD kohleat uygulanan sıçanlardan alınan meme dokusunun görüntüsü (x100)	281

48. 6 aylık stabilite çalışması süresinin başlangıcında tamoksifen dimetil- β -siklodekstrin lipozom formülasyonlarının TEM görüntüleri	299
49. 6 aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +4°C'de saklanan, tamoksifen dimetil- β -siklodekstrin lipozom formülasyonlarının TEM görüntüleri	300
50. 6 aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +25°C'de saklanan raloksifen dimetil- β -siklodekstrin lipozom formülasyonlarının TEM görüntüleri	301
51. 6 aylık stabilite çalışması süresinin başlangıcında tamoksifen dimetil- β -siklodekstrin kohleat formülasyonlarının TEM görüntüleri	302
52. 6 aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +4°C'de saklanan tamoksifen dimetil- β -siklodekstrin kohleat formülasyonlarının TEM görüntüleri	303
53. 6 aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +25°C'de saklanan raloksifen dimetil- β -siklodekstrin kohleat formülasyonlarının TEM görüntüleri	304

1. GİRİŞ

Meme kanseri, günümüzde kadınlarda görülme sıklığı en yüksek olan ve kansere bağlı ölümler içinde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada gelen kanser türüdür. Hem menapoz öncesi dönemde hem de menapoz sonrası dönemde ortaya çıkabilmektedir. Bu da hastalığı oldukça büyük bir yaş aralığında görülebilir kılmakta ve pek çok kadını risk altında tutmaktadır.

Meme kanseri tedavisi uzun ve zorlu bir süreçtir. Tedavide cerrahi girişimi takiben kemoterapi ve hormonal terapi en çok izlenen yoldur. Hormonal terapi, östrojen reseptör pozitif (ER+) ve progesteron reseptör pozitif olan meme kanserlerinde oldukça iyi tolere edilen bir tedavidir. Tedavide beklenen etki cerrahi müdahale ile tümörün çıkarılmasının ardından, meydana gelebilecek herhangi bir metastazı engellemek ve ayrıca tedavi süresince mümkün olduğunca az yan etkili uygulamalarla hastanın yaşam kalitesini artırmaktır. Hormonal terapide geçmişten günümüze en çok kullanılan bileşik tamoksifendir. Tamoksifen ve türevleri östrojen reseptörüne yarışmalı olarak bağlanarak östrojenin bağlanmasını engellerler. Tamoksifenin meme tümörleri üzerindeki olumlu etkisine rağmen, uterustaki östrojen reseptörlerine de bağlanarak endometriyum dokusunu uyarması, araştırmacıları yeni bileşikler aramaya itmiştir. Sonuçta, günümüzde Selektif Östrojen Reseptör Modulatorleri (SERM) olarak bilinen yeni bir sınıf bileşik araştırma ve tedavide yerini almıştır.

Raloksifen, kemikler ve kan lipid seviyelerinde, meme dokusu ve uterusu uyarmaksızın östrojen etkilerini taklit eden selektif östrojen reseptör modulatorü (SERM) olarak etki gösteren bir ilaçtır. Tez çalışmamızda kullandığımız iki etkin madde olan, tamoksifen ve raloksifen, ikisi de SERM grubuna dahil olmakla birlikte, iki etkin madde arasındaki

temel fark, raloksifenin östrojen etkilerini taklit ederken endometriumu uyarmamasıdır. Tamoksifen meme tümörleri üzerinde olumlu etkileri açısından östrojen antagonisti şeklinde etkiliyken endometrium üzerinde tıpkı östrojen gibi agonist etkili olmaktadır. Raloksifenin endometrium dokusunu uyarmadığı hem in vitro hem in vivo çalışmalarla kanıtlanmıştır. Ayrıca meme dokusu üzerindeki etkisi ise tamoksifen gibidir, yani meme tümörlerini küçültmekte ve koruyucu özellikte olduğu düşünülmektedir. Overleri alınmış sıçanlarda, tamoksifen östrojen benzeri uyarı oluştururken, raloksifenin bu etkiyi göstermemesi hatta östrojen ve/veya tamoksifene antagonist etki göstermesi önemli bir avantajdır. Raloksifenin klinik kullanımı ve FDA onayı osteoporoz tedavisi ve korunmasında olmakla birlikte, belirtilen avantajları araştırmacıları, meme kanseri tedavisi ve korunmasında kullanımı üzerine çalışmaya itmiştir. Literatürde raloksifenin bu yönde olumlu sonuçlar verdiği görülmektedir. Tamoksifenin belirtilen yan etkileri göz önünde bulundurularak, çalışmamızda tamoksifenle kıyaslanarak raloksifenin kullanılmasına karar verilmiştir.

Tez çalışmamızda raloksifenin belirtilen özellikleri değerlendirilerek, meme tümörleri üzerinde denenmesi yeni ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilerek tedavi etkinliğinin artırılması yönünde in vitro ve in vivo çalışmalar yapılması planlanmıştır. Raloksifenle yapılan çalışmaların tamoksifenle kıyaslanarak yapılmasına, aynı formülasyonların aynı miktar raloksifen veya tamoksifen içermesiyle in vitro ve in vivo olarak elde edilecek farkların değerlendirilmesi düşünülmüştür.

Çalışmamızda, raloksifen ve tamoksifenin lipozom, nanopartikül ve kohleat formülasyonları absorpsiyon artırıcılar kullanarak geliştirilmiştir.

Geliştirilen formülasyonların Caco-2 hücrelerinden geçiş özellikleri çözelti formlarıyla kıyaslanarak araştırılmış, oral yolla kullanılan bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmeye çalışılmıştır.

Geliştirilen formülasyonların meme kanseri hücre serileri olan MCF-7 ve MDA-MB 231 üzerindeki antitümoral aktiviteleri kıyaslamalı olarak incelenmiştir.

Meme kanseri hücrelerinde varlığının arttığı kanıtlanan MMP-2 enzimi üzerine formülasyonlarının etkinliğinin araştırılması amacıyla MCF-7 ve MDA-MB 231 hücre dizilerinde formülasyonların neden olduğu MMP-2 miktarı değişimi incelenmiştir.

Geliştirilen formülasyonların in vivo etkinlikleri Balb/C tipi dişi farelere oral ve intraperitoneal yollarla uygulanarak araştırılmıştır.

İn vitro ve in vivo yönden özellikleri incelenerek seçilen formülasyonlar meme tümörlü Sprague Dawley cinsi dişi sıçanlara uygulanarak tümör üzerindeki etkileri tümör alanını küçültme özellikleri ve histopatolojik incelemeye kanıtlanmıştır.

Seçilen formülasyonların stabilite çalışmaları yapılmıştır.

İn vitro ve in vivo yönünden incelenen formülasyonlar için in vitro/in vivo korelasyon çalışmaları yapılarak kullanılan modellerin başarısı kanıtlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser Olgusu

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nın tanımlamasına göre kanser: Hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve yayılmasıdır. Vücudun herhangi bir bölümünü etkileyebilir. Bu büyüme ve yayılma genellikle doku çevrelerinde ya da metastaz özelliğiyle uzak dokularda izlenebilir. WHO, 2008 yılında Dünya genelinde 7.6 milyon insanın kanserden öldüğünü, ölümlerin %70'inin düşük ve orta gelir düzeyli ülkelerde meydana geldiğini açıklamıştır. İyileşen kanser hastası oranını da %30 olarak belirtmiştir¹.

Canadian Cancer Society'nin 2012 yılı incelemeleri, Kanada'da her gün 500 kişiye kanser teşhisi konduğu ve günde 200 kişinin kanserden öldüğünü ifade etmektedir².

Ülkemizde de kanserli hasta sayısı hem kadınlarda hem de erkeklerde yıllar geçtikçe artmaktadır. Sağlık Bakanlığı 2010 verilerine göre, 2006-2008 yılları arasını kapsayan çalışmada kadınlarda en sık görülen kanser türleri sırasıyla: Meme, tiroid ve kolorektal kanserlerdir. Erkeklerde ise en sık rastlanan kanserler sırasıyla: Akciğer, prostat ve mesane kanserleri olarak açıklanmıştır³.

Kanser terimi, kontrolsüz hücre çoğalması, bu hücrelerin köken aldığı bölgeden (primer bölge), vücuttaki diğer bölgelere sıçrama ve yayılma özelliği ile karakterize edilen bir grup hastalık için kullanılmaktadır. Tanımlanmış 100'den fazla kanser türü bulunmaktadır. Her kanser türü, köken aldığı dokuya göre farklı karakteristik özellik gösterir. Kanserin, %85'i epitel hücrelerde meydana gelir ve karsinoma olarak adlandırılır. Mesoderm hücrelerinden köken alan kansere sarkoma, salgı bezi hücrelerinden köken alan kansere de adenokarsinoma adı verilir. Kanser,

köken aldığı hücre, doku ve organ özelliklerine göre iyi huylu (benign) veya kötü huylu (malign) tümör özellikleri gösterebilir. İyi huylu tümörler metastaz yapmadıklarından dolayı ölümcül değildirler. Kötü huylu tümörler ise invazyon ve metastaz yaparak organizmanın ölümüne sebep olurlar^{4,5}.

Kanser hücrelerini diğer hücrelerden ayıran ve karakterize eden özellikler 6 ana grupta incelenebilir. Bu özelliklerin şematik olarak ifadesi Şekil 1’de görülmektedir^{4,5}.

1) Dışardan gelen (eksternal) çoğalma sinyaline bağımlı olmadan bölünme özelliği kazanmaları

- Normal hücreler, çoğalmak için eksternal sinyallere ihtiyaç duyarlar. Kanser hücreleri bu sinyallere ihtiyaç duymaksızın bölünme potansiyeli kazanırlar. Hücrede çoğalmayı aktive edici yollarda oluşan mutasyonlar, çoğalmada görev alan moleküllerin fonksiyonunu etkileyerek kontrolsüz çoğalmaya sebep olur.

2) Çoğalmayı inhibe eden sinyallere duyarsızlık-kaçış

- Normal hücreler, vücutta homeostazı sağlamak için çoğalmayı inhibe eden sinyallere karşı duyarlılık gösterir. Kanser hücrelerinde, çoğalma sinyallerine duyarlı bölgelerde oluşan mutasyonlar sayesinde bu sinyallere cevap vermezler.

3) Apoptozisten (Programlı hücre ölümü) kaçabilme özelliği

- Normal hücreler vücuttan apoptozis ile meydana gelen DNA hasarına bağlı olarak uzaklaştırılırlar. Kanser hücreleri apoptotik sinyallere duyarsızlaşırlar. Apoptozis mekanizmasını düzenleyen yollardaki moleküllerde oluşan mutasyonlar kanser hücrelerini apoptotik sinyallere karşı duyarsız hale getirir.

4) Limitsiz bölünme potansiyeli kazanmaları

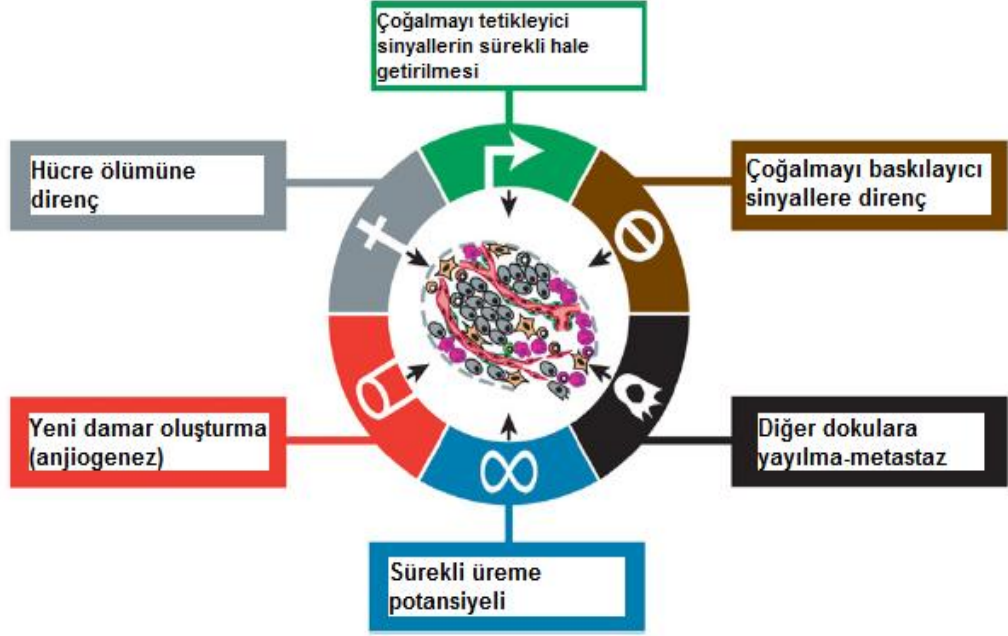
- Normal hücrelerin yaşam süreleri boyunca bölünmelerini sayan otonom bir sayaca sahiptir, yani bölünme sayıları sınırlıdır. Bu sayaç kromozom sonlarının kısalması, her DNA replikasyonunun sonunda oluşan telomerlerdir. Kanseri hücrelerinde, bölünmeye paralel olarak telomerlerin kısalması söz konusu olmadığından bölünme özellikleri devam eder. Kromozomların en uç bölümünü oluşturan telomerlerin uzunluğunun düzenlenmesini kontrol eden mekanizmaları bozan değişimler, kanser hücrelerine sınırsız bölünme potansiyeli kazandırır.

5) Yeni kan damarlarının oluşumu (Anjiyogenez)

- Normal hücreler, oksijen ve besin ihtiyaçlarını karşılamak için kan damarlarına ihtiyaç duyarlar. Genellikle yetişkinlerde damar yapısı ve sayısı sınırlıdır. Kanseri hücreleri, tümörün genişlemesi ve yayılması için, artmış besin ve oksijen ihtiyaçlarını karşılamak adına yeni kan damarları oluşturma özelliğine sahiptir.

6) İnvazyon ve metastaz yapma özellikleri

- Normal hücrelerin vücuttaki lokalizasyonu bellidir ve göç etmezler. Kanseri hücrelerinin vücudun diğer bölgelerine göçü, vücudun genel homeostazisini bozarak ölüme yol açar. İnvazyonda rol alan enzimlerde meydana gelen mutasyonlar, hücrelerin hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler adhezyon özelliklerini değiştirir.



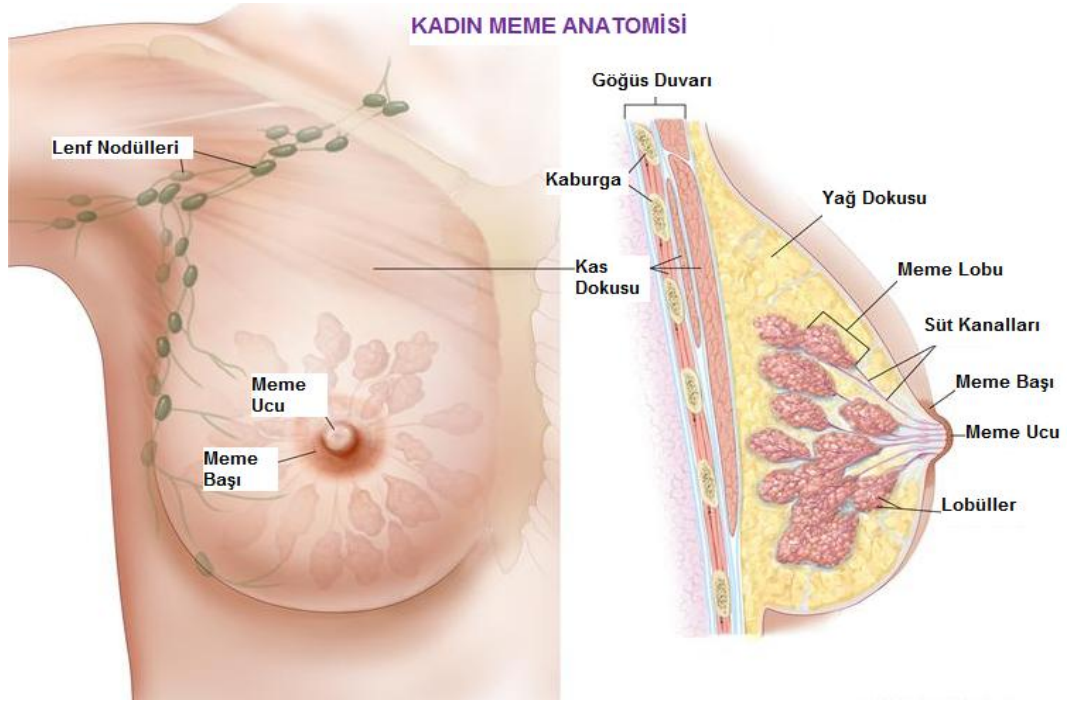
Şekil 1. Kanser hücrelerinin özellikleri⁵

2.2. Meme Kanseri

Meme kanseri, günümüzde kadınlarda görülme sıklığı en yüksek olan ve kansere bağlı ölümler içinde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada gelen kanser türüdür. Hem menapoz öncesi dönemde hem de menapoz sonrası dönemde ortaya çıkabilmektedir⁶⁻⁸. Yaşla birlikte görülme sıklığının arttığı, menapoz sonrasında meydana gelen hormonal değişikliklerin insidansı artırdığı düşünülmektedir⁹.

Memede salgı yapan hücreler tarafından oluşturulan lobüllerin birleşmesiyle loblar oluşur. Lobüller birbirlerine süt kanalları ile bağlanır ve bu süt kanalları da meme başında birleşirler. Kadın meme anatomisine ait şematik Şekil 2'de görülmektedir. Meme kanseri, lobülleri ya da süt kanallarını oluşturan hücrelerin kontrolsüz çoğalmaları ve vücudun çeşitli yerlerine giderek çoğalmaya devam etmeleriyle

gelişmektedir². Süt kanallarından kaynaklanan kansere duktal karsinom, lobüllerden kaynaklanan kansere de lobüler karsinom adı verilmektedir^{10, 11}.



Şekil 2. Kadın meme anatomisinin şematik görüntüsü¹²

2.2.1. Meme Kanseri Tipleri

Meme kanseri kalıtsal ya da sonradan edinilen bir hastalık olup, çevresel, davranışsal ya da üreme özellikleri gibi faktörlerden etkilenmektedir. Bilinen en belirgin risk faktörleri cinsiyet ve yaştır. Kadınlarda görülme sıklığı daha fazla olmakla birlikte, yaşın ilerlemesi de riski artırmaktadır. Meme kanseri, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından pek çok alt tipe sınıflandırılmıştır. Tablo 1’de WHO sınıflandırılması görülmektedir¹³.

Tablo 1. Meme tümörleri histopatolojik sınıflandırılması (WHO)

Sık Görülen Histolojik Tipler	
İnvaziv duktal karsinom	İnvaziv papiller karsinom
İnvaziv lobüler karsinom	Lobüler karsinoma in situ
Tubuler karsinom	Duktal karsinoma in situ
İnvaziv kribriform karsinom	Mikroinvaziv karsinom
Medüller karsinom	Taşlı yüzük hücreli karsinom
Müsinöz karsinom	
Seyrek Görülen Histolojik Tipler	
Nöroendokrin tümörler	Sekretuar karsinom
Apokrin karsinom	Onkositik karsinom
Metaplastik karsinom	Adenoid kistik karsinom
Lipidden zengin karsinom	

Hastalığın kalıtsal olan tipi, genellikle BRCA-1 ve BRCA-2 (yüksek penetrasyonlu genler) genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. Hastaların %5-10'unda bu genlerdeki mutasyonlara rastlanmıştır. Bu genlerinde mutasyonlarla doğan kadınların, popülasyondaki diğer kadınlara göre 10-30 kat fazla hastalığa yakalanma riski taşıdığı belirtilmiştir. Genele göre bakıldığında, bu yaşam süreleri boyunca %60-80 daha fazla risk taşıdıkları anlamına gelmektedir¹⁴⁻¹⁷.

Sporadik olan tip ise, daha çok görülen tip olup meme kanseri hastalarının %90-95'inde görülen tiptir. Bu hastalarda kalıtsal yatkınlığa rastlanmazken hastalığa hayatlarının herhangi bir döneminde oluşan somatik mutasyonlar veya düşük penetrasyonlu genlerde meydana gelen, DNA onarımında, hücre sinyal yolları ve östrojen metabolizmasında görevli proteinleri kodlayan genler ve polimorfizmlerin neden olduğu düşünülmektedir¹⁴⁻¹⁷.

Temel olarak iki gruba ayrılan hastalığın, DNA mikro dizilişleri incelenerek yapılan gen ekspresyon çalışmaları ile alt tiplerine ayrılması sağlanmıştır. Meme kanserinin iki temel alt tipi bulunmaktadır. Alt tiplere ait sınıflandırma Tablo 2'de görülmektedir¹⁸⁻²⁰.

Tablo 2. Meme kanseri alt tipleri (östrojen reseptör özelliklerine göre)

Östrojen Reseptör (ER) Negatif (-)	Östrojen Reseptör (ER) Pozitif (+)
Bazal benzeri	Luminal A
Epidermal büyüme faktörü pozitif [HER2+/ER-]	Luminal B

Bazal benzeri alt tipinde düşük HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) ve ER ekspresyonu gözlenir. Hücrelerde bazal epitelyum hücre tabakasında karakteristik olarak bulunan sitokeratin 5,6 ve 17'ye yüksek ekspresyonu belirtilmiştir. HER2+/ER- alt tipinin genellikle bazal benzeri tipinin yakınında kümeleştiği bilinmektedir. Luminal A ve B'nin yüksek ER, GATA-3 (T-cell-specific transcription factor) ve bu genler tarafından kontrol edilen genlere ekspresyonları vardır. Luminal A'nın bu genlere ekspresyon yeteneği Luminal B'den fazladır. Bunun yanı sıra Luminal B'nin HER1 ve HER2 ekspresyonu olduğu da belirtilmiştir¹⁸. Meme kanseri insidansının sürekli ve hızla artışı, onkolojik çalışmaların üzerinde oldukça yoğunlaşmasına neden olmuştur²¹. Meme kanserinin etkin tedavisinin sağlanması için çalışan araştırmacılar, alt tiplerini aydınlatarak daha başarılı tedaviler yapılacağını öngörmektedirler^{18,20}.

2.2.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanseri risk faktörlerinin aydınlatılmasına yönelik literatürde 60'lı yıllardan günümüze kadar pek çok çalışmaya rastlanmaktadır²²⁻²⁷. Yapılan çalışmaların ve belirlenen risk faktörlerinin özeti Tablo 3'de görülmektedir.

Önlenemeyen genetik risk faktörlerinin yanı sıra var olan yaşam şekli ile ilgili değişiklikler yapılarak meme kanseri riskinin azaltılabileceği bildirilmiştir. Fiziksel aktivitenin artırılması ile düzenli, sağlıklı beslenme bunlardan en önemlileridir²⁶. Diyetle dikkat edilmesi gereken başlıca noktalar: Taze meyve-sebze tüketimi, soya, izoflavon ve

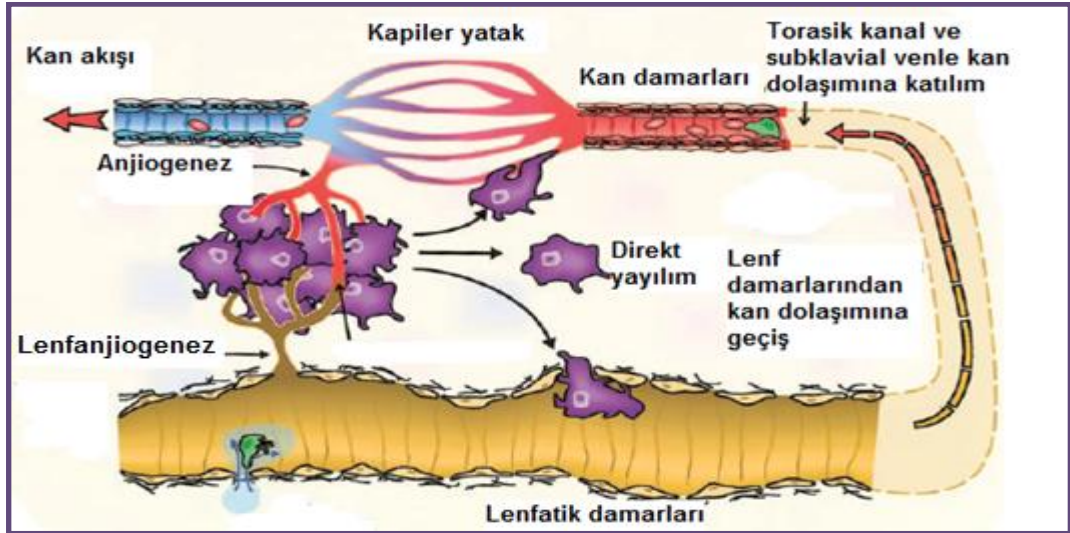
lignanların (fitohormon) tüketimi²⁸, çok fazla et tüketilmemesi olarak belirtilmektedir. Bunun yanı sıra vitamin ve minerallerin sadece meyve ve sebzelerden sağlanması, diyet dışı vitamin mineral (multivitamin kompleksleri vs.) kullanılmaması önerilmektedir. Sigara ve alkolden uzak durulması da kanserden korunmada oldukça önemlidir.

Tablo 3. Meme kanseri risk faktörleri ²⁵

Risk Faktörleri	Risk Grubu	Karşılaştırılan Grup	Rölatif Risk (%)
Alkol alımı	Günde 2 içki	Hiç alkol kullanmayan	1.2
Vücut Kitle İndeksi (BMI)	Toplunun %80'i, 55 yaş üstü	Toplunun %20'si	1.2
Hormon replasman terapisi (HRT)(östrojen ve progesteron)	5 yıldan daha fazla	Hiç almamış	1.3
Radyasyon maruziyeti	Tekrarlanan floroskopi Hodgkin's hastalığı tedavisinde radyoterapi	Hiç maruz kalmamış Hiç maruz kalmamış	1.6 5.2
Erken menarş	<12 yaş	>15 yaş	1.3
Geç menapoz	>55 yaş	<45 yaş	1.2-1.5
İlk doğum yaşı	Hiç doğum yapmayan ve ilk doğumunu 30 yaşından sonra yapan	20 yaşından önce ilk doğumunu yapan	1.7-1.9
Yaş	≥ 65	< 65	5.8
Meme kanseri geçmişi	İnvazif meme karsinomu	İnvazif meme karsinomu hikayesi olmayan	6.8
Histolojik bulgular	Lobular karsinoma in situ Ductal karsinoma in situ	Herhangi bir anomali gözlenmeyen	16.4 17.3
Meme biyopsisi	Atipik olmayan hiperplazi Atipik hiperplazi Atipik hiperplazi +pozitif aile hikayesi	Herhangi bir anomali gözlenmeyen	17.3 1.9 5.3
Sitolojik inceleme	Atipik olmayan proliferasyon Atipik proliferasyon Atipik proliferasyon+pozitif aile hikayesi	Herhangi bir anomali gözlenmeyen	2.5 4.9-5 18.1
Aile hikayesi	1.derece yakın akrabasında 50 yaşüstü postmenapozal meme kanseri olan kadın 1.derece yakın akrabasında premenapozal meme kanseri olan kadın 2.derece yakın akrabasında meme kanseri olan kadın İki tane 1.derece akrabasında meme kanseri olan kadın	1.ve 2.derece akrabalarında meme kanseri geçmişi olmayan kadın	1.8 3.3 1.5 3.6
Hücre bazında mutasyon	BRCA-1 heterozigüs, <45 yaş BRCA-1 heterozigüs, 60-69 yaş	BRCA-1 heterozigüs olmayan, <45 yaş BRCA-1 heterozigüs olmayan , 60-69 yaş	200 15

2.2.3. Meme Kanseri Yayılım Yolları

Tümör hücreleri vücutta lenfatik yolla veya kan yollarıyla sistemik dolaşıma katılarak kaynak aldıkları bölgeden farklı doku ve organlara yayılırlar. Lenf yoluyla olan yayılıma lenfojen yayılma, kan yoluyla olan yayılmaya hematojen yayılma adı verilir. Klinopatolojik veriler tümörlerin en çok lenfatik yolla yayıldıklarını bildirmektedir. Şekil 3'te tümör hücrelerinin kan dolaşımına veya lenf dolaşımına geçişleri şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 3. Tümör yayılım yolları²⁹

Meme tümörü hücrelerinin kan yoluyla metastaz yaptıkları temel organlar: Akciğer, kemik ve karaciğer olarak belirtilmektedir^{30,31}.

2.2.4. Meme Kanseri Tanısı

Meme kanserinin erken evrede teşhis edilip tedaviye başlanabilmesi için en önemli faktör, kişilerin kendindeki değişikliklere ve belirtilere duyarlı olmasıdır. Hastalığın erken evrede teşhis olanağının yükseltilebilmesi için; Kendi Kendine Meme Muayenesi (KKMM) ve Klinik Meme Muayenesi (KMM) yapılması, mamografi çektilmesi ve hekim

tarafından gerekli görüldüğü hallerde de ultrasonografi ile manyetik rezonans gibi ilave teşhis ve görüntüleme yöntemlerinin kullanımına özen gösterilmelidir^{32,33}.

Meme kanseri tanısında kullanılan radyolojik yöntemler:

- a. Mamografi
- b. Ultrasonografi
- c. Renkli Doppler Ultrasonografi
- d. Manyetik Rezonans Görüntüleme
- e. Dijital Mamografi
- f. Sintigrafi
- g. Pozitron Emisyon Tomografisi (PET), olarak gruplandırılabilir³⁴⁻³⁹

2.2.5. Meme Kanseri Tedavisi

Kanser tedavisi, genellikle birkaç farklı yöntemin kombinasyonu şeklinde uygulanır. Eğer tümör operasyona uygunsa, cerrahi işlem en etkili yöntem olarak akla gelir⁴⁰.

Hastalığın farklı alt tiplerine ve fazlarına göre farklı tedavi yaklaşımları mevcuttur⁴¹. Maughan ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptığı çalışmada meme kanserindeki temel yaklaşımları Tablo 4'te belirtildiği gibi açıklanmıştır⁴².

Tablo 4. Meme kanseri tedavi yaklaşımları

Meme koruyucu cerrahisi erken evre invaziv veya lokal ileri meme kanseri olan kadınlarda radyasyon tedavisi ile takip edilmelidir.

Meme kanserinin tedavisinde sentinel lenf nodu biyopsisi aksiller lenf nodu diseksiyonu ile karşılaştırıldığında daha az kol komplikasyonlarına neden olmaktadır.

Aksiller lenf nodu diseksiyonu klinik olarak palpabl lenf nodu olan meme kanseri olan kadınlarda yapılmalıdır.

Aromataz inhibitörleri, ve/veya tamoksifen, hormon reseptörü-pozitif meme kanseri olan tüm postmenopozal kadınlara önerilmelidir.

Kemoterapi, lenf nodu pozitif olan meme kanseri olan tüm kadınlara önerilmelidir

Trastuzumab (Herceptin) eksprese ERBB2 olan meme kanseri olan tüm kadınlar için teklif edilmelidir.

Lokal ileri meme kanseri için ameliyat öncesi kemoterapi meme koruyucu cerrahinin başarısını artırır.

Metastatik meme kanseri tedavisinde iki temel ilaç stratejisi mevcuttur. Bunlar: Kemoterapi ve hormonal terapidir³⁰.

a. Kemoterapi

Metastatik meme kanseri tedavisinde belirlenmiş standart bir kemoterapi rejimi bulunmamaktadır. Her kanser, alt tipine göre tedaviye farklı cevap vermektedir. Kemoterapinin amacı, kanser hücrelerini güçsüzleştirerek öldürmektir. Meme kanseri tedavisinde aşağıda belirtilen ilaçlardan biri ya da birkaçı kombinasyon halinde kullanılmaktadır.

- Paklitaksel	- Doksorubisin
- Karboplatin	- Siklofosfamid
- Daunorubisin	- Epirubisin
- 5-florourasil	- Gempitabin
- Eribulin	- İzapebilon
- Metotreksat	- Mitomisin
- Mitozantron	- Vinorelbin
- Dosetaksel	- Tiyotepa
- Vinkristin	- Zeloda

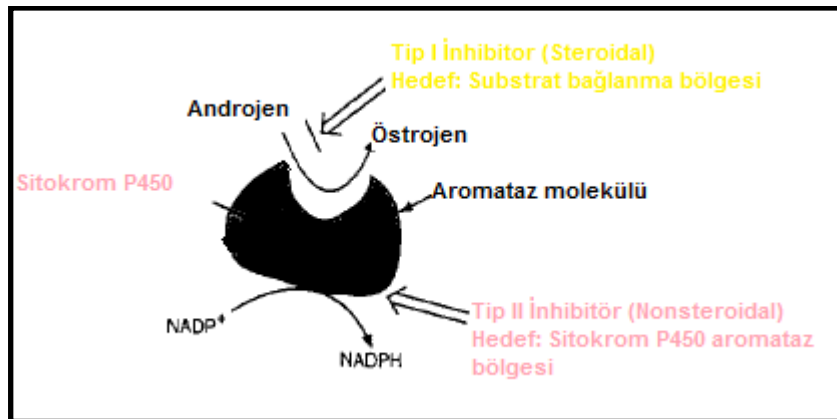
Standart kombinasyon terapilere örnekler:

- Doksorubisin + Dosetaksel
- Doksorubisin + Siklofosfamid (Bazı durumlarda + Paklitaksel/ Dosetaksel)
- Siklofosfamid + Metotreksat + 5-florourasil
- Siklofosfamid + Epirubisin + 5-florourasil
- Doksorubisin + 5-florourasil + Siklofosfamid
- Dosetaksel + Doksorubisin+ Siklofosfamid
- Gemsitabin + Epirubisin + Paklitaksel⁴³

b. Hormonal Terapi

Hormonal tedavide, literatürde iki temel ilaç grubu karşımıza çıkmaktadır. Bunlar aromataz inhibitörleri ve östrojen reseptör antagonistleridir.

Aromataz enzimi, premenapozal kadınlarda yumurtalıklarda, postmenapozal kadınlarda ise yağ dokuda bulunurlar. Enzim, iki kısımdan oluşmaktadır. Şematik görünüşü Şekil 4'te görülmektedir⁴⁴. Aromataz inhibitörleri, periferar aromatazı %90'a kadar inhibe ederek, dolaşımda bulunan östrojeni baskırlarlar.



Şekil 4. Aromataz inhibitörlerinin şematik görünümü

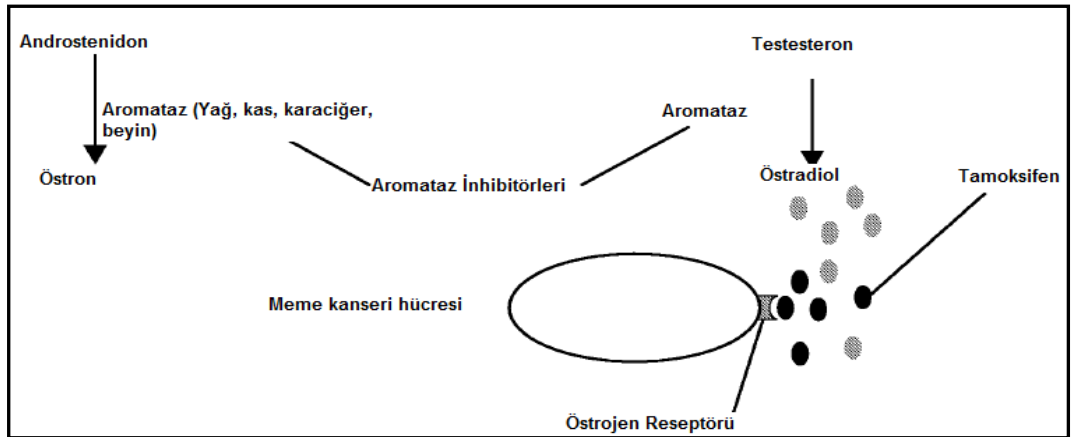
Aromataz inhibitörleri ikiye ayrılır. İlk sınıfı steroidal androstenidon türevleridir. Aromataz Sitokrom P450 substratlarıdır. Bu grup bileşiklere örnek olarak Formestan, Exemestan verilebilir. İkinci sınıf ise nonsteroidal imidazol türevleridir. Bu gruptaki bileşikler, geri dönüşlü olarak enzime müdahale ederler. Aromataz inhibitörlerinin ilk temsilcisi olan aminoglutemit, ikinci sınıfa mensuptur. İkinci sınıfa ait olan diğer bileşikler: Fadrazol, Letrozol, Anastrozol, Vorozoldür. Östrojen reseptör pozitif (ER+) tümörlerde başarılı bir tedavi grubudurlar. Bu grup bileşiklerin premenapozal kadınlarda, cerrahinin hemen ardından adjuvan terapide ve yüksek risk grubundaki kadınlarda meme kanserinden korunma amaçlı kullanımı önerilmemektedir⁴⁵. Premenapozal kadınlarda, östrojen seviyelerini tümör büyümesini durduracak kadar azaltmadığı, aynı zamanda gonatları uyararak yumurta foliküllerini uyardığı bildirilmiştir⁴⁶.

Hormonal terapi, ER+ ve progesteron reseptör pozitif olan meme kanserlerinde oldukça iyi tolere edilen bir tedavidir. Bilinen meme kanserlerinin %75'inin ER+ tiptedir. ER- olan tiplerin de %65'i progesteron reseptör pozitifdir. Östrojen reseptör pozitif tümörlerde tedavide %50-60, hem östrojen hem progesteron pozitif tümörlerde %65-70 başarı sağlanabilmektedir^{18,30,31}.

1958 yılında Lerner ve arkadaşları, ilk nonstereoidal antiöstrojenik etkili bileşik olarak farmakolojik özelliklerini tanımladıkları etamoksitritetol (MER 25) ile ilgili çalışmalarını yayımlamışlardır. Bu çalışmadan 2 yıl sonra, 1960 yılında, Jensen ve Jacobson bu bileşiğin hedef bölgesi olan östrojen reseptörünü (ER) tanımlamışlardır. Bu iki çalışma, üreme sistemi endokrinolojisinde bir çığır açmış ve çalışmalar tamoksifenin, meme kanseri hastalarının yaşam sürelerini uzatan yeni bir bileşiğin tedavide kullanılmasına olanak sağlamıştır⁴⁷.

Tedavide doğrudan östrojen reseptörüne hedeflenerek kullanılan etkin maddeler: Tamoksifen, toremifen, fulvestrant, droloksifen olarak karşımıza çıkmaktadır^{44,48}

Bu grup bileşiklerin etki mekanizması östrojen reseptörüne bağlanarak östrojenin bağlanmasını engellemek şeklindedir. Grubun ilk temsilcisi tamoksifen'dir. Tamoksifen, 1970'li yıllardan bu yana kullanılmakta, birinci kuşak östrojen reseptör antagonisti olarak etki göstermektedir⁴⁹. Aromataz inhibitörleri ile tamoksifenin etki mekanizmaları arasındaki fark Şekil 5'te görülmektedir.



Şekil 5. Aromataz inhibitörleri ile tamoksifenin etki mekanizması arasındaki fark

Tamoksifen ve türevleri östrojen reseptörüne yarışmalı olarak bağlanarak östrojenin bağlanmasını engellerken, aromataz inhibitörleri, östrojen sentezini inhibe ederek etki gösterirler.

Uzun yıllar boyunca bu sınıftaki bileşikler sadece östrojenik ve antiöstrojenik olarak sınıflandırılmışlardır⁵⁰.

Menapoz sonrası dönem, kadınlarda östrojen seviyelerindeki düşüşle karakterizedir. Östrojen seviyelerindeki bu azalmaya bağlı olarak,

ateş basması, sinir bozukluğu, uyku bozuklukları gibi yaşam kalitesini etkileyen çeşitli semptomlarla ve kardiyovasküler hastalıklar, osteoporoz başta olmak üzere metabolik değişikliklere neden olur^{51,52}. Östrojen tek başına ya da progesteronla birlikte, postmenapozal kadınlarda replasman tedavisinde kullanılmaktadır. Östrojen replasman tedavisinin, postmenopozal dönemdeki kadınlarda ateroskleratik kalp hastalığına bağlı mortalite ve morbidite hızlarını azalttığı kanıtlanmıştır. Bunun yanı sıra, Alzheimer hastalığı görülme riskini de azaltmaktadır. Bu avantajlarına rağmen, meme ve rahim karsinoma riskini artırdığı da bilinmektedir⁵³. Östrojen replasman tedavisinin, vajinal kanama, göğüslerde hassasiyet, abdominal şişlik gibi yan etkileri görülmektedir. Ayrıca tedaviye ara verildiğinde, iskelet sistemi üzerindeki olumlu etkilerinin kaybolduğu bilinmektedir. Bu yüzden daha tercih edilir yarar/risk profilleri olan terapötik ajanlara ihtiyaç doğmuştur⁵⁴.

2.2.6. Selektif Östrojen Reseptör Modülatörleri (SERM)

Östrojen reseptörü, 1960'li yılların başlarında keşfedilmiş, 1990'larda bu konuda çalışan araştırmacılar, östrojen aracılığıyla gerçekleşen tüm olaylarda tek bir yolak olduğunu düşünmüşlerdir. Bu etki mekanizması, *klasik yolak* olarak tanımlanır. Bu yolağın aşamaları:

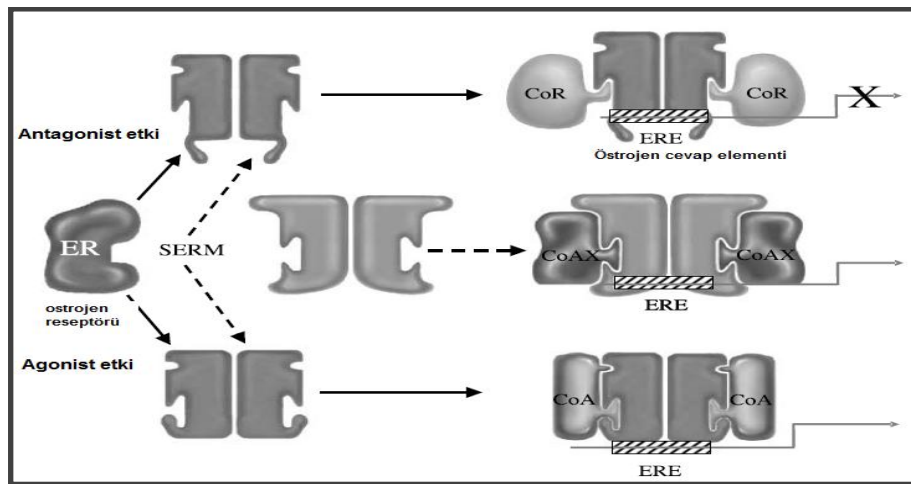
- Östrojenin sitozolik östrojen reseptörüne (ER) bağlanması
- Reseptör-ligand kompleksinin hücre çekirdeğine hareketi
- Tüm östrojene duyarlı dokularda bulunan östrojen cevap elementini (ERE) de içeren nükleer genomik elementlerin transkripsiyonel aktivasyonu

Bugün, klasik yolağın tek yolak olmadığı bilirse de, memelilerde östrojene cevaben gelişen çoğu biyolojik olayda östrojen

reseptörüyle etkileşme temeldir. Doku spesifik özelliklerin de göz önünde bulundurulduğu gelişmiş modelde:

- Hücresel bölgede ER/ligand etkileşimi (çekirdek veya hücre membranında)
- Bu etkileşimi takiben, genomik veya nongenomik sinyal yollarının aktivasyonu
- Nükleer cevaplar için ER'nin alt tipi
- Ko-düzenleyici hücresel faktörler
- Aktive olan genomik parçalar'ın rol oynadığı düşünülmektedir⁵⁵.

Selektif östrojen reseptör modölatörleri (SERM), östrojenden farklı özel bir kimyasal gruptur. Nonsteroidal östrojen yapısındadırlar⁵⁶. Östrojen reseptörlerine bağlanırlar, reseptörle etkileşerek farklı hedef dokularda östrojen agonisti veya antagonisti etki oluştururlar⁵⁰. SERM grubu bileşiklerin östrojen agonist ve antagonist etki mekanizmaları Şekil 6'da görülmektedir. Temel etki mekanizmaları östrojen reseptörlerine bağlanarak östrojenin bağlanmasını önlemek ve böylelikle östrojenin etkilerini taklit etmek veya engellemek şeklindedir⁵⁷.



Şekil 6. SERM grubu bileşiklerin östrojen agonist ve antagonist etki mekanizmaları

Günümüzde SERM grubu ilaçlar, postmenapozal dönemdeki kadınlarda Hormon Replasman Tedavisi (HRT)'ne alternatif olarak düşünülmektedir⁵⁸. Hormon replasman tedavisi, özellikle postmenapozal dönemdeki kadınlarda osteoporozu önlemek için, postmenapozal dönemde eksilen östrojeni yerine koymaya yönelik bir tedavidir. Vücuda verilen östrojen iskelet sistemi üzerinde olumlu etkili olmakla beraber, östrojenin primer etki gösterdiği yoğun östrojen reseptörleri bulunduran meme dokusu ve üreme sistemi üzerinde uyarıcı etki yapmaktadır. Bu uyarıcı etki ile meme ve endometrium tümörlerinin oluşma riskini yüksek oranda artırmaktadır⁵⁹.

İdeal bir SERM 'in taşıması gereken özellikler:

- Kemiklerde östrojen benzeri etki göstererek, kemik kütlesini korumalı ve osteoporozla bağlı kemik kırılma riskini en aza indirmelidir.
- Lipoprotein özelliklerini iyileştirerek, vasküler endotelial özellikleri geliştirerek ya da benzer olası mekanizmalarla, koroner arter hastalıkları riskini düşürmelidir.
- Östrojenden farklı olarak uterus endometrium dokusunda düzenli ya da düzenli olmayan kanamalara yol açmamalıdır. Endometrial kanser riskini artırmamalı, ideal olarak azaltmalıdır.
- Meme ağrısına neden olmamalı, meme kanseri riskini artırmamalı hatta östrojen pozitif meme kanseri riskini azaltmalıdır.
- Sıcak basması, vajinal kuruluk gibi menapoz semptomlarını etkili biçimde kontrol edebilmelidir.
- Yaşlı kadınlarda, konvansiyonel replasman tedavisinin sonucu ortaya çıkabilecek demans riskini azaltmalıdır⁵⁹.

SERM grubu bileşiklere örnek olarak: Tamoksifen, raloksifen, toremifen, enklomifen, zuklomifen, idoksifen, droloksifen, osmepifen verilebilir^{47,50,60}.

Bu bölümde tezimizde kullanılan, SERM grubundan iki etkin madde olan tamoksifen ve raloksifenin özellikleri ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

2.2.6.1. TAMOKSİFEN SİTRAT

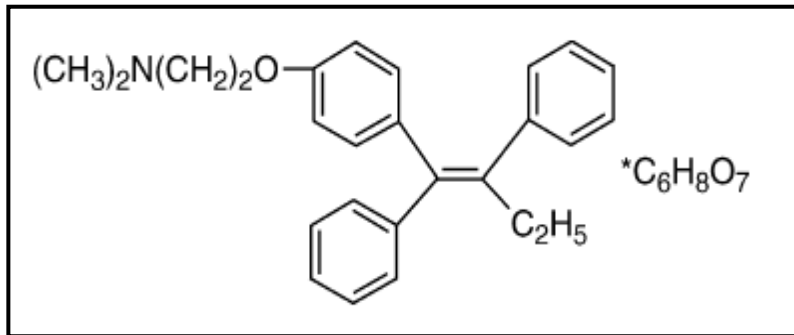
2.2.6.1.1. Tamoksifenin Yapısı ve Özellikleri

Tamoksifenin kimyasal formülü: 1-para,beta,-dimetilaminoethoksifenil-trans-1,2- difenilbut-1-en veya (Z)-2-[4-(1,2 Difenil-1 butenil)fenoksi]-N,N-dimetiletanamin'dir. Trifeniletilen türevidir⁶¹. Molekül formülü $C_{26}H_{29}NO.C_6H_8O_7$ ve sitrat tuzunun molekül ağırlığı 536.6 g/mol'dür. Sudaki çözünürlüğü 0.00102 g/L'dir⁶².

Zayıf bazik özellikte (pKa 8.8) bir bileşik olup, suda çözünürlüğü oldukça düşüktür. Suda çözünürlüğü ve etkinliğini artırmak için sitrat tuzu kullanılmaktadır. Çözünürlük sıcaklık ile kısmen artmaktadır.

Kiral özellikte kimyasal yapıya sahip olup, optik izomerlerinden Z formu aktifken E izomerinin biyolojik aktivitesi çok düşük olduğu bilinmektedir.

Tamoksifenin kimyasal yapısı Şekil 7'de gösterilmiştir⁶³.



Şekil 7. Tamoksifenin kimyasal yapısı^{61,63}

2.2.6.1.2. Kullanıldığı Yerler ve Etki Mekanizması

SERM grubu ilaçların ilk temsilcisi tamoksifendir. Tamoksifen 1966 yılında Imperial Chemical Industries (ICI, England) tarafından geliştirilmiştir. Geliştirilmesindeki amaç infertilite üzerine etkili bir ajan olarak ortaya çıkarmak iken bu etkisinin zayıf olduğu görülmüş kontraseptif etkisi incelenmiş ve kadınlarda ovülasyonu indüklediği bulunmuştur⁶⁴.

Östrojen reseptörünün keşfedilmesi ve tamoksifenin östrojen reseptörüne bağlanarak etki gösterdiğinin ortaya çıkarılmasından sonra tamoksifenin meme tümörleri üzerine etkili olabileceği fikri ortaya atılmıştır. Tamoksifen ile ilerlemiş meme kanserli kadınlarda ilk klinik çalışma 1969'da yapılmıştır. Yapılan çalışma sonucu o dönemde yaygın olarak kullanılan stilboöstrole karşı terapötik etkisinin kıyaslanabilir seviyede olduğu ve daha düşük toksisiteye neden olduğu görülmüştür.

Tamoksifenin ilerlemiş meme tümörleri üzerindeki etkinliği ve güvenilirliğinden yola çıkılarak, kanser erken teşhisinin ardından memesi alınmış kadınlarda adjuvan terapisinde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Tamoksifenin uzun dönem kullanımıyla olumlu sonuçlar alınmıştır. Tamoksifenin özellikle östrojen pozitif meme tümörlerinin önlenmesi ve tedavisinde terapötik aktivitesi kanıtlanmıştır⁶⁴⁻⁶⁵.

Tamoksifen FDA tarafından meme kanseri önlenmesi ve adjuvan terapisinde kullanılmak üzere onay almıştır⁶⁶.

1996 yılında International Agency for Research on Cancer, tamoksifeni endometrium üzerine karsinojenik etkili olarak sınıflandırmıştır. Tamoksifenin meme kanseri riski yüksek olan kadınlarda koruyucu amaçlı kullanımı günümüzde tartışmalara yol açmakta olup, önemli ölçüde sınırlanmıştır⁵⁹.

Tamoksifen nonsteroidal antiöstrojenler grubundan bir ilaçtır. Östrojen reseptörlerine bağlanır ve östrojenin bağlanmasını yarışma yönü ile engeller. Tamoksifen-reseptör bileşiği nükleusa taşınarak nükleik asid fonksiyonlarını etkiler. Tümör DNA sentezi yavaşlar ve tümör tarafından salgılanan çeşitli büyüme faktörleri azalır. Hücre proliferasyonu inhibe olur^{67,68}.

Tamoksifenin cis ve transizomerleri mevcuttur. Trans izomeri antiöstrojenik, cis izomeri östrojenik aktiviteye sahiptir. Tamoksifen zayıf östrojenik etkiye sahip bir bileşiktir. Tamoksifenin östrojen agonistik ve antagonistik etkileri hormonal ortama bağlıdır. Premenapozal kadınlarda östrojenik etkilerini hipofiz bezinde göstererek plazma östrojen düzeylerini artırıp gonodotropin düzeylerini etkilemezken postmenapozal kadınlarda ise gonodotropin düzeylerini düşürür^{69,70}. İleri evre hastalıkta endokrin tedaviye cevap oranı, bir hormon reseptörü pozitif olan olgularda %33, her iki reseptörde pozitif olan olgularda %50-70' tir⁷¹.

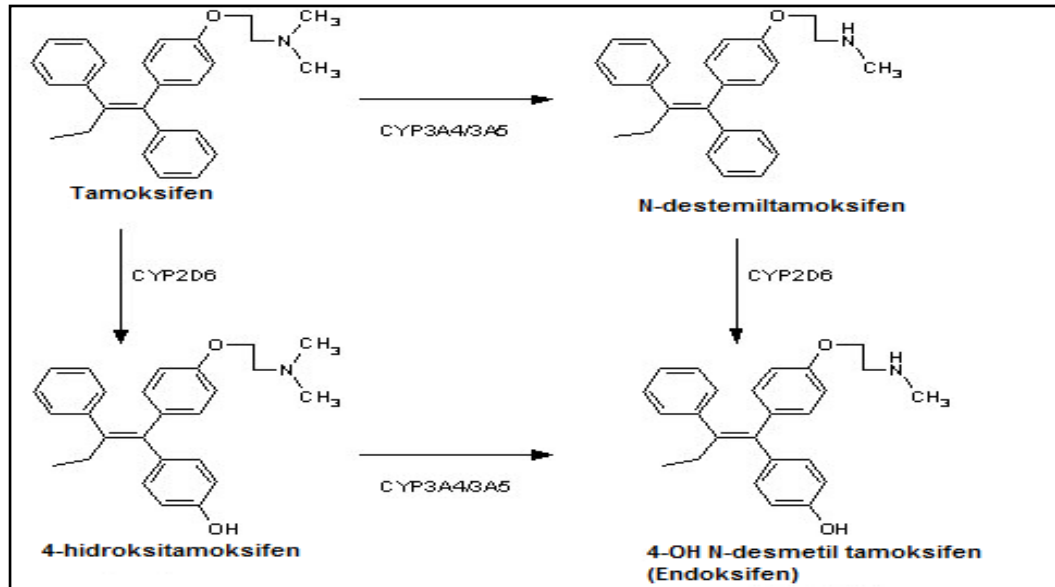
Tamoksifenin östrojenler, androjenler, progestinler, aminoglutetimid ile karşılaştırıldığı ramdomize çalışmalarda cevap oranlarının aynı veya daha iyi olması ve yan etkilerinin çok az olması nedeniyle metastatik meme kanseri tedavisinde birinci seçenек tedavi olarak son yıllara kadar kabul görmüştür. Günümüzde ise aromataz inhibitörleri ilk seçenек olarak kullanılmaktadır. Tamoksifen ve kemoterapi kombinasyonunun lokal, ipsilateral, bölgesel ve uzak rekürrens riskini olduğu kadar kontralateral meme kanseri insidansını da azalttığı gösterilmiştir⁷².

Tamoksifenin plazma lipidleri üzerine östrojenik etkisi vardır. Tamoksifenin bu etkileri kliniğe koroner kalp hastalığı riskinde belirgin bir azalma olarak yansır. Kemik üzerine östrojenik etki gösterir ve 5 yıllık kullanım sonucunda kemik mineral dansitesinde anlamlı artışa neden

olur⁷³. Bununla beraber, NSABP (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) B-14 çalışmasının sonuçları tamoksifen kullanan kadınlarda endometrium kanseri riskinde anlamlı bir artış olduğunu göstermektedir. Tamoksifen alan meme kanserli olgularda yılda bir kez pelvik muayene ve smear testi önerilmektedir⁷⁴.

2.2.6.1.3. Tamoksifenin Farmakokinetik Özellikleri

Oral alınan tamoksifen belirgin karaciğer ilk geçiş etkisine maruz kalmaktadır. İki major metaboliti vardır ki, bu metabolitler 4-OH tamoksifen ve N-desmetiltamoksifendir. 4-hidroksitamoksifenin biyolojik olarak etkinliği tamoksifene eşdeğerdir. Hızla açığa çıkan bu aktif metabolitin biyolojik yarıömrü tamoksifenden biraz daha uzundur. Aktif metaboliti sayesinde uzun biyolojik etkiye sahip olmaktadır⁷⁵⁻⁷⁷. Tamoksifene ait metabolizasyonun şematik gösterimi Şekil 8’de görülmektedir.



Şekil 8. Tamoksifenin metabolizasyonu ⁷⁸

Tamoksifen kullanılarak yapılan bir farmakokinetik çalışmada, tamoksifenin farmakokinetiği fare ve sıçan kullanılarak incelenmiştir. Tamoksifen yüksek dozda (200 mg/kg) overoktemize olgunlaşmamış sıçanlara, olgunlaşmış farelere oral yolla uygulanmıştır. Uygulamanın ardından tamoksifen ve aktif metabolitleri (N-desmetiltamoksifen, 4-OH tamoksifen) HPLC ile ayrılmış ve floresan dedektör ile tayin edilmiştir. Olgun ovariektomize farede tek dozluk uygulamanın ardından N- desmetiltamoksifen ve 4- hidroksitamoksifenin ve tamoksifen serum seviyeleri 96 saat boyunca paralellik gözlenmiştir. Diğer taraftan, olgunlaşmamış sıçan için N-desmetiltamoksifen metabolitinin serumda baskın olduğu, ancak küçük bir miktar 4- hidroksitamoksifenin gözleendiği belirtilmiştir. İki tür içinde, oral uygulamanın ardından, ilk 3-6 saat içinde serumda tamoksifen gözlenmemiştir. Fare ve sıçan grupları için, tamoksifen ve N-desmetiltamoksifen'e ait AUC değerleri arasında 4 katlık bir fark gözlenmiştir. Sıçan grubu için hesaplanan AUC değerleri, tamoksifen ve N- desmetiltamoksifen için sırasıyla 57.5 ve 111 µg.saat/mL, fare grubu için ise 15.9 ve 26.3 µg.saat/mL olarak belirtilmiştir⁷⁹.

Yapılan bir diğer çalışmada, 20 mg dozda tamoksifen tablet ve çözeltileri sağlıklı erkek gönüllülere oral yolla uygulanmış, C_{max} değerleri 42 ng/mL ve 12 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Tamoksifenin yarıömrünü 4 gün, aktif metabolit N- desmetiltamoksifen için ise 9 gün olarak belirtilmiştir⁸⁰.

Tamoksifenin 7 premenapozal ve 9 postmenapozal kadına uygulamasıyla yapılan bir çalışmada, aktif metabolit serum seviyelerinin, postmenapozal kadınlarda daha yüksek olduğunu belirtilmiştir⁸¹.

Tamoksifen yüksek oranda serum albuminine bağlandığı (%98) ve vücutta dağılım hacmi oldukça yüksek olduğu bilinmektedir (50-60 lt/kg)⁸².

Yapılan başka bir çalışmada, tamoksifenin plazma yarıömrünün 5-7 gün olduğu, temel olarak karaciğerde glukuronidasyonla metabolize edildiği ve feçesle atıldığı bildirilmiştir⁵⁰.

2.2.6.1.4. Tamoksifen ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Tamoksifen oldukça eski yıllarda bulunmuş bir molekül olduğu için literatürde tamoksifenle ilgili pek çok çalışmaya rastlamak mümkündür.

2009 yılında yapılan bir çalışmada tamoksifenin, intestinal Peyer Patçler'den alınarak lenfatik dolaşıma taşınmasını amaçlayarak aljinat/kitozan mikrokürelerini hazırlanmıştır⁸³. 2010 yılında yapılan bir diğer çalışmada, polikaprolakton kullanarak enjektabl tamoksifen mikroküreleri hazırlanmıştır. Solvan buharlaştırma metodu ile hazırlanan mikroküreler, ile in vitro salım çalışmaları ve in situ sitotoksite çalışmaları yapmışlardır. Hazırladıkları tamoksifen mikrokürelerinin daha az yan etkili olduğunu ve kemoterapide kullanılabileceğini belirtmişlerdir⁸⁴. Yapılan bir diğer çalışmada, poli(D,L-laktit-ko-glikolit) ve poli(D,L-laktit) polimerleri kullanarak püskürterek kurutma yöntemiyle tamoksifen mikroküreleri hazırlanmış ve MCF-7 hücre serileri kullanılarak yapılan antitumoral çalışmada, hazırlanan mikrokürelerin yüksek etkinlikle hücre ölümüne neden olduğunu belirtilmiştir. Sonuçlar hazırlanan mikrokürelerin meme kanseri tedavisinde kullanılabileceği şeklinde yorumlanmıştır⁸⁵.

2010 yılında yapılan bir çalışmada, tamoksifen sitrat ve soya fosfatidilkolin kullanarak film yöntemi ile lipozom hazırlanmıştır. Hazırlanan lipozomların karakterizasyonları ve in vitro salım çalışmalarını yapmıştır⁸⁶. Yapılan başka bir çalışmada, tamoksifenin aktif metaboliti olan 4-OH tamoksifen kullanarak lipozomlar hazırlamış, bu sayede tamoksifen rezistansının önüne geçmeyi amaçlamışlardır. Tamoksifen yerine bu metaboliti kullanmalarının sebebini, 4-OH tamoksifenin in vitro olarak en sitotoksik metabolit olması şeklinde açıklamışlardır. Lipozomları membran aktif bir lipit olan alkilphospholipid oktadesil-(1,1-dimetil-piperidino-4-il)-fosfat (OPP) ile hazırlamışlardır. Yaptıkları hücre kültürü çalışmasında, lipozomların serbest ilaca göre hücreye alınan miktar ve hızın arttığını ve artmış biyolojik aktiviteye dikkat çekmişlerdir⁸⁷. Yapılan başka bir çalışmada tamoksifenin topikal olarak kullanılması planlanmıştır. Hazırlanan tamoksifen lipozomların topikal olarak hirsutizm (aşırı kıllanma) tedavisinde kullanması düşünülmüştür. Bu amaçla hazırlanan lipozomlar Carbopol jel içinde süspande ettikten sonra hayvanlara uygulamıştır. Kontrol grubu olarak tamoksifen içermeyen jel kullanmıştır. Sonuç olarak, tamoksifenin lipozomal jelinin hirsutizm tedavisinde başarılı olduğunu ifade edilmiştir⁸⁸. Guo J. ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada tamoksifen ve daunorubisin ile hazırladıkları lipozomlar ile meme kanseri kök hücreleri ve fareler üzerinde denemişler ve PEG ile hazırladıkları stealth lipozomların oldukça etkin olduğunu belirtmişlerdir⁸⁹.

2011 yılında yapılan bir çalışmada, yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi kullanarak tamoksifen katı lipit nanopartikülleri (SLN) hazırlanmıştır. Hazırlanan SLN'ler, meme tümörü oluşturulan sıçanlara uygulanmıştır. Uygulama haftada 1 kez oral yolla yapılmış, çalışma toplam 4 hafta sürdürülmüştür. Kontrol grubu ve etkin madde içermeyen SLN'ler uygulanan gruplarda hızla tümör büyümesi gözlenirken, tamoksifen ve SLN içinde tamoksifen uygulanan grupta tümörlerde anlamlı küçülme gözlenmiştir⁹⁰.

Tamoksifen kullanılarak nanopartikül hazırlanması planlanan bir çalışmada, (D, L- laktit-ko-glikolit)-85:15 (PLGA) kullanarak biyoparçalananan tamoksifen nanopartikülleri hazırlanmıştır. Amaç, uzun süre etkili bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirmektir. Hazırlanan nanopartiküllerin 60°C'ye kadar stabil olduğu ve %18-70 enkapsülasyon verimi sağlandığı belirtilmiştir. Hazırlanan nanopartiküllerin in vitro salım çalışmalarında 60 günlük bir salım profili gözlenmiştir⁹¹. Nanopartiküller hazırlanarak yapılan başka bir çalışmada, Poli(amidoamin)-kolesterol konjugatı sentezlenmesinin ardından tamoksifen kullanılarak elektrosprey metodu ile nanopartiküller hazırlanmıştır. Hazırlanan nanopartiküller karakterize edilerek sitotoksisite çalışmaları yapılmış ve kullanılan tamoksifen dozuna göre artan sitotoksisite bulguları elde edilmiştir⁹².

2.2.6.1.5. Tamoksifen İçeren Piyasa Preparatları

- ✓ Nolvadex 10 mg (30 tablet ve 250 tablet)
- ✓ Nolvadex 20 mg (30 tablet)
- ✓ Tadex 10 mg (30 tablet ve 250 tablet)
- ✓ Tamoxifen 10 mg (30 tablet ve 250 tablet)
- ✓ Tamoxifen tablet BP 10 mg (30 tablet)
- ✓ Tamoxifen tablet BP 10 mg (30 tablet)
- ✓ Tamoxifen tablet BP 20 mg (30 tablet)
- ✓ Tamoxifen Teva 20 mg (30 tablet)
- ✓ Tamoxifencell 10 mg (30 tablet ve 100 tablet)
- ✓ Tamoxifencell 20 mg (30 tablet ve 100 tablet)⁹³

2.2.6.1.6. Tamoksifenin Yan Etkileri

En belirgin yan etkiler menapozal semptomlar şeklindedir. Ateş basması, vajinal kuruluk, libido düşüklüğü, ruh hali dalgalanmaları ve baş dönmesi olarak bildirilmektedir⁹⁴.

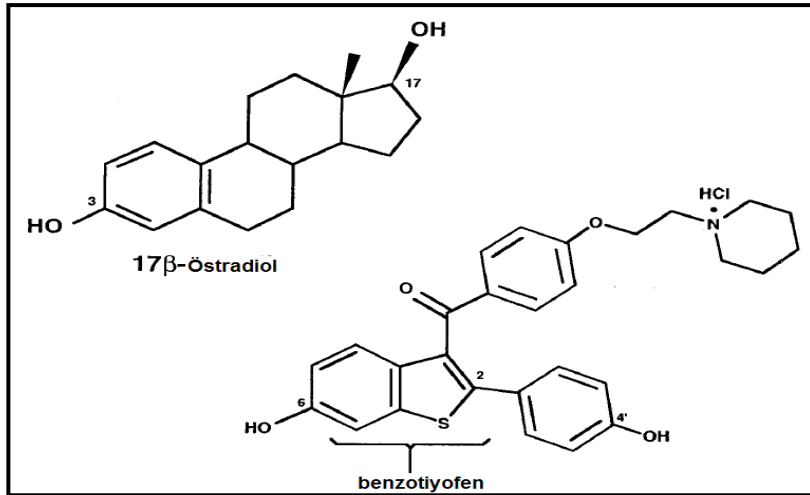
Tamoksifenin FDA gebelik kategorisi D'dir. Hamilelikte kullanımının düşüklere, vajinal kanamalara neden olduğu bildirilmiştir. Gebe kadınlarda kullanımı önerilmemektedir⁹⁵.

2.2.6.2. RALOKSİFEN HİDROKLORÜR

2.2.6.2.1. Raloksifenin Yapısı ve Özellikleri

Raloksifen hidroklorür, benzotiyazepin türevi bir bileşiktir⁹⁶. Molekül formülü $C_{28}H_{27}NO_4S$ ve molekül ağırlığı 473.6 g/mol'dür⁹⁷. Sudaki çözünürlüğü 0.000512 g/L olan beyaz-açık sarı bir tozdur^{98,100}.

Kemikler ve kan lipid seviyelerinde, meme dokusu ve uterusu uyarmaksızın östrojen etkilerini taklit eden selektif östrojen reseptör modulatorü (SERM) olarak etki gösteren bir ilaçtır⁹⁹. Şekil 9'de raloksifenin kimyasal şekli ve temel östrojen olan 17-β-östradiol görülmektedir⁹⁶.



Şekil 9. Raloksifen HCl ve 17-β-östradiol'ün kimyasal yapıları⁹⁶

2.2.6.2.2. Raloksifenin Kullanıldığı Yerler ve Etki Mekanizması

Tamoksifen ve raloksifen aynı gruba dahil olan bileşikler olmakla birlikte iki bileşiği birbirlerinden ayıran en önemli fark, raloksifenin östrojen etkilerini taklit ederken endometriumu uyarmamasıdır.

Tamoksifen meme tümörleri üzerinde olumlu etkileri açısından östrojen antagonisti olarak etkili iken endometrium üzerinde tıpkı östrojen gibi agonist etkili olmaktadır. Raloksifenin endometrium dokusunu uyarmadığı hem in vitro hem in vivo çalışmalarla kanıtlanmıştır^{101,102}. Ayrıca meme dokusu üzerindeki etkisi ise tamoksifen gibidir, yani meme tümörlerini küçültmekte ve koruyucu özellikte olduğu düşünülmektedir. Overleri alınmış sıçanlarda, tamoksifen östrojen benzeri uyarı oluştururken, raloksifenin bu etkiyi göstermemesi hatta östrojen ve/veya tamoksifene antagonist etki göstermesi önemli bir avantajdır^{54,103}.

Raloksifenin klinik kullanımı ve FDA onayı osteoporoz tedavisi ve korunmasında olmakla birlikte, belirtilen avantajları araştırmacıları, meme kanseri tedavisi ve korunmasında kullanımı üzerine çalışmaya itmiştir. Literatürde raloksifenin bu yönde olumlu sonuçlar verdiği görülmektedir^{101,102,104}. Tamoksifen ve raloksifen östrojen reseptörlerine bağlanarak etki göstermekle birlikte agonist etkilerinin yanı sıra antagonist etkilere de neden olmaktadır. SERM grubu bileşiklerde görülen bu farklı etki mekanizmalarının temel nedeni, östrojen reseptörlerine bağlanırken aktive ettikleri ya da ihtiyaç duydukları farklı endojen kofaktörler ve yapısal farklılıklar olduğu düşünülmektedir^{55,102,104}.

Östrojenin iskelet sistemi üzerindeki en belirgin etkilerini longitudinal ve radyal kemik gelişimi inhibisyonu şeklinde gösterir. Bu konuda menapoz sonrası dönemdeki kadınlarda yapılan bir çalışma olmamasına rağmen, sıçanlarda kemik uzamasının inhibisyonu, büyüme

ortamında incelenen kondrogenezis üzerine direkt etkinin bir sonucudur. Bu özellik, bisfosfonatlar ve kalsitonin gibi diğer kemik geri dönüşünü inhibe eden ajanlarda gözlenmemektedir. Sıçanlarda overlerin alınması ile başgösteren östrojen eksikliği, femurun longitudinal büyümesini tetiklemekte, raloksifen ise bu etkiyi tıpkı östrojen gibi baskılamaktadır. Raloksifen, östrojen eksikliğine bağlı olarak ortaya çıkan kemik rezorpsiyonunu engellemektedir. Raloksifenin overleri alınmış sıçanlarda, kronik kullanımda kemik direncini dengelediği de gözlenmiştir. Raloksifen ve östrojenin, 1 yıllık kullanımı sonucunda overleri alınmış sıçan omurgasında ve femoral boyunda biyomekanik özellikleri (kırığa yatkınlık) iyileştirmede etkili olduğu görülmüştür. Kemik rezorpsiyonundaki sinyal yollarında önemli iki önemli sitokin ve büyüme faktörü bulunmaktadır. Bunlar: IL-6 ve TGF β -3'tür. Raloksifenin bu sinyal yollarında da östrojen benzeri etki gösterdiği kanıtlanmıştır⁵⁵.

Raloksifenin vücuttaki farklı doku ve sistemler üzerine olan etkileri Tablo 5'de gösterilmiştir.

Tablo 5. Raloksifenin farklı dokulardaki agonistik ve antagonistik etkileri⁹⁶

DOKU	AGONİST ETKİ	ANTAGONİST ETKİ
İskelet	Evet	
Lipit	Evet	
Homeostaz	Evet	
Meme		Evet
Rahim		Evet
Vazomotor sistem		Evet

2.2.6.2.3. Raloksifenin Farmakokinetik Özellikleri

Raloksifenin farmakokinetik özellikleri incelendiğinde, farmakokinetik parametrelerin gıda alımı, yaş, kilo, sigara kullanımı, etnik

köken ve yaşa bağlı renal fonksiyonlarda azalmaya bağlı olmadığı görülmüştür^{55,99,105}.

Lineer farmakokinetik özellik göstermektedir. Raloksifen, oral alımını takiben hızla absorbe olur, glukuronidasyonla belirgin karaciğer ilk geçiş etkisine uğrar ve enterohepatik dolaşıma katılır. Oral tablet alımından sonra, yaklaşık %60 absorpsiyonuna rağmen biyoyararlanımı %2 olmaktadır^{55,99,105}.

Ortalama plazma konsantrasyonuna ulaşması ve biyoyararlanım sağlaması sistemik dönüşümüne ayrıca raloksifen ve aktif glukuronit metabolitlerinin enterosiklik dolaşıma katılmasına bağlıdır. Terapötik etkisi beslenme özelliklerinden etkilenmez^{55,99,105}.

Raloksifen vücutta yüksek oranda (serum, karaciğer, böbrekler, dalak, kemik, uterus) dağılır, anne sütüne geçer. Raloksifen ve iki monoglukuronit konjugatı plazma proteinlerine yüksek oranda (> %95) bağlanmakta (albumin, α -1 glikoprotein) fakat steroid yapılı kan proteinlerine (globülin) bağlanmamaktadır^{55,99,105}.

Raloksifenin insanda biyotransformasyon ve dağılım özellikleri ¹⁴C işaretli raloksifenle yapılan çalışmalarla incelenmiştir. Raloksifen karaciğer ilk geçiş etkisi sonucunda glukuronit konjugatlarına (raloksifen-4'-glukuronit (primer metabolit), raloksifen-6-glukuronit ve raloksifen-6, 4'-glukuronit) dönüşmektedir. Bu metabolitlerden başka metabolit gözlenmemesi, raloksifenin sitokrom P450 yolağını kullanmadığını göstermiştir. Raloksifen ve metabolitlerinin plazma konsantrasyon eğrilerinin log-lineer kısımlarının paralel oluşu, raloksifenin glukuronit metabolitlerine biyodönüşümünü kanıtlamıştır^{55,99,105}.

Görünür oral klerens 44.1 L/kg.saat olarak bulunmuştur. Oral görünür terminal eliminasyon yarı ömrü, intravenöz uygulamaya göre daha uzundur. Raloksifen ve glukuronit konjugatlarının geri dönüşlü biyotransformasyonu plazma eliminasyon yarıömrünün uzun olmasına (27.7 saat) neden olur. Raloksifen vücuttan feçes ile atılır, idrarla değişmeden atılan miktarı %0.2'den azdır. Glukuronat konjugatları, safra kanalına gider ve bakteriler aracılığıyla ana ilaca parçalanırlar. Uygulanan dozun %6'dan azı, glukuronit konjugatları halinde idrarda gözlenmiştir^{55,99,105}.

42-84 yaş arası kadınlarda yapılan çalışmalarda, farmakokinetik özelliklerinin özel popülasyonlarda farklılık göstermediği gözlenmiştir. Sadece hepatik disfonksiyonu olan hastalarda, plazma raloksifen konsantrasyonları 2.5 kat yüksek bulunmuştur. Sigara içen bireylerde klerens %20 fazla bulunmakla birlikte terapötik etkisinde anlamlı değişiklik bulunmamıştır^{55,99,105}.

Wempe MF ve arkadaşları, 2008 yılında yaptıkları çalışmada, çözünürlüğü çok düşük olan bir etkin madde olan raloksifeni, hidrosibutenil-beta-siklodekstrin (HBenBCD) ile formüle ederek, çözünürlüğünü ve dolayısıyla biyoyararlanımını artırmayı planlamışlardır. Erkek Wistar Hannover ratlarda yapılan çalışmada, farklı formülasyonlar denemişlerdir. Raloksifeni mikrokristalin selüloz ile formüle ederek %2.6, raloksifen:HBenBCD kompleksini kapsül içinde hayvanlara vererek %7.7, sıvı raloksifen:HBenBCD/PEG400/H₂O kompleksini kapsül içinde uygulayarak %5.7'lik oral biyoyararlanım sağlamışlardır. Çalışmalarını HBenBCD'nin raloksifenin oral biyoyararlanımını artırmada başarılı olduğu şeklinde yorumlamışlardır¹⁰⁶.

2.2.6.2.4 Raloksifen ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Raloksifen BCS II sınıfına mensup bir bileşiktir. Yapılan bir çalışmada, raloksifenin %2'lik düşük biyoyararlanımını artırmak için, siklodekstrinler kullanılarak biyoadeziv mikroküreler hazırlanmıştır. Raloksifenin siklodekstrinlerle kompleksleri oluşturulmuş ve bu kompleksler farklı oranlarda Carbopol ve HPMC içeren mikrokürelere hapsedilmiştir. Formülasyonlar Wistar tipi sıçanlara uygulanmış ve 30. dakikada keskin bir plazma piki elde edilmiştir. Hazırlanan mikroküre formülasyonu ile $[AUC]_{0-24\text{ s}}$ hesaplanmış ve 1,722.34 ng.s/mL olarak bildirmiştir. Toz raloksifen için elde edilen $[AUC]_{0-24\text{ s}}$ değeri, 318.28 ng.s/mL olarak belirtilmiştir. Yaklaşık 5 kat biyoyararlanım artışı sağlanmış ve bu formülasyonun raloksifenin farmakokinetik tablosunu iyileştirmede başarılı olduğu belirtilmiştir¹⁰⁷.

2011 yılında yapılan bir çalışmada, raloksifenin çözünürlüğünü artırmak için raloksifen yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi ile nanosüspansiyonları hazırlanmış ve hazırlanan süspansiyonları püskürterek kurutarak, raloksifen nanopartikülleri elde edilmiştir. Yaptıkları çözünürlük çalışmasında toz raloksifenin çözünürlüğünü %7.57, nanopartiküler sistemin çözünürlüğünü ise %30.67 olarak bulmuşlardır¹⁰⁸.

Yapılan bir çalışmada, raloksifen ile gliseril behanat kullanarak katı lipid nanopartiküller (SLN), gliseril behanat ve oleik asit kullanarak Y/S mikroemülsiyon tekniği kullanarak lipid nanopartiküller (NLC) hazırlanmıştır. pH 1.2, 6.8 ve 7.4'te in vitro salım çalışmaları yapılmıştır. pH 7.4'te 48 saatte en iyi salım profilini elde edilmiştir (%80). Formülasyonlar Wistar tipi sıçanlara uygulanmış, SLN'ler için 5.5 kat, NLC'ler için 3.5 kat biyoyararlanım artışı sağladığını bildirilmiştir¹⁰⁹.

Raloksifenin nazal ve pulmoner uygulanması ile ilgili innovatör firma olan Eli Lilly'ye ait patent başvurusu bulunmaktadır¹¹⁰.

2.2.6.2.5 Raloksifen İçeren Piyasa Preparatları

- ✓ Evista film kaplı tablet 60 mg (28 tablet)
- ✓ Ralien film kaplı tablet 60 mg (28 tablet)¹¹¹

2.2.6.2.6 Raloksifenin Yan Etkileri

Tedavinin başlamasını takiben ilk 6 ay için en çok bildirilen yan etki ateş basmasıdır. Bacak krampları, ayak ve eklem şişmeleri, terleme, Evista kullanıcıları tarafından en çok iletilen yan etkilerdir¹¹².

Raloksifenin, FDA hamilelik kategorisi X'tir. Yapılan hayvan çalışmaları, düşük doğum, fetusta kardiyak anomali, hidroensefali, hormon yapısında değişiklikler olabileceğini göstermiştir. İnsanlarda bu konuda yapılan bir çalışma yoktur. Gebe kadınların ya da gebe kalmayı planlayanların kullanması kontrendikedir, önerilmez¹¹³.

2.3. **Meme Kanserinde Matriks Metalloproteinaz Enzimleri**

Matriks metalloproteinaz (MMP) enzimlerinin insanda bilinen 17'den fazla türü vardır. Temelde benzer yapı ve fonksiyonları vardır. Yapıları 3 kısımdan oluşur. Bu kısımlar: Propeptid, katalitik kısım, çinko bağlayıcı korunaklı kısım olarak isimlendirilir. Kendi aralarında alt tipleri bulunmaktadır¹¹⁴. Bu alt tipler:

- Kollajenazlar (MMP-1, MMP-8, MMP-13)
- Gelatinazlar (MMP-2, MMP-9)
- Sitromelisinler (MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-12)

- Membran tip MMP'ler (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17)
- Ve diğlerleri (MMP-11, MMP-19, MMP-20)

Vücutta epitel hücreler, tümör hücreleri, stromal hücreler, hemopoietik hücreler ve tümör hücre membranları tarafından salgılanırlar. Latent formda salınırlar ve aktivasyonları için proteolitik enzimlere ihtiyaç duyarlar. Yara iyileşmesi, kemik yenilenmesi, kronik inflamasyon ve dejenaratif hastalıklarda etkilidirler¹¹⁴.

Tümör invazyonu ve metastazı, kanser hücrelerinin bazal membranı aşması, hücre içi stromasını geçmesi ve kan damarlarına veya lenfatik sisteme geçmesi gibi kompleks pek çok olayı kapsar^{114,115}. Tümör invazyonundan asıl sorumlu olan tiplerin, bazal membranı parçalayarak anjiogenezi başlatan MMP-2 ve MMP-9 olduğu bilinmektedir¹¹⁶.

MMP'ler tümör invazyonunda anahtar faktörlerdendir. Yara iyileşmesinde oldukça önemlidirler ancak, ekstraselüler ve membran ilişkili edopeptidaz yapılı bir aile olduklarından, tümör ilerleyişinde oldukça önemli rol oynarlar. Tümörlerde invazyon öncülü olan neoplastik keratositlerden salınırlar. Kanser hücreleri kendi salgıladıkları MMP'lerin yanı sıra çevre doku ve inflamasyonlu bölgelerin salgıladıkları MMP'lerden de faydalanırlar¹¹⁴.

MMP-2 (Jelatinaz A) ve MMP-9 (Jelatinaz B) yapı olarak diğler MMP'lerden farklıdırlar. Yapılarında birbiri ardına sıralı 3 adet Fibronektin II ünitesi ve jelatin bağlamayı sağlayan terminal amino grubu bulunmaktadır. MMP-2 ve MMP-9'un meme kanseri başlangıcı ve gelişiminde, onkojenler ve tümör supresörleriyle etkileşerek, tümörogenezisin erken fazlarında etkili olduğu bildirilmiştir¹¹⁵.

TIMP-1 (Metalloproteinaz doku inhibitörü) yaklaşık 30 kDa büyüklüğünde, glikozillenmiş bir protein yapısıdır. Gelişim, yapılanma ve patolojik proseslerin yapılanmasında görevlidir. TIMP-1'in bir görevi de, ekstraselüler ve hücre yüzeyi enzimlerinin (metalloproteinazlar) inhibe etmektir. Matriks metalloproteinaz enzimleri de bu sınıfa dahildir¹¹⁴.

Wang ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları bir çalışmada tamoksifenin, küçük hücreleri östrojen reseptör pozitif kanser tipinde, MMP-9/TIMP-1 oranını düşürdüğünü açıklamışlardır¹¹⁷.

2007 yılında yapılan başka bir çalışmada, raloksifenin düz kas ve makrofajlarda bulunan MMP-2, MMP-3 ve MMP-9 ekspresyonunu azalttığı ve yara oluşumunu etkilediği bildirilmiştir¹¹⁸. Yapılan bir diğer çalışmada, hormon replasman tedavisi alan postmenapozal kadınlarda, hormon replasman tedavisi almayan postmenapozal kadınlara göre daha yüksek MMP-2 ve MMP-9 seviyeleri gözlemlendiği belirtilmiştir¹¹⁹.

2.4. Kanser Tedavisinde Nanopartiküller

Nanoteknoloji, kanser, diyabet, solunum sistemi hastalıkları, oküler hastalıklar gibi kronik hastalıkların tedavisinde ve gen terapisinde her geçen gün daha fazla ilerlemektedir¹²⁰.

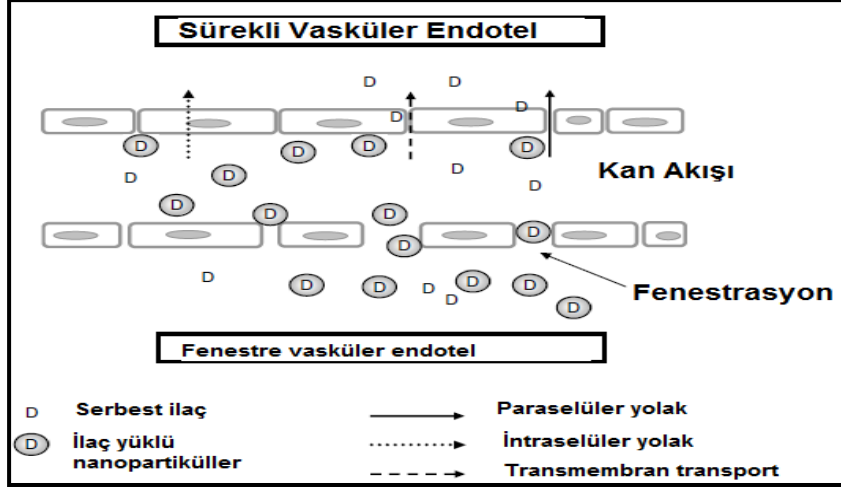
Nanopartiküller, etkin maddenin polimer matriks içinde dağıtılması veya polimer içine hapsedilmesiyle oluşturulan küçük polimerik koloidal yapılardır. Günümüzde en çok kullanılan nano boyutlu yapılar: Nanopartiküller, nanokapsüller, polimerik miseller, lipozomlar, dendrimerler, nanokristaller, magnetik nanopartiküller, quantum noktacıkları olarak sayılabilir¹²¹. Günümüzde farklı uyaranlara cevap veren pek çok özellikte polimer bulunmaktadır. Bu farklı özellikteki polimerlere örnekler Tablo 6'da görülmektedir¹²².

Tablo 6. Farklı uyaranlara cevap veren polimerlere örnekler

Uyaran tipi	Polimer
pH	Poli(2-hidroksietil metakrilat)
Sıcaklık	Poli(N-izopropilakrilamit)
Ultrasonik radyasyon	Poli(laktik-ko-glikolik) asit
Enzimler	Etilen-vinil asetat kopolimeri
Manyetik alan	Etilen-ko-vinil asetat
İnflamasyon	Hyaluronik asit hidrojeli
Kimyasal (örn:glikoz)	Akrilamit ve alil glikoz Akrilamidofenilboranik asit-N-izopropilakrilamit
Antijen konsantrasyonu	Akrilamit türevleri
Elektriksel konveksiyon	Kondrotin-4-sülfat
Elektriksel difüzyon	Hyaluronik asit hidrojeli
Elektroforez	Poli AMPS/BA
Işık	NIPAAm-co-Aam
Mekanik	Aljinat hidrojeli

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler için en önemli karakteristik parametrelerden biri partikül boyutudur. İntravenöz uygulanması düşünülen sistemler için, yüzey alanını genişletmek ve salım özelliklerini kontrol edebilmek için partikül boyutu 1 µm'den küçük olmalıdır. Nanopartiküller, epitel bariyerleri aştıktan sonra, hedef bölgesine ulaşmadan önce, biyodağılıma tabi olurlar ve vasküler yatakta ilerlemeye başlarlar. Uygulamadan sonra 20-30 nm'den daha küçük partiküller, böbreklere gider ve idrarla atılırlar. Daha büyük partiküller, karaciğer, dalak ve kemik iliğinde bulunan mononükleer fagositik sistem (MPS) hücreleri tarafından tutulurlar. 30-150 nm'lik partiküller kemik iliği, kalp, böbrek ve mideye ulaşır. 150-300 nm büyüklüğündeki partiküller ise karaciğer ve dalakta tutulur. Nanopartiküller endotel bariyerde bulunan fenestrasyon adı verilen boşluklardan dışarı kaçabilirler. Farklı doku ve organlarda bulunan veya patolojik hallerde oluşan fenestrasyonların büyüklükleri farklılık gösterir. Örneğin, fare karaciğer dokusunda bulunan fenestrasyon 150 nm iken, fareye tümör inokule edilmesiyle elde edilen tümörde 200-780 nm'lik fenestrasyonlara rastlanabilir¹²³.

Şekil 10'da serbest ilaç ve nanopartiküler sistemlerin damar sisteminde izleyebilecekleri yollar şematize edilmiştir.



Şekil 10. Vasküler sistemde hücre içine geçiş yolları

Literatür incelendiğinde mikro ve nanopartikül yapımında en çok kullanılan doğal polimerlerden biri olan kitozan dikkati çekmektedir¹²⁴⁻¹³¹.

Kitozan, katyonik yapıli bir doğal polisakkarittir. Biyoadezif, biyouyumlu, biyoparçalanabilir özelliktedir¹²⁵. Kitozanın başlıca özellikleri:

- ✓ Kontrollü ilaç salımı sağlayabilmesi
- ✓ Mukoadezif özellikleri
- ✓ İn situ jelleşme özelliği
- ✓ DNA transfeksiyonunu artırma özelliği
- ✓ Permeasyon artırma özelliği
- ✓ Efflux pompa inhibe etme özelliği
- ✓ Kolon hedefleme özelliği olarak sayılabilir.

Kitozanın oral, okuler, nazal, vajinal, bukkal, parenteral kullanımı da literatürde mevcuttur¹³².

Kitozan ile mikro/nanopartikül hazırlamada kullanılan başlıca yöntemler¹³³:

- Emülsiyon çapraz bağlanma
- Koaservasyon/Presipitasyon
- Püskürterek kurutma
- Emülsiyon damlacık koalesans
- İyonik jelleşme
- Ters miseller yöntemi
- Eleme metodu olarak sayılabilir.

2.5. Kanser Tedavisinde Lipozomlar

Lipozomlar, yaklaşık 40 yıl önce Bangham ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. Fosfolipitler hidrate edildiğinde veya sulu ortamda dağıtıdıklarında oluşan mikroskobik, küresel kesecikler olarak tanımlanmıştır¹³⁴. İlk keşfedildiği yıllarda biyolojik membran özellikleri ile ilgili çalışmalarda kullanılmış olan lipozomlar, günümüzde başta ilaç taşıyıcı sistem olmak üzere birçok bilim dalında farklı kullanım alanlarına sahiptir¹³⁵.

Lipozomlar, sulu kısmı lipit molekülleri tarafından oluşturulan membranla çevrilmiş mikropartiküler veya kolloidal lipit keseciklerdir. Lipozom oluşturmak için genellikle fosfolipitler kullanılır. Lipozom veziküllerinin çapları nanometre ile mikrometre boyutları arasında değişiklik gösterir. Lipozomlar, biyogeçimli ve biyoparçalanan özellikteki lipit içerikleri sayesinde hücre membran yapısına benzerlik gösterir ve benzerlik derecesi çeşitli kimyasal modifikasyonlarla arttırılabilir. Bu özellikleri sayesinde, ilaç hedeflendirme çalışmalarında ve immun modülasyonunda yaygın olarak kullanılırlar^{136,137}.

Lipozomların başlıca avantajları:

- Lipozomlar fosfolipit yapısında olduklarından, biyomembranlara benzerlik gösterir. Bu sayede biyogeçimli ve biyoparçalanabilir özelliktedirler, immunojenite ve toksisite söz konusu değildir.
- Düşük dozlarla terapötik etki elde edilmesine olanak sağlarlar
- Plazma etkin madde seviyesini istenen süre boyunca terapötik düzeyde tutabilirler, bu sayede dozlama aralığı uzatılmış olur
- Yan ve toksik etkileri azaltabilirler veya tamamiyle ortadan kaldırabilirler.
- Etkin maddenin enzimatik etkilerden korunmasını sağlarlar.
- Kısa yarı ömre sahip maddelerin yarılanma ömrünü uzatırlar.
- Hem lipofilik hem de hidrofilik özellikteki maddeleri taşıma özelliğine sahiptirler
- İlacı hedeflendirmek için kullanılabilirler.
- Lipozomlar, içine hapsedilmiş etkin maddelerin farmakokinetik özelliklerini değiştirirler. Lipozom içine hapsedilmiş etkin maddenin; absorpsiyon, dağılım ve eliminasyon özellikleri serbest etkin maddeden tamamiyle farklıdır¹³⁸.

Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan FDA tarafından onaylı pek çok lipozomal sistem ticari olarak bulunmaktadır. Bunlara örnek olarak: DOXIL, Daunosomes, Ablet, Amphotech ve AmbiSome verilebilir

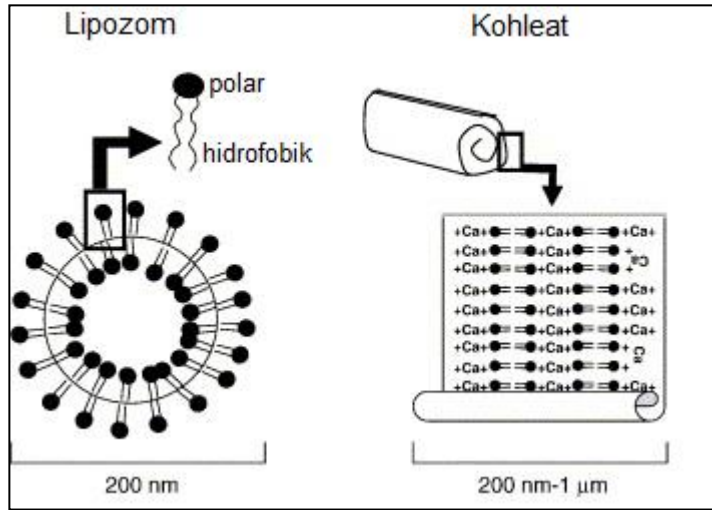
139 .

2.6. Kohleatlar

Kohleatlar, negatif yüklü fosfatidilserin (PS) lipozomlarının iki değerlikli katyonik iyonlar (örn- Ca^{+2}) varlığında oluşturduğu, içinde sulu faz içermeyen silindirik yapılardır. Kohleat silindirlerin oluşum mekanizması iki değerli iyonların sağladığı füzyon ve lipozomların içeriğini salmalarıdır. Lipozomların füzyon özellikleri Ca^{+2} ve PS oranına bağlıdır. Hem küçük

hem de daha büyük moleküller kohleat şeklinde formüle edilebilir. Lipit tabakalar arasında veya üstünde tutunabilir. Diğer lipidik ilaç taşıyıcı sistemlerle örneğin lipozomlarla karşılaştırıldıklarında stabiliteleri daha yüksektir^{140,141}.

Kohleatların birbiri üzerine sarılmış belirgin, katı, lipit tabakaları vardır. Şekil 11’de lipozom ve kohleatların şematik görüntüsü görülmektedir¹⁴².



Şekil 11. Lipozom ve kohleatların şematik görüntüsü

2.7. Hücre Kültürleri

Hücre kültürü terimi temel olarak, orjinal bir dokudan alınan disperse hücrelerden, primer kültürlerden veya bir hücre serisinden/soyundan; enzimatik, mekanik veya kimyasal disagregasyonla elde edilen hücrelerin çoğaltılması işlemi olarak ifade edilebilir¹⁴³.

Hücre kültürleri kullanılarak yapılan ilaç geçiş (transport) çalışmalarının uygulaması kolay ve in vivo korelasyonu yüksek olması,

yapı-absorbsiyon çalışmalarında kullanımını her geçen gün arttırmaktadır¹⁴⁴.

2.7.1 Hücre Kültür Sistemlerinin Hayvan Deneilerine Üstünlükleri

1. Çok daha fazla sayıda madde örneğini inceleme olanağı vardır.
2. Deneyler için ihtiyaç duyulan ilaç miktarı azdır.
3. İşlemler hızlı gerçekleştirilebilmektedir.
4. Daha fazla sayıda maddenin çalışılmasına imkan sağlamaktadır.
5. Geçiş mekanizması değerlendirilebilir.
6. Geçiş çalışmaları sırasında metabolizma olayları değerlendirilebilir.
7. Hücre toksisitesi erken teşhis edilebilir.
8. Patolojik koşullar yaratılarak moleküler mekanizmalar aydınlatılabilir.
9. Yapı-geçiş özellikleri arasındaki ilişkilerin geliştirilmesi sağlanabilir.
10. Önformülasyon aşamasında formülasyona eklenen yardımcı maddelerin, absorbsiyon arttırıcıların absorbsiyon üzerine etkileri incelenebilir¹⁴³.
11. Analitik çalışmalar kolaylaşır¹⁴⁵.

2.7.2. Hücre Kültürü Çalışmalarında Genel Olarak Önemli Olan Noktalar

146

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

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

5. Hücre dizininin heterojenitesi
6. Hücre dizininin farklılaşabilme özelliği

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

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

Geçiş mekanizması çalışmalarında ortamda bulunan maddeler dikkatlice seçilmelidir; çünkü hücre özelliklerini etkileyebilirler. Bu yüzden kullanılan çözeltinin konsantrasyonu, sıcaklık, pH, metabolik enerji kaynaklarının varlığı/yokluğu, ortamdaki iyonlar, çözücülerle etkileşebilecek proteinlerin varlığı/yokluğu ve çözeltinin tek tabakanın apikal veya basolateral kısmına eklendiği çok önemlidir¹⁴⁶.

2.7.3. Hücre Kültür Çalışmalarında Ortam Seçimi

Hücre kültürleri ile yapılan ilk çalışmalarda dokulardan elde edilen doğal ortamlar veya vücut sıvıları kullanılmıştır (tavuk yumurtası embriyo ekstraktı, serum, lenf). Hücre serileri oluşturuldukça daha fazla ortama ihtiyaç duyulmuş ve bu da kimyasal yollarla ortamlar hazırlama ve bu ortamları kullanmayı gerektirmiştir¹⁴³.

Günümüzde hücre kültürü çalışmalarında yaygın olarak kullanılan ortamlar: MEM (Eagle's Minimum Essential Medium), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), F12, DMEM/F12, α MEM, CMRL

1066, RPMI(Rapid Prototyping&Manufacturing Institute) 1640, M199, L15, McCoy's 5A, Fischer, MB752/1, NCTC 135, Ham's F-10'dur^{143,147}.

2.7.4 Kùltür Ortamının Fizikokimyasal Özellikleri

1. pH: Optimum pH değeri hücre soylarının tiplerine ve özelliklerine göre değışiklik göstermektedir. Optimum pH genellikle özel deneylerle belirlenir. Hücrelerin ihtiyaç duyduğu pH değeri genellikle 7.4'tür.
2. CO₂ ve Bikarbonat: Gaz fazındaki karbondioksit ortamda çözünmüş halde bikarbonatla denge halinde bulunur ve pH'yı düşürür. Çözünmüş CO₂, HCO₃⁻ ve pH birbirleriyle ilişkili olduklarından karbondioksitin doğrudan etkisini belirlemek zordur. Kùltürün açık veya kapalı kaplarda yapılıyor oluşu, hücrelerin konsantrasyonlarının düşük veya yüksek oluşu, havalandırmanın bulunup bulunmaması gibi faktörler CO₂ ve HCO₃⁻ miktarlarını belirler.
3. Tamponlama: Tamponlama pH'nın sabit tutulmasını sağlar. Özellikle iki durumda mutlaka tamponlama yapılmalıdır.
Açık kaplarda çalışılıyorsa (CO₂ ortam pH'sını düşürür) tamponlama yapılmalıdır.
Eğer ortamda kùltür sırasında laktik asit ve CO₂ ortaya çıkıyorsa tamponlama yapılmalıdır.
4. Oksijen: Kùltürde kullanılan hücrelerin aerob veya anaerob özellikte olmalarına göre kùltürlerin oksijen ihtiyaçları değışkenlik gösterir.
5. Osmolalite: Kùltürü yapılan hücreler genellikle osmotik basınca dayanıklı özelliktedirler. Pratikte 260 mOsm/kg ± 10 mOsm/kg ile 320 mOsm/kg ± 10 mOsm/kg arasında osmolalite değeri çoğu hücre için idealdir.

6. Sıcaklık: Hücre kültürlerinin sıcaklıkları bazı faktörlere bağlı olarak değişir:

Hücrelerin sağlandığı hayvanın vücut sıcaklığı, vücut sıcaklığındaki anatomik değişiklikler ve kullanılan inkübatörün güvenlik ayarına bağlı olarak değişir.

Genellikle tüm insan ve sıcakkanlı hayvanlardan sağlanan hücrelerle oluşturulan seriler için 37°C ve güvenlik için biraz daha düşük sıcaklıklar uygundur.

7. Viskozite: Ortamın viskozitesi genellikle serum içeriğine bağlı olarak değişir ve çoğu zaman hücre büyümesi açısından önem arz etmez. Ancak çalkalama, karıştırma, tripsinizasyon sonrası hücre ayrışması gibi durumlarda önem kazanır.
8. Yüzey gerilimi ve Köpük Oluşumu: Köpük oluşumunun etkileri tam olarak tanımlanmamakla birlikte protein denatürasyonunu artırdığı, gazların difüzyon hızını sınırladığı düşünülmektedir¹⁴³.

2.7.5. Hücre Kültür Ortamlarının Bileşenleri¹⁴³

- a. Aminoasitler (sistein, tirozin, vb)
- b. Vitaminler(biotin, folik asit, vb)
- c. Tuzlar(Na^+ K^+ Ca^{2+} Cl^- PO_4^{3-} vb)
- d. Glukoz
- e. Organik bileşikler
- f. Hormonlar ve büyüme faktörleri
- g. Antibiyotikler(Gentamisin, Eritromisin, Amfoterisin B,vb)

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

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

h. Serum

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

Avantajlar¹⁴³

1. Serum içeren ortamda büyüme daha hızlı gerçekleşir
2. Serum içermeyen ortamdaki hücrelerde fenotipik değişimler meydana gelebilir.

Dezavantajlar^{143,148}

1. Serum bileşenlerinin fizyolojik değişkenliği
2. Farklı parti serumlar raf ömrü ve davranış farklılıkları gösterebilir. Genel olarak serumun raf ömrü kısadır (max. 1 yıl)

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

2.7.6. Hücre Kültürlerinde Kullanılan Membranlar

Spesifik bir biyolojik bariyeri taklit etmek için bir hücre kültürü modeli oluştururken iyi bir hücre soyunun yanı sıra mikroporlu bir membrana ihtiyaç duyulur. Bu membran hücrelerin birbirine bağlanmasını ve büyümelerini sağlayacak bir matriks materyali (örneğin kolajen) içerebilir ya da matriks materyal ayrıca membrana uygulanabilir. Günümüzde farklı yüzey alanlarına ve por büyüklüğüne sahip, değişik materyallerden yapılmış membranlar(nitroselüloz, polikarbonat) piyasada bulunmaktadır^{146,149}.

İdeal bir mikroporlu membranın göstermesi gereken özellikler¹⁴⁶:

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

2.7.7. Caco-2 Hücre Serisinin Özellikleri

Caco-2 hücreleri insan kolon karsinoma hücreleridir. Caco-2 hücreleri aynı kaynaktan elde edilen diğer hücre serilerinden farklı özellik gösterirler. Bu hücreler plastik kaplarda veya filtrelerde yetiştirildiğinde düzgün bir tek tabaka oluşturarak ince barsak normal enterositlerin morfolojik özelliklerini kazanırlar¹⁵⁰⁻¹⁵³. Oluşan tek tabakalar morfolojik polarite gösterir ve hücrelerin apikal kısmında fırça yüzey membranı oluşur^{151,154}. Hücreler, 2-3 hafta içinde tek tabaka haline gelir, yüksek seviyede fırça yüzey membran yüzey enzimleri(aminopeptidaz, alkalın fosfataz, sükröz, dipeptil aminopeptidaz, γ -glutamil trans peptidaz, sitozolik faz II enzimleri), mikrozomal sitokrom P450 izozimleri ve iyi bağlantı kompleksleri oluştururlar^{152,155}. Ayrıca, Caco-2 hücrelerinde ince barsakta var olan pek çok aktif taşıma sisteminin (şekerler, aminoasitler, dipeptidler, safra tuzları ve kobalamin intrinsik faktör) varlığı gösterilmiştir¹⁵⁵.

Caco-2 modeli ile çalışılırken; bazolateral kısımdan apikal kısma veya hem bazolateral kısımdan apikal kısma, hem de apikal kısımdan bazolateral kısma ilaç geçişi incelenebilir¹⁵⁶⁻¹⁵⁸.

Caco-2 hücreleri intestinal ilaç geçişi ve metabolizmasının incelenmesinde, yeni bilgilerin elde edilmesinde in vitro bir model olarak kullanılmaktadır. Bu modelle elde edilen sonuçların in vivo yapı-absorpsiyon çalışmalarıyla elde edilen sonuçlarla yüksek korelasyon

sağlaması^{144,150,152}, modelin yapı-absorpsiyon çalışmalarında kullanımına olanak sağlar.

İlaçların oral absorpsiyonlarının başarılı bir şekilde değerlendirilmesi ilaç geliştirme çalışmalarının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Günümüzde ilaç firmalarınca, ilaç geliştirme çalışmalarında ve önformülasyon aşamasında yardımcı maddelerin özellikle absorpsiyon arttırıcıların¹⁵⁹, kosolvanların seçiminde Caco-2 hücrelerinden yararlanılmaktadır¹⁴⁴.

2.7.8. MCF-7 Hücre Serilerinin Özellikleri

MCF-7 hücre serisi, 69 yaşında Kafkas ırkından bir kadının meme karsinomunun metastatik bölgesinden plevral infüzyon ile elde edilmiştir. Epitel hücre morfolojisi gösterirler. Büyüme özellikleri aderendir. Hücre sayısının iki katına çıkması için gereken süre 29 saattir. Wnt7h + onkogeni vardır. 0 Rh+ kan grubu antijenlerini eksprese eder. İnsulin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinler (IGFBP) BP-2, BP-4, BP-5 üretirler.

MCF-7 hücre serileri, farklılaşmış meme epitel hücre benzeri özelliklerini korur. Sitoplazmik östrojen reseptörleri bulunmaktadır. Bu reseptörlerle Östrojeni bağlayabilme ve işleyebilme özellikleri taşır.

MCF hücre serilerinin büyümesi TNF- α (Tumor Necrosis Factor) tarafından inhibe edilir. IGFBP salgıları antiöstrojenik bileşikler tarafından kontrol edilebilir¹⁶⁰.

MCF-7 hücre serileri, östrojen pozitif meme tümörüne yönelik ilaç geliştirme ve geçişi çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır^{89,92,160-164}.

2.7.9. MDA-MB-231 Hücre Serilerinin Özellikleri

MDA-MB-231 hücre serisi, 51 yaşında Kafkas ırkından bir kadının meme karsinomunun metastatik bölgesinden plevral infüzyon ile elde edilmiştir. Epitel hücre morfolojisi gösterirler. Büyüme özellikleri aderendir. Tümörojenik özelliği vardır. Çıplak farelerde ve ALS uygulanmış farelerde az farklılaşmış üçüncü seviyede tümör (adenokarsinom) oluşturma özelliği vardır. EGF ve TGF reseptörlerini eksprese etme yeteneğindedir. 0 Rh - kan grubu antijenlerini eksprese eder¹⁶⁵.

MCF-7 hücre serisine göre daha agresif bir kanser hücre dizisidir. İnvazyon ve metastaz yeteneği (örn: kemik iliğine) daha fazladır^{166,167}.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Etkin Maddeler

• Tamoksifen sitrat (TAM)	Sigma, ABD
• Raloksifen hidroklorür (RLX)	Sigma, ABD

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1,2-dioleil- <i>sn</i> -glisero-3-fosfo-L-serin (DOPS)	Avanti Polar Lipids Inc, ABD
Asetonitril	Merck, Almanya
Dekstran (M.A:500000)	Sigma, ABD
Dimetil- β -Siklodestrin	Sigma, ABD
Dipotasyum Hidrojen Fosfat (K_2HPO_4)	Merck, Almanya
Diyaliz Membran (M.A< 12000 Da)	Sigma, ABD
Dubelco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Biochrom, Almanya
Eosin	Sigma, ABD
Etil Asetat	Merck, Almanya
Fetal Calf Serum	Biochrom, Almanya
Formaldehit	Merck, Almanya
Gentamisin (10 mg/ml)	Sigma, ABD
Glasiyel Asetik Asit	Merck, Almanya

Hematoksin	Sigma, ABD
İsopropil Alkol (İsopropanol)	Merck, Almanya
Kalsiyum Klorür ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Almanya
Kitozan (≥ 75 deasetil)	Sigma, ABD
Kloroform	Merck, Almanya
L- α -Dipalmitoil Fosfatidil Kolin (DPPC)	Avanti Polar Lipids Inc, ABD
Metanol	Merck, Almanya
MTT	Sigma, ABD
(3-(4-5-dimetiltiyazol-2-il)-2-5-difenil-tetrazolyum bromit)	
Orto-fosforik asit	Sigma, ABD
Polietilen Glikol (PEG) 8000	Sigma, ABD
Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4)	Merck, Almanya
Propilen Glikol	Merck, Almanya
RPMI 1640	Biochrom, Almanya
Sodyum bikarbonat (NaHCO_3)	Merck, Almanya
Sodyum Dihidrojen Fosfat (Na_2HPO_4)	Merck, Almanya
Sodyum Hidroksit	Merck, Almanya
Sodyum Taurokolat	Sigma, ABD
Tripolifosfat (TPP)	Merck, Almanya

3.1.3. Kullanılan Alet ve Malzemeler

Etüv	Haraeus
Etüv (CO ₂ 'li)	Haraeus
Difüzyon sistemi	Harvard Aparatus Co.
Direnç ölçüm aleti	Evohm® Voltmeter
HPLC(Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi)	Thermo Finnigan, Shimadzu
Surveyor PDA dedektör	
Surveyor otosampler	
Surveyor LC pompa	
HP 1015 Laserjet yazıcı	
Hücre Kültürü Sarf Malzemeleri	Granier GmbH
Flasklar (25 cm ² ve 75 cm ²)	
Steril pipetler	
Santrifüj tüpleri (15 ve 50 mL'lik)	
Cryo tüpler (2 mL)	
96 gözlü plakalar	
Corning Snapwell Insert (3407)	Corning Costar®, ABD
Laminar akış	Telstar Bio-II-A
Partikül büyüklüğü ve Zeta Potansiyel	Malvern Zeta Sizer- Nano
Ölçüm aleti	ZS
pH-metre	pH Meter CG 840
Süzme kiti (vakum pompası)	Alltech

0.22 µm naylon filtre	Millipore®
Terazi	Shimadzu AW 320
Termostatlı ısıtıcı	Heidolph
Ultrasonik banyo	Brainsonic 221
UV Spektrofotometresi	Shimadzu UV 1700
Vakum Pompası	Laborbedorf Erich Wiegard
Rotaevaporatör	Heidolph
Ultrasantrifuj	Jouan KR 221
Elektron mikroskobu	Carl Zeis EM 900
Bidistile Su Ünitesi	Millipore®
Ultrasonik Banyo	Bransonic 221
Manyetik Karıştırıcı	Snijders
FT-IR Spektrometre	Brouker
Vorteks	Nüve-NM 110
Franz Difüzyon Hücreleri	Çalışkan Cam
Human MMP-2 Elisa Kiti	Ray®Biotech

3.2. YÖNTEM

Tez çalışmamız, raloksifen hidroklorür etkin maddesi ile yapılan çalışmalar ve tamoksifen sitrat klorür ile yapılan çalışmalar olmak üzere iki ana bölümden oluşmaktadır. Öncelikle raloksifen hidroklorür ve tamoksifen sitrat ile yapılan çalışmaların yöntemleri, ardından da bulguları ayrı ayrı verilecektir.

Yöntem kısmındaki ortak bölümler raloksifen hidroklorür ile yapılan çalışmalar kısmında anlatılacak ve tamoksifen sitrat kısmında da o bölüme atıf yapılacaktır.

3.2.1. Raloksifen hidroklorür Etkin Maddesi ile Yapılan Çalışmalar

3.2.1.1. Raloksifen hidroklorür Etkin Maddesi ile Yapılan İn Vitro Çalışmalar

3.2.1.1.1. Raloksifen Hidroklorürün Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi

Raloksifen hidroklorür miktar tayini için HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) (Shimadzu) analizi kullanıldı. HPLC yöntemi; etkin maddenin hücre kültüründen geçiş çalışmalarında, in vitro diyaliz membran geçiş çalışmalarında, in vivo çalışmalarda ve stabilite çalışmalarında kullanıldı.

HPLC analizlerine başlamadan önce raloksifen hidroklorür için UV spektrofotometre kullanılarak, 200 – 400 nm arasında dalga boyu taraması yapıldı. Dalga boyu taraması yapmak amacıyla raloksifen hidroklorürün; hücre kültürü geçişlerinde kullanılan ortam olan Propilen

Glikol/Dulbecco's Modifies Eagle Medium (PG/DMEM)(%60/%40) ve diyaliz membran-Franz difüzyon hücrelerinden geçiş deneylerinde kullanılan ortam olan pH 7.4 fosfat tamponunda 50 µg/ml konsantrasyonda çözeltileri hazırlandı. Dalga boyu taraması, 1 cm'lik kuvarz küvetler kullanarak pH 7.4 fosfat tamponu ve PG/DMEM (%60/%40) körlerine karşı yapıldı. Raloksifenin HPLC'de miktar tayini koşulları Tablo 7'de görülmektedir.

Tablo 7. Raloksifen hidroklorürün HPLC ile miktar tayini koşulları¹⁶⁸

KOLON	ACE 5 C18, 4.6x250 mm
Mobil Faz	(50mM fosfat tamponu (pH sı o-fosforik asitle 3'e ayarlanır) asetonytril.(%64:%36)
Kolon Sıcaklığı	37°C
Akış Debisi	0.7 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	125 µL
Dalga Boyu	287 nm
Alıkonma Zamanı	8.5 dk

3.2.1.1.1.1. Raloksifen Hidroklorürün HPLC ile Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

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

Validasyon işlemleri hem hücre geçiş çalışmalarında kullanılacak PG/DMEM içerisinde, hem de diyaliz membrandan geçiş çalışmalarında kullanılacak pH 7.4 fosfat tamponunda hem de in vivo çalışmalar için plazmada gerçekleştirildi. Tablo 7'de HPLC yönteminin

koşulları verilmiştir¹⁶⁸. Bu koşullarla, validasyon çalışması yapılmış ve aşağıdaki parametreler incelenmiştir.

3.2.1.1.1.1. Doğrusallık

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

Raloksifen hidroklorürün PG/DMEM (%60:%40) içerisinde 10 farklı derişimde (25-0.012 µg/mL) 6 ayrı seri çözeltisi hazırlandı ve HPLC'ye enjekte edildi. Pik alanları bulundu. Raloksifen hidroklorür derişimlerine karşılık elde edilen pik alanlarına doğrusal en küçük kareler yöntemi uygulandı. Standart doğru denklemi elde edildi. Gerekli istatistiksel parametreler hesaplandı.

Raloksifen hidroklorürün pH 7.4 fosfat tamponu içerisinde 10 farklı derişimde (25-0.012 µg/mL) 6 ayrı seri çözeltisi hazırlandı ve HPLC'ye enjekte edildi. Pik alanları bulundu. Raloksifen hidroklorür derişimlerine karşılık elde edilen pik alanlarına doğrusal en küçük kareler yöntemi uygulandı. Standart doğru denklemi elde edildi. Gerekli istatistiksel parametreler hesaplandı.

İn vivo numunelerin analizi için, farelerden alınan kan, alır almaz santrifüj edilerek plazma ayrılmıştır. Plazma deneyde kullanılıncaya kadar -70°C'de derin dondurucuda bekletilmiştir. Deneyde kullanılacağı zaman derin dondurucudan çıkartılıp oda sıcaklığına getirilerek erimesi sağlanmıştır.

Örnekler, literatürde belirtildiği gibi, 200 µl plazmaya, 100 µl metanol, 400 µl asetonitril ve 200 µl değişik konsantrasyonlarda raloksifen içeren çözeltiler ilave edilerek hazırlanmıştır. Numuneler 30 sn vorteksle karıştırıldıktan sonra 10 dk süreyle +4°C sıcaklıkta 15000 rpm'de santrifuj edilmiştir. Santrifüjün ardından üstteki berrak kısım ayrılmış ve Tablo 7'de belirtilen koşullarda HPLC'ye enjekte edilmiştir¹⁶⁹. Raloksifen hidroklorürün plazma içerisinde 10 farklı derişimde (25-0.012 µg/mL) 6 ayrı seri çözeltisi hazırlandı ve HPLC'ye enjekte edildi. Pik alanları bulundu. Raloksifen hidroklorür derişimlerine karşılık elde edilen pik alanlarına doğrusal en küçük kareler yöntemi uygulandı. Standart doğru denklemi elde edildi. Gerekli istatistiksel parametreler hesaplandı.

3.2.1.1.1.1.2. Doğruluk ve Geri Elde

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

Raloksifen hidroklorürün, PG/DMEM (%60/%40) içerisinde hazırlanan %80, %100 ve %120 raloksifen hidroklorür içeren çözeltilerinden kalibrasyon denklemi kullanılarak geri elde edilen miktarları hesaplandı.

Raloksifen hidroklorürün, pH 7.4 fosfat tamponu içerisinde hazırlanan %80, %100 ve %120 raloksifen hidroklorür içeren çözeltilerinden kalibrasyon denklemi kullanılarak geri elde edilen miktarları hesaplandı.

Raloksifen hidroklorürün, plazma içerisinde hazırlanan %80, %100 ve %120 raloksifen hidroklorür içeren çözeltilerinden kalibrasyon denklemi kullanılarak geri elde edilen miktarları hesaplandı.

Geri elde edilen miktarlar hesaplanarak, gerekli istatistiksel parametrelerle değerlendirildi.

3.2.1.1.1.1.3. Kesinlik

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

a. Deney İçi Kesinlik

Raloksifen hidroklorürün kalibrasyon doğru denklemini oluşturmak için PG/DMEM (%60/%40) içerisindeki stok çözeltisinden uygun seyreltmeler yapılarak hazırlanan çeşitli derişimdeki çözeltilerin, herhangi bir derişimde olan örneklerinden biri HPLC'ye ardı ardına 10 kere enjekte edildi.

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

Raloksifen hidroklorürün kalibrasyon doğru denklemini oluşturmak için plazma içerisindeki stok çözeltisinden uygun seyreltmeler

yapılarak hazırlanan çeşitli derişimdeki çözeltilerin, herhangi bir derişimde olan örneklerinden biri HPLC'ye ardı ardına 10 kere enjekte edildi.

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

b. Deneyler Arası Kesinlik

Raloksifen hidroklorürün PG/DMEM (%60/%40) içerisindeki 25, 6.25, 1.56, 0.39 µg/mL derişimlerde çözeltileri hazırlandı. Bu numuneler birbirini takip eden 3 gün içerisinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edildi. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen derişimlerin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

Raloksifen hidroklorürün pH 7.4 fosfat tamponu içerisindeki 25, 6.25, 1.56 ve 0.39 µg/mL derişimlerde çözeltileri hazırlandı. Bu numuneler birbirini takip eden 3 gün içerisinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edildi. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen derişimlerin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

Raloksifen hidroklorürün plazma içerisindeki 25, 6.25, 1.56 ve 0.39 µg/mL derişimlerde çözeltileri hazırlandı. Bu numuneler birbirini takip eden 3 gün içerisinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edildi. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen derişimlerin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

3.2.1.1.1.1.4. Özgünlük ve Seçicilik

Kullanılan analiz yönteminin sadece analiz etmek istenilen maddeyi saptaması gerekmektedir. Numune içinde var olan diğer

maddelerin aynı dalga boyunda saptanıp saptanmadığının kontrolü yapılmalıdır.

Bu amaçla, dimetil- β -CD ve sodyum taurokolatın 50 $\mu\text{g/mL}$ 'lik çözeltileri hazırlandı ve 287 nm'de HPLC'ye enjekte edildi.

3.2.1.1.1.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı

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

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

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

σ : kalibrasyon aralığındaki en düşük derişimin standart sapması

S: kalibrasyon eğrisinin eğimi

3.2.1.1.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Analizi

Çalışmalar, DSC (Differential Scanning Calorimetry) kullanılarak 10°C/dk tarama hızında ve 300°C'ye kadar yapıldı. Etkin maddeler ve formülasyon hazırlamada kullanılan tüm yardımcı maddelerin tek başına ve etkin maddeyle 1:1 oranındaki karışımları kullanarak yapıldı. Örnekler 2 mg tartılarak alüminyum örnek kaplarına kondu. Alüminyum kapak kapatılarak pellet basılmasının ardından aletin ısıtma hücresine yerleştirildi. 20-300°C sıcaklık aralığında azot atmosferi altında ölçümler gerçekleştirildi. DSC çalışmalarında, Raloksifen ile 1:1 oranında karışımları kullanılan maddeler:

- Dimetil- β -siklodekstrin
- Sodyum taurokolat

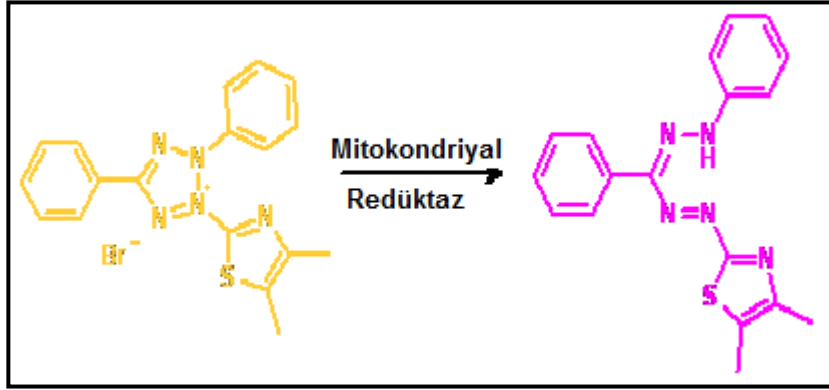
- Kitozan
- Sodyum tripolifosfat
- Dipalmitoil fosfatidil kolin (DPPC)
- Dioktil fosfatidil serin (DOPS)
- Polietilen glikol 8000 (PEG 8000)
- Dekstran
- Kalsiyum klorür dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

3.2.1.1.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.2.1.1.3.1. MTT (Sitotoksosite) Testleri

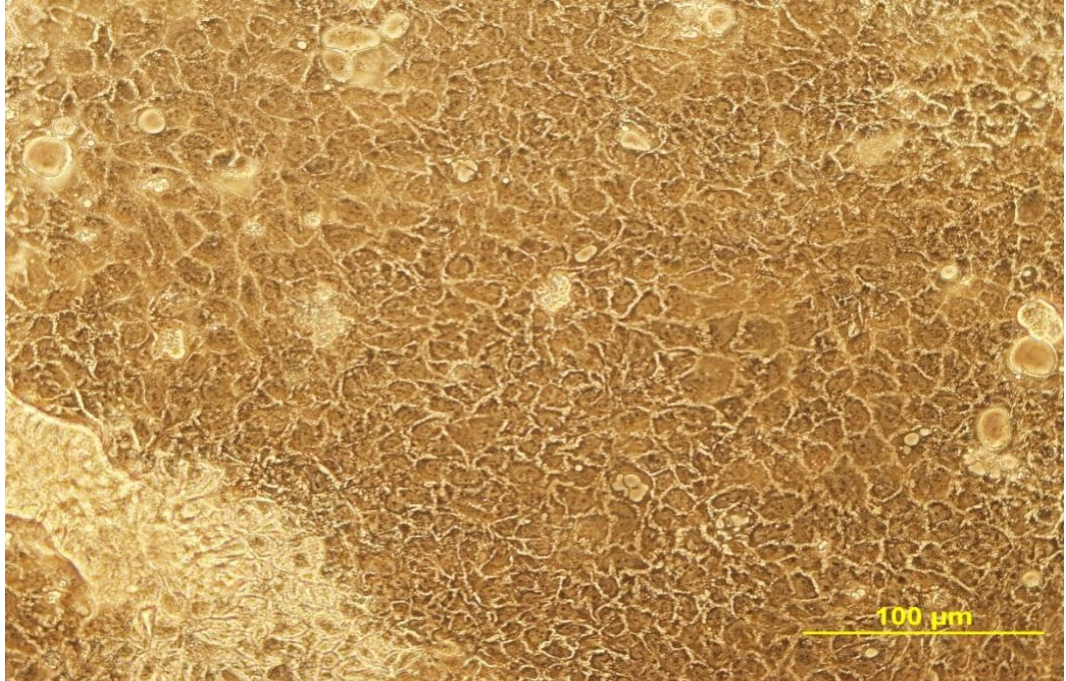
Gelişme fazındaki hücreler, sitotoksik ilaca maruz bırakılır. Hücrelerin ilaca maruz kalacağı süre genellikle maksimum hücre hasarının oluşması için gereken süredir ki; bu süre aynı zamanda ilacın stabilitesine de bağlıdır. İlacın uzaklaştırılmasından sonra, hücrelerin 2-3 kez bölünmesi için belli bir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

MTT testinin esası, sarı renkli çözünebilir özellikteki MTT boyasının, metabolik olarak aktif olan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat dehidrogenaz (SDH) enzimi ile koyu mavi renkli çözünmez özellikteki formazan ürününe dönüşmesidir(Şekil 12). Oluşan formazan ürünü çözünür hale getirilir ve oluşan mor renk spektrofotometrik olarak ölçülür.

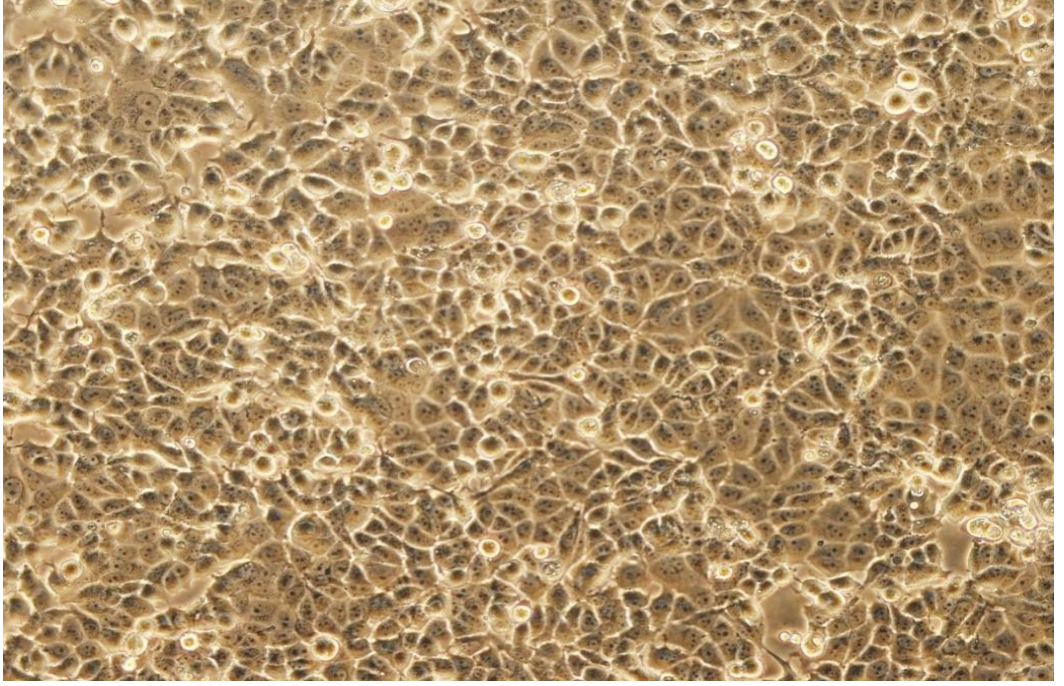


Şekil 12. MTT reaksiyonunun kimyasal gösterimi¹⁷⁰

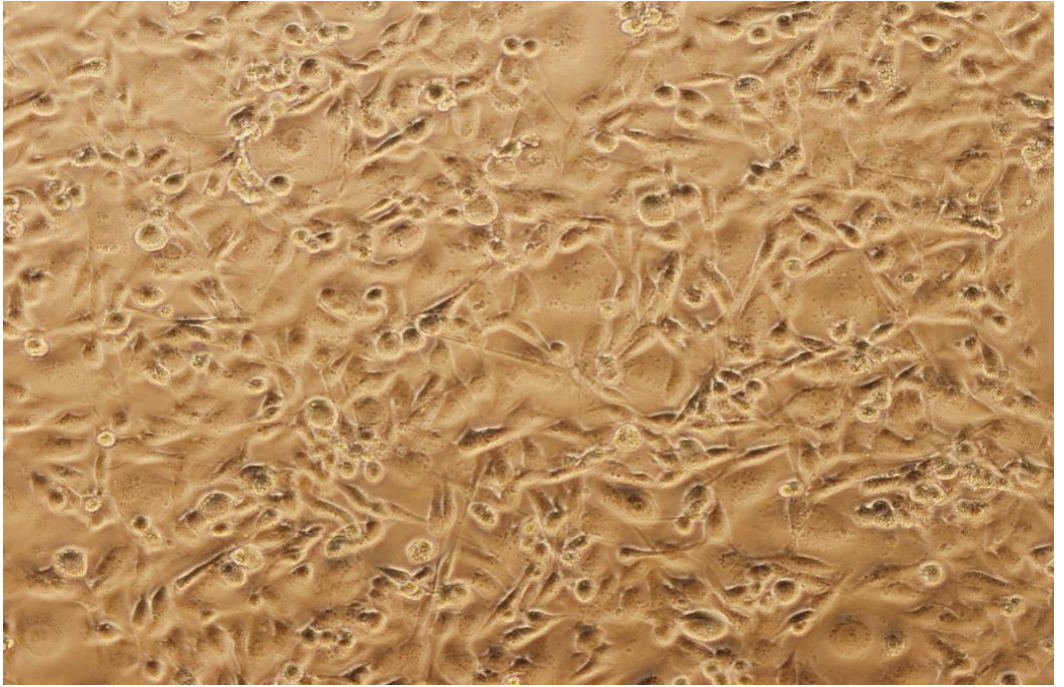
MTT testi hücrelerin yetiştirme ve yaşama ortamı olan DMEM içerisinde yapıldı. Testte Caco-2, MCF-7 ve MDA MB-231 hücrelerinin canlılıkları 24 saat izlendi. Kullanılan hücrelerin inverted mikroskop görüntüleri Resim 1,2 ve 3'de görülmektedir.



Resim 1. Caco-2 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görüntüsü



Resim 2. MCF-7 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görüntüsü



Resim 3. MDA MB-231 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görüntüsü

Raloksifen, tamoksifen, sodyum taurokolat, dimetil- β -siklodekstrin ve hücre kültüründen geçiş deneylerinde kullanılacak ortam olan Propilen Glikol/DMEM (%60/%40) için MTT testi uygulandı. Ayrıca etkin madde içermeyen lipozom, nanopartikül ve kohleat formülasyonları da MTT testine tabi tutuldu. Amaç, hücrelerden geçiş çalışmasını yapacağımız çözelti, nanopartikül, lipozom ve kohleat formülasyonlarını oluşturan etkin ve yardımcı maddelerin hücreler canlı kalacak şekilde, maksimum hangi miktarlarda kullanılabileceğinin görülmesidir. Hücre kültüründen geçiş deneylerinde kullanılması planlanan ortam olan Propilen Glikol/DMEM (%60/%40)'in etkisinin deneylerden önce görülmesi de oldukça önemlidir.

Bu amaç için farklı konsantrasyonlarda raloksifen HCl, sodyum taurokolat, dimetil- β -siklodekstrin süspansiyon ve çözeltileri ile etkin madde içermeyen lipozom, nanopartikül ve kohleatlar hazırlanmıştır.

Raloksifen hidroklorür için: 900, 450, 120, 60 μ g/mL derişimlerde süspansiyonlar, DMEM ile ayrı ayrı hazırlandı.

Sodyum taurokolat için: 7.5, 3.75, 1.875, 0.005 mM derişimlerde çözeltiler, DMEM ile ayrı ayrı hazırlandı.

Dimetil- β -siklodekstrin için: %5, %1.5, %0.375, %0.15 siklodekstrin içeren çözeltiler, DMEM ile ayrı ayrı hazırlandı.

Lipozom formülasyonunda kullanılacak lipidlerin hücrelere etkisini görmek için etkin madde ve absorbsiyon arttırıcı maddeler içermeyen, sadece dipalmitoil fosfatidil kolin (DPPC) ve kitozandan oluşan lipozomlar %25, %50 ve %75'lik olarak hazırlandı ve MTT testine tabi tutuldu.

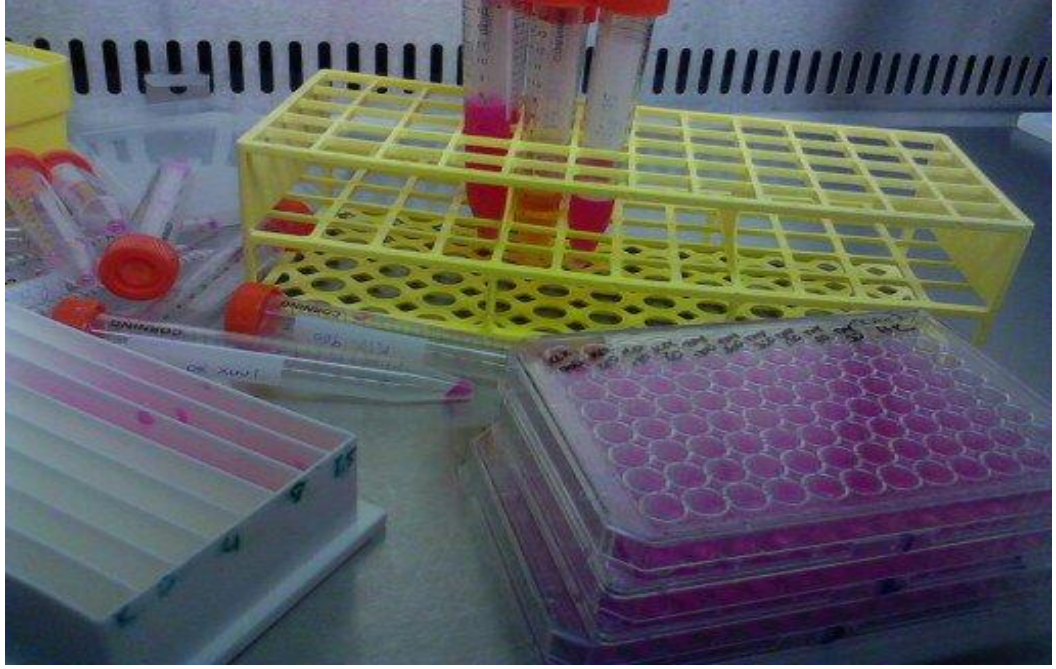
Nanopartiküller de aynı lipozomlar gibi etkin madde ve absorpsiyon artırıcı kullanmadan hazırlandı ve %25, %50 ve %75'lik olarak hazırlandı ve MTT testine tabi tutuldu.

Kohleatlar da, lipozomlar ve nanopartiküller gibi etkin madde ve absorpsiyon artırıcı kullanmadan hazırlandı ve %25, %50 ve %75'lik olarak hazırlandı ve MTT testine tabi tutuldu.

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

Test için kullanılacak 3 tip hücre 96 kuyucuklu doku költür plakalarında üretildi. Kuyucuklara 100'er µL DMEM eklendi ve 24 saat 37°C'de CO₂'li etüvde bekletildi. Her hücre grubu için hiçbir madde içermeyen sadece DMEM içeren kontrol grupları belirlendi. Ardından kaplar boşaltıldı ve değışen derişimlerde test maddelerinin DMEM içerisindeki çözeltileri (100 µL) kuyucuklara eklendi ve 24 saat 37°C'de CO₂'li etüvde bekletildi. 24 saatin sonunda kaplardaki içerik boşaltılarak, tüm kuyucuklara 100 µL taze DMEM ile 13 µL MTT çözeltisi eklendi. Költür kapları hemen alüminyum folyoyla sıkıca sarıldı ve 3 saat 37°C'de CO₂'li etüvde bekletildi. 3 saatin sonunda etüvden çıkarılan kaplar boşaltıldı ve kuyucuklara 100'er µL izopropanol ilave edildi. Oluşan mor renk spektrofotometrik olarak 570 nm'de tayin edildi. Farklı derişimlerdeki maddeler için farklı absorbans değeri elde edildi ve bu değeri hareketle %canlılık hesapları yapıldı.

MTT testleri esnasında çekilmiş bir fotoğraf Resim 4'de görölmektedir. MTT testleri ŞAP Enstitüsü'nde yapılmıştır.



Resim 4. 96 kuyucuklu plakalara formülasyonlar uygulandıktan sonra çekilen fotoğraf

3.2.1.1.4. Çalışmalarda Kullanılan Raloksifen Formülasyonları

İn vitro geçiş çalışmalarında çözelti, lipozom, nanopartikül ve kohleat tipi formülasyonlar kullanıldı. Formülasyon içeriklerinde kullanılacak raloksifen hidroklorür, sodyum taurokolat, dimetil- β -siklodekstrin miktarları MTT testi sonuçları göz önüne alınarak belirlendi. Çalışmalarda kullanılan raloksifen formülasyonları:

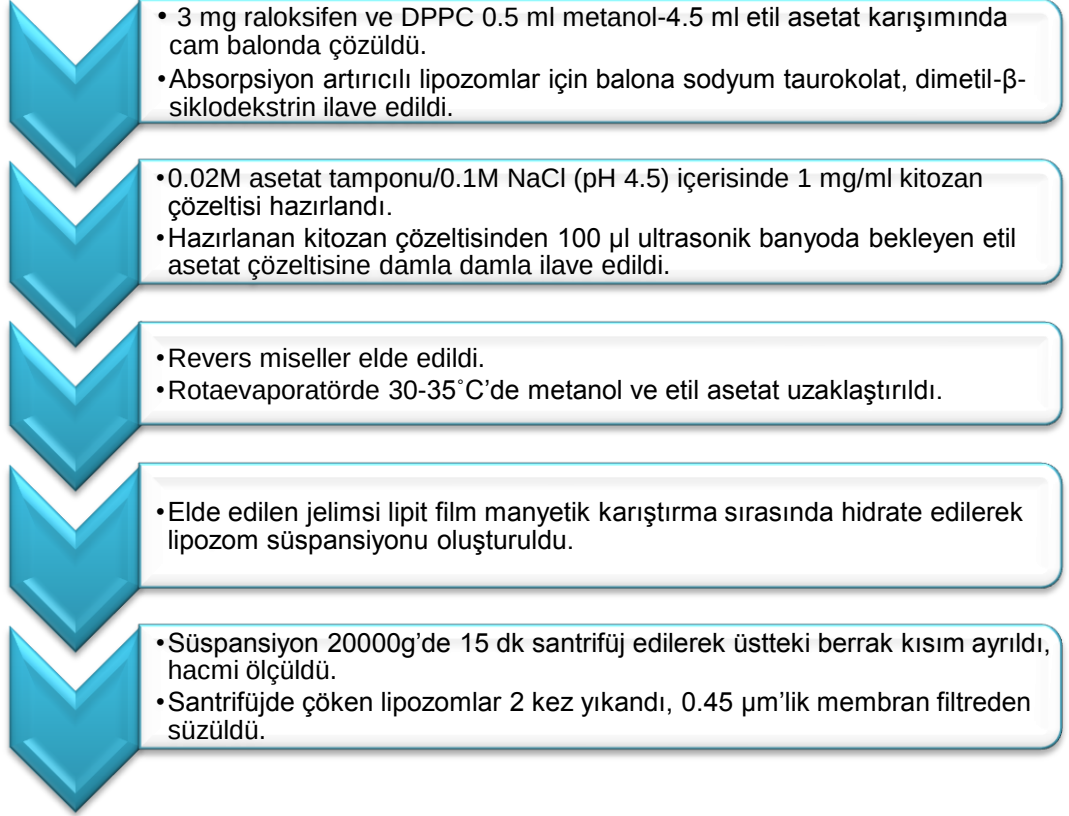
- Raloksifen hidroklorür çözeltisi
- Raloksifen hidroklorür ve dimetil- β -siklodekstrin içeren çözelti
- Raloksifen hidroklorür ve sodyum taurokolat içeren çözelti
- Raloksifen hidroklorür lipozomları
- Raloksifen hidroklorür ve dimetil- β -siklodekstrin içeren lipozomlar
- Raloksifen hidroklorür ve sodyum taurokolat içeren lipozomlar
- Raloksifen hidroklorür nanopartikülleri

- Raloksifen hidroklorür ve dimetil- β -siklodekstrin içeren nanopartiküller
- Raloksifen hidroklorür ve sodyum taurokolat içeren nanopartiküller
- Raloksifen hidroklorür kohleatları
- Raloksifen hidroklorür ve dimetil- β -siklodekstrin içeren kohleatlar
- Raloksifen hidroklorür ve sodyum taurokolat içeren kohleatlardır.

3.2.1.1.4.1. Raloksifen İçeren Lipozomların Hazırlanması

Kitozanın, oral verilmesi planlanan lipozomların midedeki stabilitesini artıracığı ve kitozan ile nanopartikül hazırlamayı düşündüğümüz için lipozom hazırlanması ile ilgili yapılan literatür taramasında Şema 1’de aşamaları görülen yöntem kullanarak lipozom hazırlanmasına karar verildi. Raloksifen hidroklorür, sodyum taurokolat/dimetil- β -siklodekstrin ve kitozan içeren lipozomlar aşağıdaki Şema 1’de belirtildiği gibi hazırlandı¹⁷¹.

Şema 1. Raloksifen lipozomlarının hazırlanışı

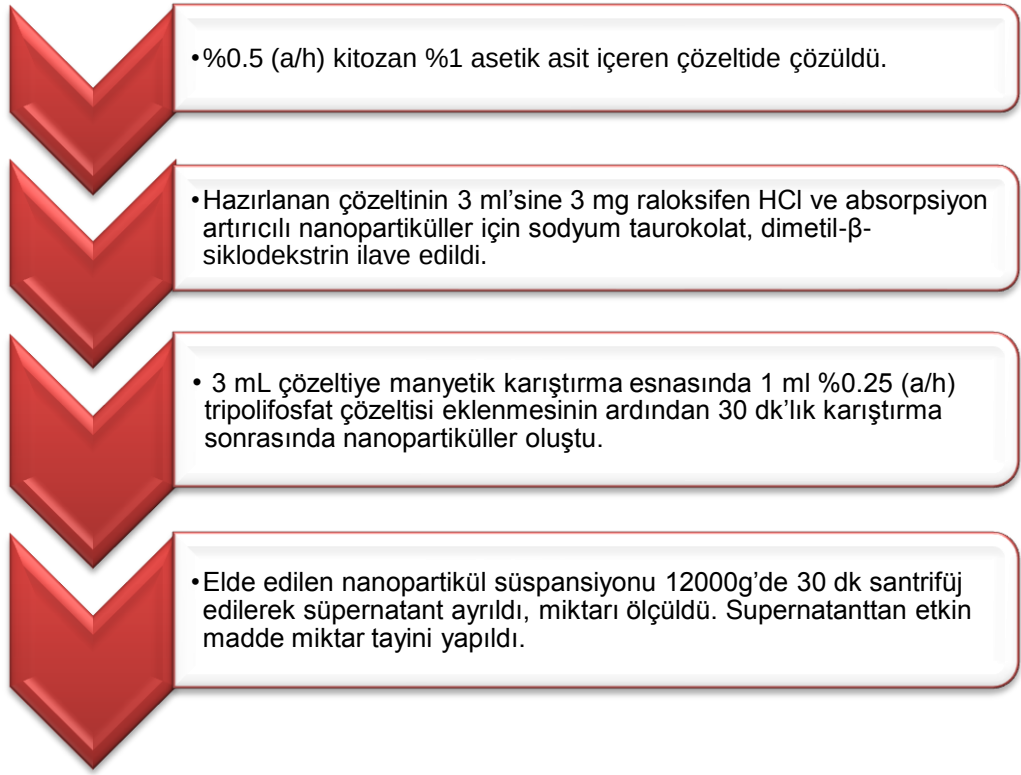


Şema 1'de aşamaları belirtildiği gibi hazırlanan MLV tipte lipozomlar Caco-2 hücre kültürü geçişlerinde, diyaliz membrandan Franz difüzyon deneylerinde ve in vivo çalışmalarda kullanıldı.

3.2.1.1.4.2 Raloksifen İçeren Nanopartiküllerin Hazırlanması

Kitozan, raloksifen HCl, sodyum taurokolat, dimetil- β -siklodekstrin ve kitozan içeren nanopartiküller literatüre göre Şema 2’de belirtildiği gibi hazırlandı¹⁷².

Şema 2. Raloksifen içeren nanopartiküllerin hazırlanışı

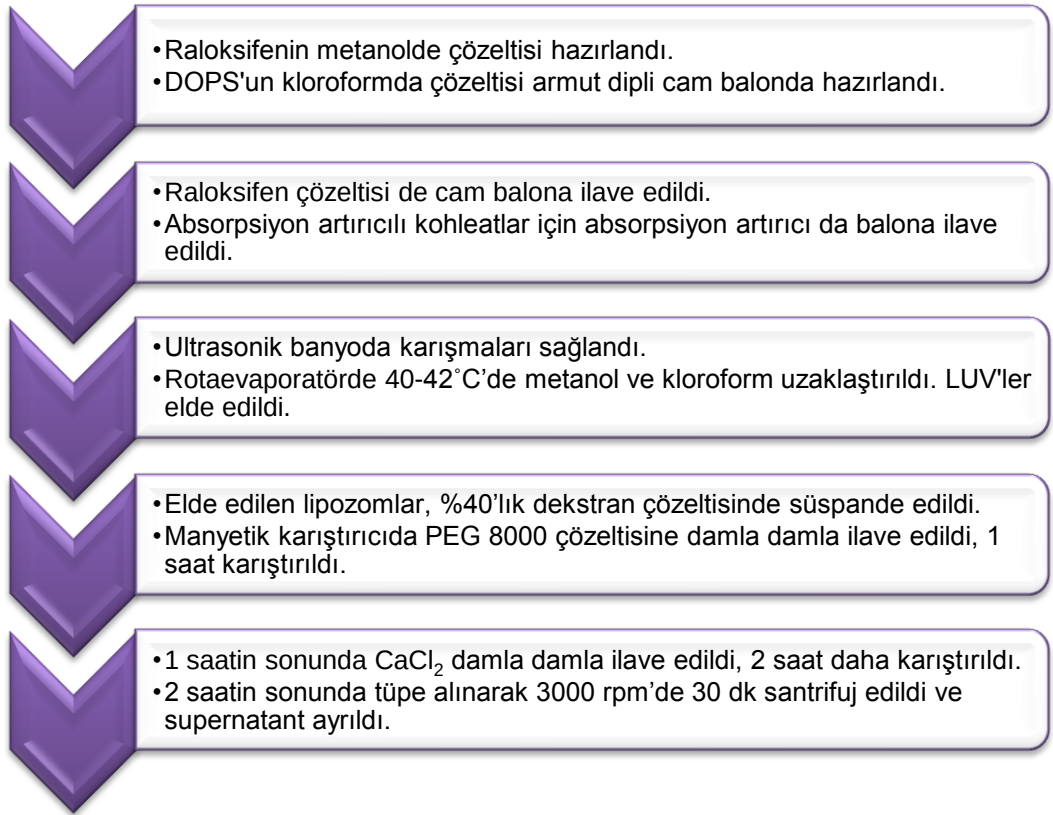


Şema 2’de açıklandığı gibi hazırlanan nanopartiküller hücre kültürü geçişlerinde, diyaliz membrandan Franz difüzyon deneylerinde ve in vivo çalışmalarda kullanıldı.

3.2.1.1.4.3 Raloksifen İçeren Kohleatların Hazırlanması

Literatür incelendiğinde kohleat hazırlanmasına yönelik benzer metodlar karşımıza çıkmaktadır^{140-142,173,174}. Kohleat hazırlarken izlenen basamaklar Şema 3’de verilmiştir.

Şema 3. Raloksifen içeren kohleatların hazırlanışı¹⁷⁴



Şema 3’de açıklandığı gibi hazırlanan kohleatlar hücre kültürü geçişlerinde, diyaliz membrandan Franz difüzyon deneylerinde ve in vivo çalışmalarda kullanıldı.

3.2.1.1.4.4. Raloksifen İçeren Lipozom, Nanopartikül ve Kohleatların Karakterizasyonu

a. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı

Hazırlanan formülasyonların partikül büyüklüğü ve dağılımı Malvern Zeta Sizer-Nano ZS aleti ile ölçüldü. Ölçümler, aletin küvet sisteminde az miktarda lipozom, nanopartikül veya kohleatin p H 7.4 fosfat tamponu içinde dağıtılmasıyla elde edilen dispersiyon kullanılarak yapıldı.

Malvern Zeta Sizer- Nano ZS cihazı ile partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli ve moleküler ağırlık ölçümleri yapılabilmektedir. Partikül büyüklüğü ölçüm aralığı 0,6–6000 nm arasındadır. Cihaz partikül büyüklüğü ölçerken Dynamic Light Scattering (DLS) (Dinamik Işın Saçılımı) teknolojisi kullanmaktadır. Partiküller içinde bulundukları ortamda çözücü molekülleri sayesinde Brownian hareketi yaparlar. Partikül boyutunun büyümesi Brownian hareketini yavaşlatırken, sıcaklığın artması ile Brownian hareketi artar.

Hazırlanan lipozom, nanopartikül ve kohleatların partikül büyüklüğü ve dağılımının zamanla ve sıcaklıkla değişip değişmediğı stabilite çalışmalarında incelenmiştir.

b. Lipozom, Nanopartikül ve Kohleatların Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi

Hazırlanan lipozom, nanopartikül ve kohleatların şekli TEM (Transmission Electron Microscopy) ile Orta Doğu Teknik Üniversitesi TEM Laboratuvarı’da görüntülendi.

c. Lipozom, nanopartikül ve kohleatların İçine Hapsedilen Raloksifen hidroklörür Miktar Tayini

Raloksifen hidroklörür içeren lipozom, nanopartikül ve kohleatların Bölüm 3.2.1.1.4.1, 3.2.1.1.4.2 ve 3.2.1.1.4.3’de anlatıldığı gibi hazırlanmalarının ardından supernatant (üstteki berrak kısımlar) uygun biçimde seyreltilerek HPLC’de raloksifen miktar tayinleri yapılmıştır.

d. Zeta Potansiyeli Ölçümleri

Hazırlanan lipozom, nanopartikül ve kohleatların zeta potansiyel ölçümleri Malvern Zeta Sizer-Nano ZS aleti kullanılarak yapıldı. Cihazın zeta potansiyel ölçerken kullandığı çalışma prensibi elektroforezdir. Elektroforez ortamda bulunan partiküllerin elektriksel alandaki hareketini ifade eder. Elektroforetik hız, elektroforetik mobilite ile orantılıdır. Elektroforetik mobilite, ölçülebilir bir parametredir. Elektroforetik mobilite de zeta potansiyeli ile ilişkilidir.

3.2.1.1.5. İn Vitro Geçiş Çalışmaları

3.2.1.1.5.1. Hücre Tek Tabakası İçermeyen Filtrelerden Geçiş Çalışmaları

Hücre geçişi çalışmalarında kullanılan filtrelerin, geçiş üzerine etkisi olup olmadığını görmek amacıyla üzerinde hücre tek tabakası olmayan filtrelerden çözelti, nanopartikül, lipozom ve kohleat geçişleri incelendi. Geçiş çalışmaları için hazırlanan çözelti, nanopartikül, lipozom ve kohleatlar PG/DMEM ile 4 mL hacme tamamlandı. Difüzyon hücresinin apikal kısmına PG/DMEM içerisinde dağıtılmış lipozomlar, basolateral kısmına da 4mL PG/DMEM ilave edildi. 15., 30., 45.

dakikalarda, 1.,2., 4., 6., 8., 12. ve 24. saatlerde bazolateral kısımdan 1.5 mL örnek alındı. Ortamın hacminin değişmemesi için örnek alımından sonra, bazolateral kısma örnek hacmi kadar etkin madde içermeyen 37°C'ye getirilmiş PG/DMEM ilave edildi. Alınan örneklerdeki etkin madde miktar tayini HPLC ile yapıldı. Hücrelerden geçen %kümülatif ilaç miktarları zamana karşı grafiğe geçirildi, 24 saat sonunda %kümülatif geçen miktarlar hesaplandı. Hücre geçiş çalışmalarında kullanılan difüzyon hücresi Resim 5'de ve özel polikarbonat membranlar ise Resim 6'da görülmektedir.



Resim 5. Hücre geçiş çalışmalarında kullanılan dikey difüzyon hücresi



Resim 6. Dikey difüzyon hücreleriyle kullanılan polikarbonat membranlar

3.2.1.1.5.2. Geçiş Çalışmalarında Kullanılmak Üzere Caco-2 Hücrelerinin Üretilmesi

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

Doku kültürü şişesinin yüzeyine tutunmuş hücreleri uzaklaştırmak için tripsinizasyon işlemi uygulandı. Tripsinizasyon işleminin ardından hücreler tripan mavisini ile boyanarak, bruker lamında mikroskop ile sayıldı. Hücre yoğunluğu hesaplandı. Caco-2 hücrelerinin mililitresinde 80000 hücre olacak şekilde DMEM ile seyreltme yapıldı^{175,176}. Hücreler hazırlandıktan sonra filtreler üzerine aktarıldı. 48 saatte bir ortam tazelendi.

Caco-2 hücrelerinin tek tabaka oluşturması için süre 21 gündür¹⁷⁵⁻¹⁷⁹. Hücre kültürü geçişi için kullanılan hücreler ŞAP Enstitüsü Hücre ve Virüs Bankası'nda üretilmiştir.

3.2.1.1.5.2.1. Caco-2 Hücrelerinden Geçiş Çalışmaları Geçiş Çalışmaları

Hücre kültürlerinden geçişi incelenecek formülasyonlarda kullanılacak etkin madde ve absorpsiyon artırıcı miktarlarının

belirlenmesinde MTT testi sonuçları esas alındı. MTT testi sonuçlarında hücrelerin canlılığını etkilemeyecek biçimde kullanılabilecek maksimum miktarda raloksifen, sodyum taurokolat ve dimetil- β -CD derişimleri kullanıldı.

Caco-2 hücreleriyle ilgili kaynaklar incelendi. 21 günde üretilen hücre tek tabakalarının kullanılmasına karar verildi¹⁷⁵⁻¹⁷⁹.

Geçiş çalışmalarında kullanılan Caco-2 hücreleri, Şekil 17’de görülen 0.4 μ m por çaplı polikarbonat filtreler üzerinde üretildi. Üzerinde hücre tek tabakası olan filtreler, difüzyon hücresinin apikal ve bazolateral kısımlarının ara bölümüne yerleştirildi. Difüzyon sisteminin sıcaklığı 37°C’ye ayarlandı. Hücrelerin canlılığını koruyabilmeleri için sisteme sürekli %95 O₂, %5 CO₂ (karbojen gazı) verildi. Apikal kısımdan bazolateral kısma doğru geçişler incelendi.

Çözelti formülasyonlarıyla yapılan çalışmalarda, belirlenen miktarlardaki raloksifen ve penetrasyon arttırıcılar (sodyum taurokolat ve dimetil- β -siklodekstrin), 4 mL PG/DMEM (%60/%40) içerisinde çözöldü. Difüzyon hücresinin (Resim 6) apikal kısmına DMEM içerisinde hazırlanan çözelti, basolateral kısmına da 4mL PG/DMEM (%60/%40) ilave edildi.

Geçiş çalışmaları için hazırlanan çözelti, nanopartiköl, lipozom ve kohleat PG/DMEM (%60/%40) ile 4 mL hacme tamamlandı. Difüzyon hücresinin apikal kısmına DMEM içerisinde dağıtılmış lipozomlar, basolateral kısmına da 4mL PG/DMEM (%60/%40) ilave edildi.

15., 30., 45. dakikalarda, 1.,2., 4., 6., 8., 12. ve 24. saatlerde bazolateral kısımdan 1.5 mL örnek alındı. Ortamın hacminin değışmemesi

için örnek alımından sonra, bazolateral kısma örnek hacmi kadar ilaçsız 37°C'ye getirilmiş PG/DMEM (%60/%40) ilave edildi. Alınan örneklerdeki R raloksifen miktar tayini HPLC ile yapıldı. Hücrelerden geçen % kümülatif ilaç miktarları zamana karşı grafiğe geçirildi, 24 saat sonunda % kümülatif geçen miktarlar hesaplandı.

3.2.1.1.5.2.2. Raloksifen Hidroklorürün Geçirgenlik Katsayısının (k=P_{app}) Hesaplanması

Raloksifen hidroklorürün çözelti, lipozom, nanopartikül ve kohleat formülasyonlarıyla gerçekleştirilen geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen % kümülatif raloksifen hidroklorür miktarlarından hareketle log k değerleri hesaplandı.

Geçirgenlik katsayısı birimi cm/saat'tir ve aşağıdaki formüle göre hesaplanır¹⁷⁹⁻¹⁸¹.

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

Formüle göre:

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

(dQ / dt): Geçirgenlik hızı,

A: Membran alanı,

C₀ ise donör kompartmandaki konsantrasyonu ifade eder.

3.2.1.1.5.2.3. Caco-2 Hücrelerinin Bütünlüklerinin Değerlendirilmesi

Hücre kültürlerinde hücre bütünlüğünün tespitinde kullanılan yöntemlerden biri de elektriksel direncin ölçülmesidir^{182,183}. Bu amaçla, Evom Voltmeter direnç ölçüm aleti kullanılmıştır¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. Elektrotlardan biri DMEM'li ortama,

diğeri ise DMEM bulunan hücre tabakasına daldırılarak değerler ohm (Ω) cinsinden ölçüldü. Evom Voltmeter® aleti ile TEER ölçümü sırasında çekilen fotoğraf Resim 7’de görülmektedir.

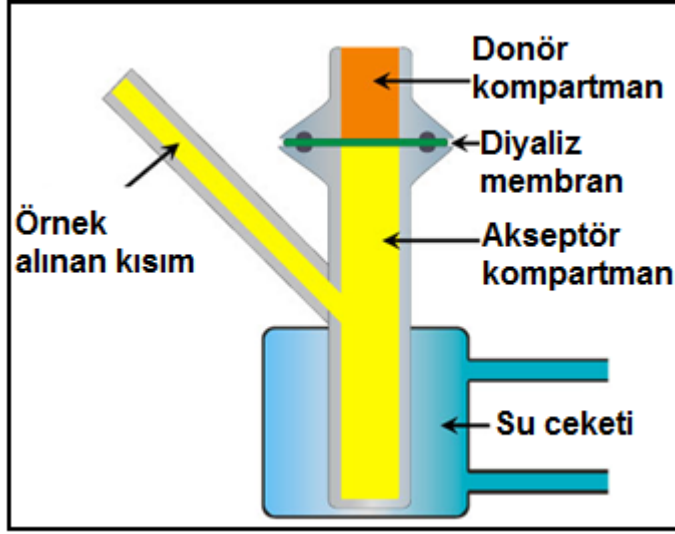


Resim 7. Evom Voltmeter® aleti ile TEER ölçümü sırasında çekilen fotoğraf

3.2.1.1.5.3. Diyaliz Membran Geçişleri

Diyaliz membran geçişleri pH 7.4 fosfat tamponunda yapıldı. Bu pH'nın seçilmesindeki amaç hücre kültürü çalışmalarında kullanılan DMEM'in pH'sının 7.36 olarak ölçülmesiydi. Çözelti, lipozom, nanopartikül ve kohleatların diyaliz membrandan geçiş çalışmaları yapıldı.

Kullanılan diyaliz membran 24 saat boyunca pH 7.4 fosfat tamponunda ıslatıldı. Diyaliz membran geçişleri Franz difüzyon hücreleri kullanılarak yapıldı. Franz difüzyon hücresinin şematik görünümü Şekil 13'de görülmektedir.



Şekil 13. Franz difüzyon hücresinin şematik görüntüsü

Diyaliz membran, Franz hücrelerinin orta kısmına yerleştirildi. Hücrelerin alt kısmına pH 7.4 fosfat tamponu (2 mL), üst kısmına ise geçişi incelenecek çözelti, lipozom, nanopartikül ve kohleat formülasyonları koyuldu. Ortam sıcaklığı 37°C’de tutuldu, sabit hızda karıştırma deney süresince devam etti.

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

3.2.1.1.6. MCF-7 ve MDA MB-231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan Antitümoral Aktivite Tayini

Çalışma 96 gözlü plakalar kullanılarak yapılmıştır. Plakaların her gözündeki 1×10^4 hücre olacak şekilde MCF-7 ve MDA MB-231 hücre kültürü yapılmıştır. Etkisi izlenmek istenen raloksifenin çözeltileri, nanopartikülleri, lipozomları ve kohleatları 96 gözlü plakanın kuyucuklarına ekilmiş ve %95 oksijen %5 karbondioksit içeren etüvde 37°C 'de 4 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. 4 günün sonunda her bir göze 10 μL MTT çözeltisi (5 mg/mL) ilave edilerek 4 saat aynı koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. 4 saatlik sürenin sonunda, her göze 100 μL 2-propanol, Triton X-100 (%10) ve 0.1 N HCl karışımı ilave edilerek zaman kaybetmeden 570 nm'de çok gözlü plate reader (plaka okuyucu) kullanılarak absorbansları ölçülmüştür. Sonuçlar kontrol grupları yani yalnızca DMEM ile inkübe edilmiş kuyucuklar ile karşılaştırılarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır²⁰⁴.

$$\% \text{inhibisyon} = \frac{\text{Kontrol kuyucuklarının absorbansı} - \text{Numune kuyucuklarının absorbansı}}{\text{Kontrol kuyucuklarının absorbansı}} \times 100$$

3.2.1.1.7. MCF-7 ve MDA MB-231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan MMP-2 Enzim İnhibisyonu Çalışmaları

MMP-2 enzim miktar tayini için Ray Bio Tech® Human Elisa kiti kullanıldı. Çalışmalar kitin içindeki uygulama şemasına göre adım adım yapıldı. Raloksifene ait tüm formülasyonlar, çözeltiler, lipozomlar, nanopartiküller ve kohleatların hem MCF-7 hem de MDA MB-231 hücrelerinde MMP-2 enzim miktarları ölçülmüş ve kontrol gruplarıyla kıyaslanarak enzim inhibisyon yüzdeleri hesaplanmıştır. Kitin içinde MMP-

2 standartı bulunmaktadır. Bu standarttan uygun seyreltmelerle 6 farklı konsantrasyonda örneğin hazırlanmasıyla kalibrasyon denklemi elde edilmiştir. Bu kalibrasyon doğrusunun denklemi kullanılarak tüm formülasyonların bulunduğu kuyucuklardaki MMP-2 enzimi miktarları hesaplanmıştır. Şema 4’de deneyin yapılış aşamaları belirtilmiştir.

Şema 4. MMP-2 enzim inhibisyonu çalışması basamakları

Kullanılacak tüm re ajanlar, örnekler ve standartlar oda sıcaklığına getirilerek kitle anlatıldığı gibi hazırlandı.

Her kuyucuğa standart veya örnek koyulup 2.5 saat oda sıcaklığında bekletildi.

Her kuyucuğa antikor koyuldu ve 1 saat oda sıcaklığında bekletildi.

Her kuyucuğa streptavidin koyuldu ve 45 dk. oda sıcaklığında bekletildi.

Her kuyucuğa TMB koyuldu ve 30 dk. oda sıcaklığında bekletildi.

Her kuyucuğa bekletme çözeltisi koyuldu ve 450 nm’de spektrofotometrik olarak okundu.

3.2.1.2. Raloksifen hidroklorür Etkin Maddesi ile Yapılan İn Vivo Çalışmalar

İn vivo çalışmalar iki ayrı ana bölümde yapılmıştır.

Birinci kısım hazırlanan raloksifen hidroklorür formülasyonlarının oral ve intraperitoneal yolla dişi Balb-C tipi farelere uygulanması ve plazmadan etkin madde miktar tayini yapılmasını içermektedir.

İkinci kısım ise, in vitro ve in vivo çalışmalar sonucunda seçilen raloksifen hidroklorür formülasyonlarının oral yolla tümör oluşturulmuş Sprague Dawley cinsi dişi sıçanlara uygulanmasının ardından formülasyonların tümör gelişimine olan etkisinin palpasyon, tümör alanı değişimi, hayvan ağırlıklarının değişimi ve patolojik incelemelerle değerlendirilmesini içermektedir.

3.2.1.2.1. Balb-C tipi Sağlıklı Dişi Farelerle Yapılan İn Vivo alışmalar

3.2.1.2.1.1. Çalışmalarda Kullanılan Hayvanlar

İn vivo çalışmalarımızın bu kısmında, 14-16 haftalık, 30 ± 2 gram ağırlığındaki dişi Balb-C tipi fareler kullanıldı. İn vivo deneyler, Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı'ndan (G..ET-10.010) onay alınarak etik kurallara uygun biçimde Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda veteriner hekim eşliğinde yapıldı.

3.2.1.2.1.2. Deneyin Yapılışı

İn vivo deneyler için fareler her gruptan 3 paralel örnek alınacak şekilde 26 deney grubuna ayrılmıştır. Tablo 8'de deney grupları görülmektedir. Hayvanlar deney başlamadan önce tartılarak ortalama hayvan ağırlıkları belirlenmiştir. Formülasyonlar oral ve intraperitoneal yolla 100 μ L hacimde, 4 mg/kg insan dozundan hareketle hesaplanan dozda (120 μ g/mL) 30 g ağırlığındaki dişi farelere uygulanmıřtır¹⁸⁷ (Resim 8, 9). Örnekler ve 15 ve 30. dakikalarda, 2., 4., 8. ve 24. saatlerde intrakardiyak

olarak alındı (Resim 10), alınır alınmaz plazmaları ayrıldı ve analiz edilene kadar derin dondurucuda (-70 °C) bekletildi.

Tablo 8. Farelere uygulanan raloksifen formülasyonları, uygulama yolları ve deney grupları

Grup Numarası	Grup Adı	Uygulama Yolu
Grup 1	Kontrol	İntraperitoneal
Grup 2	Kontrol	Oral
Grup 3	Raloksifen hidroklorür çözeltisi	İntraperitoneal
Grup 4	Raloksifen hidroklorür çözeltisi	Oral
Grup 5	Raloksifen hidroklorür ve dimetil- β -siklodekstrin içeren çözelti	İntraperitoneal
Grup 6	Raloksifen hidroklorür ve dimetil- β -siklodekstrin içeren çözelti	Oral
Grup 7	Raloksifen hidroklorür ve sodyum taurokolat içeren çözelti	İntraperitoneal
Grup 8	Raloksifen hidroklorür ve sodyum taurokolat içeren çözelti	Oral
Grup 9	Raloksifen hidroklorür lipozomları	İntraperitoneal
Grup 10	Raloksifen hidroklorür lipozomları	Oral
Grup 11	Raloksifen hidroklorür ve dimetil- β -siklodekstrin içeren lipozomlar	İntraperitoneal
Grup 12	Raloksifen hidroklorür ve dimetil- β -siklodekstrin içeren lipozomlar	Oral
Grup 13	Raloksifen hidroklorür ve sodyum taurokolat içeren lipozomlar	İntraperitoneal
Grup 14	Raloksifen hidroklorür ve sodyum taurokolat içeren lipozomlar	Oral
Grup 15	Raloksifen hidroklorür nanopartikülleri	İntraperitoneal
Grup 16	Raloksifen hidroklorür nanopartikülleri	Oral
Grup 17	Raloksifen hidroklorür ve dimetil- β -siklodekstrin içeren nanopartiküller	İntraperitoneal
Grup 18	Raloksifen hidroklorür ve dimetil- β -siklodekstrin içeren nanopartiküller	Oral
Grup 19	Raloksifen hidroklorür ve sodyum taurokolat içeren nanopartiküller	İntraperitoneal
Grup 20	Raloksifen hidroklorür ve sodyum taurokolat içeren nanopartiküller	Oral
Grup 21	Raloksifen hidroklorür kohleatları	İntraperitoneal
Grup 22	Raloksifen hidroklorür kohleatları	Oral
Grup 23	Raloksifen hidroklorür ve dimetil- β -siklodekstrin içeren kohleatlar	İntraperitoneal
Grup 24	Raloksifen hidroklorür ve dimetil- β -siklodekstrin içeren kohleatlar	Oral
Grup 25	Raloksifen hidroklorür ve sodyum taurokolat içeren kohleatlar	İntraperitoneal
Grup 26	Raloksifen hidroklorür ve sodyum taurokolat içeren kohleatlar	Oral



Resim 8. Farelere oral yolla formülasyonların uygulanışı



Resim 9. Farelere intraperitoneal yolla formülasyonların uygulanışı



Resim 10. Farelerden intrakardiyak olarak kan alınması

Farelerden alınan kanlardan ayrılan plazmalar Bölüm 3.2.1.2.1’de anlatıldığı gibi hazırlandıktan sonra HPLC’ye enjekte edilerek her formülasyona ait kan konsantrasyonu-zaman grafikleri oluşturulmuştur.

3.2.1.2.2. Raloksifen hidroklorür Formülasyonları ve Sprague Dawley Cinsi Dişi Sıçanlarla Yapılan İn Vivo Çalışmalar

Çalışmamızda MDA MB-231 hücrelerinin Balb/C farelere subkütan enjeksiyonuyla farelerde tümör oluşturulması ve oluşturulan tümörler üzerinde formülasyonlarımızın etkinliğinin incelenmesi planlanmıştır. Hayvanlarda tümör oluşturmak için, literatürde farklı hücre yoğunlukları kullanılmıştır¹⁸⁸⁻¹⁹³. Literatür bilgileri ışığında Balb/C tipi farelerde tümör hücresi enjeksiyonu ile tümör oluşturma çalışmalarında başarı sağlanamamıştır. Bunun nedeninin farelerin kuvvetli bağışıklık

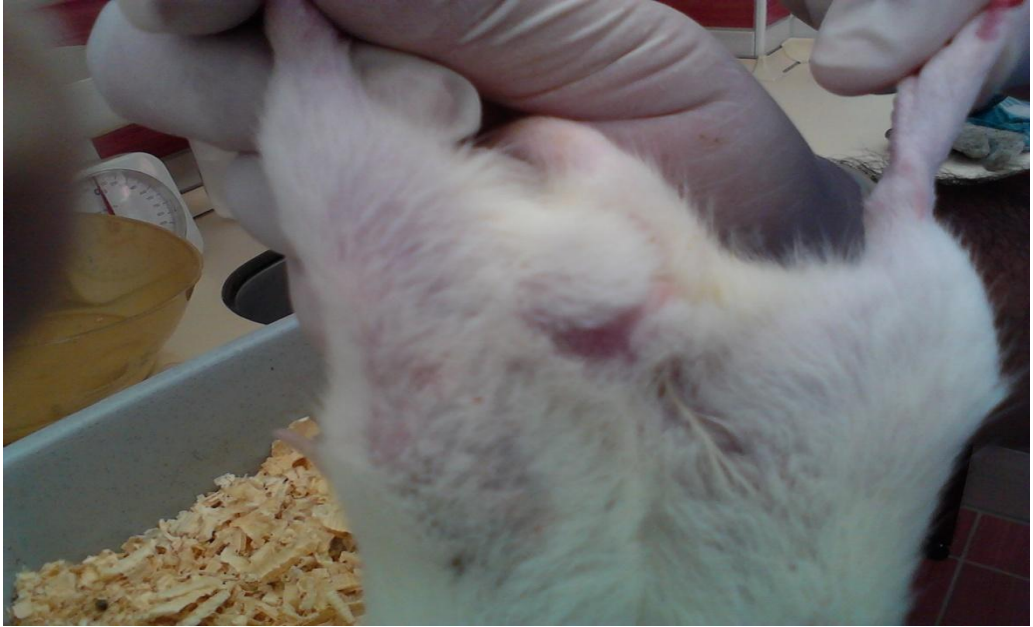
sistemi olduğu literatür taramasıyla da görölmüş kanser hücresi enjeksiyonundan 2 hafta önce kortizon uygulaması yapılarak ardından tümör hücresi uygulaması yapılmış ancak yine tümör oluşumu gözlenmemiştir^{194,195}.

Tümör oluşturma çalışmalarında olumlu sonuç alınamayınca hayvan telefinin önlenmesi amacıyla çalışmaya son verilmesine karar verilmiş ve bu amaçla çözüm arayışına girilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda Gülhane Askeri Tıp Akademisi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Sprague Dawley cinsi dişi sıçanlarda meme tümörü oluşturma çalışmaları yapıldığı öğrenildi. Orada üretilen onbir nesil safkan Sprague Dawley sıçanlardan temin edilmek suretiyle çalışmanın sürdürülebileceği düşünüldü. Literatür araştırması yapıldığında bu tip hayvanlar kullanılarak meme tümörü oluşturulan pek çok çalışmaya rastlandı. Bu sayede Balb/C tipi farelerin telef edilmesi önlenerek çok daha az sayıda hayvanla çalışmanın devam ettirilebileceğine karar verildi¹⁹⁶⁻²⁰¹. Çalışmamızın bu kısmında, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda üretilen onbir nesil safkan dişi Sprague Dawley sıçanlarda nitrozo metil üre (NMU)'nin gebeliği takiben 21. Günde 50 mg/kg dozda¹⁹⁶⁻²⁰¹ uygulanmasıyla hayvanlarda tümör oluşumunun ardından, en iyi permeabilite katsayısına sahip formülasyonlar meme tümörlü sıçanlara oral yolla 8 hafta boyunca uygulandı (G.Ü.ET-10.010) (Resim 11). Meme tümörlü sıçanlara oral yolla uygulanan formülasyonlar Tablo 9'da verilmiştir.

Kıyaslama yapmak amacıyla hiçbir uygulama yapılmayan tümörlü hayvanlar kontrol grubu olarak kullanıldı. Haftada 1 kez uygulama yapılan sıçanların her hafta ağırlıkları ve tümör çapları ölçüldü. Meme tümörlü sıçanlara ait görüntülere örnekler Resim 12 ve 13'de görülmektedir.



Resim 11. Meme tümörlü sıçanlara oral yolla fomülasyonların uygulanışı



Resim 12. Sıçanda oluşturulmuş meme tümörü örneği



Resim 13. Meme tümörü oluşturulmuş bir sıçan

Tablo 9. Meme tümörlü sıçanlara oral yolla uygulanan raloksifen formülasyonları

Formülasyon Tipi	Uygulama Yolu
Raloksifen hidroklorür ve dimetil- β -siklodekstrin içeren çözelti	Oral
Raloksifen hidroklorür ve dimetil- β -siklodekstrin içeren lipozomlar	Oral
Raloksifen hidroklorür ve dimetil- β -siklodekstrin içeren kohleatlar	Oral

Sıçanlardaki tümörleri ölçmek için kumpas kullanıldı ve en boy olmak üzere iki ölçüm yapıldı. Böylece değerlendirme tümör alanları üzerinden yapıldı. Tümör büyüklüklerinin ölçülmesi sırasında çekilen bir fotoğraf Resim 14’de görülmektedir.



Resim 14. Tümör ölçümleri sırasında çekilmiş bir fotoğraf

3.2.1.2.2.1.Histopatoloji Çalışmaları

8 haftalık uygulama sonucu tümörlü sıçanların tümör bölgelerinden örnek alınarak patolojik incelemeye gönderilmiştir. Kıyaslama yapabilmek amacıyla hiçbir uygulama yapılmamış meme tümörlü sıçandan da örnek alınarak patolojik incelemesi yapılmıştır. Meme tümör dokusunun çıkarılışı esnasında çekilen bir fotoğraf Resim 15’de görülmektedir. Tümör dokusu çıkarılan sıçanlara bir örnek Resim 16’da görülmektedir.



Resim 15. Tümörlü sıçanın tümör dokusunun çıkarılması



Resim 16. 8 haftalık uygulama sonrasında tümör dokusu çıkarılmış bir sıçan

Meme tümörü dokuları çıkarılan sıçanlardan alınan tümör dokuları hiçbir uygulama yapılmamış sağlıklı sıçanla kıyaslanmak üzere patolojik incelemeye gönderilmiştir (Resim 17). Patolojik incelemeler Gülhane Askeri Tıp Akademisi Patoloji Bölümü'nde yapılmıştır.



Resim 17. Patolojiye gönderilen tümör dokuları ve sağlıklı meme dokusu

3.2.1.2.2.2.Histopatolojik Doku Hazırlığı

Örnekler en az 24 saat %10'luk tamponlu formol içinde bekletildi. Rutin patolojik takip ardından parafin bloklar elde edildi. Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyandı. Preparatlar ışık mikroskobu (Nikon, E-600, Tokyo, Japonya) ile değerlendirildi. Yapılan incelemede malignite olup olmadığı, varsa malignitenin cinsi ve tedaviye yanıtı değerlendirildi. Tedaviye yanıt tümörün içerdiği fibrozis ve nekroz oranları ile değerlendirildi.

3.2.1.3. Raloksifen Hidrolorür Etkin Maddesi ile Yapılan Stabilit e  alışmaları

Raloksifen ile hazırlanan formülasyonlar içinden: Raloksifen dimetil- -siklodekstrin    eltisi, raloksifen dimetil- -siklodekstrin lipozomları ve raloksifen dimetil- -siklodekstrin kohleatları stabilit e çalışmaları için seçilmiştir.

Formülasyonlar stabilit e çalışması için hazırlanmış ve ardından pH 7.4 fosfat tamponuyla hidrate edilerek 4 C, 25 C %60 bağıl nem ve 40 C %75 bağıl nem ortamlarında 6 ay süreyle muhafaza edilmiştir.

3.2.1.3.1. Formülasyonlarda Raloksifen Miktar Tayini

Raloksifen, lipozom, kohleat ve    eltilerden Bölüm 3.2.1.1.1.1'de anlatıldığı gibi HPLC yöntemiyle, 0.gün (başlangıç) ve. 1.,2.,3.,4.,5. ve 6. aylarda tayin edildi.

3.2.1.3.2. Formülasyonların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımları

Hazırlanan formülasyonların partikül büyüklüğü ve dağılımı Malvern Zeta Sizer-Nano ZS aleti ile 0.gün (başlangıç) ve. 1.,2.,3.,4.,5. ve 6. aylarda tayin edildi.

3.2.1.3.3. Formülasyonların Zeta Potansiyelleri

Hazırlanan formülasyonların zeta potansiyelleri Malvern Zeta Sizer-Nano ZS Sizer aleti ile 0.gün (başlangıç) ve. 1.,2.,3.,4.,5. ve 6. aylarda tayin edildi.

3.2.1.3.4. Formülasyonların TEM Görüntüleri

Stabilite çalışmalarına tabi tutulacak formülasyonların başlangıçta ve 6. ayda TEM görüntüleri çekilmiştir.

3.2.1.4. İn Vitro-İn Vivo Korelasyon Çalışmaları

Aynı örnek alma zamanlarında, hücre kültürlerinde hesaplanan %kümülatif geçen raloksifen miktarı ve kandaki raloksifen miktarı ile aynı örnek alma zamanlarında alınan plazma numunelerinin analizi ile bulunan plazma konsatrasyonu grafiğe geçirilerek korelasyon çalışması oral yolla verilen tüm formülasyon tipleri için gerçekleştirilmiştir^{202,203}.

3.2.1.5. Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

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

3.2.2. Tamoksifen Sitrat Etkin Maddesi İle Yapılan Çalışmalar

3.2.2.1 Tamoksifen Sitrat Etkin Maddesi İle Yapılan İn Vitro Çalışmalar

3.2.2.1.1. Tamoksifen Sitratın Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi

Tamoksifen sitratın miktar tayini için HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) analizi kullanıldı. HPLC yöntemi, etkin maddenin hücre kültüründen geçiş çalışmalarında, in vitro diyaliz membran geçiş çalışmalarında, in vivo çalışmalarda ve stabilite çalışmalarında kullanıldı.

HPLC analizlerine başlamadan önce tamoksifen sitrat için UV spektrofotometre kullanılarak, 200 – 400 nm arasında dalga boyu taraması yapıldı. Dalga boyu taraması yapmak amacıyla tamoksifen sitratın, hücre kültürü geçişlerinde kullanılan ortam olan Propilen Glikol/Dulbecco's Modifies Eagle Medium (PG/DMEM) (%60/40) ve diyaliz membran-Franz difüzyon hücrelerinden geçiş deneylerinde kullanılan ortam olan pH 7.4 fosfat tamponunda 50 µg/ml konsantrasyonda çözeltileri hazırlandı. Dalga boyu taraması, 1 cm'lik kuvarz küvetler kullanarak pH 7.4 fosfat tamponu ve PG/DMEM (%60/%40) körlerine karşı yapıldı. HPLC ile tamoksifen tayininde kullanılan HPLC koşulları Tablo 10'da verilmiştir²⁰³.

Tablo 10. Tamoksifen sitratın HPLC ile miktar tayini koşulları²⁰³

KOLON	ODS 2, 4.6x150 mm
Mobil Faz	0.025 M Dipotasyum hidrojen fosfat tamponu (pH sı <i>asetik asit ile</i> 8.7'ye ayarlanır):metanol (%10:%90)
Kolon Sıcaklığı	25°C
Akış Debisi	1 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	125 µL
Dalga Boyu	238 nm
Alıkonma Zamanı	6-8 dk

3.2.2.1.1.1. Tamoksifen Sitratin HPLC ile Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

Validasyon işlemleri hem hücre geçiş çalışmalarında kullanılacak PG/DMEM içerisinde, hem de diyaliz membrandan geçiş çalışmalarında kullanılacak pH 7.4 fosfat tamponunda hem de in vivo çalışmalar için plazmada gerçekleştirildi. Tablo 10'da HPLC yönteminin koşulları verilmiştir.

Tablo 12'de verilen koşullarla; validasyon çalışması yapılmış ve aşağıdaki parametreler incelenmiştir.

3.2.2.1.1.1.1. Doğrusallık

Tamoksifen sitratin PG/DMEM (%60:%40) içerisinde 10 farklı derişimde (25-0.012 µg/mL) 6 ayrı seri çözeltisi hazırlandı ve HPLC'ye enjekte edildi. Pik alanları bulundu. Tamoksifen sitrat derişimlerine karşılık elde edilen pik alanlarına doğrusal en küçük kareler yöntemi uygulandı. Standart doğru denklemi elde edildi. Gerekli istatistiksel parametreler hesaplandı.

Tamoksifen sitratin pH 7.4 fosfat tamponu içerisinde 10 farklı derişimde (25-0.012 µg/mL) 6 ayrı seri çözeltisi hazırlandı ve HPLC'ye enjekte edildi. Pik alanları bulundu. Tamoksifen sitrat derişimlerine karşılık elde edilen pik alanlarına doğrusal en küçük kareler yöntemi uygulandı. Standart doğru denklemi elde edildi. Gerekli istatistiksel parametreler hesaplandı.

İn vivo numunelerin analizi için, farelerden alınan kan, alır almaz santrifüj edilerek plazma ayrılmıştır. Plazma deneyde kullanılıncaya kadar -70°C'de derin dondurucuda bekletilmiştir. Deneyde kullanılacağı

zaman derin dondurucudan çıkartılıp oda sıcaklığına getirilerek erimesi sağlanmıştır.

Örnekler, literatürde belirtildiği gibi, 200 µl plazmaya, 100 µl metanol, 400 µl asetronitril ve 200 µl değişik konsantrasyonlarda (tamoksifen içeren çözeltiler ilave edilerek hazırlanmıştır. Numuneler 30 sn vorteksledikten sonra 10 dk süreyle +4°C'de 15000 rpm'de santrifuj edilmiştir. Santrifujun ardından üstteki berrak kısım ayrılmış ve yukarıda Tablo 7'de belirtilen koşullarda HPLC'ye enjekte edilmiştir¹⁶⁸. Tamoksifen sitratın plazma içerisinde 10 farklı derişimde (25-0.012 µg/mL) 6 ayrı seri çözeltilisi hazırlandı ve HPLC'ye enjekte edildi. Pik alanları bulundu. Tamoksifen sitrat derişimlerine karşılık elde edilen pik alanlarına doğrusal en küçük kareler yöntemi uygulandı. Standart doğru denklemi elde edildi. Gerekli istatistiksel parametreler hesaplandı.

3.2.2.1.1.1.2. Doğruluk ve Geri Elde

Tamoksifen sitratın, PG/DMEM (%60/%40) içerisinde hazırlanan %80, %100 ve %120 tamoksifen sitrat içeren çözeltilerinden kalibrasyon denklemi kullanılarak geri elde edilen miktarları hesaplandı.

Tamoksifen sitratın, pH 7.4 fosfat tamponu içerisinde hazırlanan %80, %100 ve %120 tamoksifen sitrat içeren çözeltilerinden kalibrasyon denklemi kullanılarak geri elde edilen miktarları hesaplandı.

Tamoksifen sitratın, plazma içerisinde hazırlanan %80, %100 ve %120 tamoksifen sitrat içeren çözeltilerinden kalibrasyon denklemi kullanılarak geri elde edilen miktarları hesaplandı.

Geri elde edilen miktarlar hesaplanarak, gerekli istatistiksel parametrelerle değerlendirildi.

3.2.2.1.1.1.3. Kesinlik

a. Deney İçi Kesinlik

Tamoksifen sitratın kalibrasyon doğru denklemini oluşturmak için PG/DMEM (%60/%40) içerisindeki stok çözeltisinden uygun seyreltmeler yapılarak hazırlanan çeşitli derişimdeki çözeltilerin, herhangi bir derişimde olan örneklerinden biri HPLC'ye ardı ardına 10 kere enjekte edildi.

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

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

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

b. Deneyler Arası Kesinlik

Tamoksifen sitratın PG/DMEM (%60/%40) içerisindeki 25, 6.25, 1.56 ve 0.39 µg/mL derişimlerde çözeltileri hazırlandı. Bu numuneler birbirini takip eden 3 gün içerisinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edildi. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen derişimlerin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

Tamoksifen sitratın pH 7.4 fosfat tamponu içerisindeki 25, 6.25, 1.56, 0.39 µg/mL derişimlerde çözeltileri hazırlandı. Bu numuneler birbirini takip eden 3 gün içerisinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edildi. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen derişimlerin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

Tamoksifen sitratın plazma içerisindeki 25, 6.25, 1.56, 0.39 µg/mL derişimlerde çözeltileri hazırlandı. Bu numuneler birbirini takip eden 3 gün içerisinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edildi. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen derişimlerin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

3.2.2.1.1.1.4. Özgünlük ve Seçicilik

Dimetil-β-CD ve sodyum taurokolatın 50 µg/mL'lik çözeltileri hazırlandı ve 238 nm'de HPLC'ye enjekte edildi.

3.2.2.1.1.1.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı

Tamoksifen sitrat için bu yönteme ait duyarlılık ve saptama sınırı Bölümü 3.2.1.1.1.1.5'de anlatıldığı gibi hesaplandı.

3.2.2.1.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Analizi

Çalışmalar, DSC (Differential Scanning Calorimetry) kullanılarak 10°C/dk tarama hızında ve 300°C'ye kadar yapıldı. Etkin maddeler ve formülasyon hazırlamada kullanılan tüm yardımcı maddelerin tek başına ve etkin maddeyle 1:1 oranındaki karışımları kullanarak yapıldı. Örnekler 2 mg tartılarak alüminyum örnek kaplarına kondu. Alüminyum kapak kapatılarak pellet basılmasının ardından aletin ısıtma hücresine

yerleştirildi. 20-300°C sıcaklık aralığında azot atmosferi altında ölçümler gerçekleştirildi. DSC çalışmaları, tamoksifen ile 1:1 oranında karışımları kullanılan maddeler:

- Dimetil-β-siklodekstrin
- Sodyum taurokolat
- Kitozan
- Sodyum tripolifosfat
- Dipalmitoil fosfatidil kolin (DPPC)
- Dioktil fosfatidil serin (DOPS)
- Polietilen glikol 8000 (PEG 8000)
- Dekstran
- Kalsiyum klorür dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

3.2.2.1.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.2.2.1.3.1. MTT Testi

MTT Testi Bölüm 3.2.1.1.3'te anlatılmıştır. Raloksifen ve yardımcı maddelere ile formülasyonlara ek olarak: Tamoksifen için: 1200, 600, 300, 120, 60, 30 µg/mL derişimlerde süspansiyonlar, DMEM ile ayrı ayrı hazırlanarak MTT testine tabi tutulmuştur..

3.2.2.1.4. Çalışmalarda Kullanılan Tamoksifen Formülasyonları

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

- Tamoksifen sitrat çözeltisi
- Tamoksifen sitrat ve dimetil-β-siklodekstrin içeren çözelti
- Tamoksifen sitrat ve sodyum taurokolat içeren çözelti

- Tamoksifen sitrat lipozomları
- Tamoksifen sitrat ve dimetil- β -siklodekstrin içeren lipozomlar
- Tamoksifen sitrat ve sodyum taurokolat içeren lipozomlar
- Tamoksifen sitrat nanopartikülleri
- Tamoksifen sitrat ve dimetil- β -siklodekstrin içeren nanopartiküller
- Tamoksifen sitrat ve sodyum taurokolat içeren nanopartiküller
- Tamoksifen sitrat kohleatları
- Tamoksifen sitrat ve dimetil- β -siklodekstrin içeren kohleatlar
- Tamoksifen sitrat ve sodyum taurokolat içeren kohleatlardır.

3.2.2.1.4.1. Tamoksifen İçeren Lipozomların Hazırlanması

Tamoksifen lipozomları Bölüm 3.2.1.1.4.1'de, Şema 1'de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Tek fark raloksifen HCl yerine tamoksifen sitrat kullanılmasıdır.

3.2.2.1.4.2. Tamoksifen İçeren Nanopartiküllerin Hazırlanması

Tamoksifen nanopartikülleri, Bölüm 3.2.1.1.4.2'de, Şema 2'de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Tek fark raloksifen HCl yerine tamoksifen sitrat kullanılmasıdır.

3.2.2.1.4.3. Tamoksifen İçeren Kohleatların Hazırlanması

Tamoksifen kohleatları, Bölüm 3.2.1.1.4.3'de, Şema 3'de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Tek fark raloksifen HCl yerine tamoksifen sitrat kullanılmasıdır.

3.2.2.1.4.4. Tamoksifen İçeren Lipozom, Nanopartikül ve Kohleatların Karakterizasyonu

Tamoksifen sitrat ile hazırlanan formülasyonların karakterizasyonu amacıyla, Bölüm 3.2.1.1.4.4'de ayrıntılarıyla açıklanan partikül büyüklüğü ve dağılımı, TEM görüntüsü, etkin madde miktar tayini, zeta potansiyeli parametreleri incelenmiştir.

3.2.2.1.5. İn Vitro Geçiş Çalışmaları

Tamoksifen sitrat ile hazırlanan formülasyonlar ile de Bölüm 3.2.1.1.5'te ayrıntılarıyla anlatılan:

- ✓ Hücre tek tabakası içermeyen polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları, Bölüm 3.2.1.1.5.1'de anlatıldığı gibi yapılmıştır.
- ✓ Caco-2 hücrelerinden geçiş çalışmaları, Bölüm 3.2.1.1.5.2.1'de anlatıldığı gibi yapılmış ve Bölüm 3.2.1.1.5.2.2'de ifade edilen formülle tamoksifen formülasyonlarına ait geçirgenlik katsayıları hesaplanmıştır. Bölüm 3.2.1.1.5.2.3'de ifade edilen TEER ölçümleri, tamoksifen sitrat içeren formülasyonlar ile yapılan Caco-2 geçiş çalışmalarının ardından da yapılmıştır.
- ✓ Diyaliz membran geçiş çalışmaları, Şekil 20'de görülen Franz difüzyon sistemi kullanılarak, Bölüm 3.2.1.1.5.3'te anlatıldığı gibi, tamoksifen sitrat içeren formülasyonlar ile yapılmıştır.

3.2.2.1.6. MCF-7 ve MDA MB-231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan Antitümoral Aktivite Tayini

Etkisi izlenmek istenen tamoksifenin çözeltileri, nanopartikülleri, lipozomları ve kohleatları Bölüm 3.2.1.1.6'da anlatıldığı gibi işleme tabi tutulmuş sonuçlar tamoksifen sitrat içeren formülasyonlarla kıyaslamalı olarak değerlendirilmiştir.

3.2.2.1.7. MCF-7 ve MDA MB-231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan MMP-2 Enzim İnhibisyonu Çalışmaları

Etkisi izlenmek istenen tamoksifenin çözeltileri, nanopartikülleri, lipozomları ve kohleatları Bölüm 3.2.1.1.7'de anlatıldığı gibi aynı kit kullanılarak, formülasyonların MCF-7 ve MDA-MB 231 hücrelerinde bulunan MMP-2 enzim miktarlarını nasıl değiştirdiği değerlendirilmiş, sonuçlar tamoksifen sitrat içeren formülasyonlarla kıyaslamalı olarak yorumlanmıştır.

3.2.2.2. Tamoksifen Sitrat Etkin Maddesi ile Yapılan İn Vivo Çalışmalar

İn vivo çalışmalar, raloksifen HCl etkin maddesinde de olduğu gibi, iki ayrı ana bölümde yapılmıştır. İlk kısımda, hazırlanan tamoksifen sitrat formülasyonlarının oral ve intraperitoneal yolla dişi Balb-C tipi farelere uygulanmış ve plazmadan tamoksifen miktar tayini yapılmıştır. İkinci kısım ise, in vitro ve in vivo çalışmalar sonucunda seçilen tamoksifen sitrat formülasyonlarının tümör oluşturulmuş Sprague Dawley cinsi dişi sıçanlara oral yolla uygulanmasının ardından formülasyonların tümör gelişimine olan etkisinin palpasyon, tümör alanı değişimi, hayvan ağırlıklarının değişimi ve patolojik incelemelerle değerlendirilmesini içermektedir.

3.2.2.2.1. Tamoksifen Sitrat Formülasyonları ile Balb-C tipi Sağlıklı Dişi Farelerle Yapılan İn Vivo Çalışmalar

Tamoksifen içeren formülasyonlarla yapılan in vivo çalışmalarda da Bölüm 3.2.1.2.1.1.'de belirtilen özellikte hayvanlar kullanılarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Deney grupları Tablo 11'de

görülmektedir. İn vivo çalışmalar Bölüm 3.2.1.2.1.2.'de açıklandığı gibi yapılmıştır (G.Ü.ET-10.010).

Tablo 11. Farelere uygulanan tamoksifen formülasyonları, uygulama yolları ve deney grupları

Grup Numarası	Grup Adı	Uygulama Yolu
Grup 1	Kontrol	İntraperitoneal
Grup 2	Kontrol	Oral
Grup 3	Tamoksifen sitrat çözeltisi	İntraperitoneal
Grup 4	Tamoksifen sitrat çözeltisi	Oral
Grup 5	Tamoksifen sitrat ve dimetil- β -siklodekstrin içeren çözelti	İntraperitoneal
Grup 6	Tamoksifen sitrat ve dimetil- β -siklodekstrin içeren çözelti	Oral
Grup 7	Tamoksifen sitrat ve sodyum taurokolat içeren çözelti	İntraperitoneal
Grup 8	Tamoksifen sitrat ve sodyum taurokolat içeren çözelti	Oral
Grup 9	Tamoksifen sitrat lipozomları	İntraperitoneal
Grup 10	Tamoksifen sitrat lipozomları	Oral
Grup 11	Tamoksifen sitrat ve dimetil- β -siklodekstrin içeren lipozomlar	İntraperitoneal
Grup 12	Tamoksifen sitrat ve dimetil- β -siklodekstrin içeren lipozomlar	Oral
Grup 13	Tamoksifen sitrat ve sodyum taurokolat içeren lipozomlar	İntraperitoneal
Grup 14	Tamoksifen sitrat ve sodyum taurokolat içeren lipozomlar	Oral
Grup 15	Tamoksifen sitrat nanopartikülleri	İntraperitoneal
Grup 16	Tamoksifen sitrat nanopartikülleri	Oral
Grup 17	Tamoksifen sitrat ve dimetil- β -siklodekstrin içeren nanopartiküller	İntraperitoneal
Grup 18	Tamoksifen sitrat ve dimetil- β -siklodekstrin içeren nanopartiküller	Oral
Grup 19	Tamoksifen sitrat ve sodyum taurokolat içeren nanopartiküller	İntraperitoneal
Grup 20	Tamoksifen sitrat ve sodyum taurokolat içeren nanopartiküller	Oral
Grup 21	Tamoksifen sitrat kohleatları	İntraperitoneal
Grup 22	Tamoksifen sitrat kohleatları	Oral
Grup 23	Tamoksifen sitrat ve dimetil- β -siklodekstrin içeren kohleatlar	İntraperitoneal
Grup 24	Tamoksifen sitrat ve dimetil- β -siklodekstrin içeren kohleatlar	Oral
Grup 25	Tamoksifen sitrat ve sodyum taurokolat içeren kohleatlar	İntraperitoneal
Grup 26	Tamoksifen sitrat ve sodyum taurokolat içeren kohleatlar	Oral

3.2.2.2.2. Tamoksifen Sitrat Formülasyonları ile Sprague Dawley Cinsi Dişi Sıçanlarla Yapılan İn Vivo Çalışmalar

Çalışmalarda Bölüm 3.2.1.2.2’de belirtilen özellikteki hayvanlar kullanılarak seçilen tamoksifen lipozomları ve kohleatları çözelti formülasyonları ile 8 hafta boyunca meme tümörlü sıçanlara uygulanmış, tümör boyutundaki küçülme, hayvan ağırlıkları değerlendirilmiş ve histopatoloji çalışmaları Bölüm 3.2.1.2.2.2 açıklandığı gibi hazırlanan doku numuneleri ile Bölüm 3.2.1.2.2.1’de açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir. Seçilen formülasyonlar Tablo 12’de görülmektedir.

Tablo 12. Meme tümörlü sıçanlara oral yolla uygulanan tamoksifen formülasyonları

Formülasyon Tipi	Uygulama Yolu
Tamoksifen sitrat ve dimetil- β -siklodekstrin içeren çözelti	Oral
Tamoksifen sitrat ve dimetil- β -siklodekstrin içeren lipozomlar	Oral
Tamoksifen sitrat ve dimetil- β -siklodekstrin içeren kohleatlar	Oral

3.2.2.3. Tamoksifen Sitrat Etkin Maddesi ile Yapılan Stabilite Çalışmaları

Tamoksifen ile hazırlanan formülasyonlar içinden: Tamoksifen dimetil- β -siklodekstrin çözeltisi, tamoksifen dimetil- β -siklodekstrin lipozomları ve tamoksifen dimetil- β -siklodekstrin kohleatları stabilite için seçilmiştir.

Formülasyonlar stabilite çalışması için hazırlanmış ve ardından pH 7.4 fosfat tamponuyla hidrate edilerek 4°C, 25°C $\pm$ %60 bağıl nem ve 40°C $\pm$ %75 bağıl nem ortamlarında 6 ay süreyle muhafaza edilmiştir.

3.2.2.3.1. Formülasyonlarda Tamoksifen Miktar Tayini

Tamoksifen, lipozom, kohleat ve çözeltilerden Bölüm 3.2.2.1.1.1'de anlatıldığı gibi HPLC yöntemiyle, 0.gün (başlangıç) ve 1.,2.,3.,4.,5. ve 6. aylarda tayin edildi.

3.2.2.3.2. Formülasyonların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımları

Hazırlanan formülasyonların partikül büyüklüğü ve dağılımı Malvern Zeta Sizer Nano-ZS aleti ile 0.gün (başlangıç) ve 1.,2.,3.,4.,5. ve 6. aylarda tayin edildi.

3.2.2.3.3. Formülasyonların Zeta Potansiyelleri

Hazırlanan formülasyonların Zeta potansiyelleri Malvern Zeta Sizer Nano-ZS aleti ile 0.gün (başlangıç) ve 1.,2.,3.,4.,5. ve 6. aylarda tayin edildi.

3.2.2.3.4. Formülasyonların TEM Görüntüleri

Stabilite çalışmalarına tabi tutulacak formülasyonların başlangıçta ve 6. ayda TEM görüntüleri çekilmiştir.

3.2.2.4. İn Vitro-İn Vivo Korelasyon Çalışmaları

Aynı örnek alma zamanlarında, hücre kültürlerinde hesaplanan % kümülatif geçen tamoksifen miktarı ve kandaki tamoksifen miktarı ile aynı örnek alma zamanlarında alınan plazma numunelerinin analizi ile bulunan plazma konsantrasyonu grafiğe geçirilerek korelasyon çalışması oral yolla verilen tüm formülasyon tipleri için gerçekleştirilmiştir^{202,203}.

3.2.2.5. Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

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

4. BULGULAR

Bu bölümde 3. bölümde (yöntem) yapıları anlatılan çalışmalar sonucu elde edilen veriler tablolar ve grafikler halinde sunulmuştur. Tablolarda "n" değerleri, in vitro ve in vivo çalışmalarda yapılan paralel deney sayısını ifade etmektedir. Yapılan deneyler sonucu elde edilen değerlerle, ortalama (ort), standart sapma (S.S), bağıl sapma (B.S) ve %95 olasılıklı güven aralığı ($\pm$ G.S) değerleri hesaplanmış, sonuçlar tablo ve grafiklerde gösterilmiştir.

Bulgular bölümünün ilk kısmında raloksifen hidroklorüre, ikinci kısmında tamoksifen sitrata ise ait bulgular sunulmuştur.

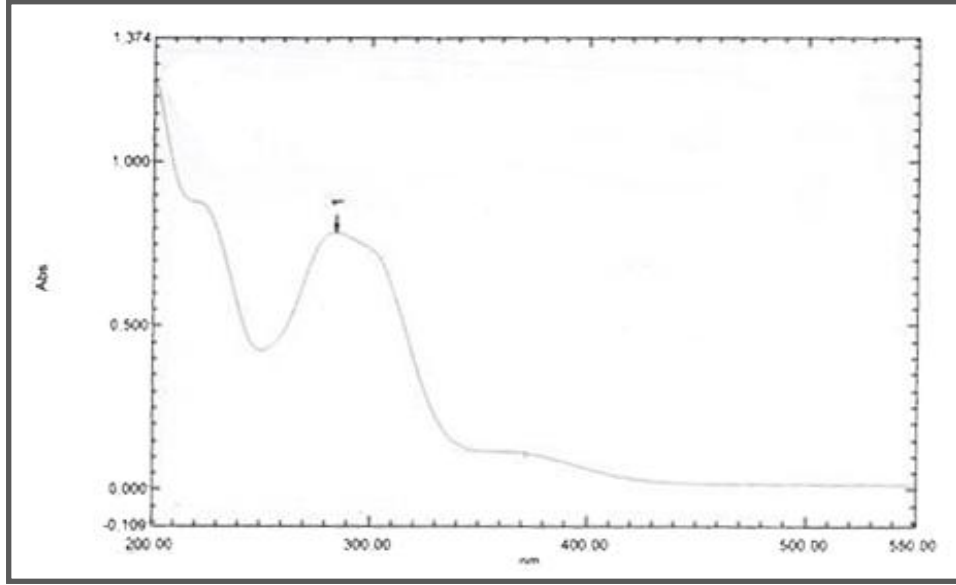
4.1. Raloksifen Hidroklorüre Ait Çalışmalarla İlgili Bulgular

4.1.1. Raloksifen Hidroklorür Etkin Maddesi ile Yapılan İn Vitro Çalışmalar

4.1.1.1. Raloksifen Hidroklorürün Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesine Ait Bulgular

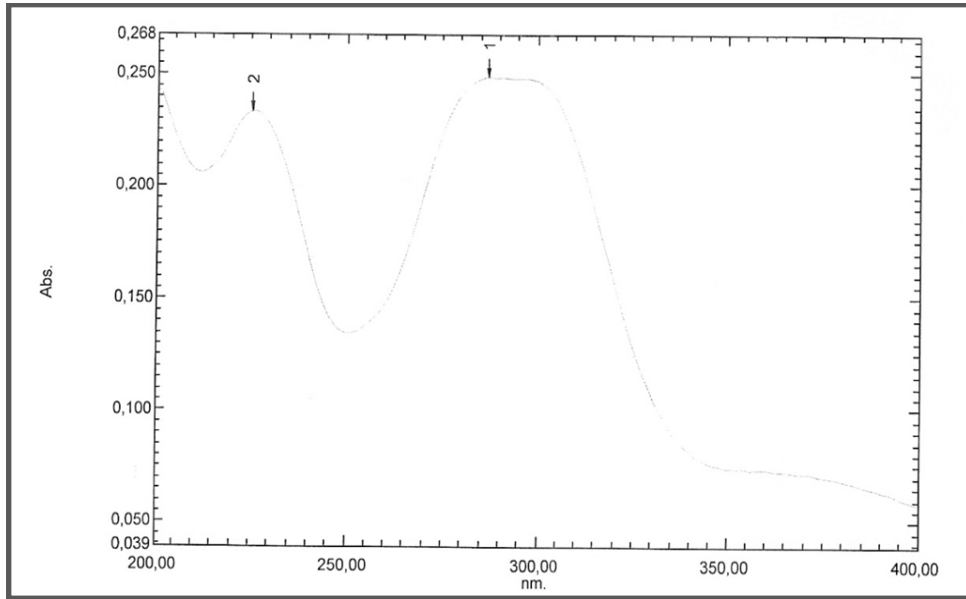
4.1.1.1.1. UV Spektrumuna Ait Bulgular

Raloksifen hidroklorürün PG/DMEM (%60/%40) içindeki spektrumu Şekil 14'de gösterilmiştir. Dalga boyu taraması sonucunda raloksifen hidroklorürün maksimum dalga boyu verdiği absorbansın (λ_{max}) 287 nm olduğu görüldü.



Şekil 14. Raloksifen hidroklorüre ait PG/DMEM (%60/%40) içindeki 200-550 nm arası dalga boyu taraması

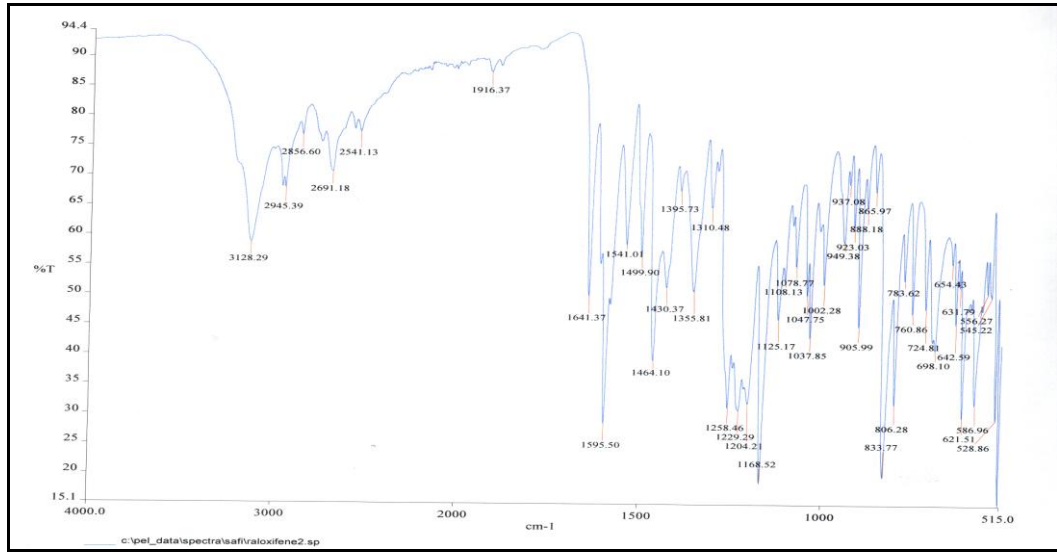
Raloksifen hidroklorürün pH 7.4 fosfat tamponu içindeki spektrumu Şekil 15’de gösterilmiştir. Dalga boyu taraması sonucunda raloksifen hidroklorürün maksimum dalga boyu verdiği absorbansın ($\lambda_{\max}$) 287 nm olduğu görüldü.



Şekil 15. Raloksifen hidroklorüre ait pH 7.4 fosfat tamponu içindeki 200-400 nm arası dalga boyu taraması

4.1.1.1.2. FT-IR Spektrumuna Ait Bulgular

Toz raloksifen hidroklorür kullanılarak FT-IR ile Şekil 16'da görülen spektrum elde edilmiştir.

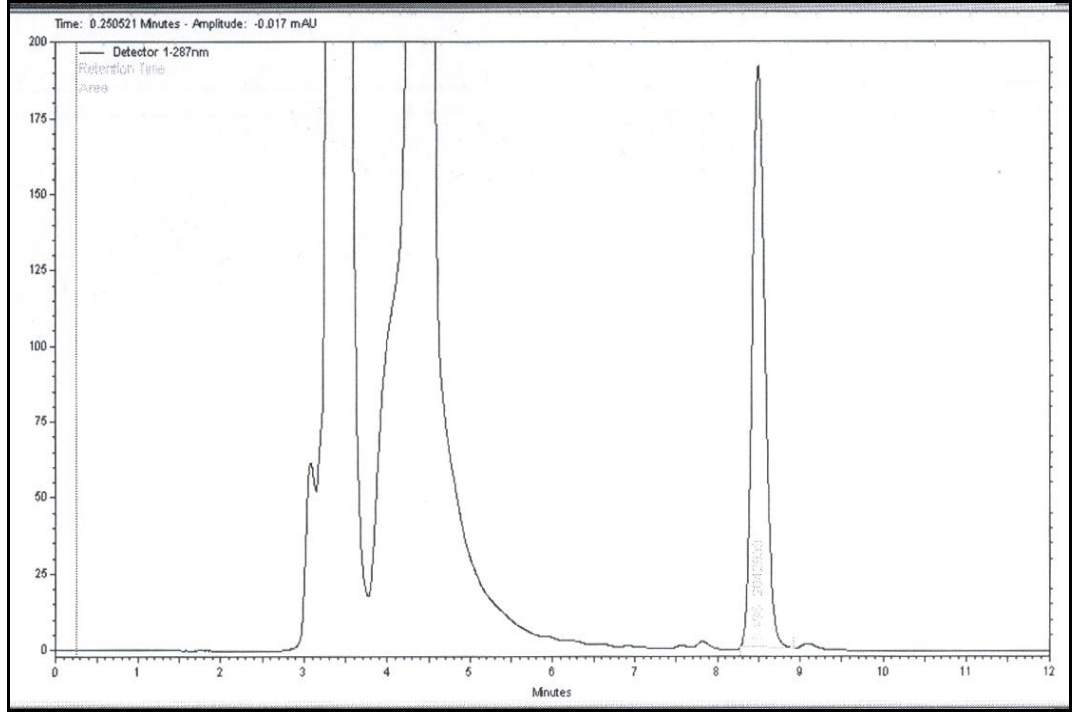


Şekil 16. Raloksifen hidroklorüre ait FT-IR spektrumu

4.1.1.1.3. Raloksifen Hidroklorürün HPLC ile Miktar Tayini Yönteminin Validasyonuna Ait Bulgular

4.1.1.1.3.1. Raloksifen Hidroklorürün PG/DMEM (%60/%40) İçinde Validasyonuna Ait Bulgular

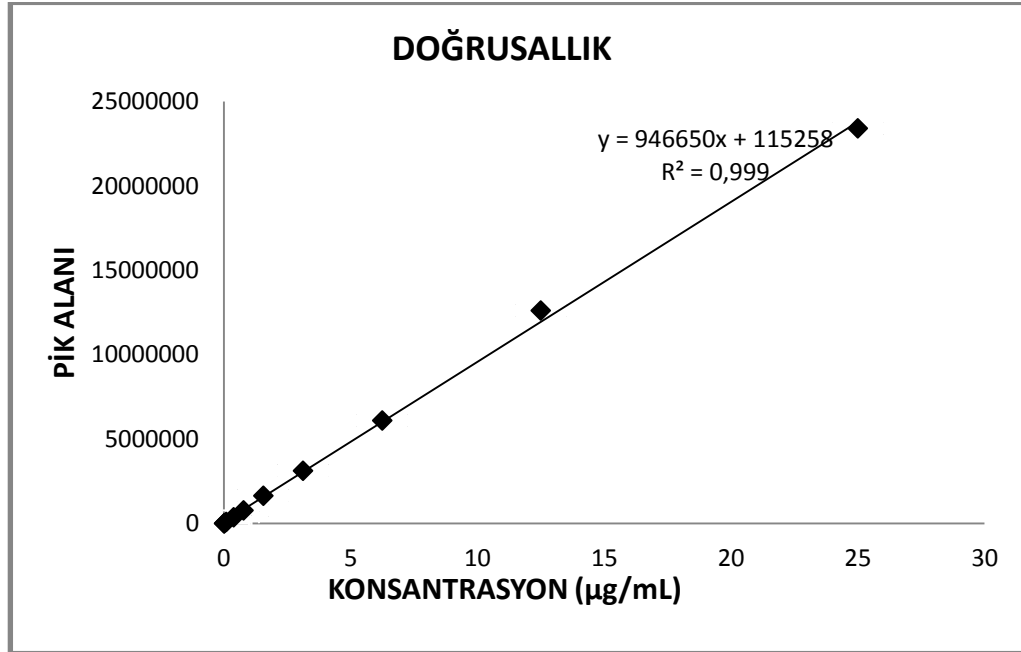
Raloksifenin PG/DMEM' de hazırlanan çözeltilerinin HPLC'ye enjekte edilmesiyle elde edilen pik örneği Şekil 17'de görülmektedir.



Şekil 17. PG/DMEM içerisinde 6.25 µg/mL'nin raloksifen piki

4.1.1.1.3.1.1. Doğrusallık

Çalışmalar, Bölüm 3.2.1.1.1.1'de anlatıldığı gibi yapıldı. Hesaplanan pik alanlarına karşılık konsantrasyonlar grafiğe geçirildi. En küçük kareler yöntemine göre değerlendirilip, standart doğru denklemi bulundu ve doğrusallığı kanıtlandı. Elde edilen konsantrasyon pik alanı grafiği Şekil 18'de verilmiştir.



Şekil 18. Raloksifenin PG/DMEM’li ortamda HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği (n=6)

4.1.1.1.3.1.2. Doğruluk ve Geri Elde

Çalışmalar Bölüm 3.2.1.1.1.2’de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 13’de verilmiştir.

Tablo 13. Raloksifenin PG/DMEM içindeki çözeltisinden geri elde ile hesaplanan miktarları (n=3)

Çözeltideki Raloksifen Yüzdesi	Çözeltideki Raloksifen Miktarı (µg/mL)	Hesapla Bulunan Raloksifen Miktarı $\pm$ G.S	Bağıl Sapma Ortalama
%80	0.120	$0.120 \pm 0.173 \times 10^{-3}$	0.233
%100	0.150	$0.150 \pm 0.586 \times 10^{-3}$	0.389
%120	0.180	$0.180 \pm 0.191 \times 10^{-3}$	0.171

4.1.1.1.3.1.3. Kesinlik

a. Deney İçi Kesinlik

Çalışmalar Bölüm 3.2.1.1.1.3'de anlatıldığı gibi yapıldı. Raloksifenin PG/DMEM (%60/%40) içindeki deney içi kesinlik sonuçları Tablo 14'de verilmiştir.

Tablo 14. Raloksifenin PG/DMEM içindeki deney içi kesinlik sonuçları

Örnek No	Raloksifen Çözeltilisinin Derişimi (µg/mL)	Hesapla Bulunan Raloksifen Çözeltilisi Derişimi (µg/mL)
1	0.180	0.179
2	0.180	0.180
3	0.180	0.183
4	0.180	0.179
5	0.180	0.177
6	0.180	0.179
7	0.180	0.181
8	0.180	0.179
9	0.180	0.180
10	0.180	0.180
Ortalama	0.180	0.179
Standart Sapma		0.155×10^{-2}
Bağıl Sapma		0.862

b. Deneyler Arası Kesinlik

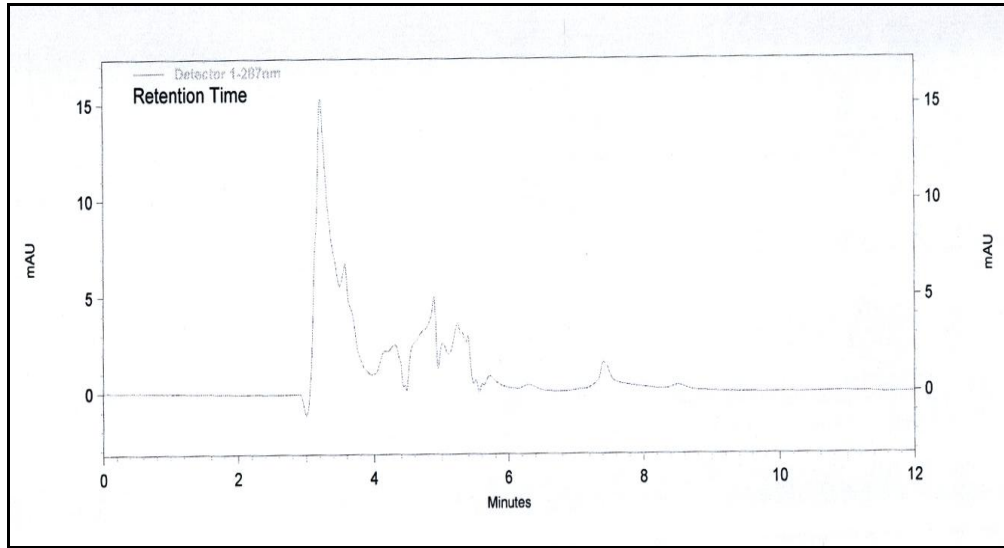
Raloksifenin PG/DMEM (%60/%40) içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları Tablo 15'de verilmiştir.

Tablo 15. Raloksifenin PG/DMEM (%60/%40) içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları

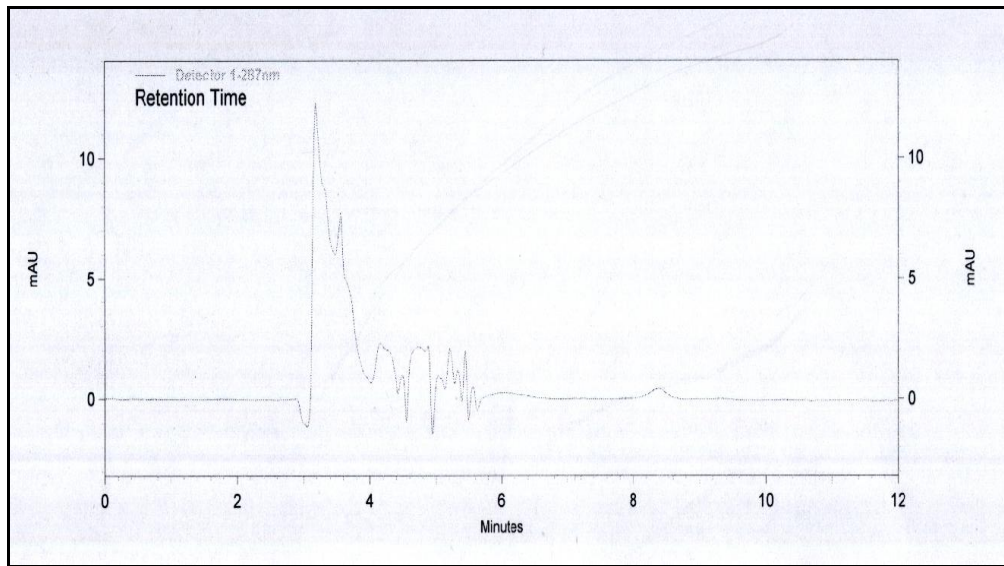
Derişim(µg/mL)	1.gün	2.gün	3.gün	ORT	S.S	B.S
25	24.6	24.6	24.7	24.6	0.1	0.250
6.25	6.34	6.33	6.32	6.33	0.01	0.133
1.56	1.62	1.63	1.63	1.63	0.01	0.303
0.39	0.279	0.286	0.278	0.281	0.004	1.500

4.1.1.1.3.1.4. Özgünlük ve Seçicilik

Çalışmalar bölüm 3.2.1.1.1.4'de anlatıldığı gibi yapıldı. Raloksifenin pik verdiği dalga boyunda sodyum taurokolat'ın ve dimetil- β -CD'nin pik vermediği gösterildi. Yöntemin raloksifen tayinine uygun oluşuna karar verildi. Şekil 19'da sodyum taurokolat ve 20'de dimetil- β -CD'ye ait pikler görülmektedir.



Şekil 19. Sodyum taurokolat enjeksiyonu ile elde edilen pik



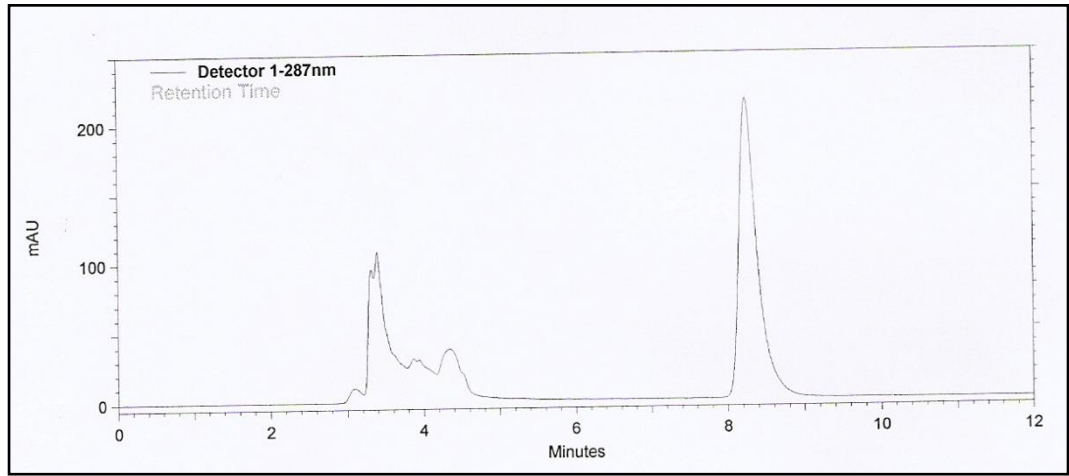
Şekil 20. Dimetil- β -CD enjeksiyonu ile elde edilen pik

4.1.1.1.3.1.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı

Hesaplar Bölüm 3.2.1.1.1.1.5'de verilen formüllere göre yapıldı. Analitik yöntemin duyarlılığı 0.0102 µg/mL, saptama sınırı 0.0310 µg/mL olarak bulundu.

4.1.1.1.3.2. Raloksifen Hidroklorürün pH 7.4 Fosfat Tamponu İçinde Validasyonuna Ait Bulgular

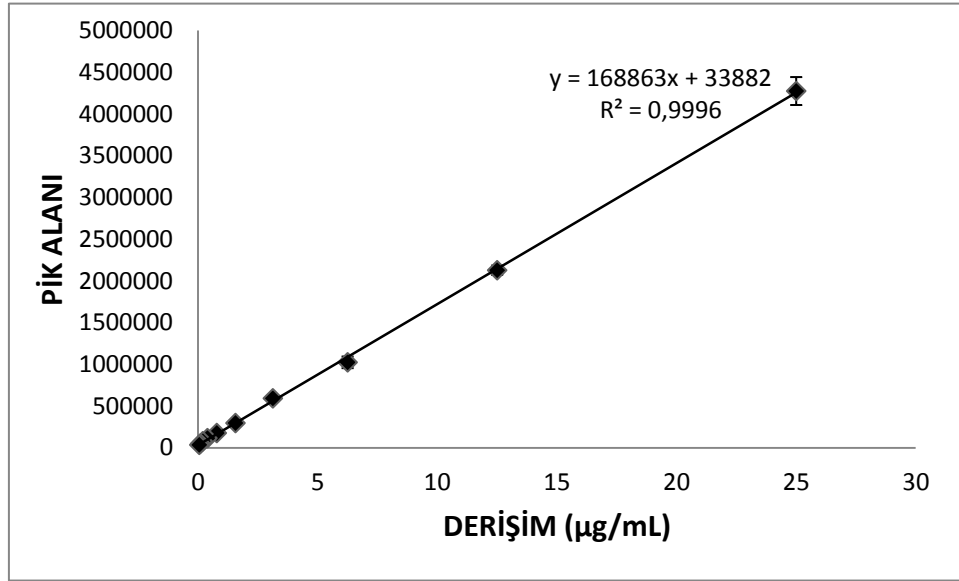
Raloksifenin pH 7.4 fosfat tamponu²⁰⁵ içinde hazırlanan çözeltilerinin HPLC'ye enjekte edilmesiyle elde edilen pik örneği Şekil 21'de görülmektedir.



Şekil 21. pH 7.4 fosfat tamponu içerisinde 6.25 µg/mL'nin raloksifen piki

4.1.1.1.3.2.1. Doğrusallık

Çalışmalar, Bölüm 3.2.1.1.1.1.1'de anlatıldığı gibi yapıldı. Hesaplanan pik alanlarına karşılık konsantrasyonlar grafiğe geçirildi. En küçük kareler yöntemine göre değerlendirilip, standart doğru denklemi bulundu ve doğrusallığı kanıtlandı. Elde edilen konsantrasyon pik alanı grafiği Şekil 22'de verilmiştir.



Şekil 22. Raloksifenin pH 7.4 fosfat tamponunda HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği (n=6)

4.1.1.1.3.2.2. Doğruluk ve Geri Elde

Çalışmalar Bölüm 3.2.1.1.1.2'de anlatıldığı gibi yapıldı. Sonuçlar Tablo 16'da verilmiştir.

Tablo 16. Raloksifenin pH 7.4 fosfat tamponu içindeki çözeltisinden geri elde ile hesaplanan miktarları (n=3)

Çözeltideki Raloksifen Yüzdesi	Çözeltideki Raloksifen Miktarı (µg/mL)	Hesapla Bulunan Raloksifen Miktarı ± G.S	Bağıl Sapma Ortalama
%80	0.8	0.799 ± 0.038	0.0333
%100	1	0.980 ± 0.042	0.0368
%120	1.2	1.18 ± 0.06	0.0496

4.1.1.1.3.2.3. Kesinlik

a. Deney İçi Kesinlik

Çalışmalar Bölüm 3.2.1.1.1.3'de anlatıldığı gibi yapıldı. Raloksifenin pH 7.4 fosfat tamponu içindeki deney içi kesinlik sonuçları Tablo 17'da verilmiştir.

Tablo 17. Raloksifenin pH 7.4 fosfat tamponu içindeki deney içi kesinlik sonuçları

Örnek No	Raloksifen Çözeltilisinin Derişimi (µg/mL)	Hesapla Bulunan Raloksifen Çözeltilisi Derişimi (µg/mL)
1	1.00	1.017
2	1.00	0.979
3	1.00	1.022
4	1.00	0.956
5	1.00	1.024
6	1.00	0.994
7	1.00	1.013
8	1.00	0.990
9	1.00	1.085
10	1.00	0.969
Ortalama	1.00	1.004
Standart Sapma		0.027
Bağıl Sapma		2.65

b. Deneyler Arası Kesinlik

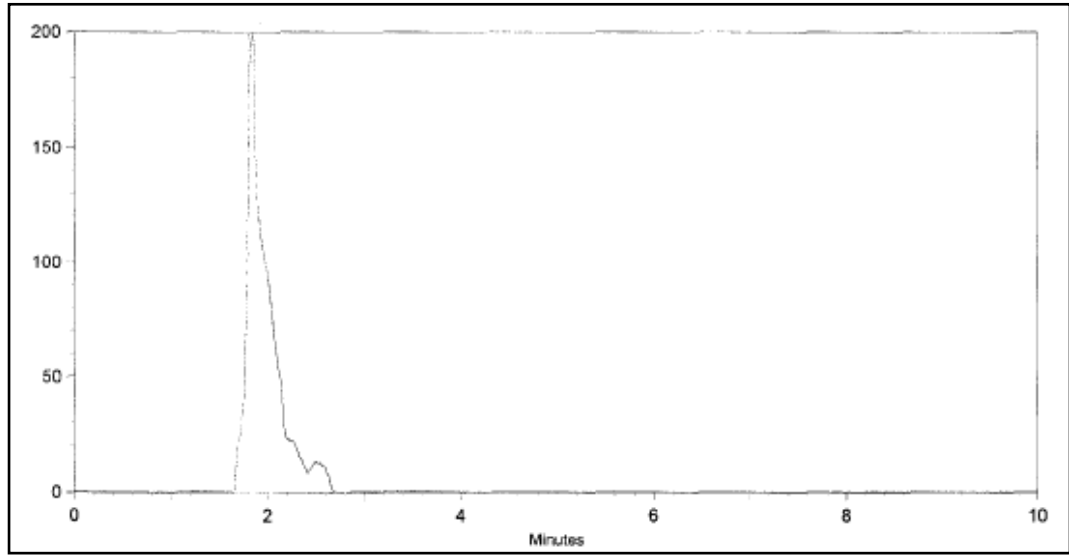
Raloksifenin pH 7.4 fosfat tamponu içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları Tablo 18'de verilmiştir.

Tablo 18. Raloksifenin pH 7.4 fosfat tamponu içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları

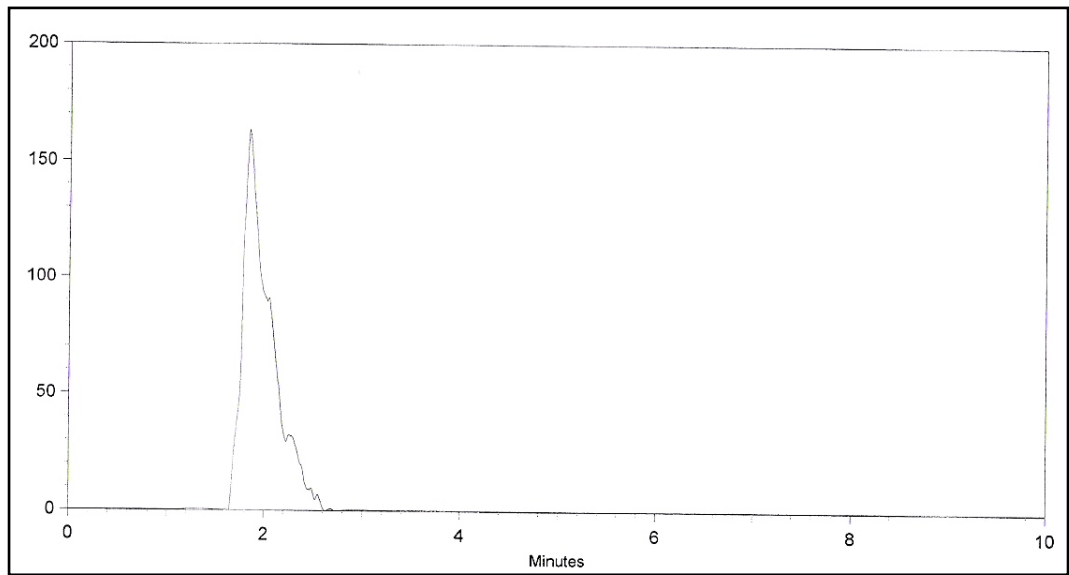
Derişim(µg/mL)	1.gün	2.gün	3.gün	ORT	S.S	B.S
25	24.5	24.9	23.8	24.4	0.6	2.35
6.25	5.98	6.23	6.27	6.16	0.16	2.61
1.56	1.66	1.59	1.54	1.53	0.04	2.92
0.39	0.358	0.372	0.392	0.38	0.015	3.91

4.1.1.1.3.2.4. Özgünlük ve Seçicilik

Çalışmalar bölüm 3.2.1.1.1.4'de anlatıldığı gibi yapıldı. Raloksifenin pik verdiği dalga boyunda sodyum taurokolat'ın ve dimetil- β -CD'nin pik vermediği gösterildi. Yöntemin raloksifen tayinine uygun oluşuna karar verildi. Şekil 23'de sodyum taurokolat ve 24'de dimetil- β -CD'ye ait pikler görülmektedir.



Şekil 23. Sodyum taurokolat enjeksiyonu ile elde edilen pik



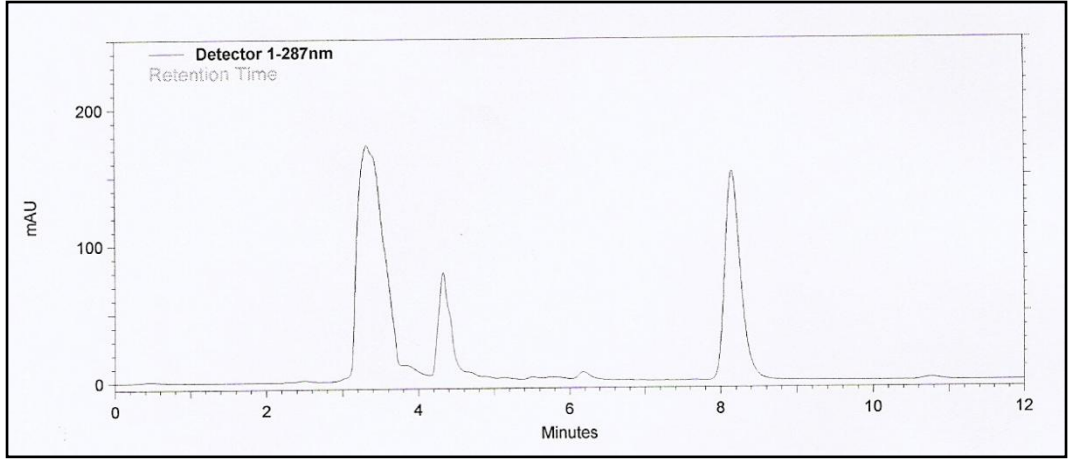
Şekil 24. Dimetil- β -CD enjeksiyonu ile elde edilen pik

4.1.1.1.3.2.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı

Hesaplar Bölüm 3.2.1.1.1.1.5'de verilen formüllere göre yapıldı. Analitik yöntemin duyarlılığı 0.0211 µg/mL, saptama sınırı 0.0640 µg/mL olarak bulundu.

4.1.1.1.3.3. Raloksifen Hidroklorürün Fare Plazması İçinde Validasyonuna Ait Bulgular

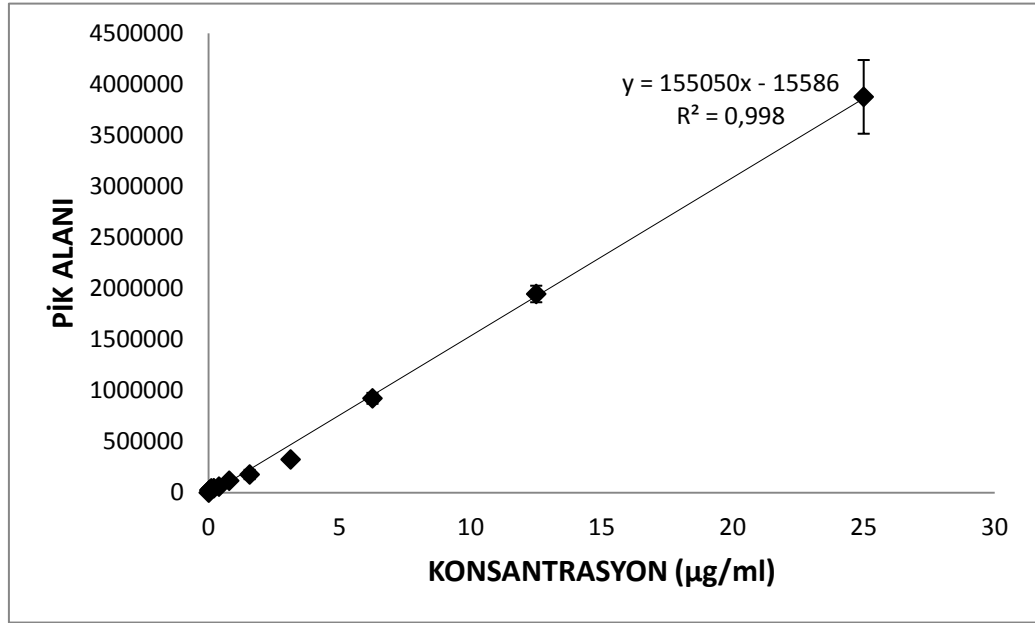
Raloksifen ile plazmada Bölüm 3.2.1.1.1.1.1'de anlatıldığı şekilde hazırlanan örneklerin HPLC'ye enjekte edilmesiyle elde edilen pik örneği Şekil 25'de görülmektedir.



Şekil 25. Plazmada 6.25 µg/mL derişimde raloksifen piki

4.1.1.1.3.3.1. Doğrusallık

Çalışmalar, Bölüm 3.2.1.1.1.1.1'de anlatıldığı gibi yapıldı. Hesaplanan pik alanlarına karşılık konsantrasyonlar grafiğe geçirildi. En küçük kareler yöntemine göre değerlendirilip, standart doğru denklemi bulundu ve doğrusallığı kanıtlandı. Elde edilen konsantrasyon pik alanı grafiği Şekil 26'da verilmiştir.



Şekil 26. Raloksifenin plazmada HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği (n=6)

4.1.1.1.3.3.2. Doğruluk ve Geri Elde

Çalışmalar Bölüm 3.2.1.1.1.2'de anlatıldığı gibi yapıldı. Sonuçlar Tablo 19'da verilmiştir.

Tablo 19. Raloksifenin plazma içindeki çözeltisinden geri elde ile hesaplanan miktarları (n=3)

Çözeltideki Raloksifen Yüzdesi	Çözeltideki Raloksifen Miktarı (µg/mL)	Hesapla Bulunan Raloksifen Miktarı ± G.S	Bağıl Sapma Ortalama
%80	0.120	0.121±0.004	3.16
%100	0.150	0.147±0.003	1.94
%120	0.180	0.181±0.004	1.85

4.1.1.1.3.3.3. Kesinlik

a. Deney İçi Kesinlik

Çalışmalar Bölüm 3.2.1.1.1.3'de anlatıldığı gibi yapıldı. Raloksifenin plazma içindeki deney içi kesinlik sonuçları Tablo 20'de verilmiştir.

Tablo 20. Raloksifenin plazma içindeki deney içi kesinlik sonuçları

Örnek No	Raloksifen Çözeltilisinin Derişimi (µg/mL)	Hesapla Bulunan Raloksifen Çözeltilisi Derişimi (µg/mL)
1	0.180	0.173
2	0.180	0.176
3	0.180	0.177
4	0.180	0.181
5	0.180	0.184
6	0.180	0.191
7	0.180	0.176
8	0.180	0.187
9	0.180	0.175
10	0.180	0.191
Ortalama	0.180	0.181
Standart Sapma		0.007
Bağıl Sapma		3.76

b. Deneyler Arası Kesinlik

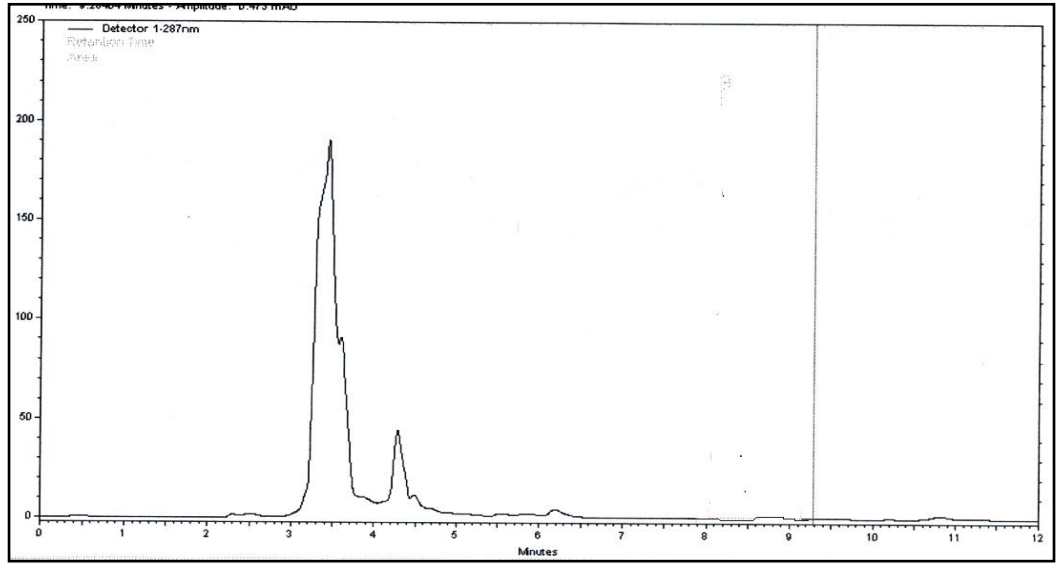
Raloksifenin plazma içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları Tablo 21'de verilmiştir.

Tablo 21. Raloksifenin plazma içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları

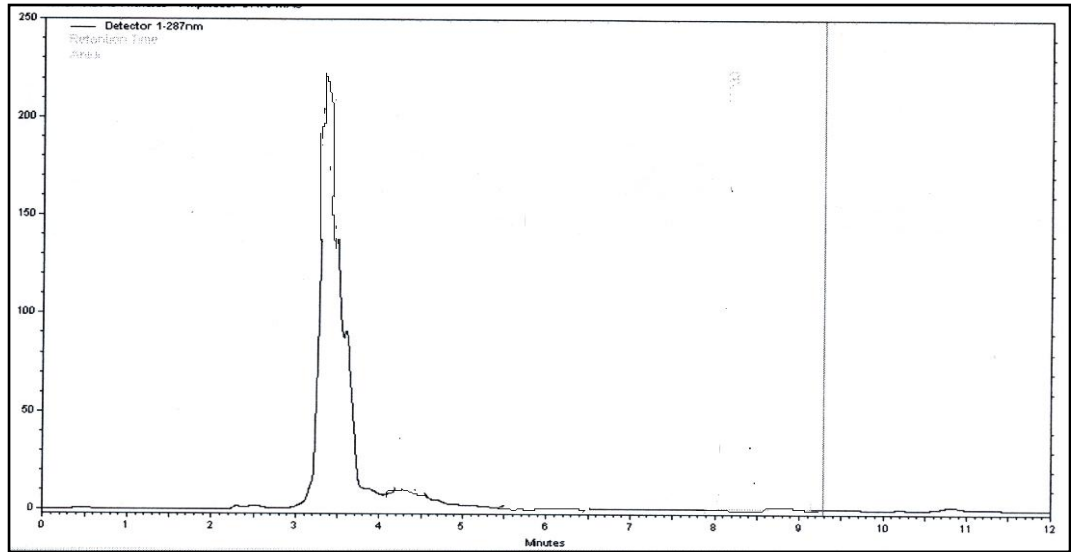
Derişim(µg/mL)	1.gün	2.gün	3.gün	ORT	S.S	B.S
25	24.4	23.8	23.0	24	0.435	1.82
6.25	6.31	6.85	6.36	6.10	0.47	4.59
1.56	1.51	1.50	1.58	1.53	0.05	2.74
0.39	0.409	0.376	0.381	0.389	0.079	4.62

4.1.1.1.3.3.4. Özgünlük ve Seçicilik

Çalışmalar bölüm 3.2.1.1.1.4'de anlatıldığı gibi yapıldı. Raloksifenin pik verdiği dalga boyunda sodyum taurokolat'ın ve dimetil- β -CD'nin pik vermediği gösterildi. Yöntemin raloksifen tayinine uygun oluşuna karar verildi. Şekil 27'de sodyum taurokolat ve 28'de dimetil- β -CD'ye ait pikler görülmektedir.



Şekil 27 Sodyum taurokolat enjeksiyonu ile elde edilen pik



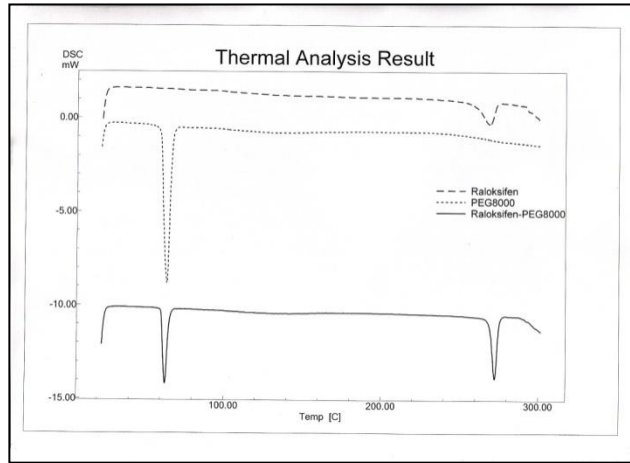
Şekil 28. Dimetil- β -CD enjeksiyonu ile elde edilen pik

4.1.1.1.3.3.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı

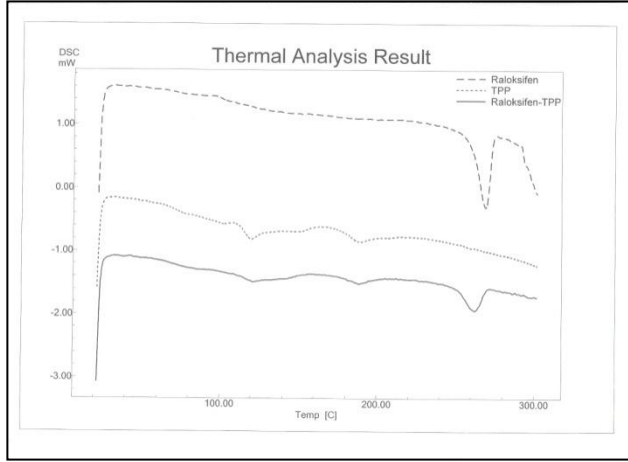
Hesaplar Bölüm 3.2.1.1.1.5’de verilen formüllere göre yapıldı. Analitik yöntemin duyarlılığı 0.0275 µg/mL, saptama sınırı 0.0833 µg/mL olarak bulundu.

4.1.1.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizine Ait Bulgular

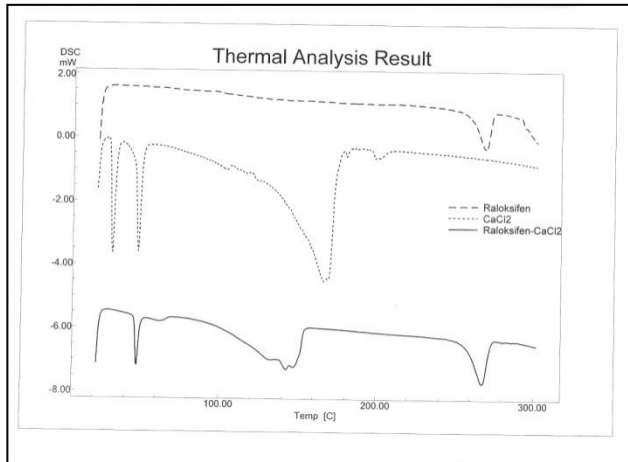
Çalışmalar, DSC (Differential Scanning Calorimetry) kullanılarak 10°C/dk tarama hızında ve 300°C’ye kadar yapıldı. Raloksifen ve formülasyon hazırlamada kullanılan tüm yardımcı maddelerin tek başına ve etkin maddeyle 1:1 oranındaki karışımları kullanarak yapıldı. Bölüm 3.2.1.1.2 ‘de kullanılan maddeler belirtilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen grafikler Şekil 29-37 arasında görülmektedir.



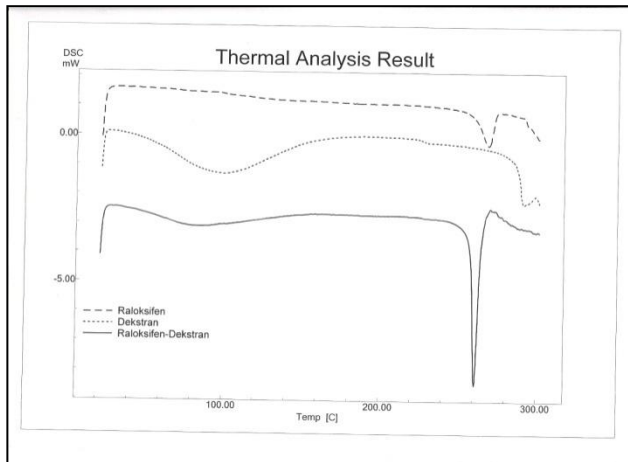
Şekil 29. Raloksifen, PEG 8000 ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı



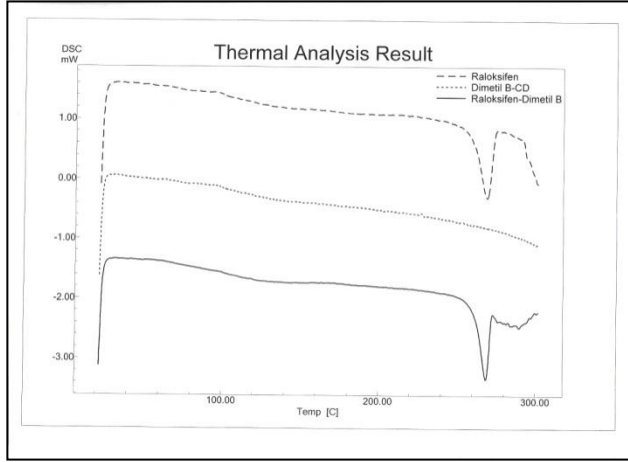
Şekil 30. Raloksifen, TPP ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı



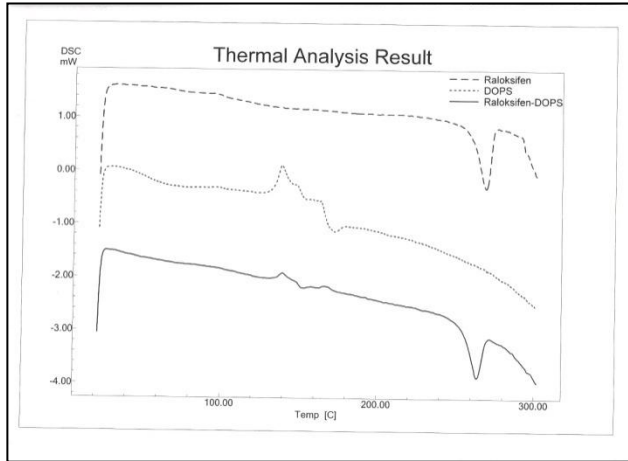
Şekil 31. Raloksifen, CaCl₂ ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı



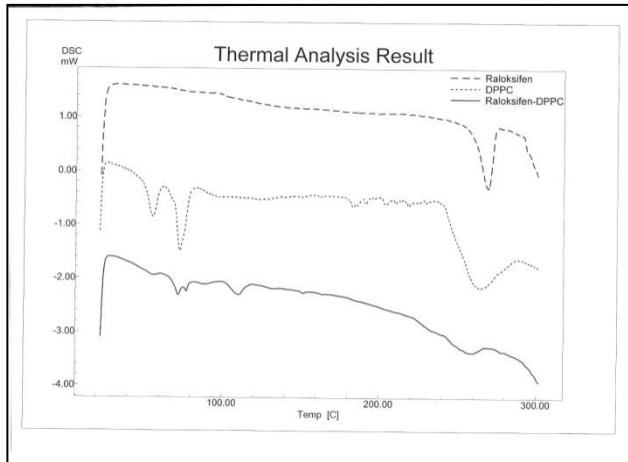
Şekil 32. Raloksifen, Dekstran ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı



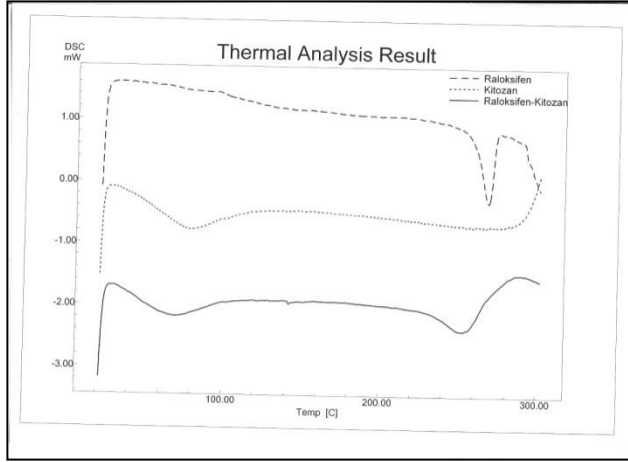
Şekil 33. Raloksifen, Dimetil-β-siklodekstrin ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı



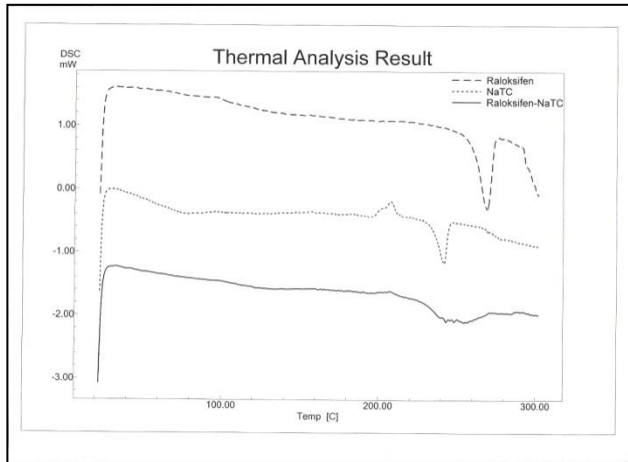
Şekil 34. Raloksifen, DOPS ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı



Şekil 35. Raloksifen, DPPC ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı



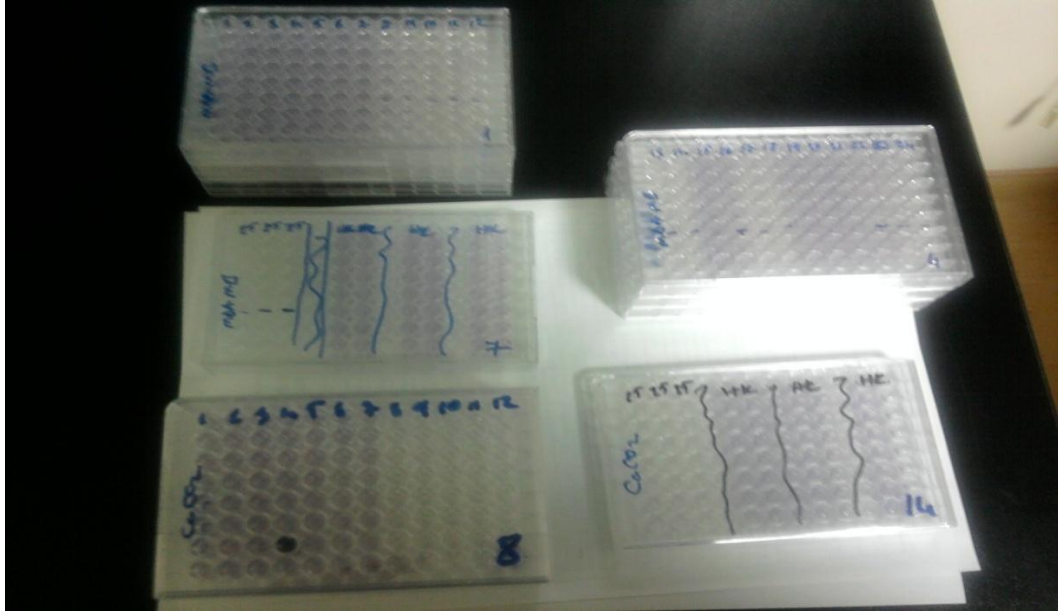
Şekil 36. Raloksifen, Kitozan ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı



Şekil 37. Raloksifen, Sodyum taurokolat ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı

4.1.1.3. MTT Testine Ait Bulgular

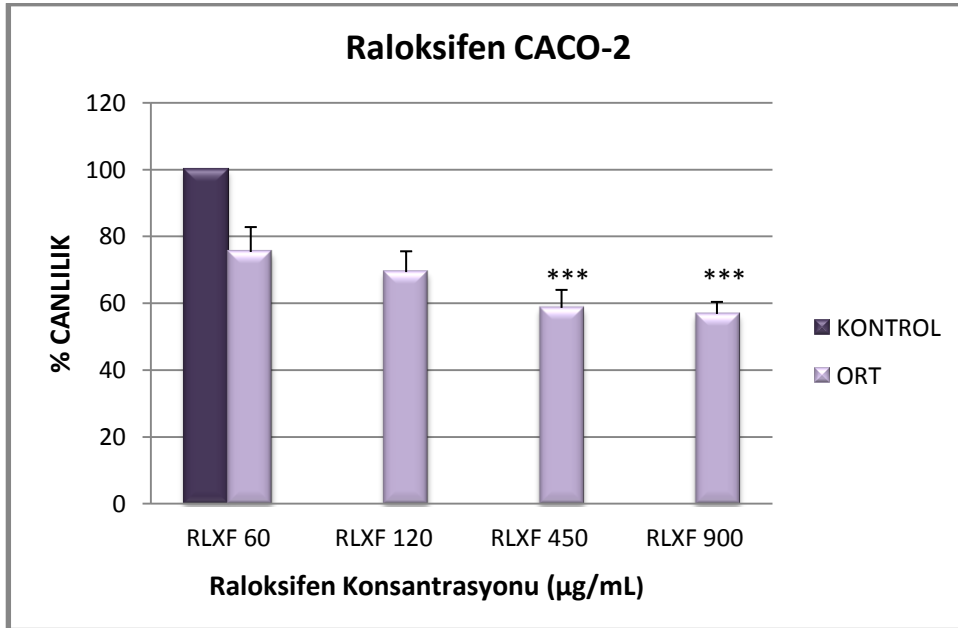
Raloksifen ve absorpsiyon artırıcıların Caco-2, MDA MB-231 ve MCF-7 hücrelerine olan toksik etkileri incelendi. Etkin madde içermeyen lipozom, kohleat ve nanopartikül formülasyonlarının %25, %50 ve %75 oranındaki miktarlarının ve ayrıca hücre kültürü geçişlerinde kullanılan ortam olan PG/DMEM (%60/%40)'in de hücreler üzerine etkileri incelendi. MTT testi sırasında kültür kaplarında oluşan mor renk Resim 18'de gösterilmiştir.



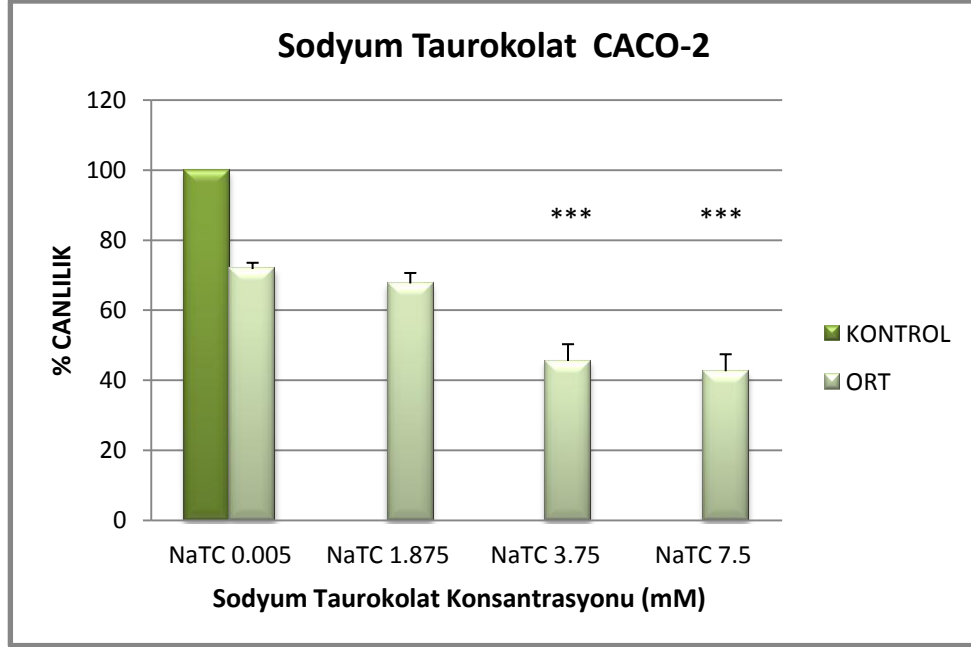
Resim 18. MTT testi sonucunda platelerdeki değişim

4.1.1.3.1. Caco-2 Hücreleriyle Yapılan MTT Testine Ait Bulgular

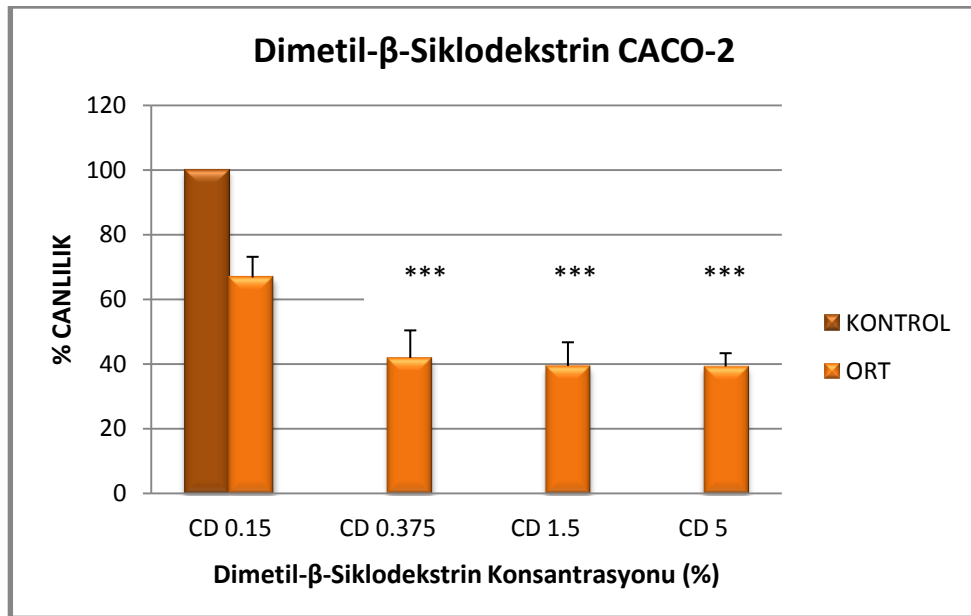
Caco-2 hücreleriyle yapılan MTT testi sonucunda elde edilen %canlılık değerlerine ait bulguların grafikleri Şekil 38-44'de verilmiştir.



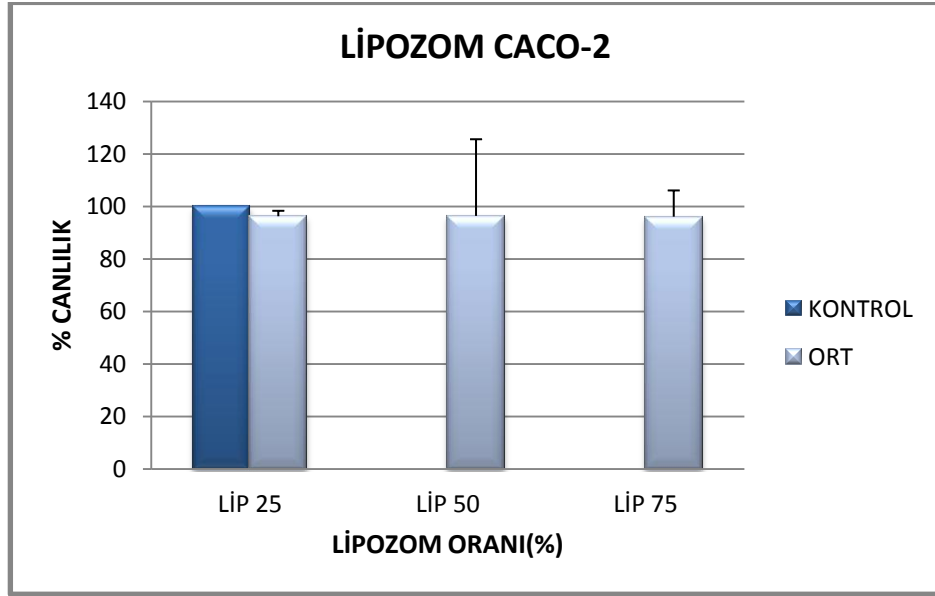
Şekil 38. Raloksifenin Caco-2 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları (**p<0.001)



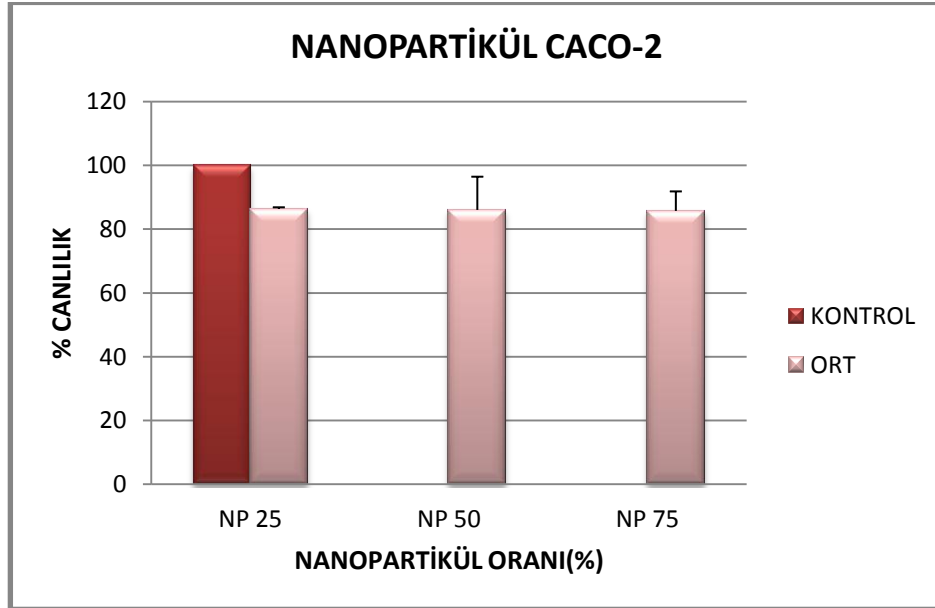
Şekil 39. Sodyum taurokolatın Caco-2 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları (p<0.001)**



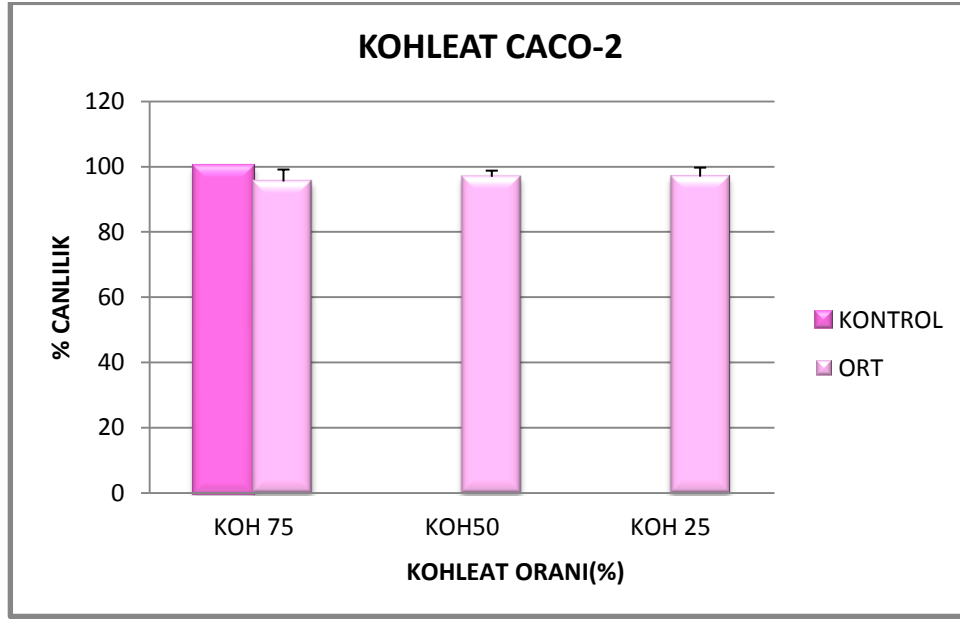
Şekil 40. Dimetil-β-siklodekstrinin Caco-2 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları (p<0.001)**



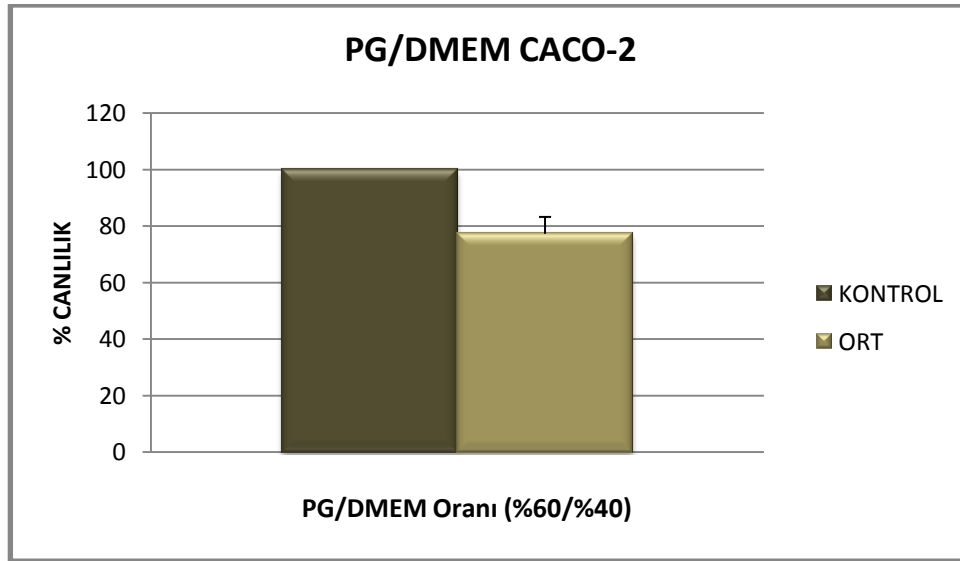
Şekil 41. Lipozomların Caco-2 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları



Şekil 42. Nanopartiküllerin Caco-2 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları



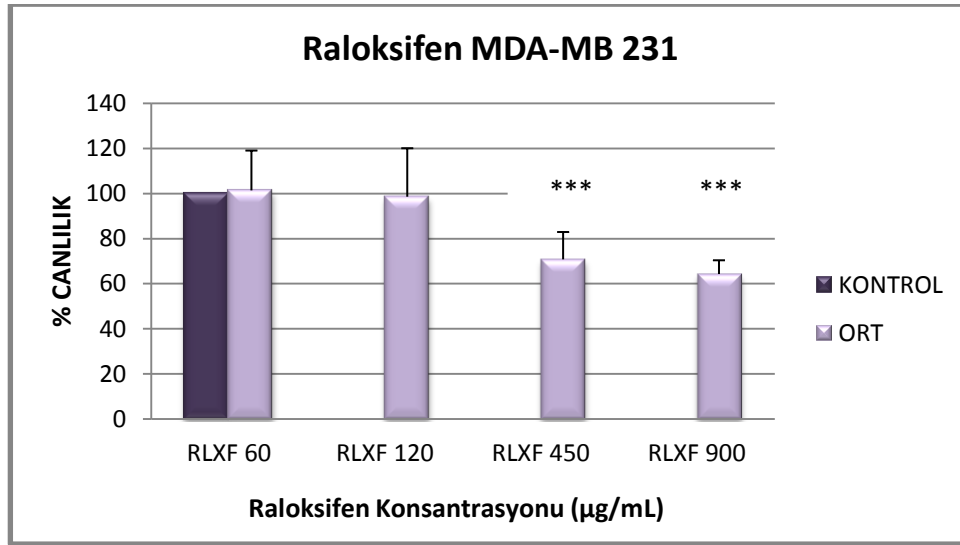
Şekil 43. Kohleatların Caco-2 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları



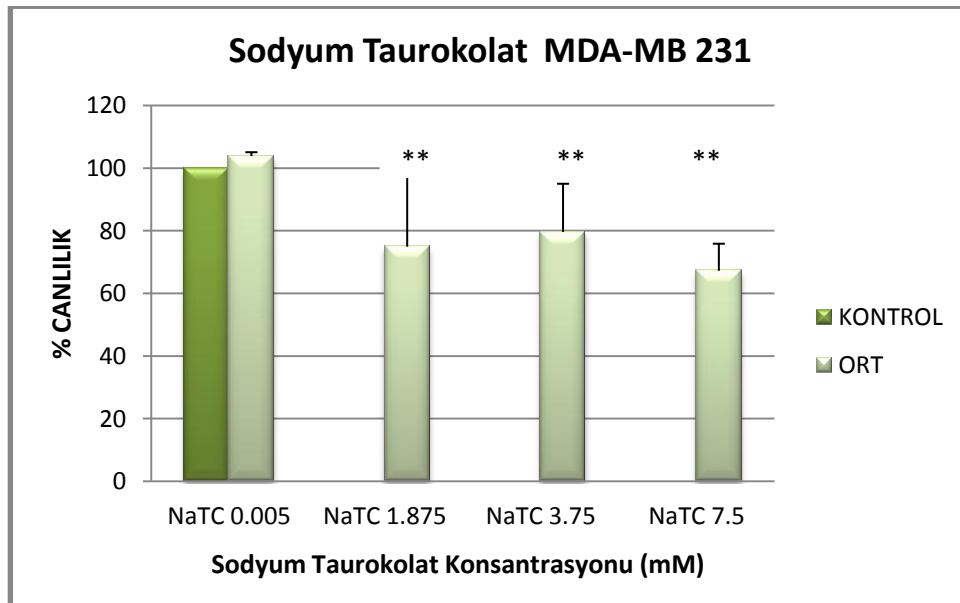
Şekil 44. PG/DMEM (%60/%40)'ın Caco-2 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları

4.1.1.3.2. MDA-MB 231 Hücreleriyle Yapılan MTT Testine Ait Bulgular

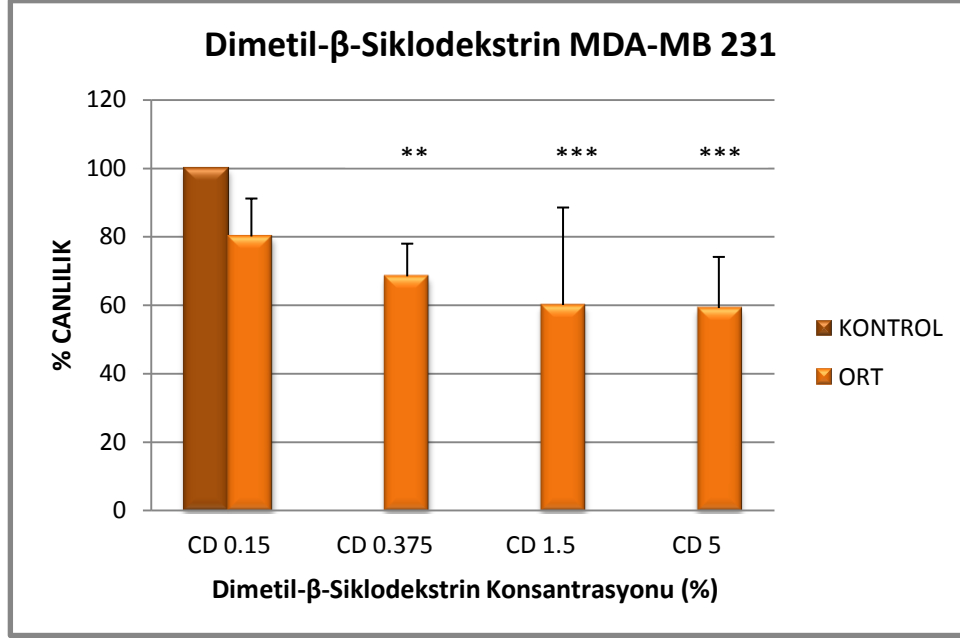
MDA-MB 231 hücreleriyle yapılan MTT testi sonucunda elde edilen %canlılık değerlerine ait bulguların grafikleri Şekil 45-51'de verilmiştir.



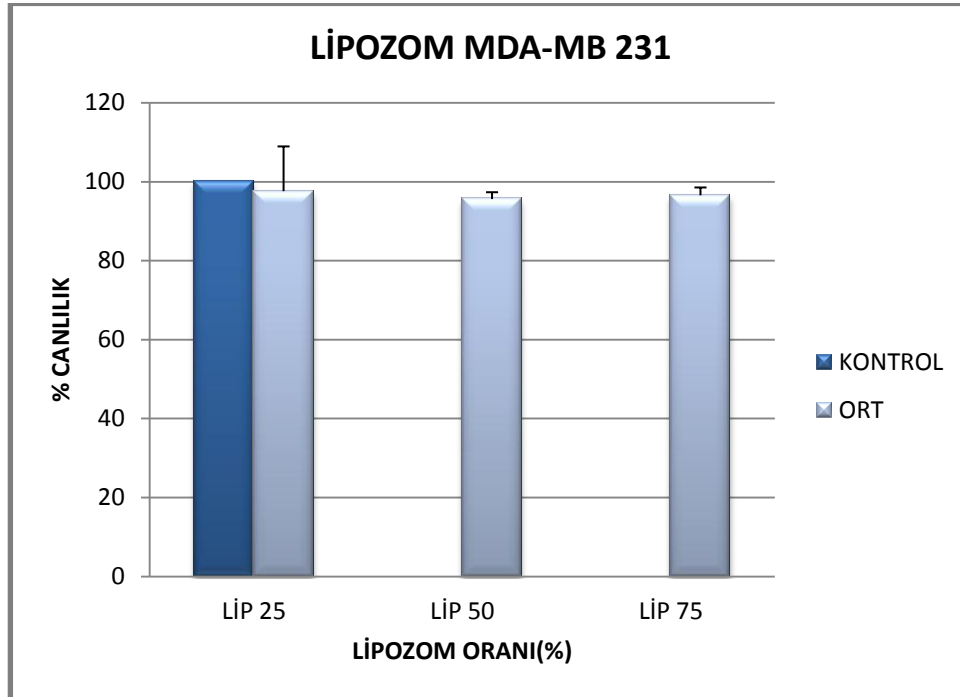
Şekil 45. Raloksifenin MDA-MB 231 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları (***p<0.001)



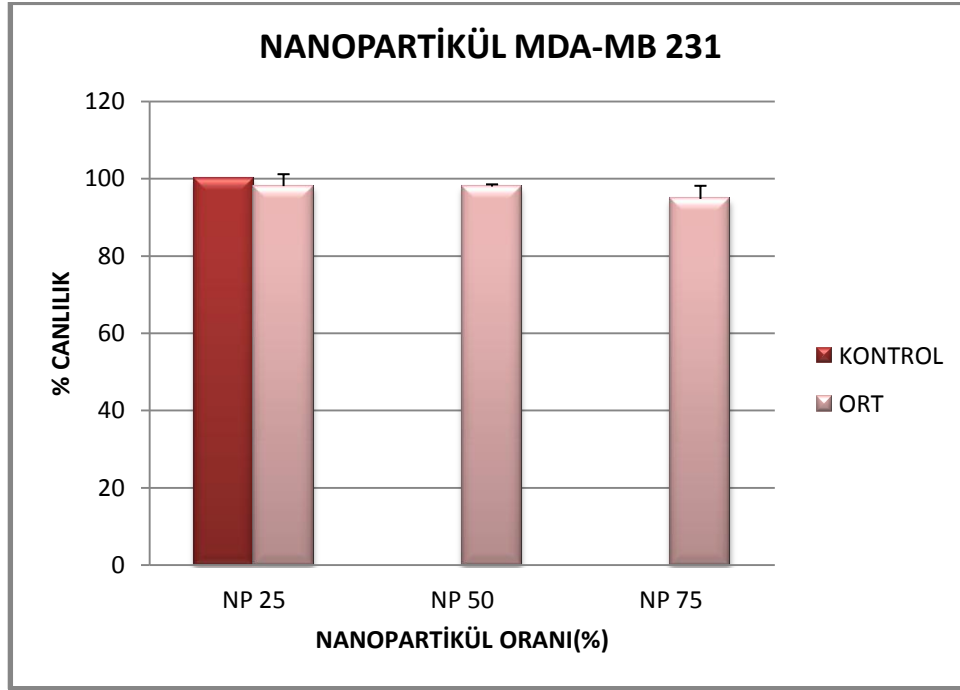
Şekil 46. Sodyum taurokolatın MDA-MB 231 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları (** p<0.01)



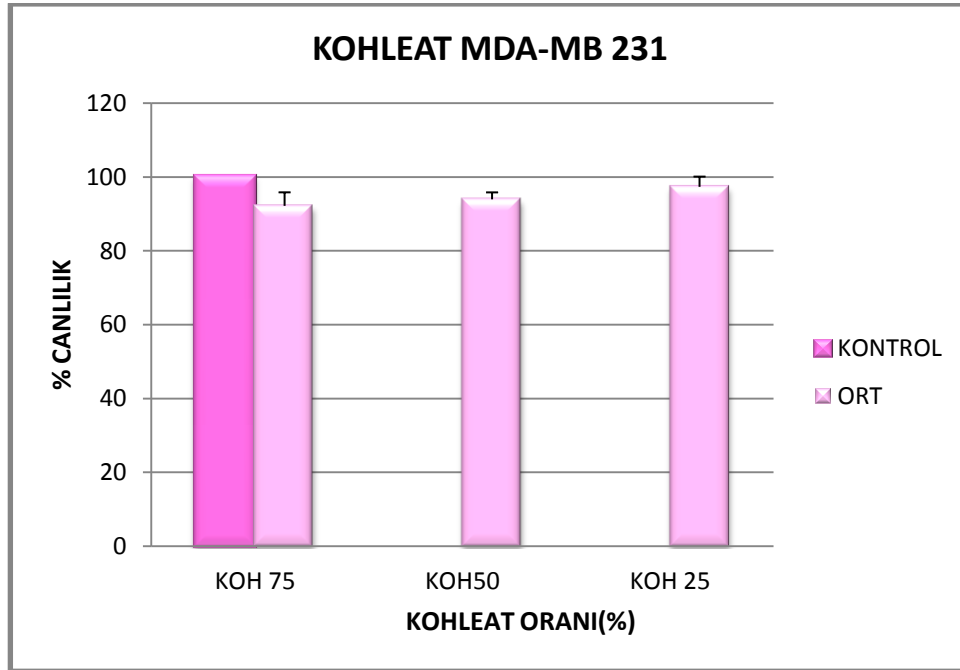
Şekil 47. Dimetil- β -siklodekstrinin MDA-MB 231 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları (p<0.01, *** p<0.001)**



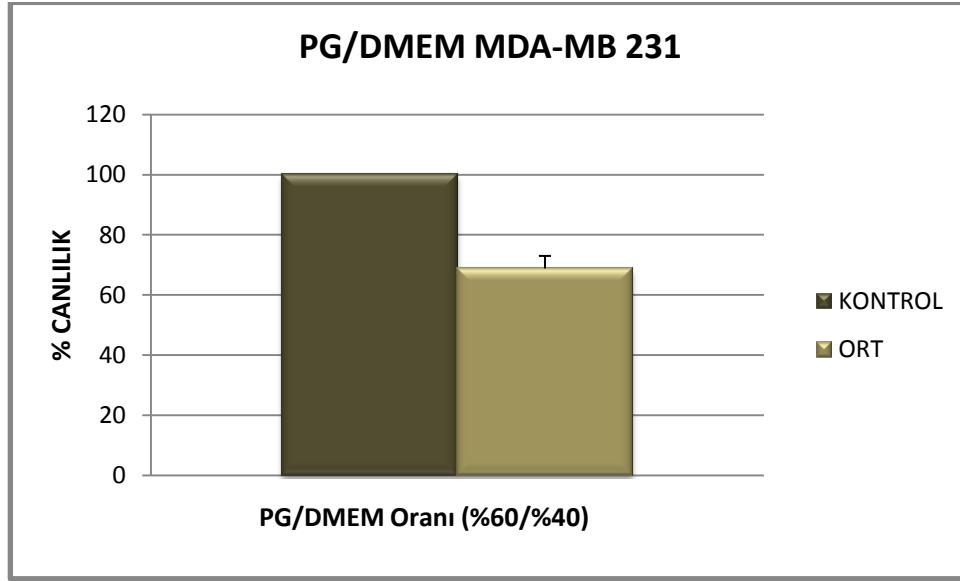
Şekil 48. Lipozomların MDA-MB 231 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları



Şekil 49. Nanopartiküllerin MDA-MB 231 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları



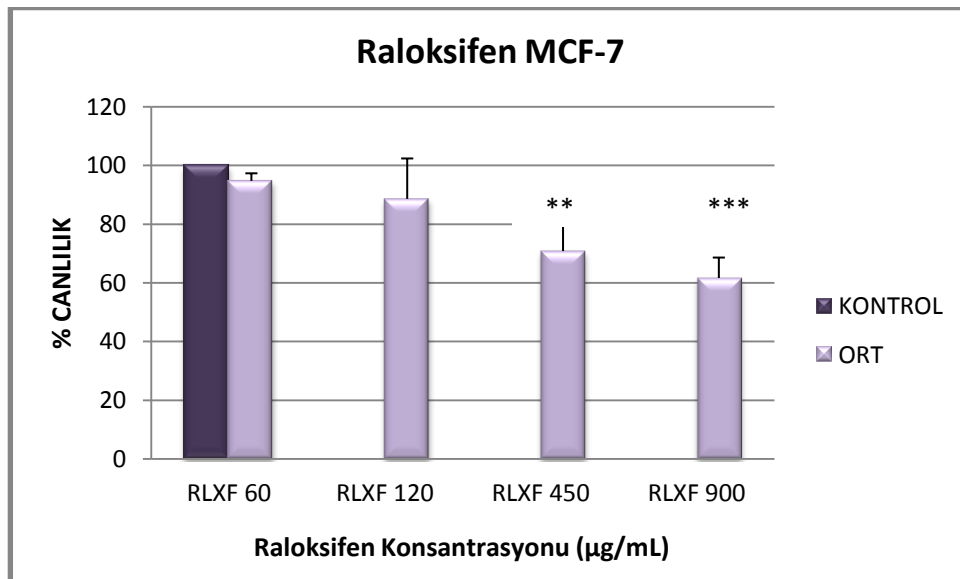
Şekil 50. Kohleatların MDA-MB 231 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları



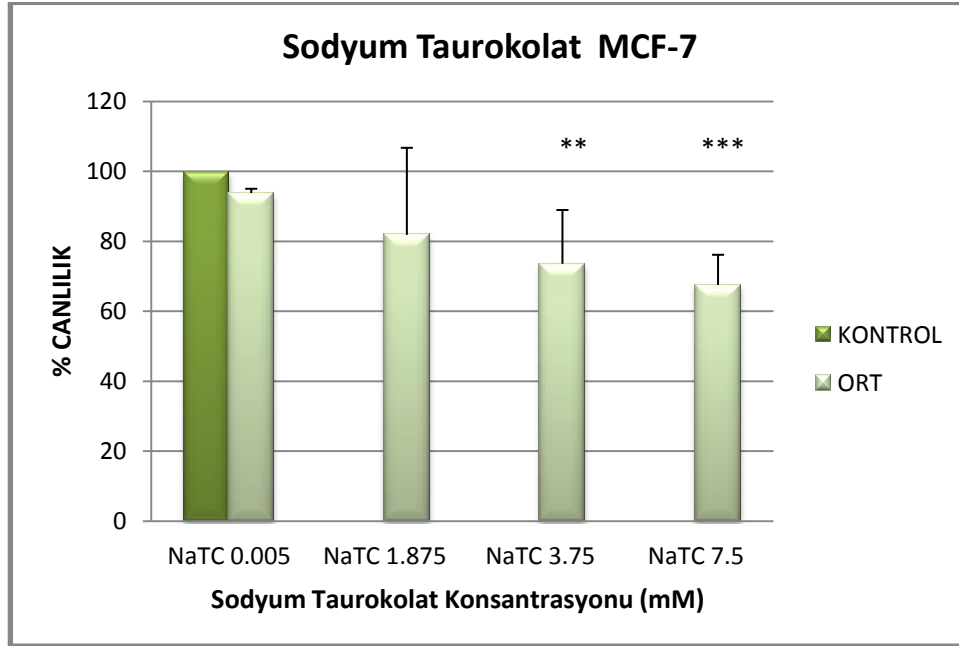
Şekil 51. PG/DMEM (%60/%40)'ın MDA-MB 231 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları

4.1.1.3.3. MCF-7 Hücreleriyle Yapılan MTT Testine Ait Bulgular

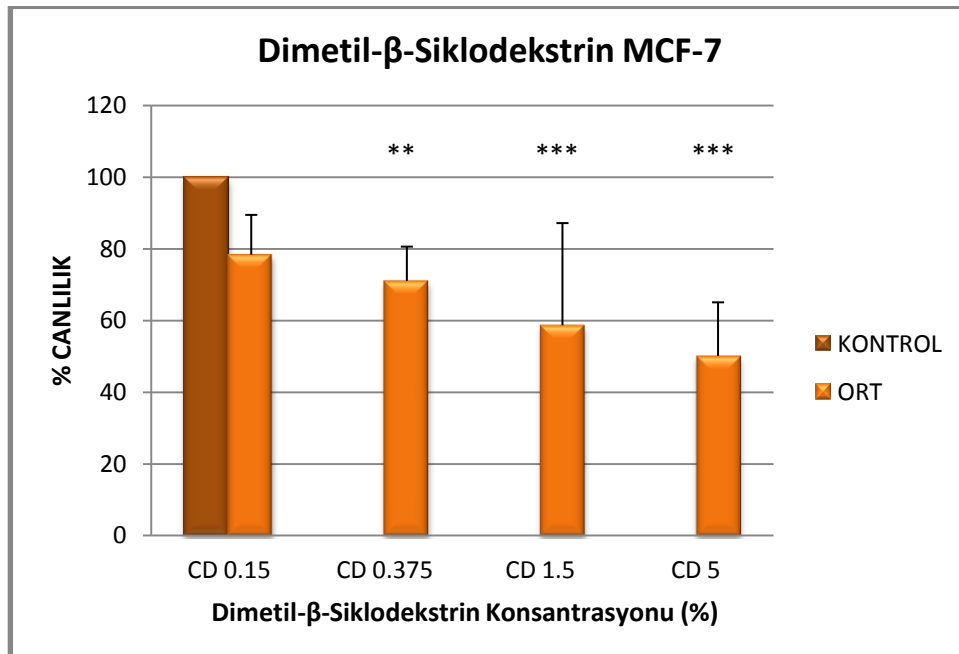
MCF-7 hücreleriyle yapılan MTT testi sonucunda elde edilen %canlılık değerlerine ait bulguların grafikleri Şekil 52-58'de verilmiştir.



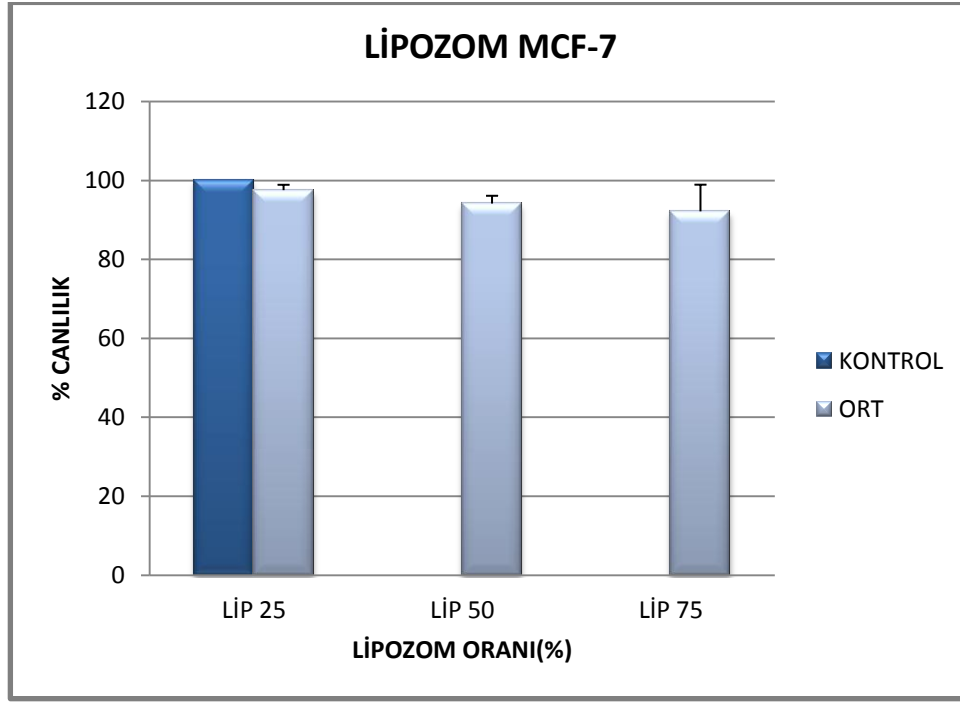
Şekil 52. Raloksifenin MCF-7 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları (p<0.01, ***p<0.001)**



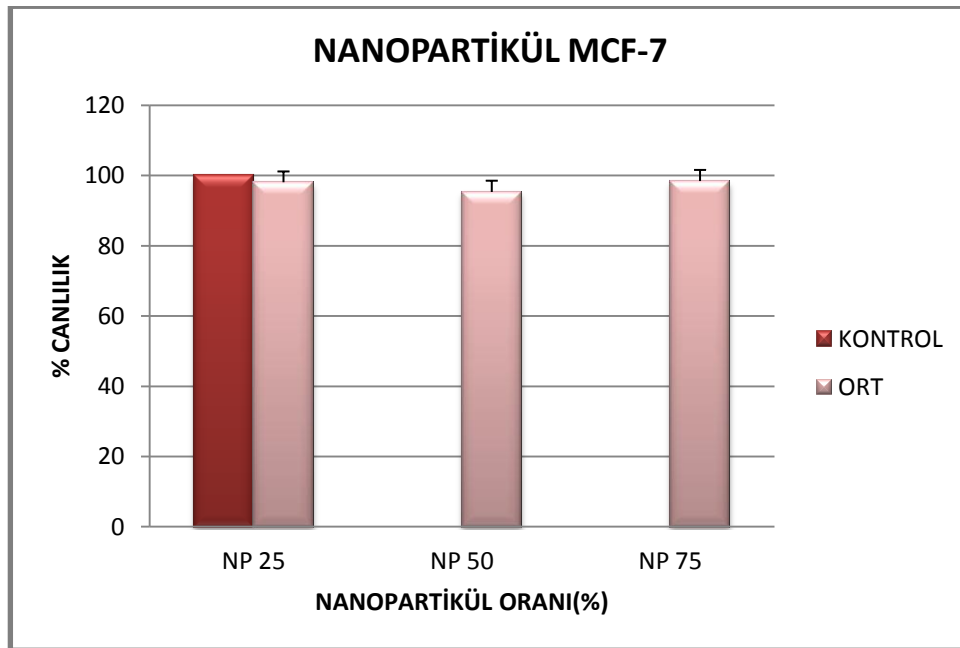
Şekil 53. Sodyum taurokolatın MCF-7 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları(p<0.01, ***p<0.001)**



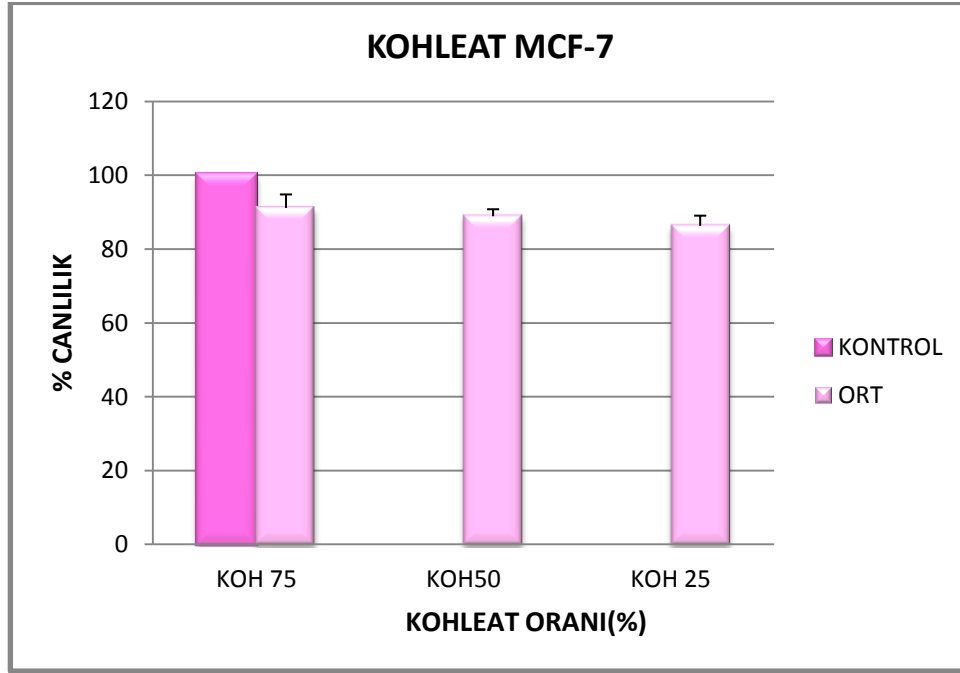
Şekil 54. Dimetil-β-siklodekstrinin MCF-7 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları (p<0.01, ***p<0.001)**



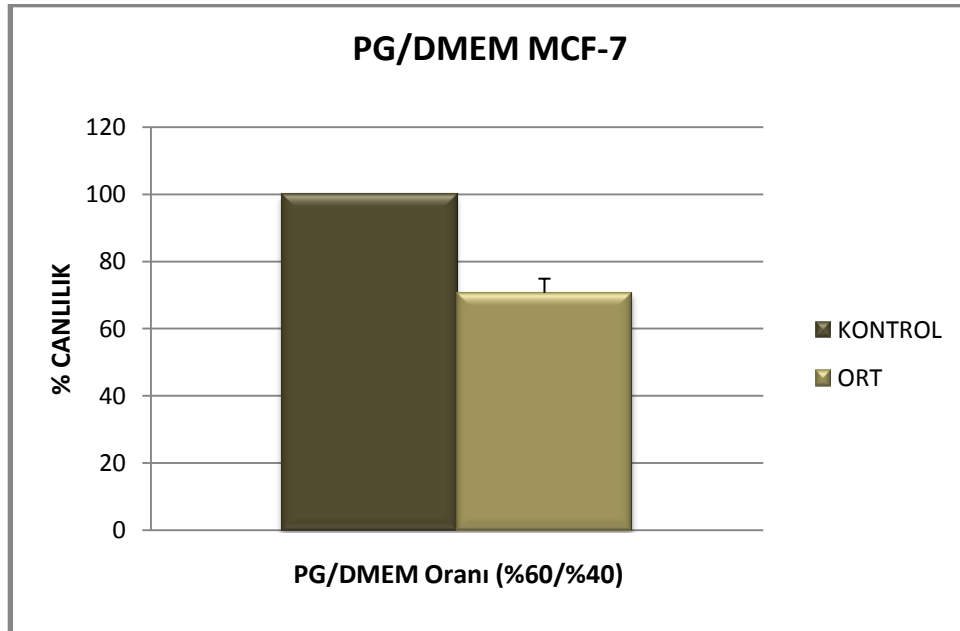
Şekil 55. Lipozomların MCF-7 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları



Şekil 56 Nanopartiküllerin MCF-7 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları



Şekil 57. Kohleatların MDA-MB 231 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları



Şekil 58. PG/DMEM (%60/%40)'ın MCF-7 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları

4.1.1.4. Raloksifen İçeren Formülasyonlara Ait Bulgular

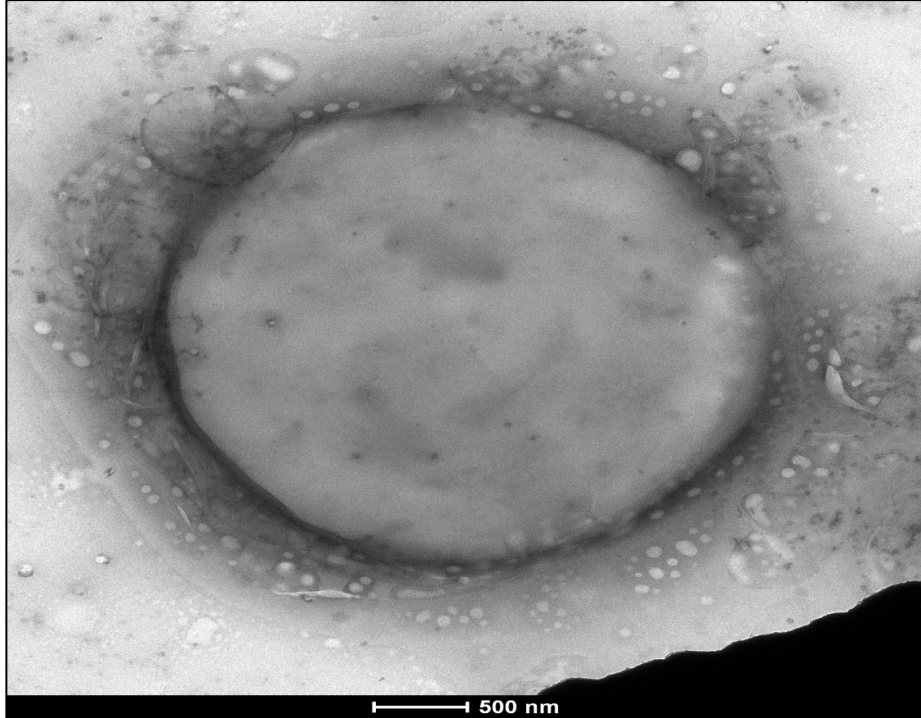
4.1.1.4.1. Raloksifen İçeren Lipozomların Karakterizasyonuna Ait Bulgular

4.1.1.4.1.1. Lipozomların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular

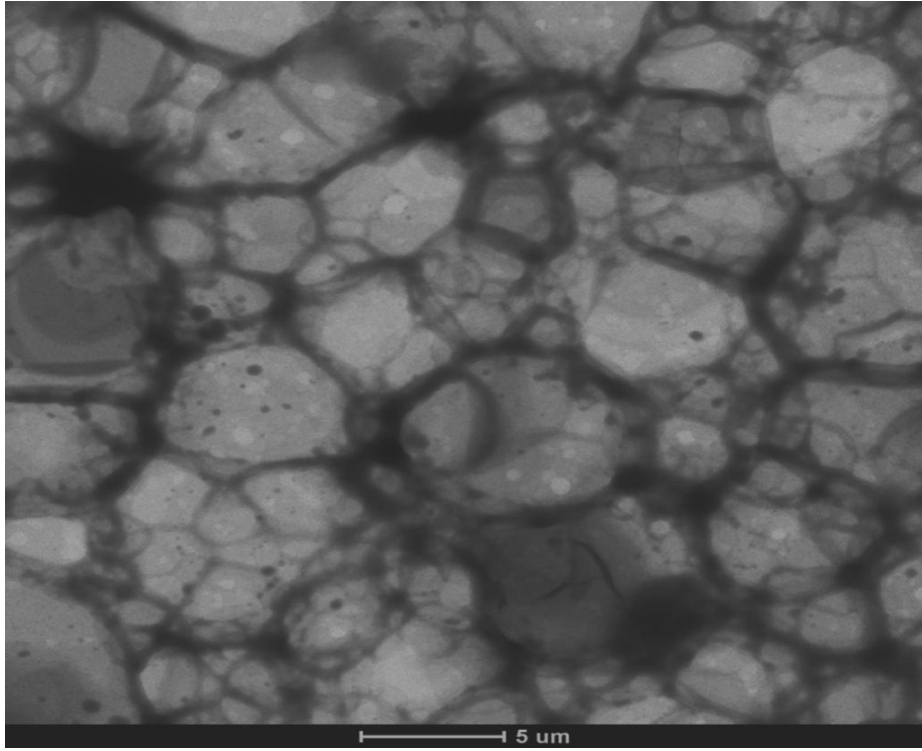
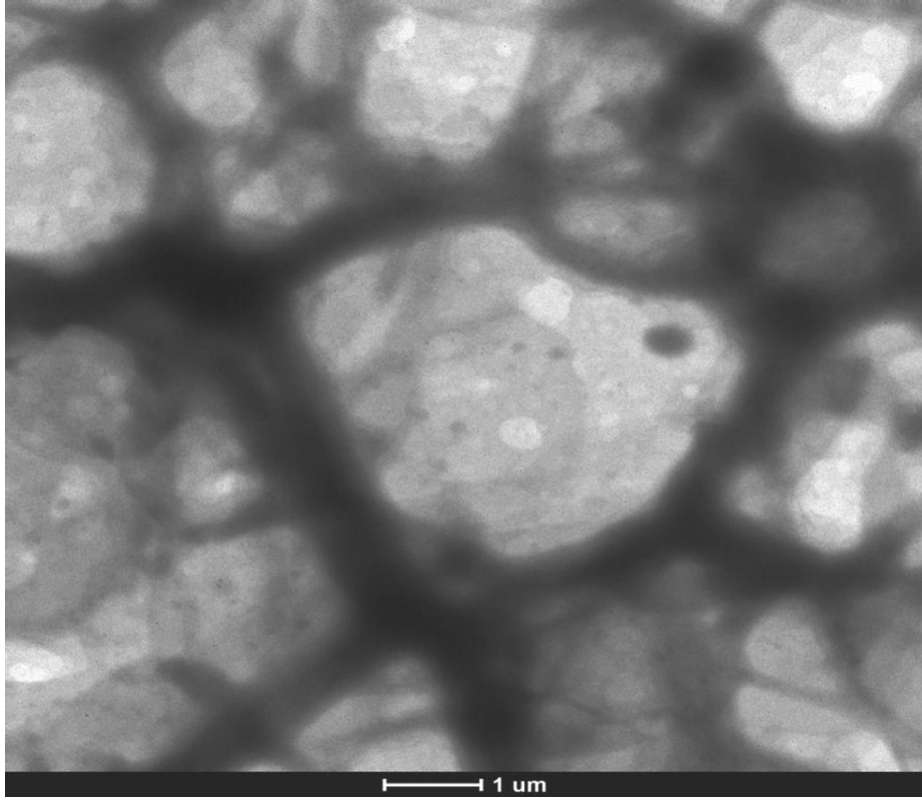
Lipozomların partikül büyüklüğü ve dağılımları Malvern Zeta Sizer- Nano ZS ile ölçüldü. Alınan sonuçların ortalaması hesaplanarak, polidispersite indeksi ile birlikte Tablo 22’de verilmiştir.

4.1.1.4.1.2. Lipozomların Şekline Ait Bulgular

Lipozomların şekilleri TEM mikroskobu ile incelendi. Elde edilen görüntüler Resim 19-20’de verilmiştir.



Resim 19. Etkin madde içermeyen lipozomların TEM görüntüsü



Resim 24. Raloksifen ve dimetil- β -CD içeren lipozomların TEM görüntüsü

4.1.1.4.1.3. Lipozomların İçine Hapsedilen Raloksifen Hidroklorür Miktar Tayinine Ait Bulgular

Lipozomların içine hapsedilen raloksifen miktarı ortalamaları hesaplanarak Tablo 22’de verilmiştir.

4.1.1.4.1.4. Lipozomların Zeta Potansiyeli Ölçümlerine Ait Bulgular

Lipozomların zeta potansiyelleri Malvern Zeta Sizer- Nano ZS ile ölçüldü. Alınan sonuçların ortalaması hesaplanarak Tablo 22’de verilmiştir.

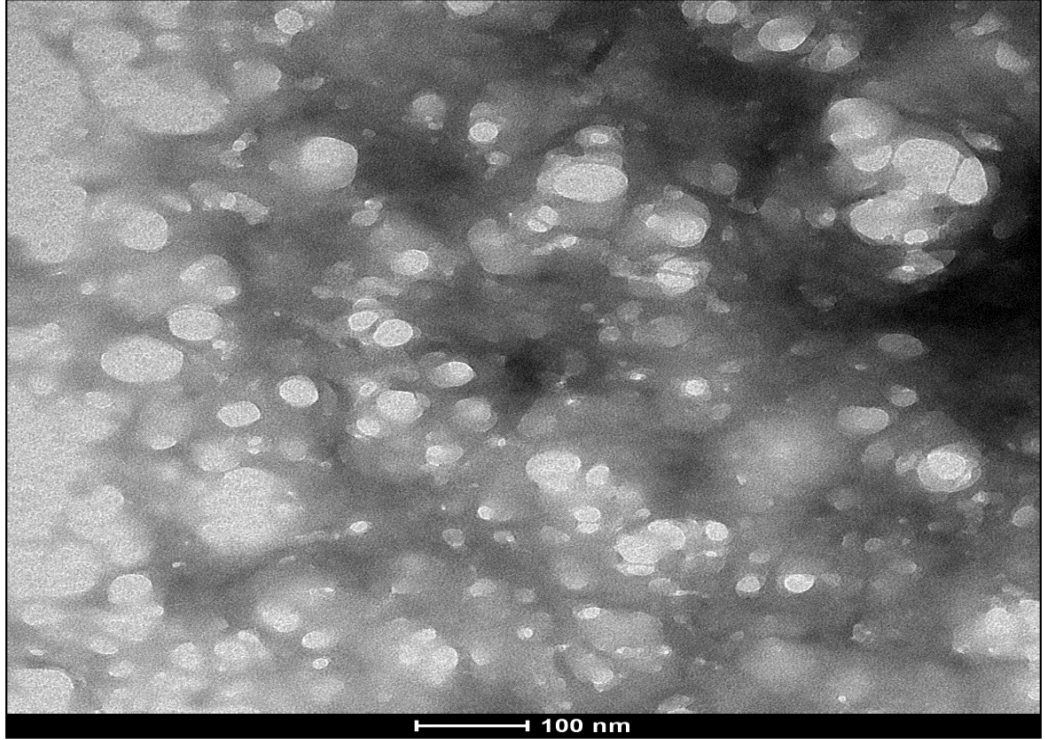
4.1.1.4.2. Raloksifen İçeren Nanopartiküllerin Karakterizasyonuna Ait Bulgular

4.1.1.4.2.1. Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular

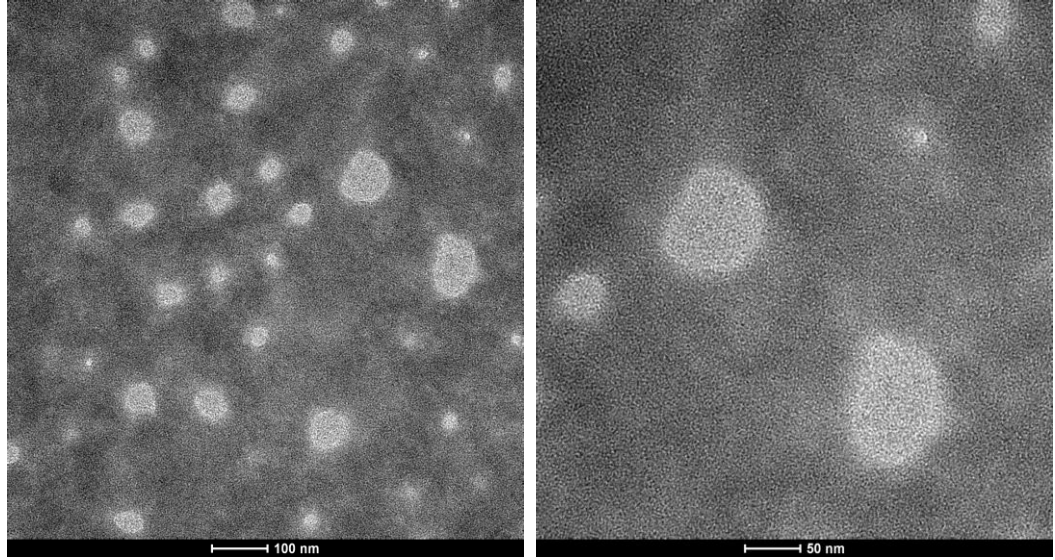
Nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve dağılımları Malvern Zeta Sizer- Nano ZS ile ölçüldü. Alınan sonuçların ortalaması hesaplanarak polidispersite indeksi ile birlikte Tablo 22’de verilmiştir.

4.1.1.4.2.2. Nanopartiküllerin Şekline Ait Bulgular

Nanopartikülleri şekilleri TEM mikroskobu ile incelendi. Elde edilen görüntüler Resim 21 ve Resim 22’de verilmiştir.



Resim 21. Etkin madde içermeyen nanopartiküllerin TEM görüntüsü



Şekil 22. Raloksifen ve dimetil- β -CD içeren nanopartiküllerin TEM görüntüsü

4.1.1.4.2.3. Nanopartiküllerin İçine Hapsedilen Raloksifen Hidroklorür Miktar Tayinine Ait Bulgular

Nanopartiküllerin içine hapsedilen raloksifen miktarı ortalamaları hesaplanarak Tablo 22’de verilmiştir.

4.1.1.4.2.4. Nanopartiküllerin Zeta Potansiyeli Ölçümlerine Ait Bulgular

Nanopartiküllerin zeta potansiyelleri Malvern Zeta Sizer- Nano ZS ile ölçüldü. Alınan sonuçların ortalaması hesaplanarak Tablo 22’de verilmiştir.

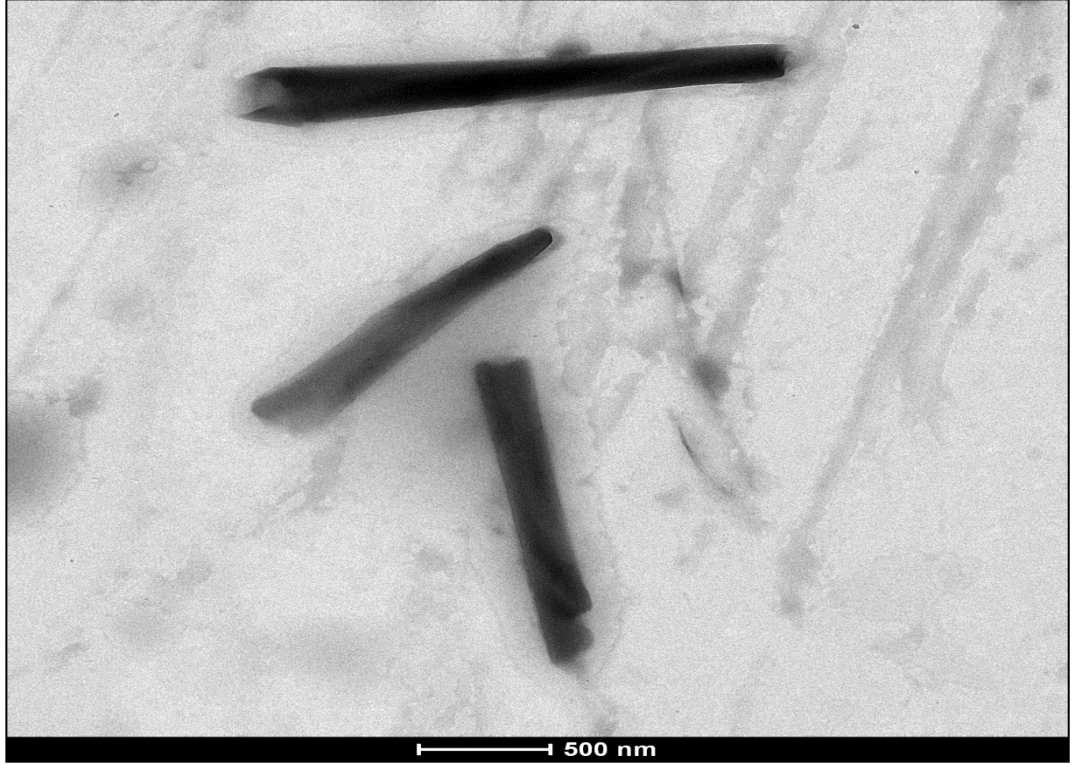
4.1.1.4.3. Raloksifen İçeren Kohleatların Karakterizasyonuna Ait Bulgular

4.1.1.4.3.1. Kohleatların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular

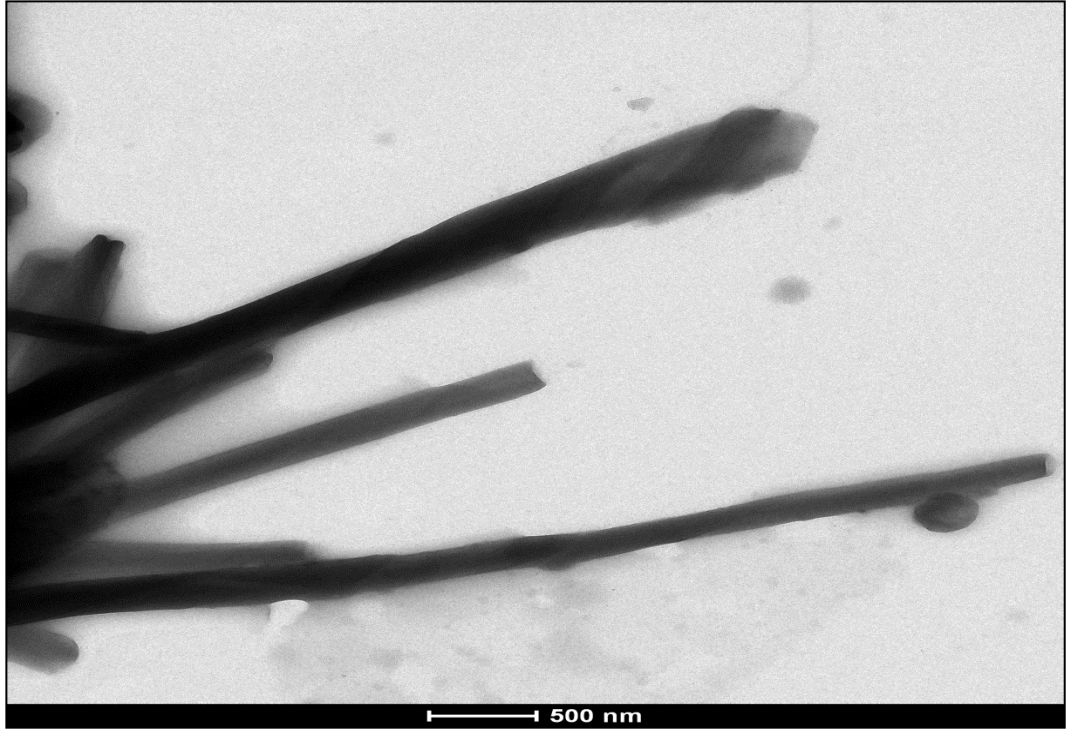
Kohleatların partikül büyüklüğü ve dağılımları Malvern Zeta Sizer- Nano ZS ile ölçüldü. Alınan sonuçların ortalaması hesaplanarak Tablo 22’de verilmiştir.

4.1.1.4.3.2. Kohleatların Şekline Ait Bulgular

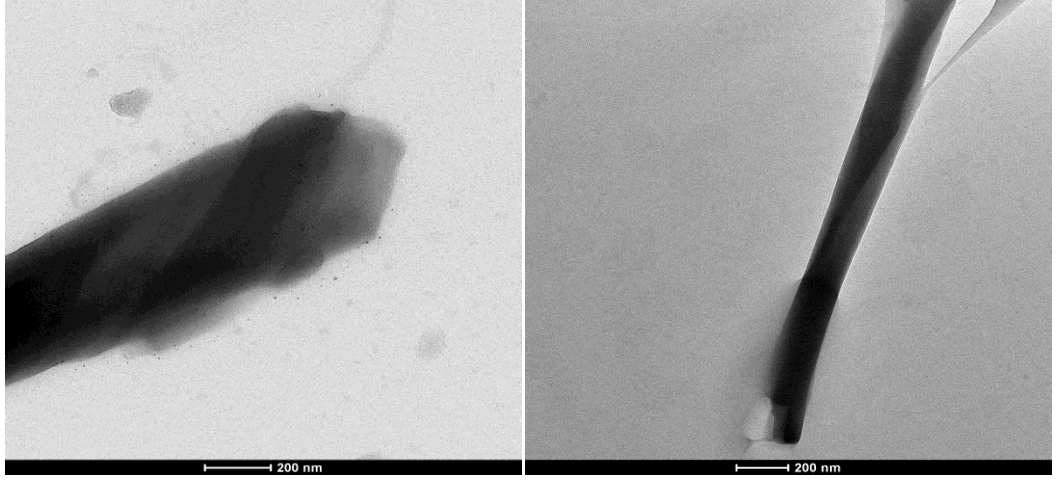
Kohleatların şekilleri TEM mikroskobu ile incelendi. Elde edilen görüntüler Resim 23-25’de verilmiştir.



Resim 23. Etkin madde içermeyen kohleatların TEM görüntüsü



Şekil 24. Raloksifen içeren kohleatların TEM görüntüsü



Şekil 25. Raloksifen ve dimetil- β -siklodekstrin içeren kohleatların TEM görüntüsü

4.1.1.4.3.3. Kohleatların İçine Hapsedilen Raloksifen Hidroklorür Miktar Tayinine Ait Bulgular

Kohleatların içine hapsedilen raloksifen miktarı ortalamaları hesaplanarak Tablo 22’de verilmiştir.

4.1.1.4.3.4. Kohleatların Zeta Potansiyeli Ölçümlerine Ait Bulgular

Kohleatların zeta potansiyelleri Malvern Zeta Sizer- Nano ZS ile ölçüldü. Alınan sonuçların ortalaması hesaplanarak Tablo 22’de verilmiştir.

Tablo 22. Raloksifen içeren formülasyonların karakterizasyon parametreleri

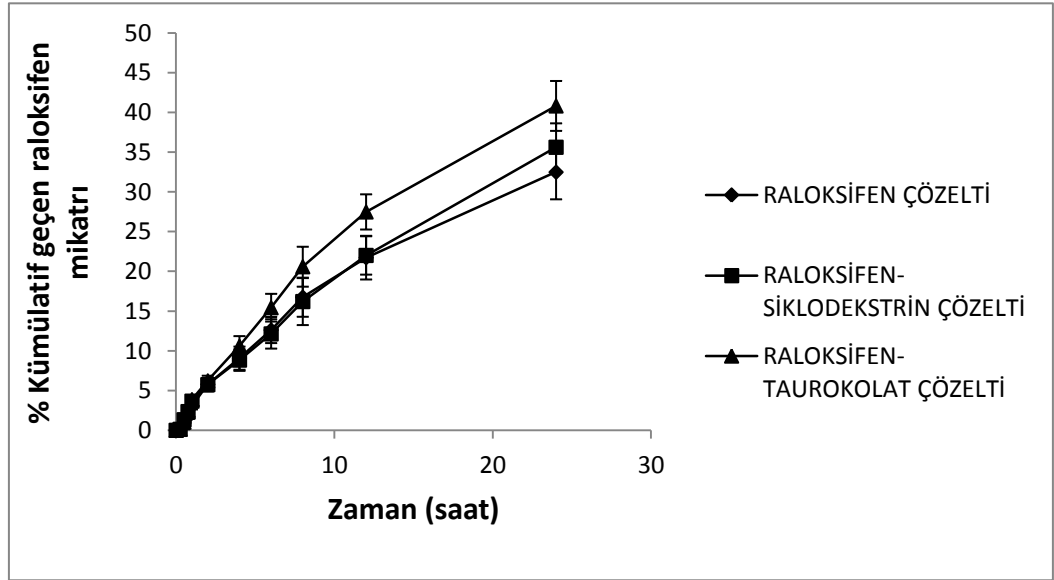
Formülasyon Tipi	Partikül Büyüklüğü $\pm$ S.S. (n=3)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)	Enkapsülasyon Verimi (%)
Raloksifen içeren lipozomlar	210 $\pm$ 6.3	0.28	7.9 $\pm$ 0.1	51.9 $\pm$ 5.4
Raloksifen ve dimetil- β -CD içeren lipozomlar	344.6 $\pm$ 8.6	0.33	-12.5 $\pm$ -1.3	42.9 $\pm$ 1.4
Raloksifen ve sodyum taurokolat içeren lipozomlar	223.6 $\pm$ 5.9	0.34	9.4 $\pm$ 1.4	48.3 $\pm$ 5.5
Raloksifen içeren nanopartiküller	168 $\pm$ 4.0	0.32	34.5 $\pm$ 2.1	89.4 $\pm$ 9.0
Raloksifen ve dimetil- β -CD içeren nanopartiküller	344.7 $\pm$ 15.5	0.22	57.7 $\pm$ 2.2	82.2 $\pm$ 8.5
Raloksifen ve sodyum taurokolat içeren nanopartiküller	223.7 $\pm$ 10.9	0.35	-43.8 $\pm$ 0.7	86.9 $\pm$ 9.1
Raloksifen içeren kohleatlar	229.7 $\pm$ 15.6	1.00	-26.6 $\pm$ -1.8	43.4 $\pm$ 1.5
Raloksifen ve dimetil- β -CD içeren kohleatlar	288.7 $\pm$ 2.1	1.00	-37.0 $\pm$ -1.6	36.2 $\pm$ 3.7
Raloksifen ve sodyum taurokolat içeren kohleatlar	261 $\pm$ 5.7	1.00	-18.0 $\pm$ -0.8	39.4 $\pm$ 2.5

4.1.1.5. İn Vitro Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular

4.1.1.5.1.Hücre Tek Tabakası İçermeyen Filtrelerden Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular

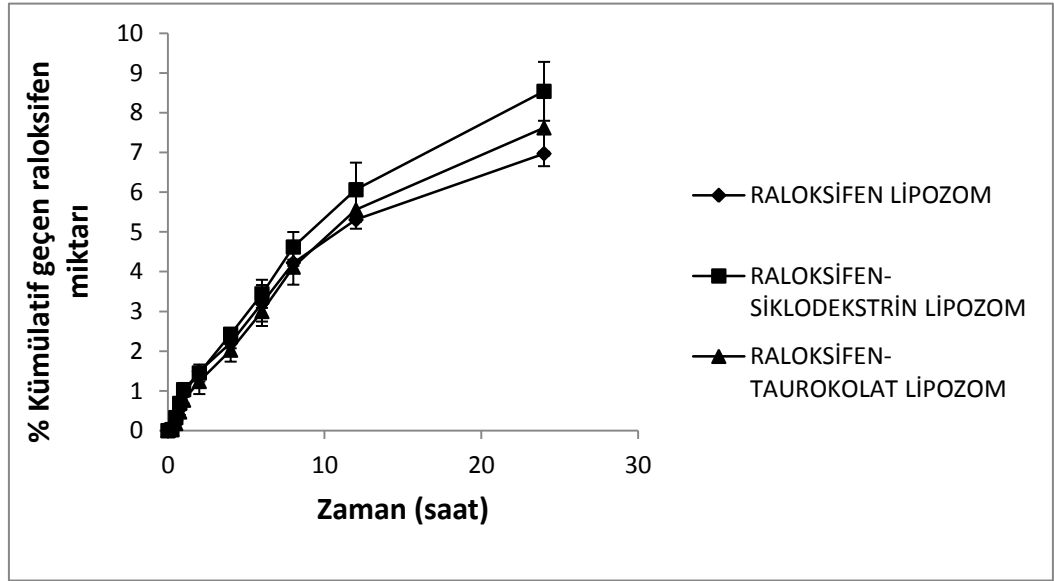
Caco-2 hücre tabakası içermeyen membranlardan raloksifen ve absorpsiyon artırıcıları içeren çözelti, lipozom, nanopartikül ve kohleat geçişleri, Bölüm 3.2.1.4'te belirtilen formülasyonlarla, Bölüm 3.2.1.1.5.1'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

PG/DMEM içerisinde 30 µg/mL derişimde raloksifen ve belirtilen miktarlarda absorpsiyon artırıcı içeren çözeltiler ile elde edilen %kümülatif geçen raloksifen miktarlarını gösteren grafik Şekil 59'da görülmektedir.



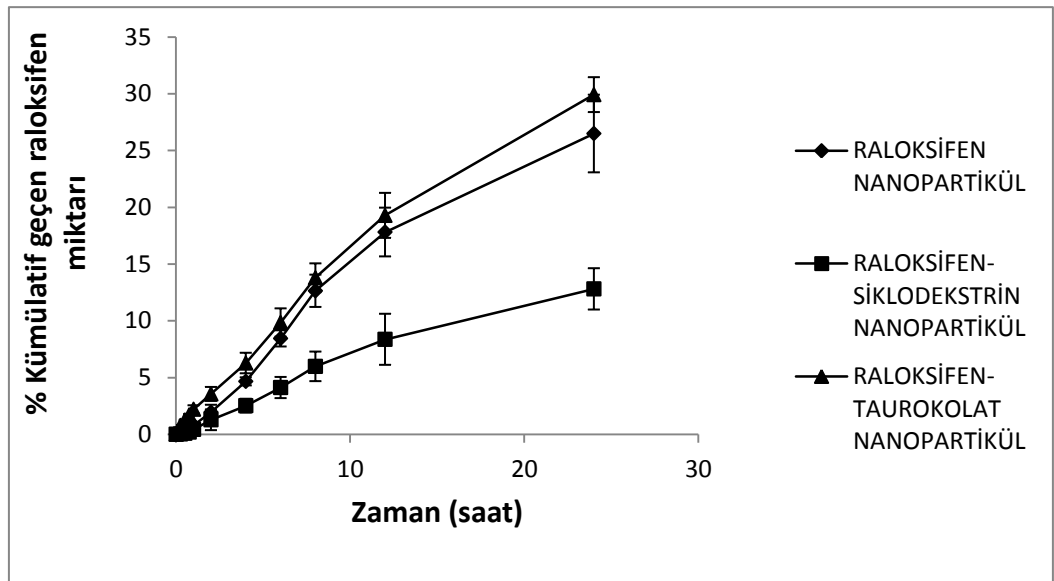
Şekil 59. Raloksifen içeren çözeltilerin boş polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik (n=3)

Raloksifen içeren lipozomların PG/DMEM içerisinde dağıtıldıktan sonra boş polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucu elde edilen grafik Şekil 60'da görülmektedir.



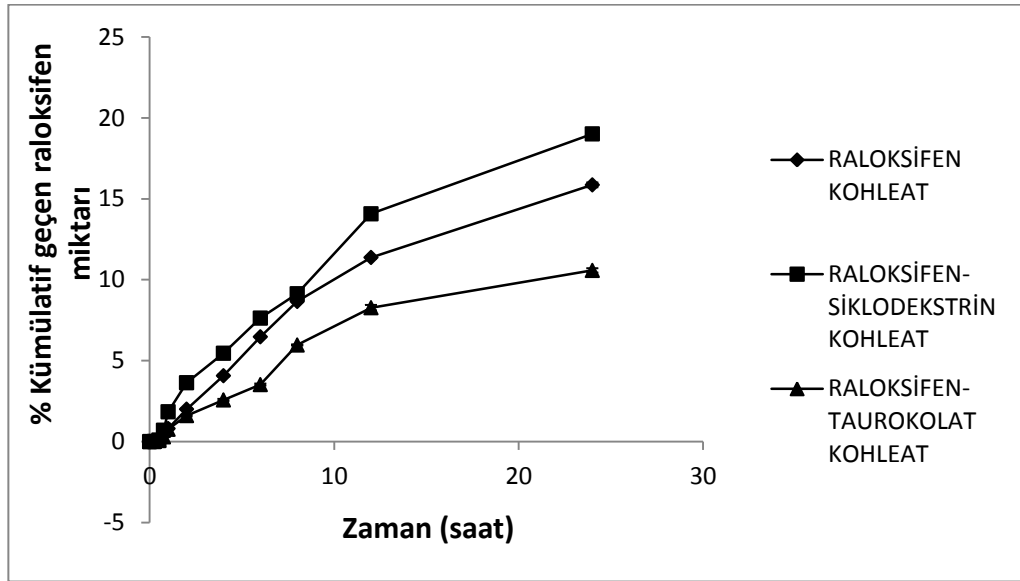
Şekil 60. Raloksifen içeren lipozomların boş polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik (n=3)

Raloksifen içeren nanopartiküllerin PG/DMEM içerisinde dağıtıldıktan sonra boş polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucu elde edilen grafik Şekil 61’de görülmektedir.



Şekil 61. Raloksifen içeren nanopartiküllerin boş polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik (n=3)

Raloksifen içeren kohleatların PG/DMEM içerisinde dağıtıldıktan sonra boş polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucu elde edilen grafik Şekil 62’de görülmektedir.

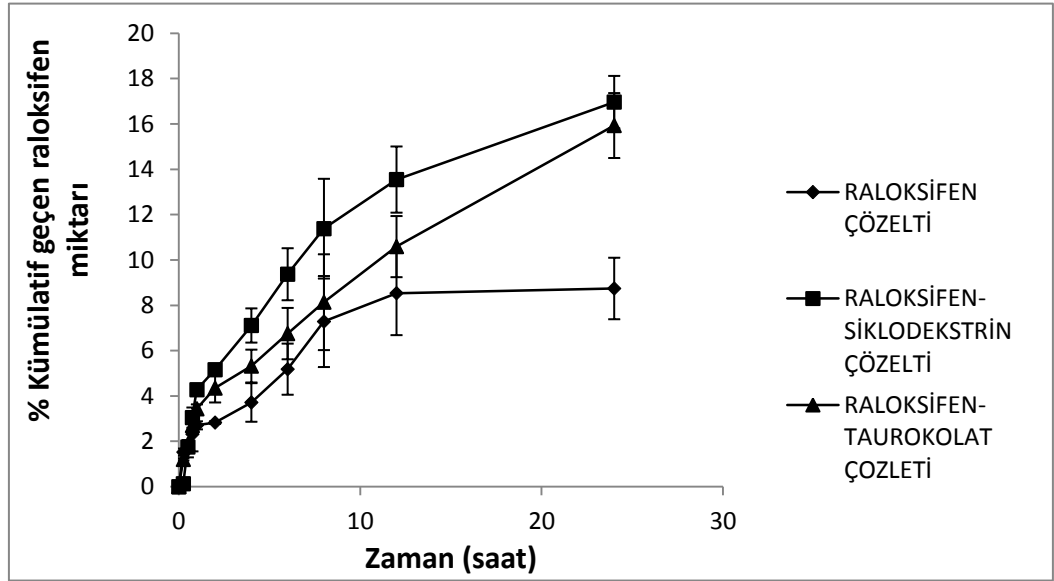


Şekil 62. Raloksifen içeren kohleatların boş polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik (n=3)

4.1.1.5.2. Caco-2 Hücrelerinden Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular

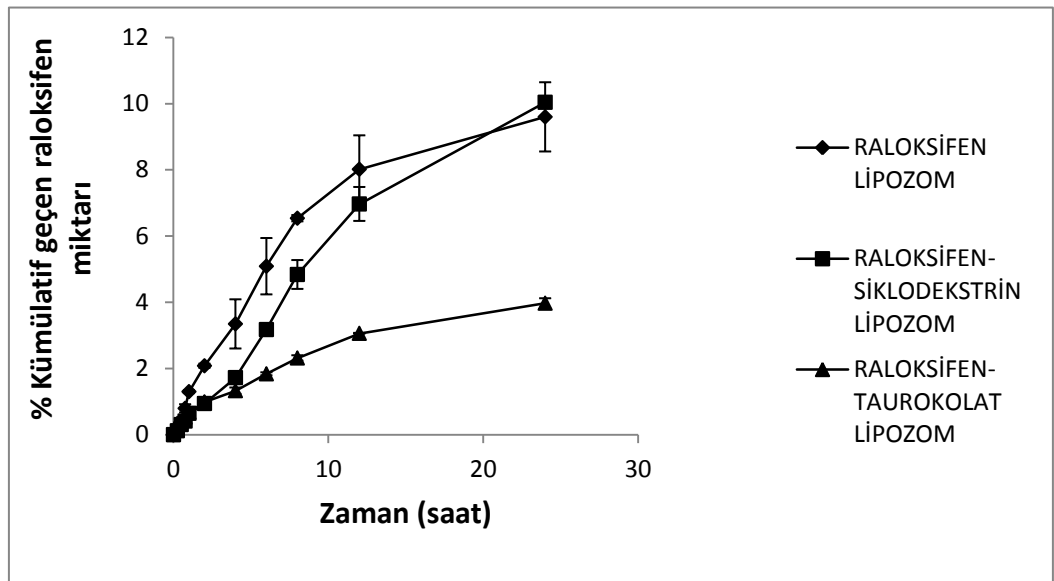
80000 hücre/mL yoğunlukta Caco-2 hücre tek tabakası içeren membranlardan raloksifen ve absorpsiyon artırıcıları içeren çözelti, lipozom ve nanopartikül geçişleri Bölüm 3.2.1.1.5.2’de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

PG/DMEM içerisinde 30 µg/mL derişimde raloksifen ve belirtilen miktarlarda absorpsiyon artırıcı içeren çözeltiler ile elde edilen %kümülatif geçen raloksifen miktarlarını gösteren grafik Şekil 63’de görülmektedir.



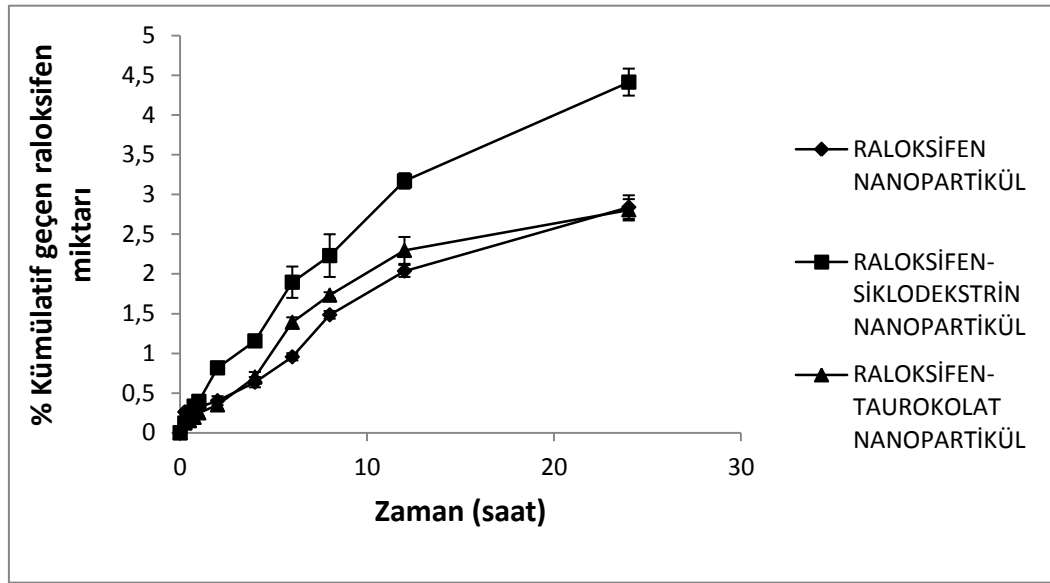
Şekil 63. Raloksifen içeren çözeltilerin üzerinde Caco-2 tek tabakası üretilen polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik (n=3)

Raloksifen içeren lipozomların PG/DMEM içerisinde dağıtıldıktan sonra üzerinde Caco-2 tek tabakası üretilen polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucu elde edilen grafik Şekil 64'de görülmektedir.



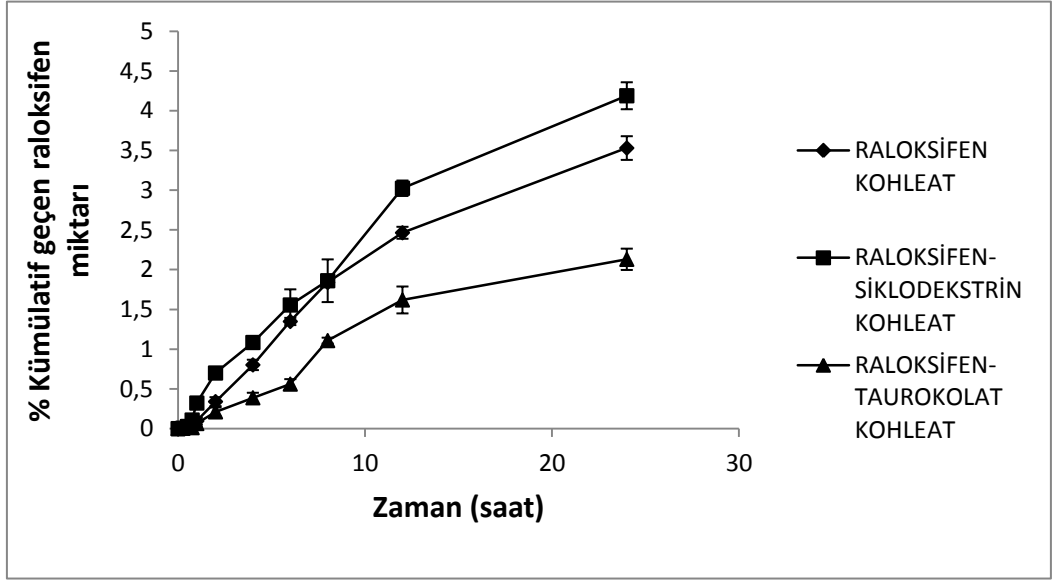
Şekil 64. Raloksifen içeren lipozomların üzerinde Caco-2 tek tabakası üretilen polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik (n=3)

Raloksifen içeren nanopartiküllerin PG/DMEM içerisinde dağıtıldıktan sonra üzerinde Caco-2 tek tabakası üretilen polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucu elde edilen grafik Şekil 65’de görülmektedir.



Şekil 65. Raloksifen içeren nanopartiküllerin üzerinde Caco-2 tek tabakası üretilen polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik (n=3)

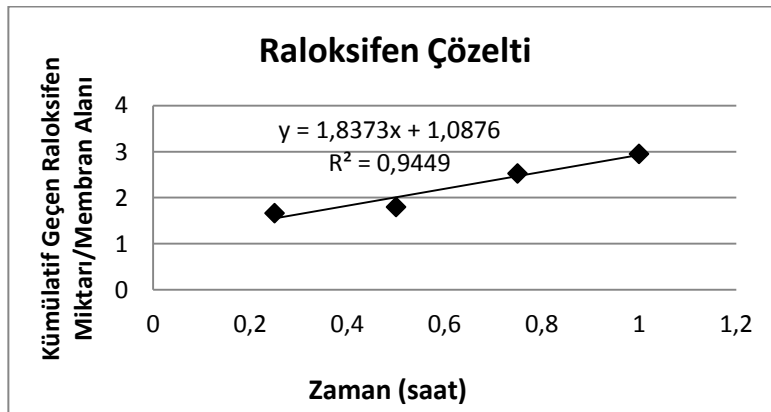
Raloksifen içeren kohleatların PG/DMEM içerisinde dağıtıldıktan sonra üzerinde Caco-2 tek tabakası üretilen polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucu elde edilen grafik Şekil 96’da görülmektedir.



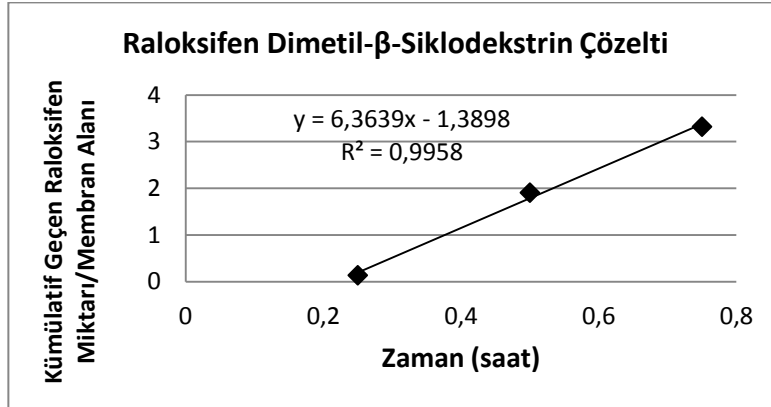
Şekil 66. Raloksifen içeren kohleatların üzerinde Caco-2 tek tabakası üretilen polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik (n=3)

4.1.1.5.2.1. Raloksifenin Caco-2 Hücrelerinden Geçirgenlik Katsayısının ($k=P_{app}$) Hesaplanmasına Ait Bulgular

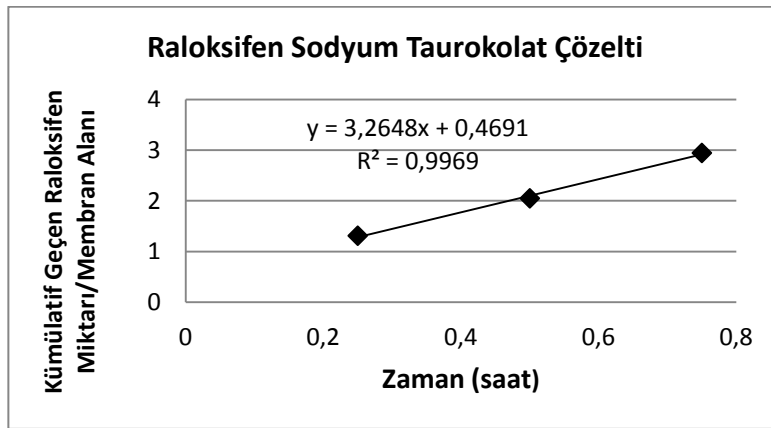
Log k değerlerinin Bölüm 3.2.1.1.5.2.1'de anlatıldığı gibi hesaplanmasında kullanılan grafikler Şekil 67-78'da, hesaplanan permeabilite katsayıları Tablo 23'de görülmektedir.



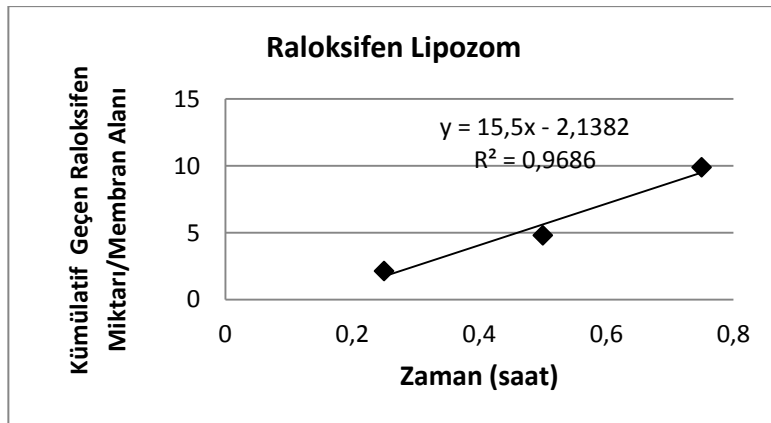
Şekil 67. Raloksifen çözeltisi ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik



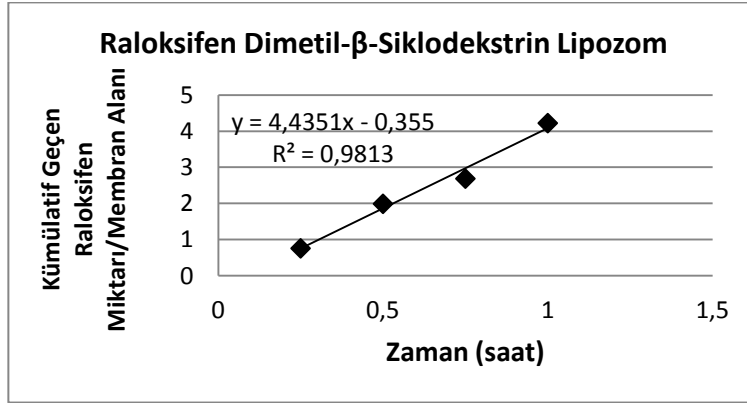
Şekil 68. Raloksifen ve dimetil-β-siklodekstrin çözeltisi ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik



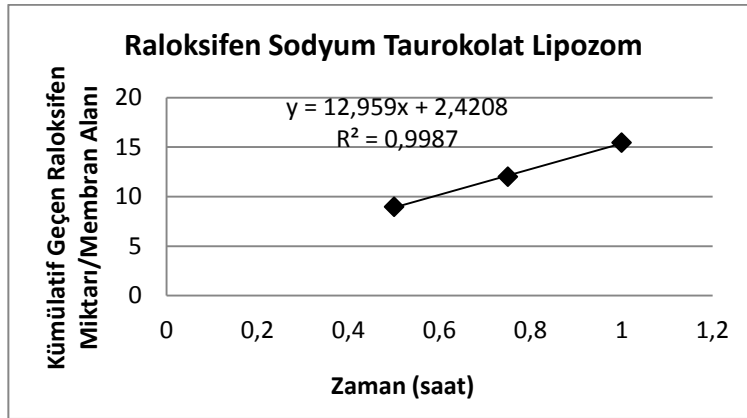
Şekil 69. Raloksifen ve sodyum taurokolat çözeltisi ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik



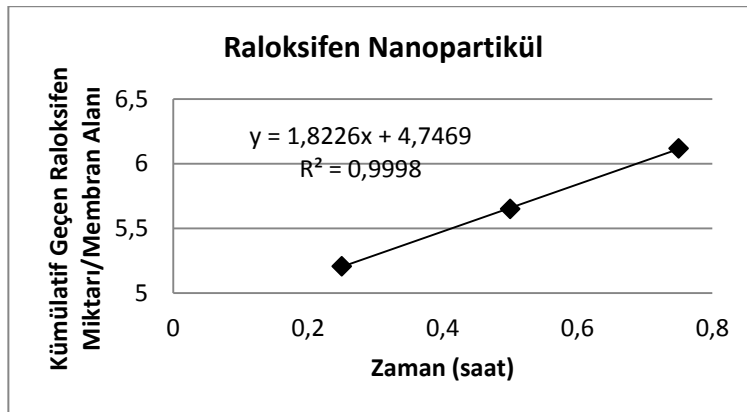
Şekil 70. Raloksifen lipozom ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik



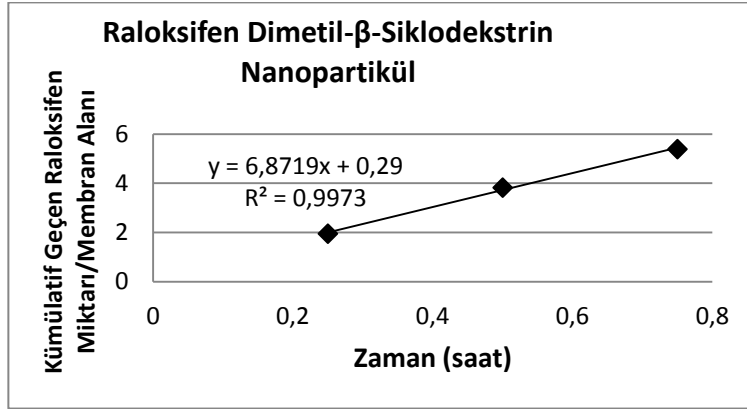
Şekil 71. Raloksifen ve dimetil-β-siklodekstrin içeren lipozomlar ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik



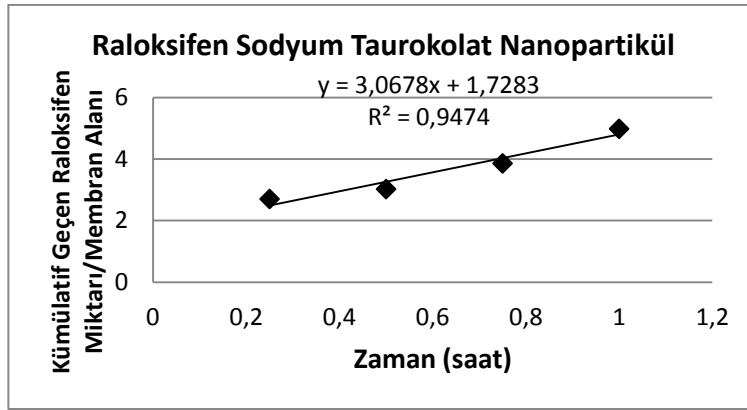
Şekil 72. Raloksifen ve sodyum taurokolat içeren lipozomlar ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik



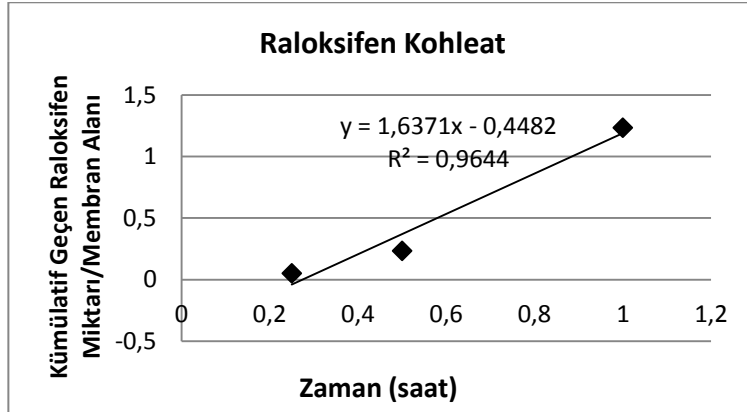
Şekil 73. Raloksifen nanopartikülleri ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik



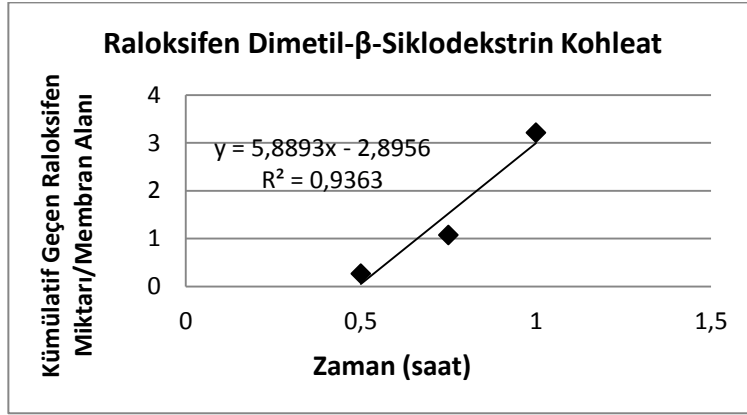
Şekil 74. Raloksifen ve dimetil-β-siklodekstrin içeren nanopartiküller ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik



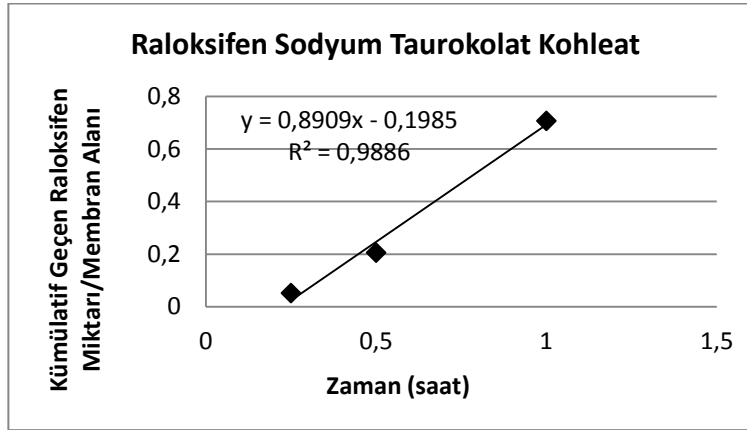
Şekil 75. Raloksifen ve sodyum taurokolat içeren nanopartiküller ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik



Şekil 76. Raloksifen içeren kohleatlar ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik



Şekil 77. Raloksifen ve dimetil- β -siklodekstrin içeren kohleatlar ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik



Şekil 78. Raloksifen ve sodyum taurokolat içeren kohleatlar ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik

Tablo 23. Raloksifen formülasyonları için hesaplanan permeabilite katsayıları

Formülasyon Tipi	Permeabilite Katsayısı (cm/saat) (n=3)
Raloksifen çözeltisi	1.53±0.06
Raloksifen ve dimetil-β-siklodekstrin içeren çözelti	1.95±0.04
Raloksifen ve sodyum taurokolat içeren çözelti	1.83±0.14
Raloksifen lipozomları	1.60±0.08
Raloksifen ve dimetil-β-siklodekstrin lipozomları	4.14±0.12
Raloksifen ve sodyum taurokolat içeren lipozomlar	1.61±0.07
Raloksifen nanopartikülleri	0.523±0.040
Raloksifen ve dimetil-β-siklodekstrin nanopartiküller	1.19±0.05
Raloksifen ve sodyum taurokolat içeren nanopartiküller	0.748±0.02
Raloksifen kohleatlar	0.159±0.010
Raloksifen ve dimetil-β-siklodekstrin kohleatlar	1.37±0.03
Raloksifen ve sodyum taurokolat içeren kohleatlar	0.511±0.040

4.1.1.5.2.2. Caco-2 Hücrelerinin Bütünlüklerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular

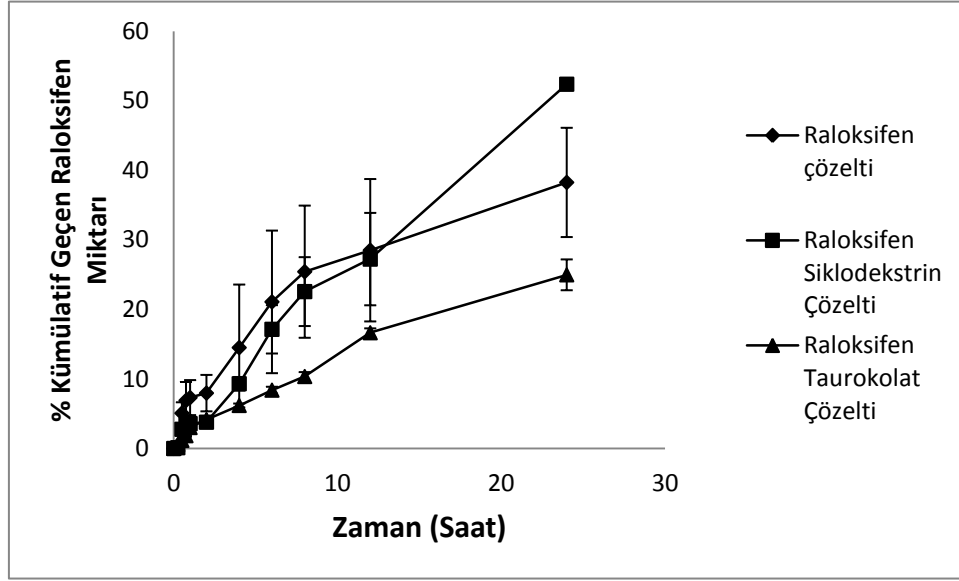
Caco-2 hücreleri polikarbonat membranlarda geçiş için hazırlandıktan önce ve belirtilen formülasyonların geçiş çalışmaları yapıldıktan sonra TEER değerleri ölçülmüş ve Tablo 32’de belirtilen sonuçlar elde edilmiştir. Deneyden hemen önce, geçiş çalışmalarına başlamadan önce ölçülen başlangıç TEER değeri ise 245 Ω olarak ölçüldü. Ölçülen TEER değerleri Tablo 24’de görülmektedir.

Tablo 24. Raloksifen formülasyonları ile yapılan hücre geçişlerinden sonra elde edilen TEER değerleri

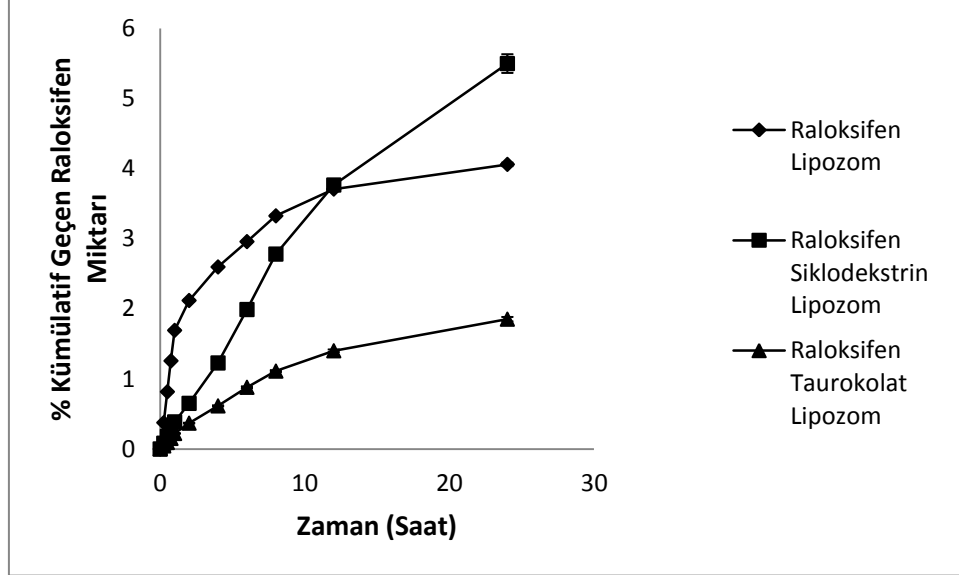
Formülasyon Tipi	TEER Değeri (Ω)
Raloksifen çözeltisi	242
Raloksifen ve sodyum taurokolat içeren çözelti	209
Raloksifen ve dimetil- β -siklodekstrin içeren çözelti	202
Raloksifen lipozomları	240
Raloksifen ve sodyum taurokolat içeren lipozomlar	229
Raloksifen ve dimetil- β -siklodekstrin lipozomları	210
Raloksifen nanopartikülleri	245
Raloksifen ve sodyum taurokolat içeren nanopartiküller	220
Raloksifen ve dimetil- β -siklodekstrin nanopartiküller	209
Raloksifen kohleatlar	239
Raloksifen ve sodyum taurokolat içeren kohleatlar	224
Raloksifen ve dimetil- β -siklodekstrin kohleatlar	215

4.1.1.5.3. Diyaliz Membran Geçişlerine Ait Bulgular

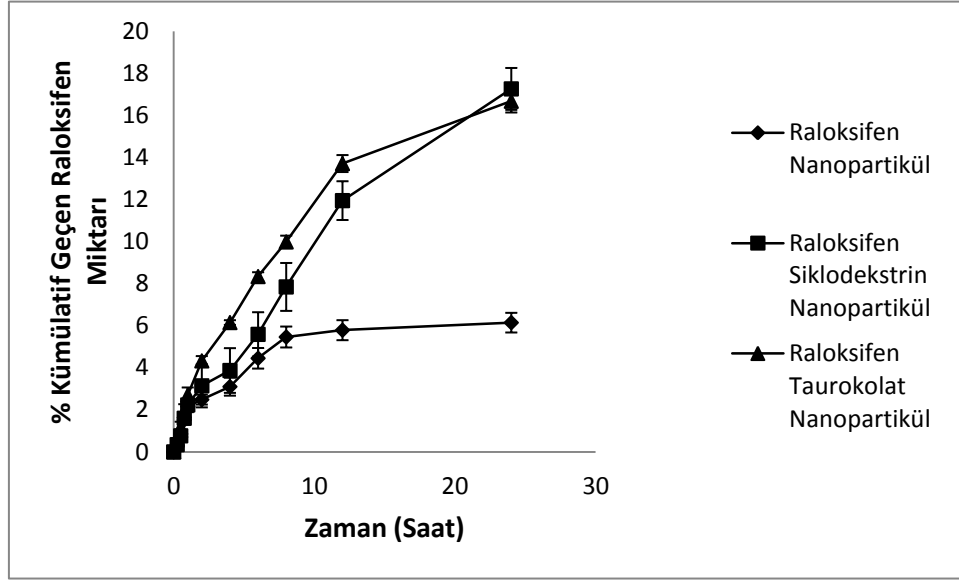
Diyaliz membran geçişleri Bölüm 3.2.1.1.5.3'de anlatıldığı şekilde çözelti, lipozom, nanopartikül ve kohleat formülasyonları için gerçekleştirildi. M.A< 12000 Da özellikteki diyaliz membran kullanıldı. Tüm formülasyon tiplerinden raloksifenin salım profilleri incelenmiş ve kümülatif salınan raloksifen miktarının değişik kinetiklere uyumu incelenmiştir. Şekil 79-82'de raloksifen formülasyonlarının salım profilleri görülmektedir.



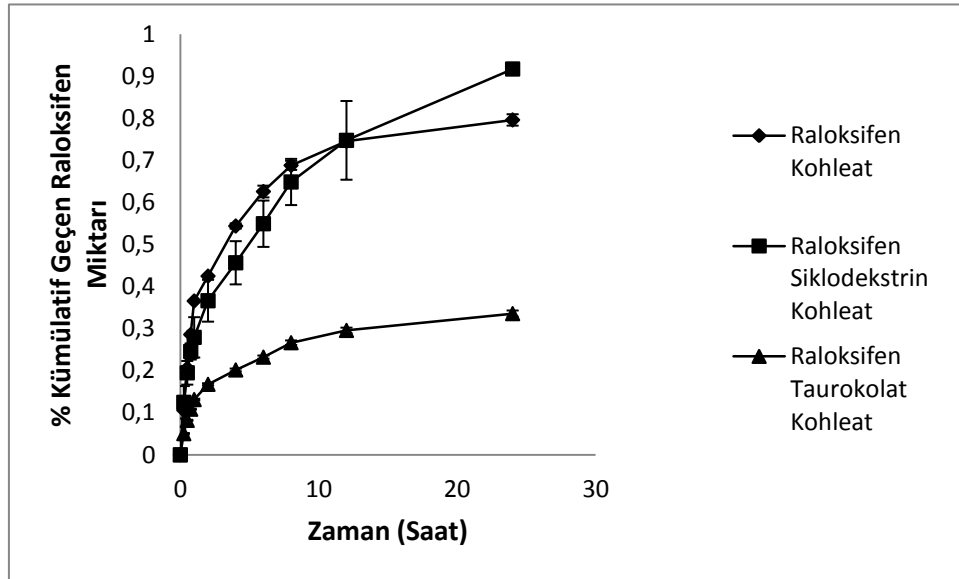
Şekil 79. Raloksifen içeren çözeltilerin pH 7.4 fosfat tamponunda $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 'deki geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik (n=3)



Şekil 80. Raloksifen içeren lipozomların pH 7.4 fosfat tamponunda $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 'deki geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik (n=3)



Şekil 81. Raloksifen içeren nanopartiküllerin pH 7.4 fosfat tamponunda $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 'deki geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik (n=3)



Şekil 82. Raloksifen içeren kohleatların pH 7.4 fosfat tamponunda $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 'deki geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik (n=3)

4.1.1.5.3.1. Diyaliz Membran Geçişlerinden Elde Edilen Sonuçların Kinetik Olarak Değerlendirilmesine Ait Bulgular

Diyaliz membran geçiş çalışmaları sonucunda çözeltiler ve tüm formülasyonlar için de zamana karşı %kümülatif salınan raloksifen miktarının değişik kinetiklere olan uyumu incelenmiştir. Çözeltiler için elde edilen kinetik tabloları (Tablo 25, 26, 27) raloksifenin salımının sadece raloksifen içeren çözeltide Birinci derece salım kinetiğine, dimetil- β -siklodekstrin çözelti geçişlerinde Hixon Crowell ve sodyum taurokolat içeren çözelti geçişlerinde ise RRSWB (Rosin-Rammler-Sperling-Weibull-Bennet) salım kinetiğine uyum sağladığı göstermiştir.

Tablo 25. Raloksifen çözelti formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, raloksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r^2	SKT
Birinci derece	-0.0197	4.54	0.916	116.5
Hixson Crowel	0.0280	0.10	0.904	469.9
Sıfır derece	1.54	6.53	0.878	591.7
RRSBW	0.826	-3.01	0.834	162.8
BTA	0.810	-7.44	0.823	208.6
Higuchi	8.57	-1.71	0.978	29.5

Tablo 26. Raloksifen ve dimetil- β -siklodekstrin çözelti formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, raloksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r^2	SKT
Birinci derece	-0.0303	4.61	0.992	24.4
Hixson Crowel	0.0418	0.0060	0.993	21.5
Sıfır derece	2.18	1.49	0.987	53.2
RRSBW	1.14	-3.77	0.864	65.6
BTA	1.17	-9.45	0.859	103.3
Higuchi	11.3	-8.49	0.955	108.4

Tablo 27. Raloksifen ve sodyum taurokolat çözelti formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, raloksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	-0.0119	4.59	0.986	7.87
Hixson Crowel	0.0176	0.0232	0.983	29.6
Sıfır derece	1.037	1.66	0.977	40.5
RRSBW	0.817	-3.81	0.986	4.39
BTA	0.808	-8.23	0.986	4.82
Higuchi	5.46	-3.26	0.974	14.2

Lipozomlar için elde edilen kinetik tabloları (Tablo 28, 29, 30), raloksifenin salımının raloksifen lipozom ve raloksifen sodyum taurokolat içeren lipozom geçişlerinde Higuchi, dimetil- β -CD içeren lipozomlarda ise RRSWB salım kinetiğine uyum sağladığını göstermiştir.

Tablo 28. Raloksifen lipozom formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, raloksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	-0.0000	4.59	0.703	4.17
Hixson Crowel	0.0000	0.0229	0.701	25.6
Sıfır derece	0.0023	1.47	0.699	25.8
RRSBW	0.482	-6.39	0.892	2.63
BTA	0.481	-9.45	0.891	2.67
Higuchi	0.108	0.610	0.892	1.52

Tablo 29. Raloksifen ve dimetil- β -siklodekstrin lipozom formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, raloksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	-0.0000	4.602	0.961	1.14
Hixson Crowel	0.0001	0.0043	0.960	1.92
Sıfır derece	0.0040	0.282	0.958	2.043
RRSBW	0.9407	-9.51	0.994	1.64
BTA	0.939	14.5	0.994	1.71
Higuchi	0.165	0.888	0.982	0.541

Tablo 30. Raloksifen ve sodyum taurokolat lipozom formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, raloksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	0.0000	4.603	0.909	0.314
Hixson Crowel	0.0000	0.0032	0.908	0.7500
Sıfır derece	0.0013	0.209	0.907	0.314
RRSBW	0.832	-9.73	0.982	0.449
BTA	0.832	14.2	0.981	0.455
Higuchi	0.654	-0.206	0.992	0.0288

Nanopartiküller için elde edilen kinetik tabloları (Tablo 31, 32, 33) raloksifenin salımının tüm nanopartikül geçişlerinde Higuchi salım kinetiğine uyum sağladığını göstermiştir.

Tablo 31. Raloksifen nanopartikül formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, raloksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	0.0000	4.46	0.713	11.7
Hixson Crowel	0.0001	0.0281	0.711	43.6
Sıfır derece	0.0040	1.81	0.708	44.4
RRSBW	0.323	-6.87	0.890	11.4
BTA	0.621	-10.5	0.889	11.7
Higuchi	0.184	0.339	0.894	4.36

Tablo 32. Raloksifen ve dimetil-β-siklodekstrin nanopartikül formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, raloksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	-0.0001	4.49	0.970	6.82
Hixson Crowel	0.0002	0.0181	0.972	20.2
Sıfır derece	0.0012	1.24	0.967	24.2
RRSBW	0.818	-7.53	0.966	4.92
BTA	0.812	-11.9	0.965	5.42
Higuchi	0.491	-2.202	0.974	7.97

Tablo 33. Raloksifen ve sodyum taurokolat nanopartikül formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, raloksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	-0.0077	4.58	0.902	26.3
Hixson Crowel	0.0015	0.0378	0.897	82.9
Sıfır derece	0.699	2.47	0.888	91.4
RRSBW	0.753	-3.83	0.976	21.3
BTA	0.746	-7.989	0.975	23.7
Higuchi	3.88	-1.26	0.986	3.85

Kohleatlar için elde edilen kinetik tabloları (Tablo 34, 35, 36), raloksifenin salımının tüm kohleat geçişlerinde RRSWB salım kinetiğine uyum sağladığını göstermiştir.

Tablo 34. Raloksifen kohleat formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, raloksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	0.0003	4.61	0.671	0.167
Hixson Crowel	0.0004	0.0005	0.670	1.23
Sıfır derece	0.0026	0.325	0.669	1.23
RRSBW	0.413	-5.88	0.906	0.0078
BTA	0.413	-8.67	0.906	0.0079
Higuchi	0.157	0.162	0.874	0.0064

Tablo 35. Raloksifen ve dimetil-β-siklodekstrin kohleat formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, raloksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	-0.00032	4.601	0.860	0.0844
Hixson Crowel	0.00050	0.00409	0.860	0.780
Sıfır derece	0.0322	0.264	0.859	0.783
RRSBW	0.425	-5.96	0.988	0.00815
BTA	0.425	-8.79	0.988	0.00820
Higuchi	0.182	0.0871	0.982	0.0110

Tablo 36. Raloksifen ve sodyum taurokolat kohleat formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, raloksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

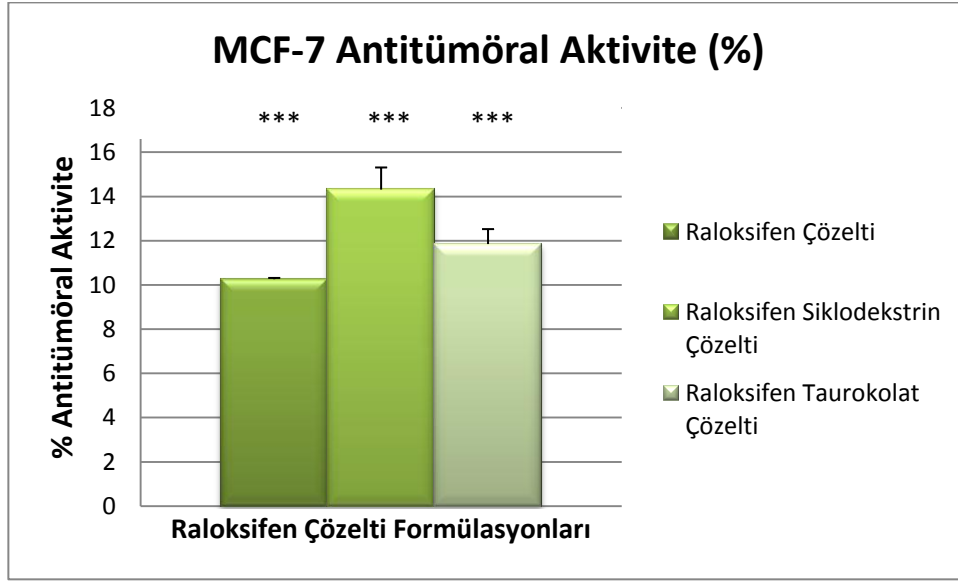
Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	-0.000110	4.61	0.764	0.0193
Hixson Crowel	0.000170	0.00188	0.764	0.167
Sıfır derece	0.0112	0.121	0.764	0.167
RRSBW	0.436	-6.79	0.958	0.00514
BTA	0.426	-9.54	0.957	0.00514
Higuchi	0.0652	0.0557	0.935	0.00534

4.1.1.6. MCF-7 ve MDA MB-231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan Antitümoral Aktivite Tayinine Ait Bulgular

4.1.1.6.1. MCF-7 Hücreleri Kullanılarak Yapılan Antitümoral Aktivite Tayinine Ait Bulgular

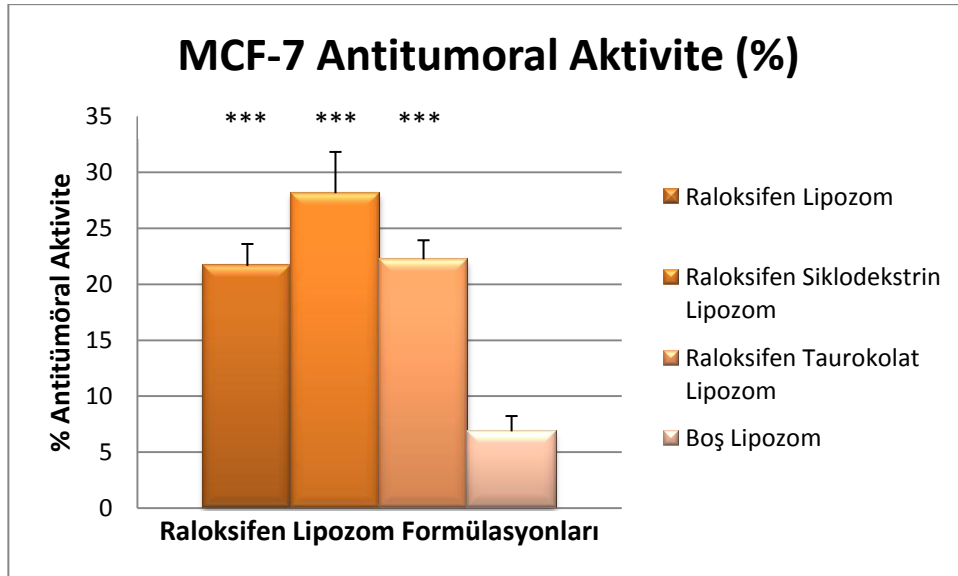
Antitümöral aktivite çalışmalarının yapılışı Bölüm 3.2.1.1.6'da açıklanmıştır. Formülasyonlarda in vivo deneylerde kullanılan doz olan 120 µg, 0.1 mL'de olacak şekilde ayarlanmıştır. Sonuçlar kontrol grupları yani yalnızca DMEM ile inkübe edilmiş kuyucuklar ile karşılaştırılarak Bölüm 3.2.1.1.6'daki formüle göre yapılmıştır.

Raloksifen çözelti formülasyonları ile MCF-7 hücre serilerinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları Şekil 83'de verilmiştir.



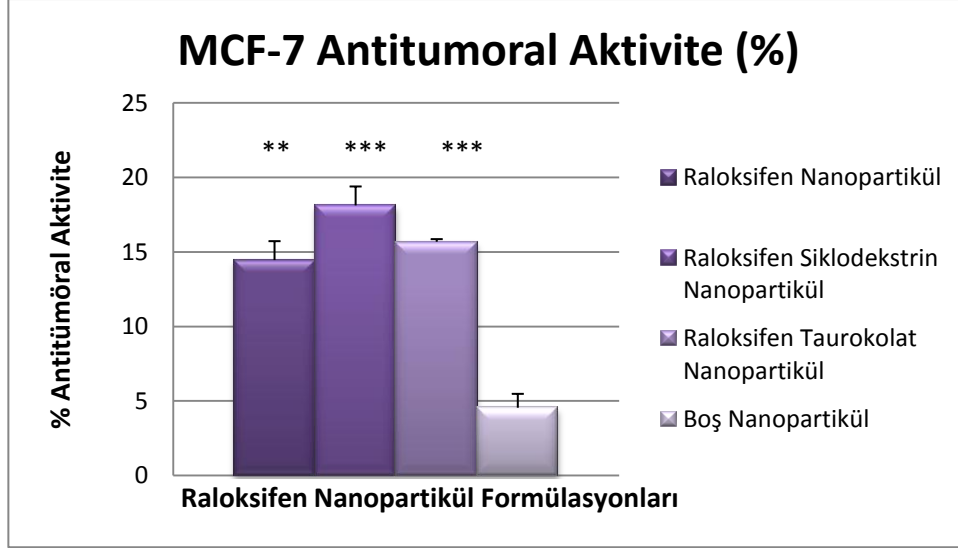
Şekil 83. Raloksifen çözelti formülasyonları ile MCF-7 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları (p<0.001) (Başlangıç hücre sayısı 1x10⁴)**

Raloksifen lipozom formülasyonları ile elde edilen antitümöral aktivite sonuçları Şekil 84’de verilmiştir.



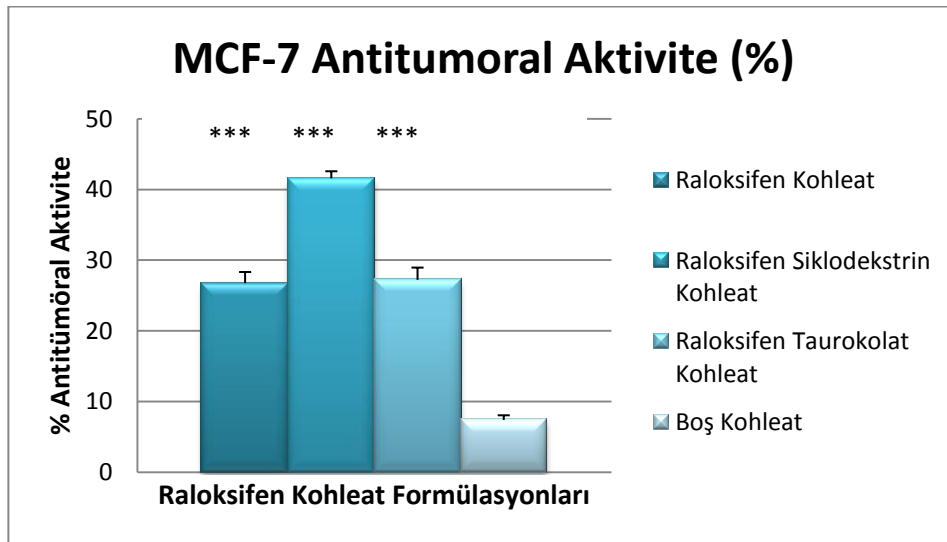
Şekil 84. Raloksifen lipozom formülasyonları ile MCF-7 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları (p<0.001) (Başlangıç hücre sayısı 1x10⁴)**

Raloksifen nanopartikül formülasyonları ile elde edilen antitümöral aktivite sonuçları Şekil 85’de verilmiştir.



Şekil 85. Raloksifen nanopartikül formülasyonları ile MCF-7 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) (Başlangıç hücre sayısı 1×10^4)

Raloksifen kohleat formülasyonları ile elde edilen antitümöral aktivite sonuçları Şekil 86’da verilmiştir.

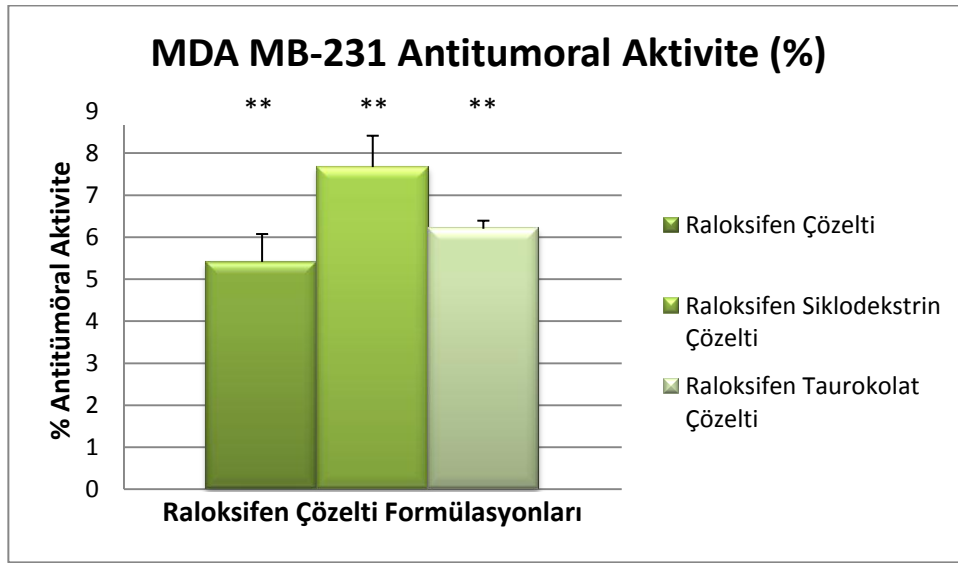


Şekil 86. Raloksifen kohleat formülasyonları ile MCF-7 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları (*** $p < 0.001$) (Başlangıç hücre sayısı 1×10^4)

4.1.1.6.2. MDA MB-231 Kullanılarak Yapılan Antitümöral Aktivite Tayinine Ait Bulgular

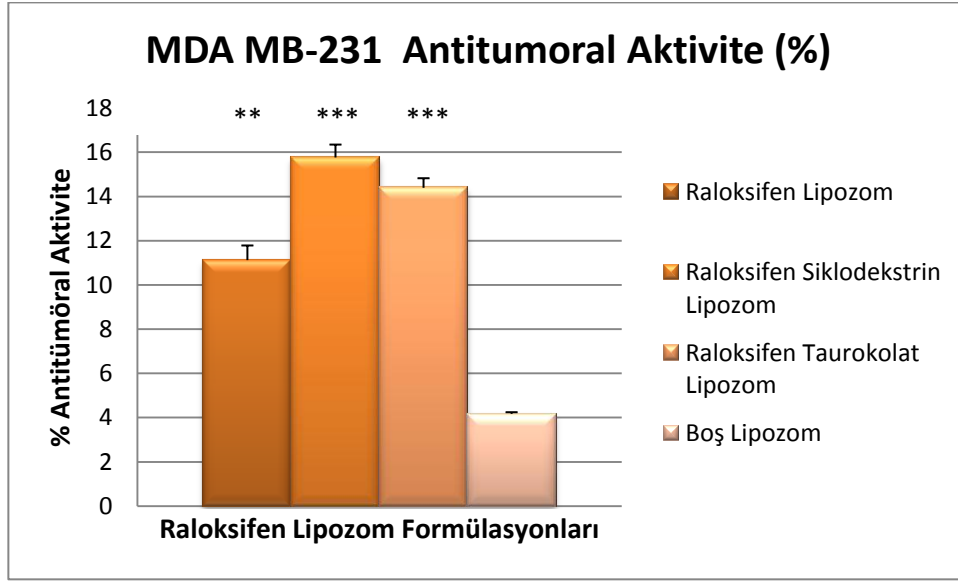
Antitümöral aktivite çalışmalarının yapılışı Bölüm 3.2.1.1.6'da açıklanmıştır. Formülasyonlarda in vivo deneylerde kullanılan doz olan 120 µg, 0.1 mL'de olacak şekilde ayarlanmıştır. Sonuçlar kontrol grupları yani yalnızca DMEM ile inkübe edilmiş kuyucuklar ile karşılaştırılarak Bölüm 3.2.1.6'daki formüle göre yapılmıştır.

Raloksifen çözelti formülasyonları ile MDA MB-231 hücre serilerinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları Şekil 87'de verilmiştir.



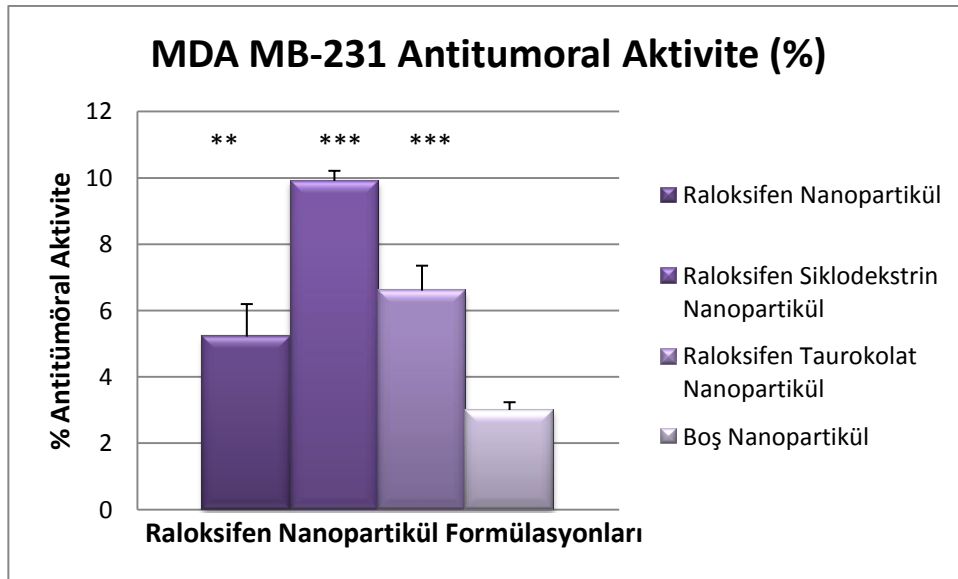
Şekil 87. Raloksifen çözelti formülasyonları ile MDA MB-231 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları (p< 0.01) (Başlangıç hücre sayısı 1x10⁴) (n=3)**

Raloksifen lipozom formülasyonları ile elde edilen antitümöral aktivite sonuçları Şekil 88'de verilmiştir.



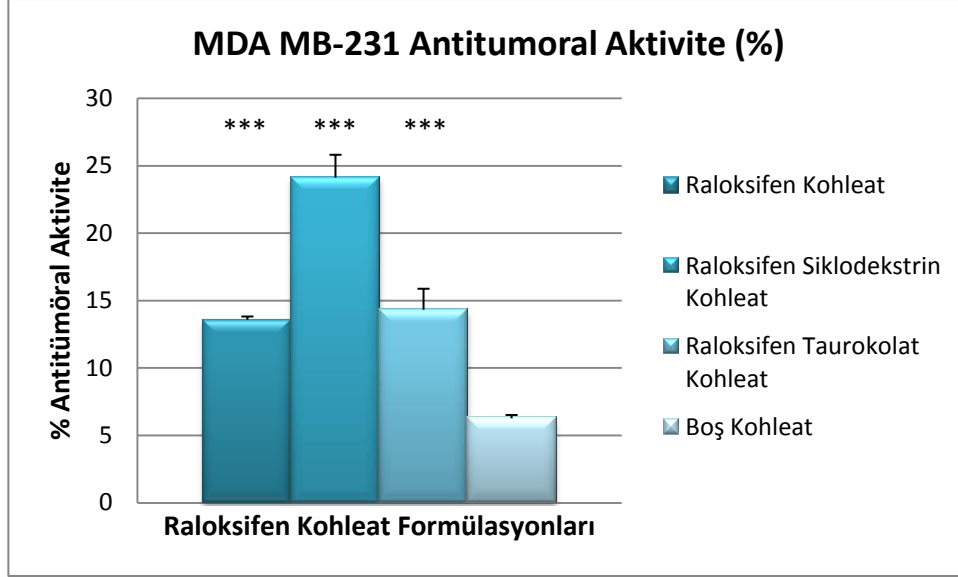
Şekil 88. Raloksifen lipozom formülasyonları ile MDA MB-231 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları (p< 0.01, ***p<0.001) (Başlangıç hücre sayısı 1×10^4) (n=3)**

Raloksifen nanopartikül formülasyonları ile elde edilen antitümöral aktivite sonuçları Şekil 89’da verilmiştir.



Şekil 89. Raloksifen nanopartikül formülasyonları ile MDA MB-231 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları (p< 0.01, ***p<0.001) (Başlangıç hücre sayısı 1×10^4) (n=3)**

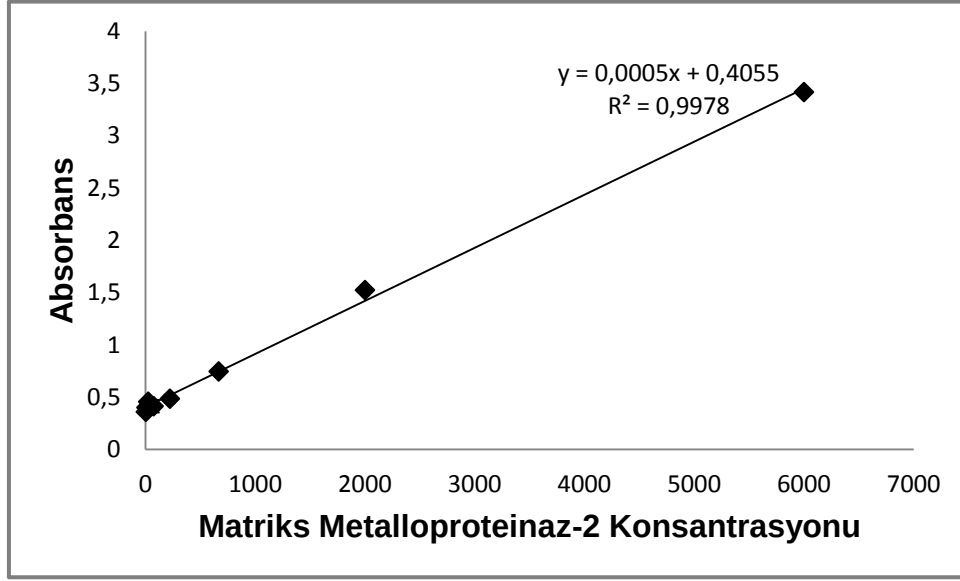
Raloksifen kohleat formülasyonları ile elde edilen antitümöral aktivite sonuçları Şekil 90'da verilmiştir.



Şekil 90. Raloksifen kohleat formülasyonları ile MDA MB-231 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları (***p<0.001) (Başlangıç hücre sayısı 1×10^4) (n=3)

4.1.1.7. MCF-7 ve MDA MB-231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan MMP-2 Enzim İnhibisyonu Çalışmalarına Ait Bulgular

Raloksifene ait tüm formülasyonlar, çözeltiler, lipozomlar, nanopartiküller ve kohleatların hem MCF-7 hem de MDA MB-231 hücrelerinde MMP-2 enzim miktarları ölçülmüş ve kontrol gruplarıyla kıyaslanarak enzim inhibisyon yüzdeleri hesaplanmıştır. Çalışmanın yapılışı Bölüm 3.2.1.1.7'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Kalibrasyon denklemi Şekil 91'de verilmiştir.



Şekil 91. MMP-2 miktar tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu

4.1.1.7.1. MCF-7 Hücreleri Kullanılarak Yapılan MMP-2 Enzim İnhibisyonu Çalışmalarına Ait Bulgular

Şekil 91’de belirtilen kalibrasyon grafiği kullanılarak raloksifen formülasyonlarının MCF 7 hücrelerindeki %MMP-2 inhibisyonu değerleri kontrol gruplarıyla kıyaslanarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 37’de görülmektedir.

Tablo 37. Raloksifen formülasyonlarının MCF 7 hücrelerindeki %MMP 2 inhibisyonu değerleri (n=3)

Formülasyon Tipi	%MMP 2 İnhibisyonu $\pm$ S.S
Raloksifen çözeltisi	13.7 $\pm$ 2.4
Raloksifen ve sodyum taurokolat içeren çözelti	17.2 $\pm$ 2.4
Raloksifen ve dimetil- β -siklodekstrin içeren çözelti	18.9 $\pm$ 2.5
Raloksifen lipozomları	23.4 $\pm$ 2.5
Raloksifen ve sodyum taurokolat içeren lipozomlar	28.8 $\pm$ 1.7
Raloksifen ve dimetil- β -siklodekstrin lipozomları	32.2 $\pm$ 3.3
Raloksifen içermeyen lipozomlar	8.92 $\pm$ 2.66
Raloksifen nanopartikülleri	17.2 $\pm$ 1.8
Raloksifen ve sodyum taurokolat içeren nanopartiküller	19.7 $\pm$ 1.3
Raloksifen ve dimetil- β -siklodekstrin nanopartiküller	21.6 $\pm$ 2.3
Raloksifen içermeyen nanopartiküller	5.31 $\pm$ 2.25
Raloksifen kohleatlar	34.6 $\pm$ 3.4
Raloksifen ve sodyum taurokolat içeren kohleatlar	39.1 $\pm$ 2.6
Raloksifen ve dimetil- β -siklodekstrin kohleatlar	51.9 $\pm$ 2.6
Raloksifen içermeyen kohleatlar	13.8 $\pm$ 1.5

4.1.1.7.2. MDA MB-231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan MMP-2 Enzim İnhibisyonu Çalışmalarına Ait Bulgular

Şekil 91’de belirtilen kalibrasyon grafiği kullanılarak Raloksifen formülasyonlarının MDA MB-231 hücrelerindeki %MMP-2 inhibisyonu değerleri kontrol gruplarıyla kıyaslanarak hesaplanmıştır. Sonçlar Tablo 38’de görülmektedir.

Tablo 38. Raloksifen formülasyonlarının MDA MB-231 hücrelerindeki %MMP 2 inhibisyonu değerleri (n=3)

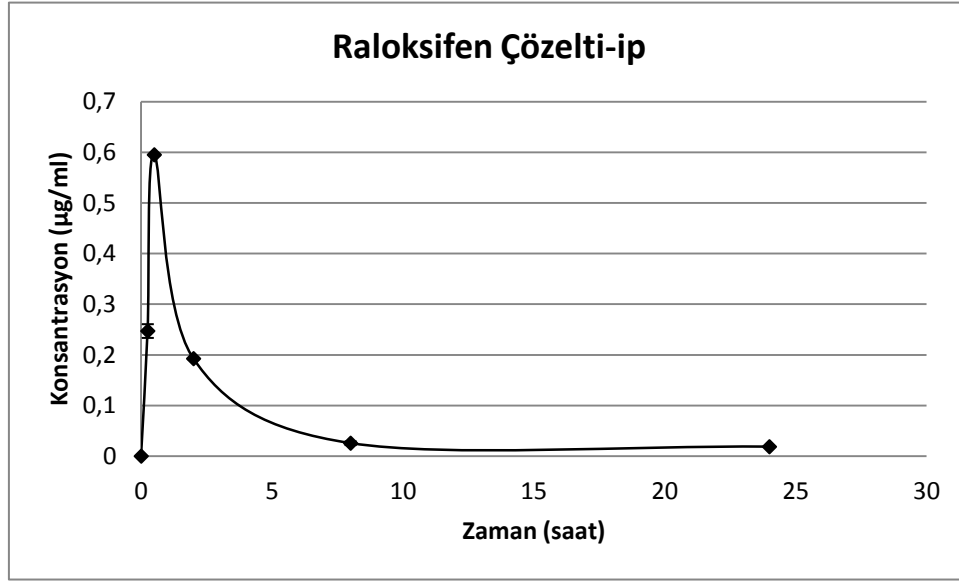
Formülasyon Tipi	%MMP 2 İnhibisyonu $\pm$ S.S
Raloksifen çözeltisi	11.4 $\pm$ 1.6
Raloksifen ve sodyum taurokolat içeren çözelti	13.6 $\pm$ 3.0
Raloksifen ve dimetil- β -siklodekstrin içeren çözelti	14.5 $\pm$ 4.0
Raloksifen lipozomları	15.2 $\pm$ 2.5
Raloksifen ve sodyum taurokolat içeren lipozomlar	21.7 $\pm$ 2.9
Raloksifen ve dimetil- β -siklodekstrin lipozomları	28.1 $\pm$ 2.2
Raloksifen içermeyen lipozomlar	8.92 $\pm$ 2.67
Raloksifen nanopartikülleri	6.75 $\pm$ 1.16
Raloksifen ve sodyum taurokolat içeren nanopartiküller	7.69 $\pm$ 2.28
Raloksifen ve dimetil- β -siklodekstrin nanopartiküller	10.6 $\pm$ 2.9
Raloksifen içermeyen nanopartiküller	5.30 $\pm$ 2.27
Raloksifen kohleatlar	28.8 $\pm$ 2.4
Raloksifen ve sodyum taurokolat içeren kohleatlar	32.7 $\pm$ 1.9
Raloksifen ve dimetil- β -siklodekstrin kohleatlar	39.7 $\pm$ 2.8
Raloksifen içermeyen kohleatlar	11.7 $\pm$ 2.2

4.1.2. Raloksifen Hidroklorür Etkin Maddesi ile Yapılan İn Vivo Çalışmalara Ait Bulgular

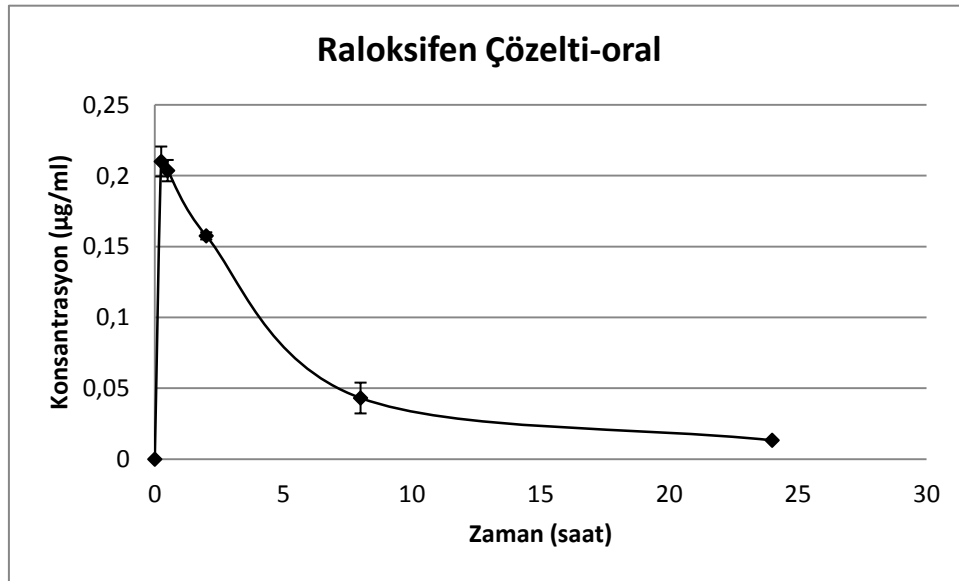
4.1.2.1. Balb-C tipi Sağlıklı Dişi Farelerle Yapılan İn Vivo Çalışmalara Ait Bulgular

İn vivo çalışmalar Bölüm 3.2.1.2’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş, farelere 0.1 ml serum fizyolojik içinde 120 μ g raloksifen

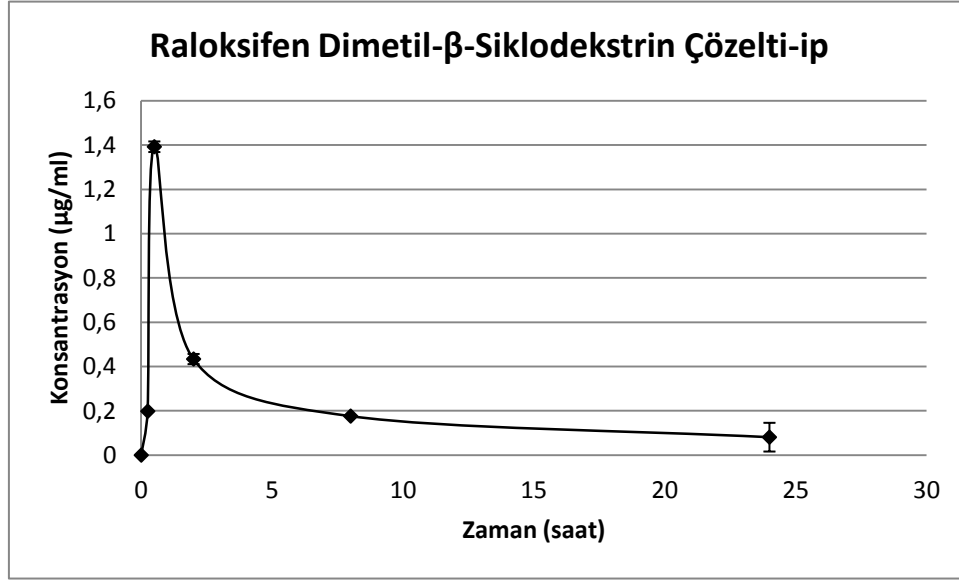
içeren formülasyonlar intraperitoneal ve oral yollarla uygulanarak Şekil 92-115'de verilen plazma konsantrasyon-zaman profilleri elde edilmiştir.



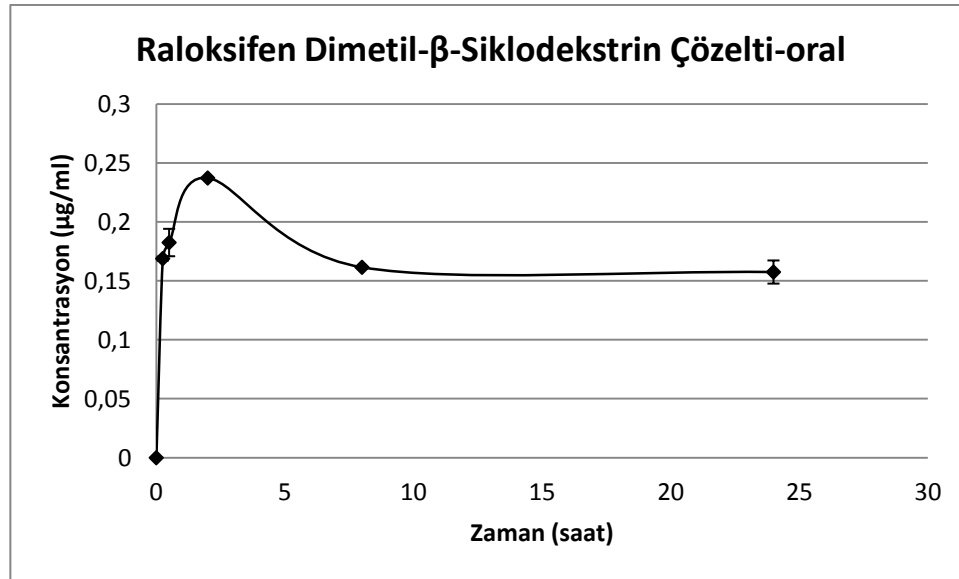
Şekil 92. Raloksifen çözeltisinin ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



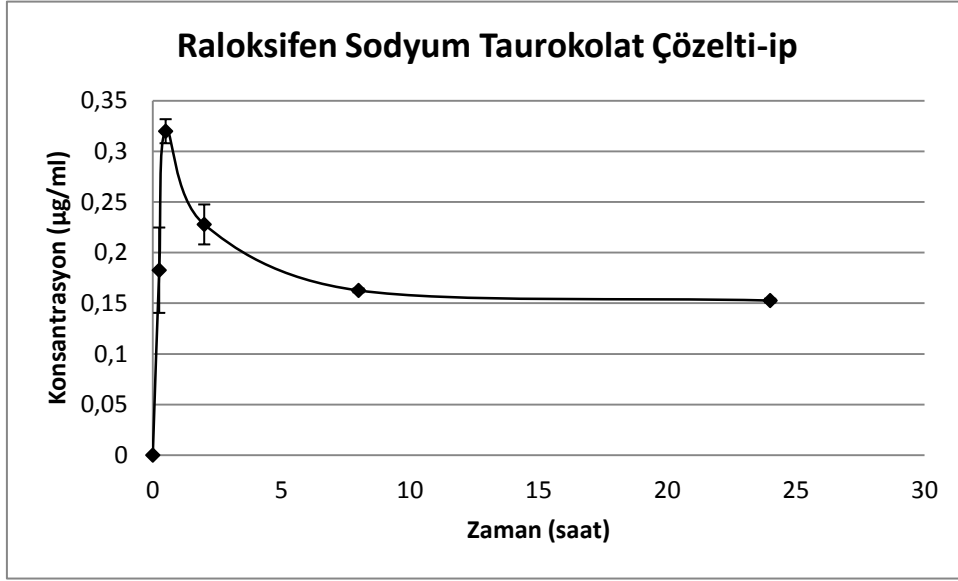
Şekil 93. Raloksifen çözeltisinin oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



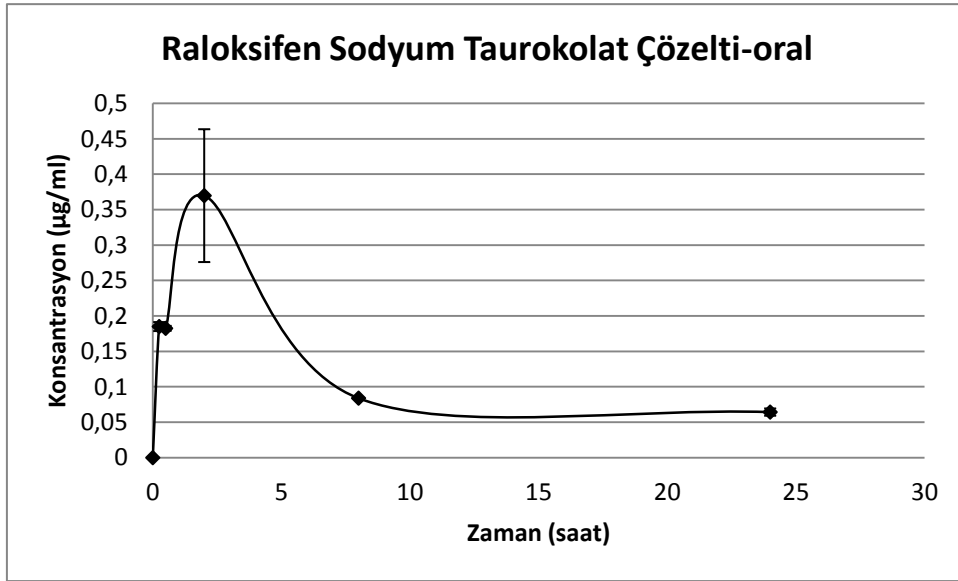
Şekil 94. Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin çözeltisinin ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



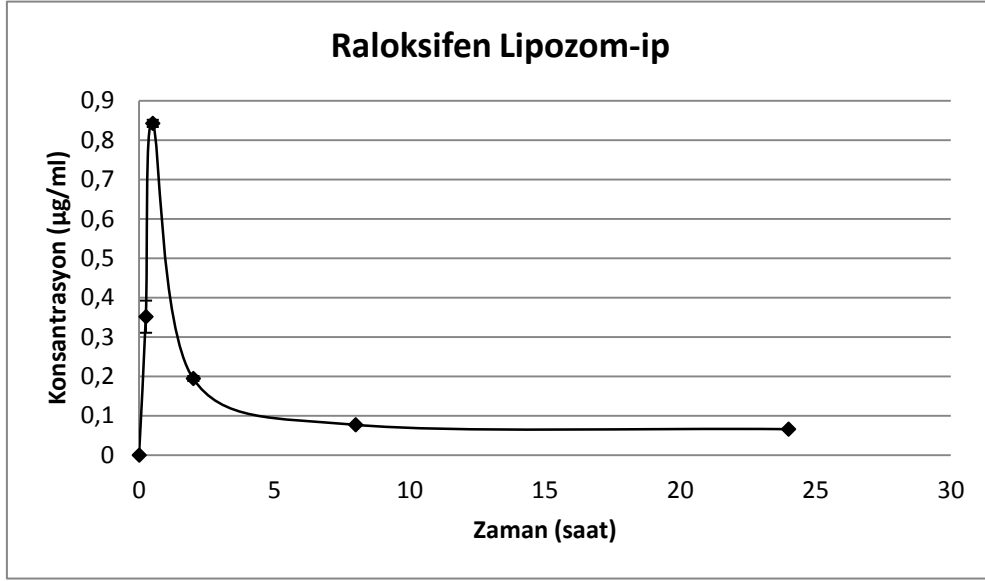
Şekil 95. Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin çözeltisinin oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



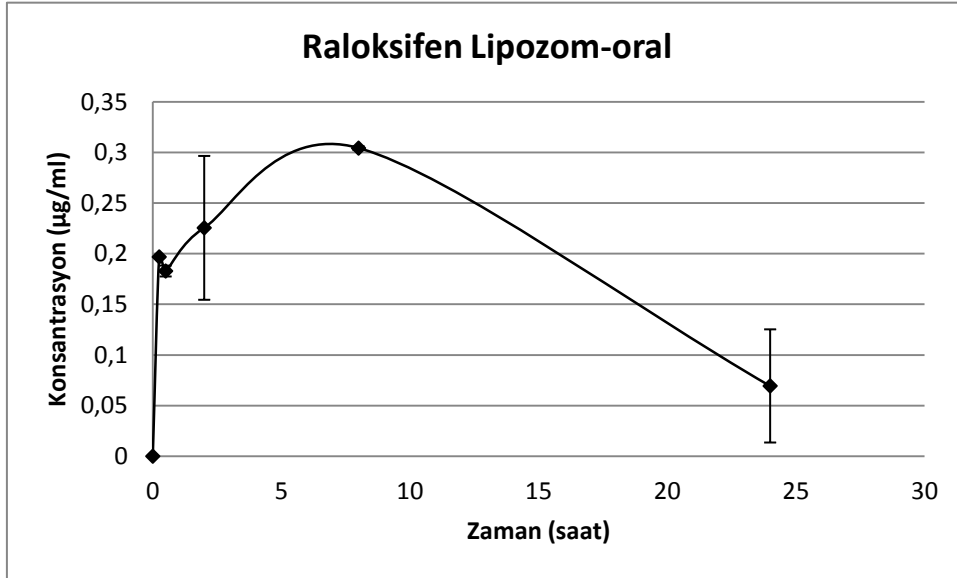
Şekil 96. Raloksifen sodyum taurokolat çözeltisinin ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



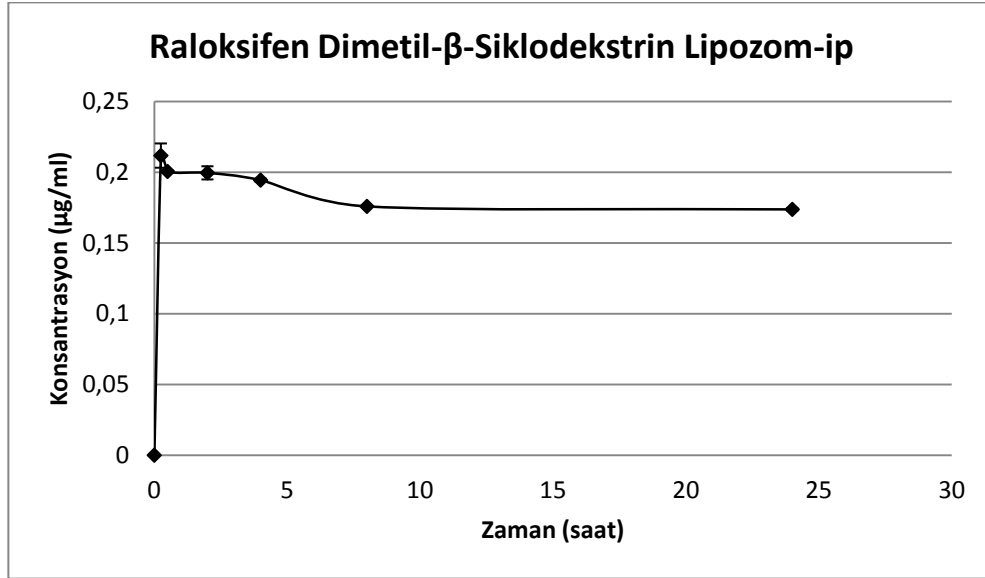
Şekil 97. Raloksifen sodyum taurokolat çözeltisinin oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



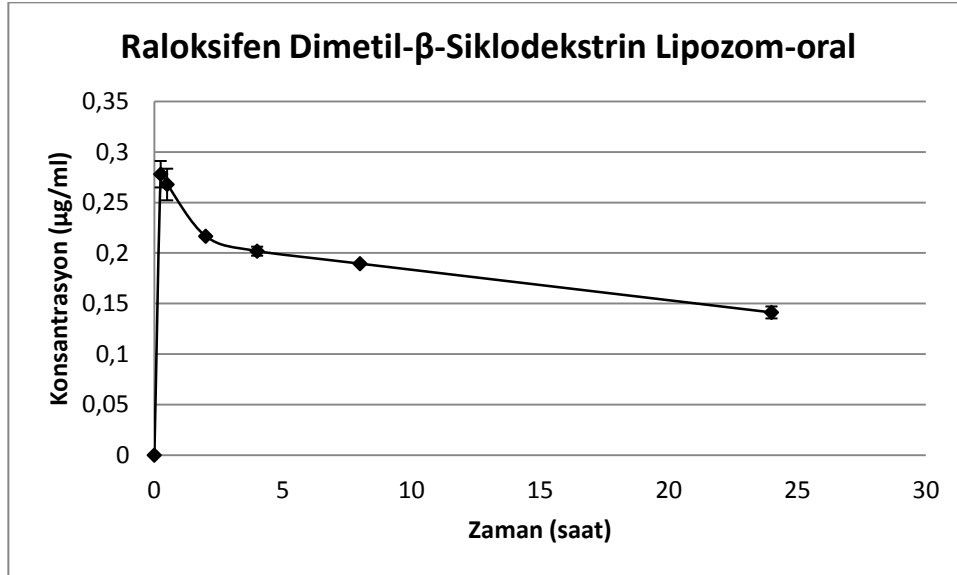
Şekil 98. Raloksifen lipozomlarının ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



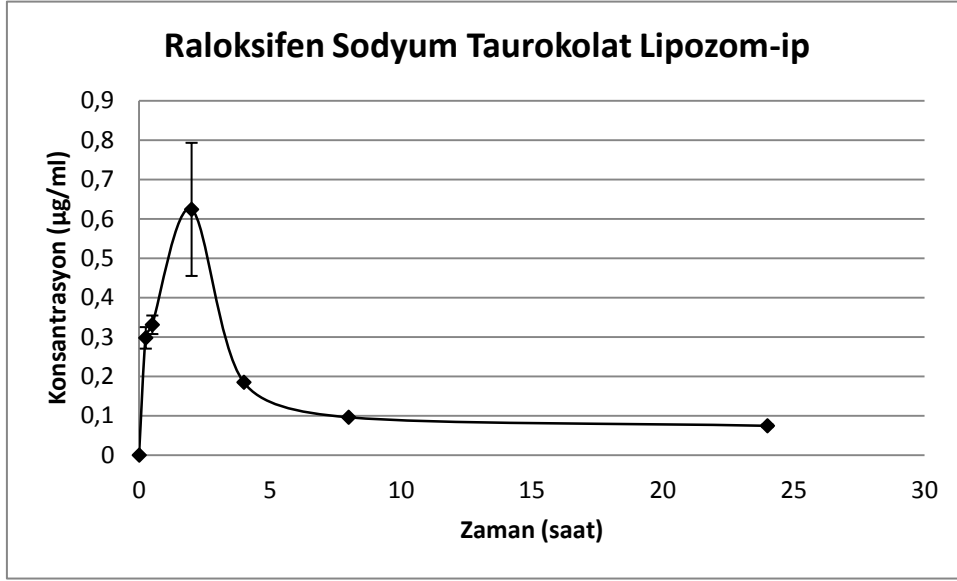
Şekil 99. Raloksifen lipozomlarının oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



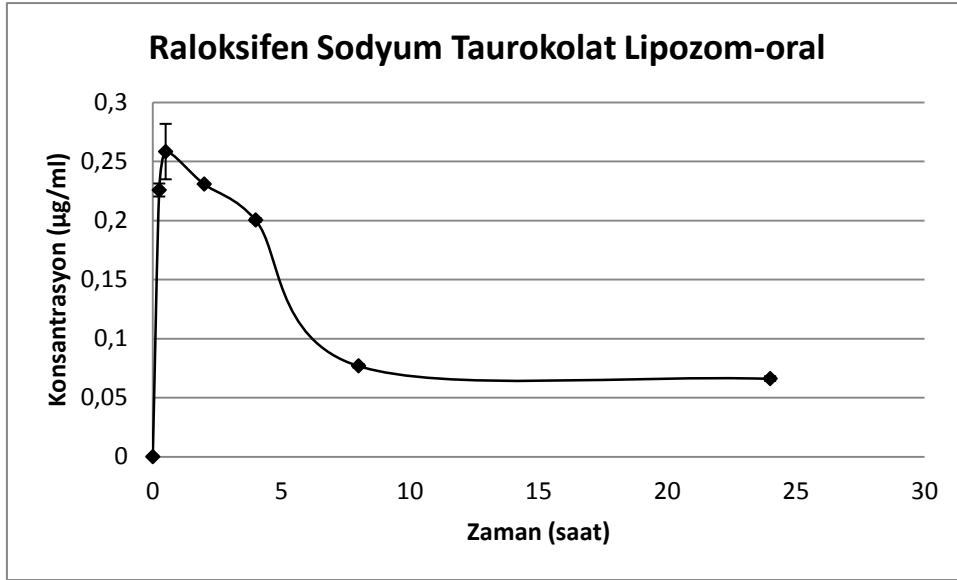
Şekil 100. Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin lipozomlarının ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



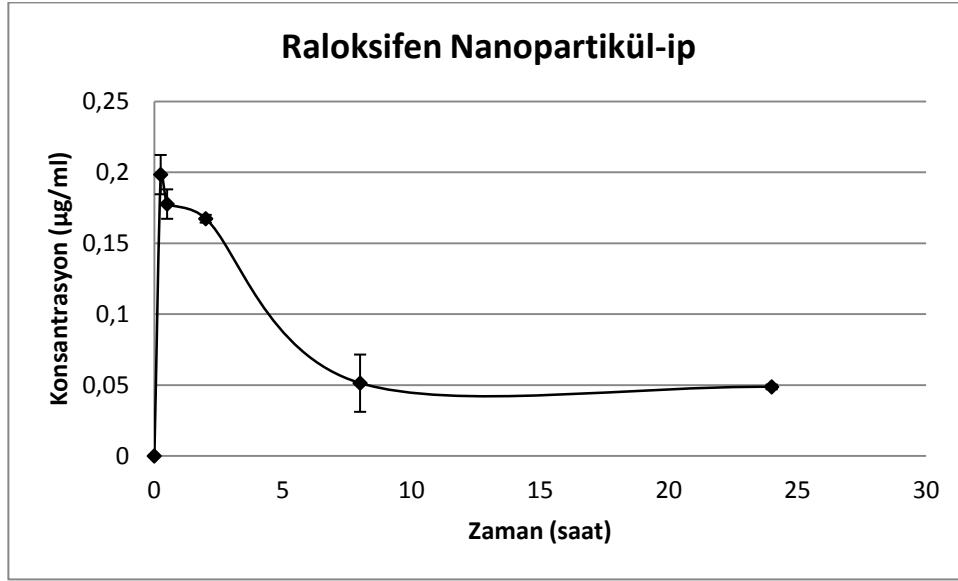
Şekil 101. Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin lipozomlarının oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



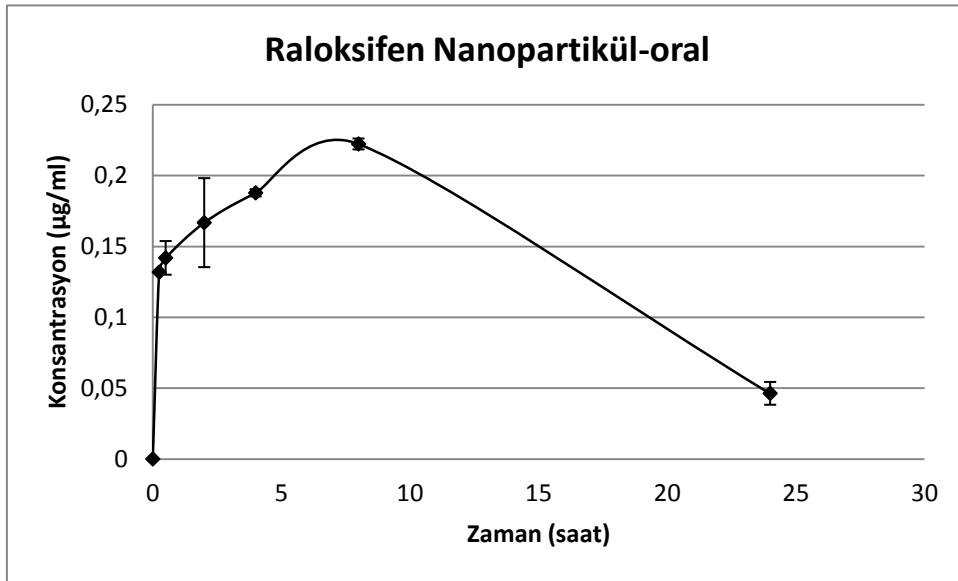
Şekil 102. Raloksifen sodyum taurokolat lipozomlarının ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



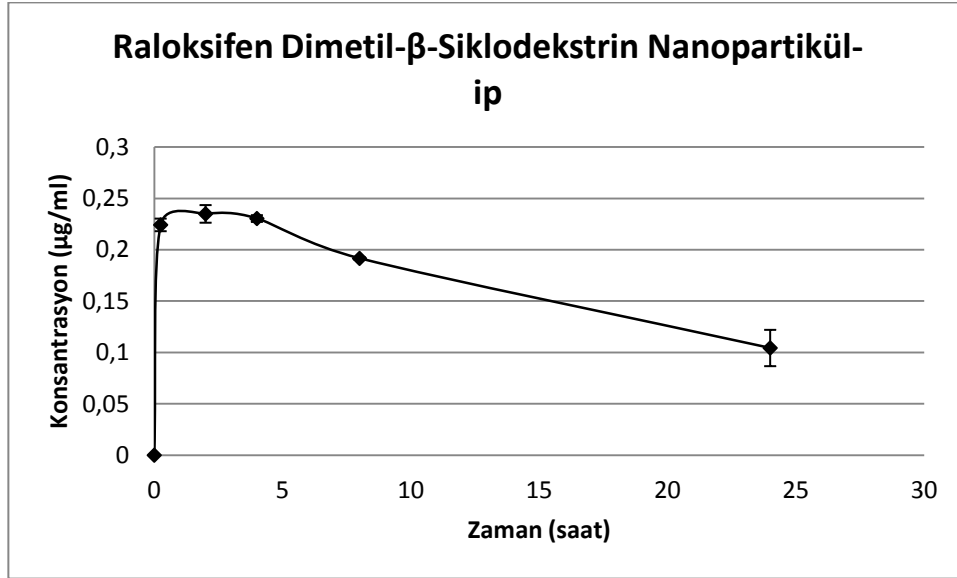
Şekil 103. Raloksifen sodyum taurokolat lipozomlarının oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



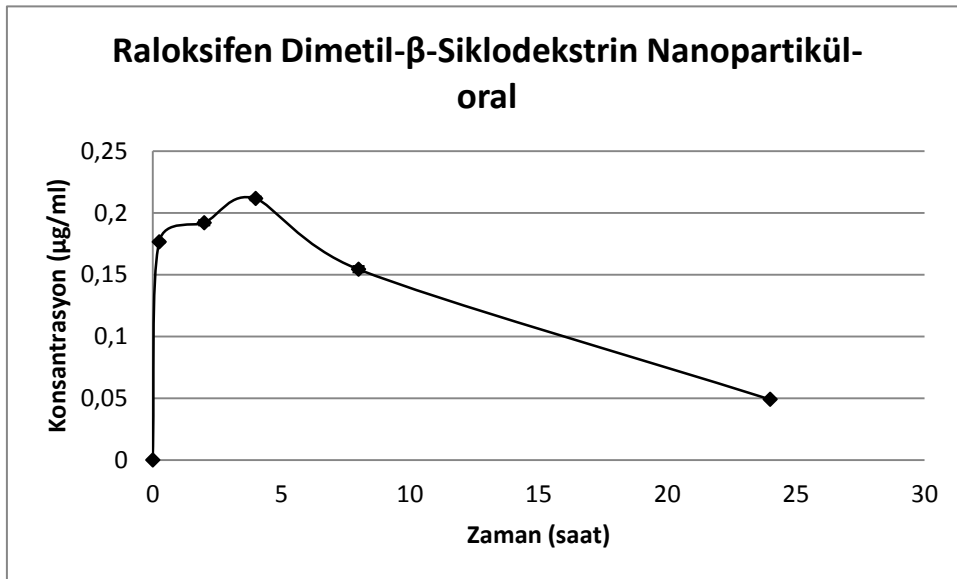
Şekil 104. Raloksifen nanopartiküllerinin ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



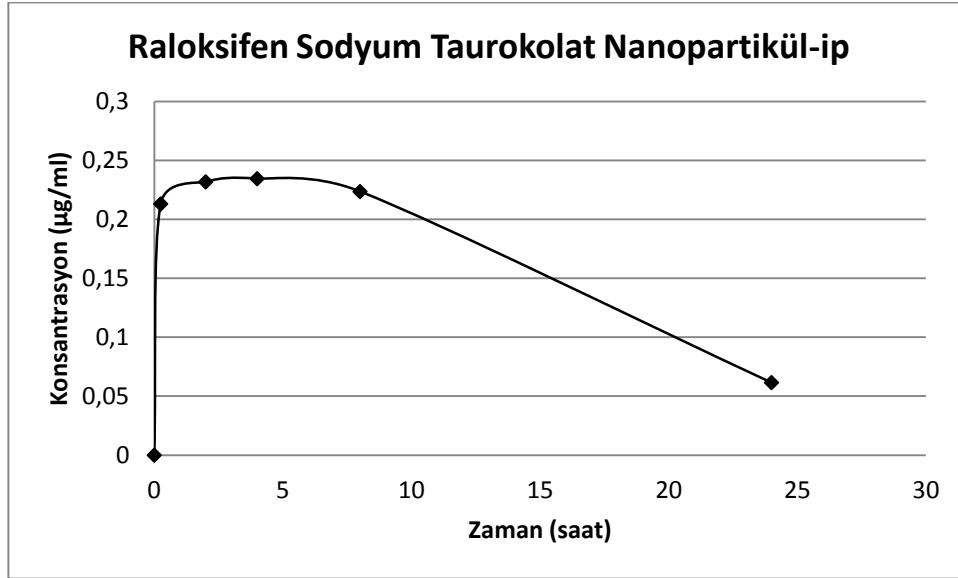
Şekil 105. Raloksifen nanopartiküllerinin oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



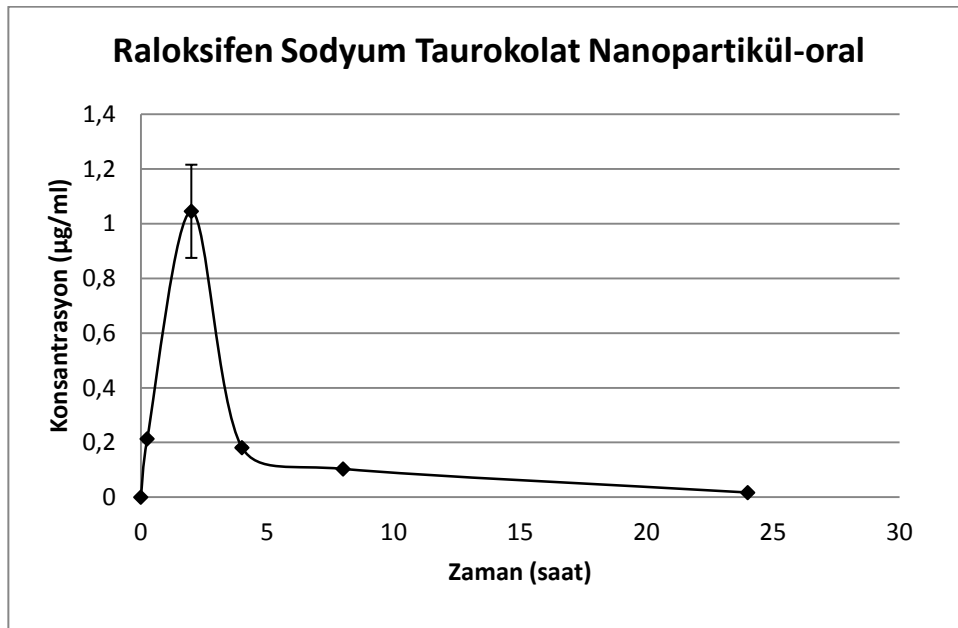
Şekil 106. Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin nanopartiküllerinin ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



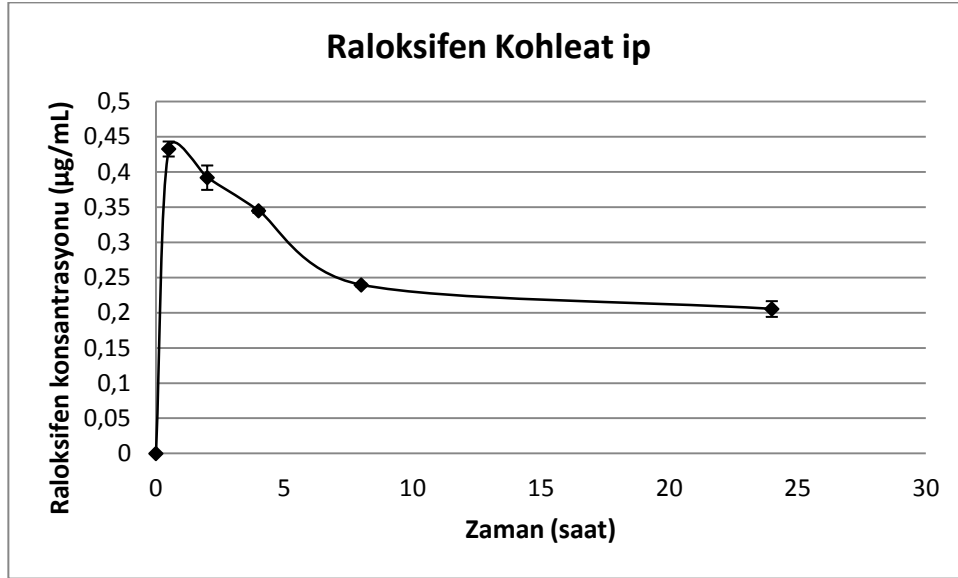
Şekil 107. Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin nanopartiküllerinin oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



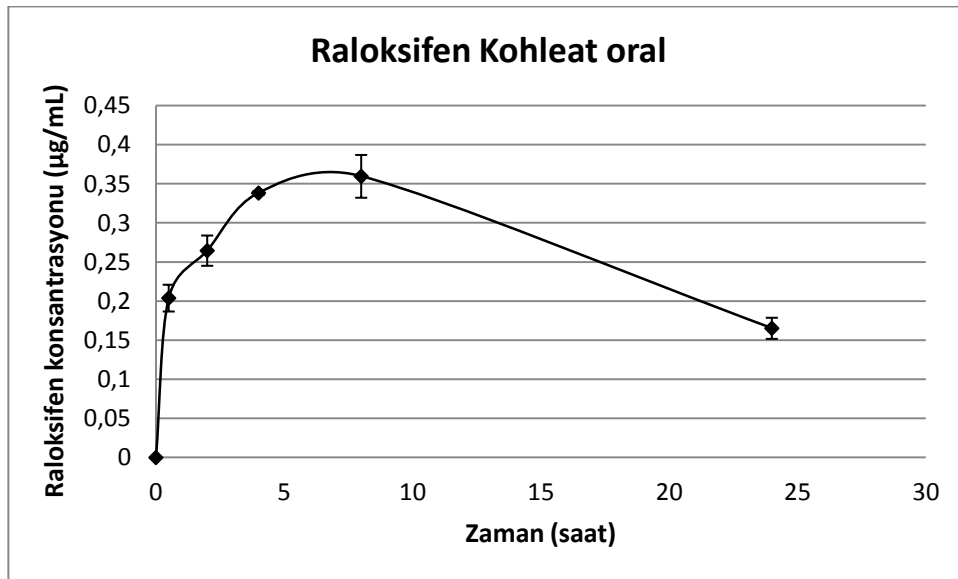
Şekil 108. Raloksifen sodyum taurokolat nanopartiküllerinin ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



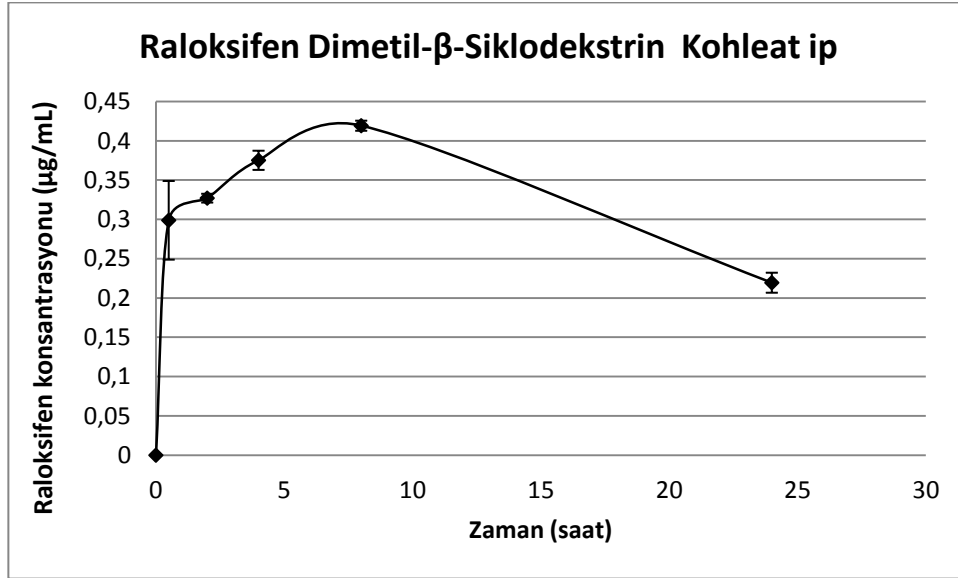
Şekil 109. Raloksifen sodyum taurokolat nanopartiküllerinin oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



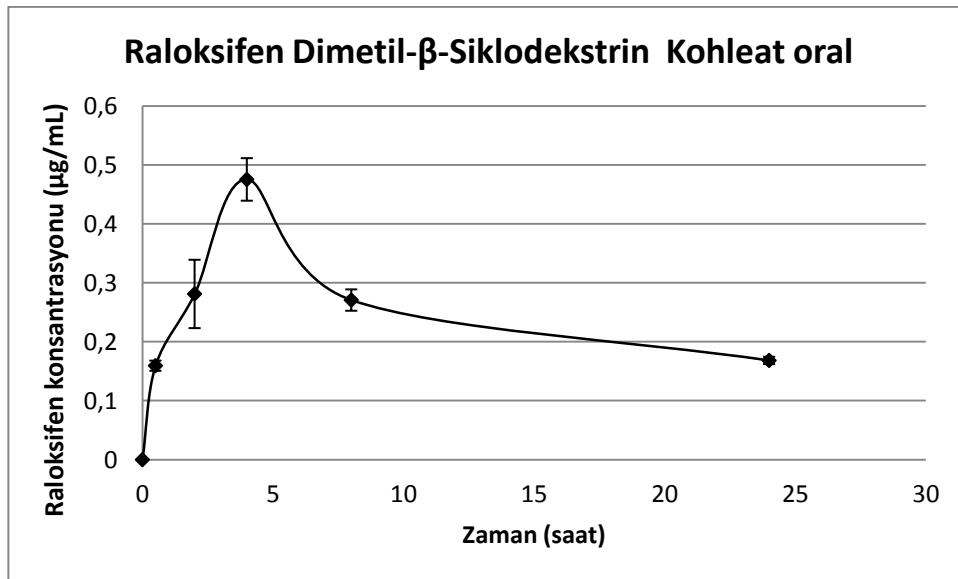
Şekil 110. Raloksifen kohleatlarının ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



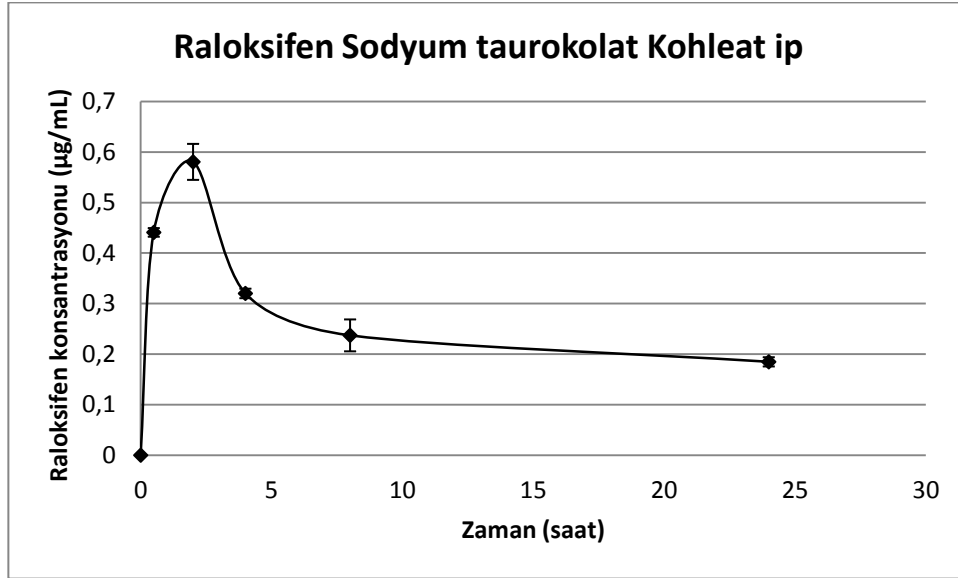
Şekil 111. Raloksifen kohleatlarının oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



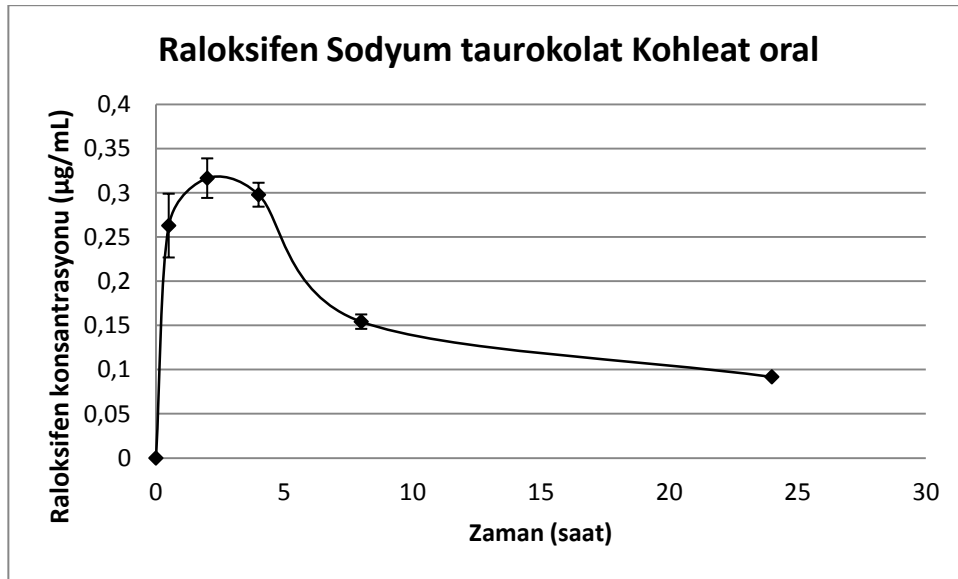
Şekil 112. Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin kohleatlarının ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



Şekil 113. Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin kohleatlarının oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



Şekil 114. Raloksifen sodyum taurokolat kohleatlarının ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)

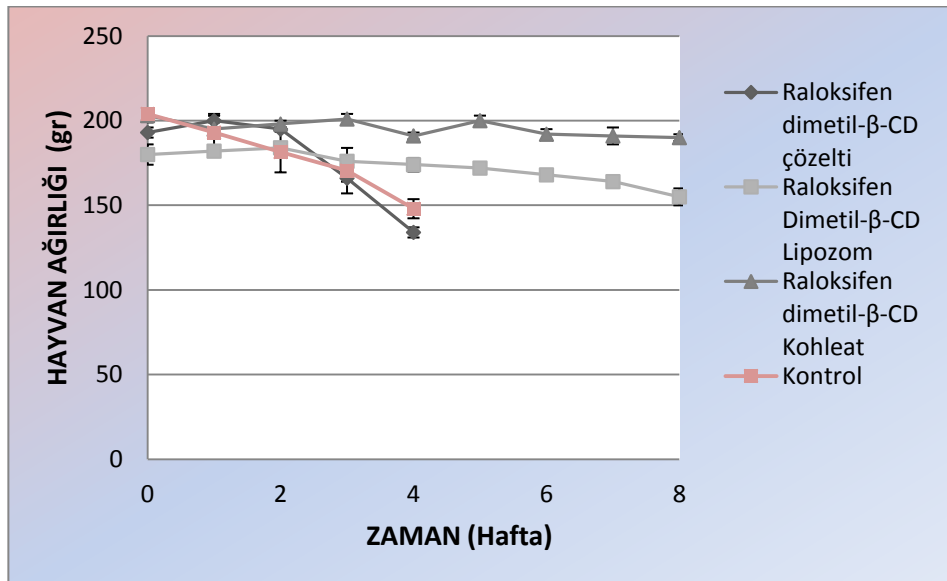


Şekil 115. Raloksifen sodyum taurokolat kohleatlarının oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)

4.1.2.2. Sprague Dawley Cinsi Meme Tümörü Oluşturulmuş Dişi Sıçanlarla Yapılan İn Vivo Çalışmalara Ait Bulgular

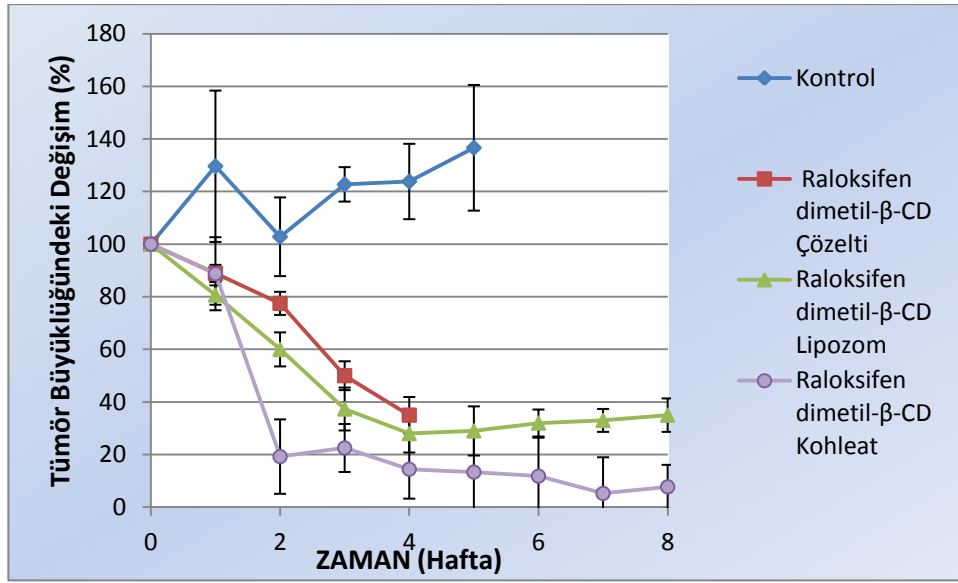
Çalışmanın bu kısmında, in vitro çalışmalarda en iyi permeabilite katsayısına sahip formülasyonlar raloksifen dimetil- β -CD lipozom ve raloksifen dimetil- β -CD kohleatları ile kıyaslama yapabilmek amacıyla raloksifen dimetil- β -CD çözelti formülasyonları meme tümörlü sıçanlara 8 hafta boyunca oral yolla uygulandı.

Uygulama yapılan meme tümörlü sıçanların her hafta ağırlıkları ve tümör çapları ölçüldü. 8 hafta sonunda hayatta kalan sıçanların tümörleri çıkartılarak patolojik incelemeye tabi tutuldu. Şekil 116'da hayvan ağırlıklarının hiçbir uygulama yapılmayan tümörlü sıçan kontrol grubu kabul edilerek çizilen grafiği görülmektedir. Raloksifen dimetil- β -CD çözelti ve kontrol grupları 8 haftalık deney süresini tamamlayamadan ölmüşlerdir.



Şekil 116. 8 hafta süresince oral uygulama yapılan sıçanların ağırlıklarındaki değişim (n=3)

Sıçanların tümörleri 8 hafta boyunca her hafta düzenli ölçülerek tümör alanları hesaplanmıştır. Başlangıç tümör alanları her grup için 100 birim kabul edilerek tümör alanlarındaki %değişim hesaplanmıştır. Tümör alanlarındaki %değişim Şekil 117’de görülmektedir.



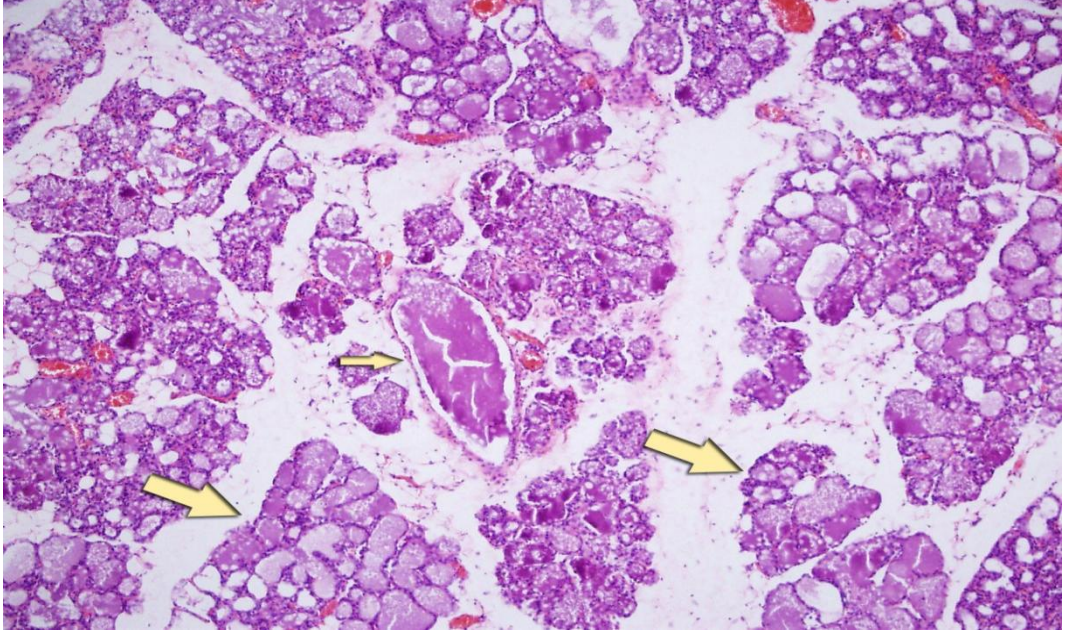
Şekil 117. 8 hafta süresince oral uygulama yapılan sıçanların tümör alanlarındaki değişim (n=3)

4.1.2.3. Histopatoloji Çalışmalarına Ait Bulgular

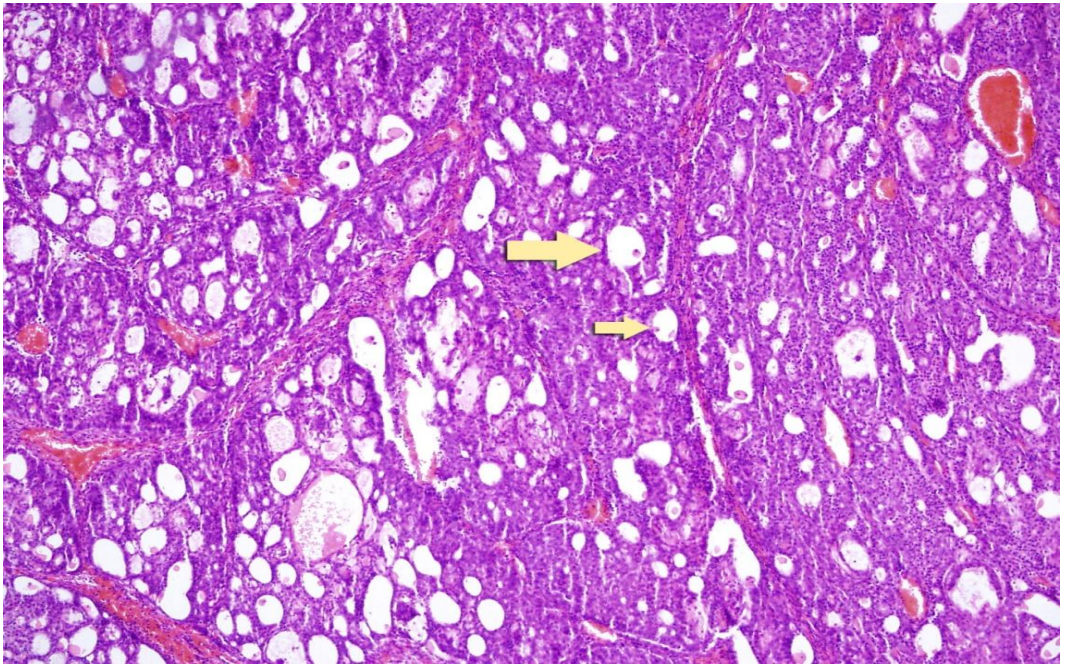
Deney süresi tamamlandıktan sonra sıçanlar açılarak tümör dokularından kesitler alınmış, alınan kesitlerin Bölüm 3.1.2.2.2.2’de anlatıldığı gibi hazırlanmasının ardından patolojik olarak incelenmiştir. İncelemede malignite olup olmadığı, varsa malignitenin cinsi ve tedaviye yanıtı değerlendirildi. Tedaviye yanıt tümörün içerdiği fibrozis ve nekroz oranları ile değerlendirildi.

Kıyaslama yapabilmek için sağlıklı meme dokusu ve hiçbir uygulama yapılmamış meme tümürlü sıçandan alınan kesitler de incelenmiştir. Resim 26’da sağlıklı sıçan meme dokusu görülmektedir.

Resim 27'de ise hiçbir ilaç uygulaması yapılamamış meme tümörlü sıçanlardan alınan meme tümörü görüntüsü görülmektedir.

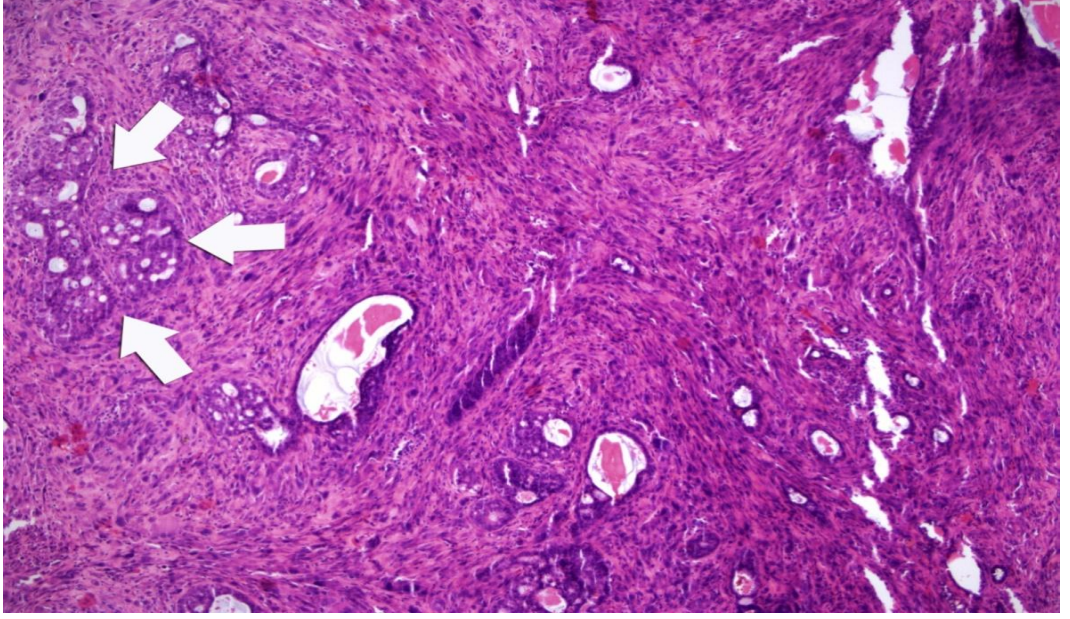


Resim 26. Sağlıklı sıçan meme dokusu görüntüsü (x100) (uzun oklar: normal meme lobülleri, kısa ok: duktus)

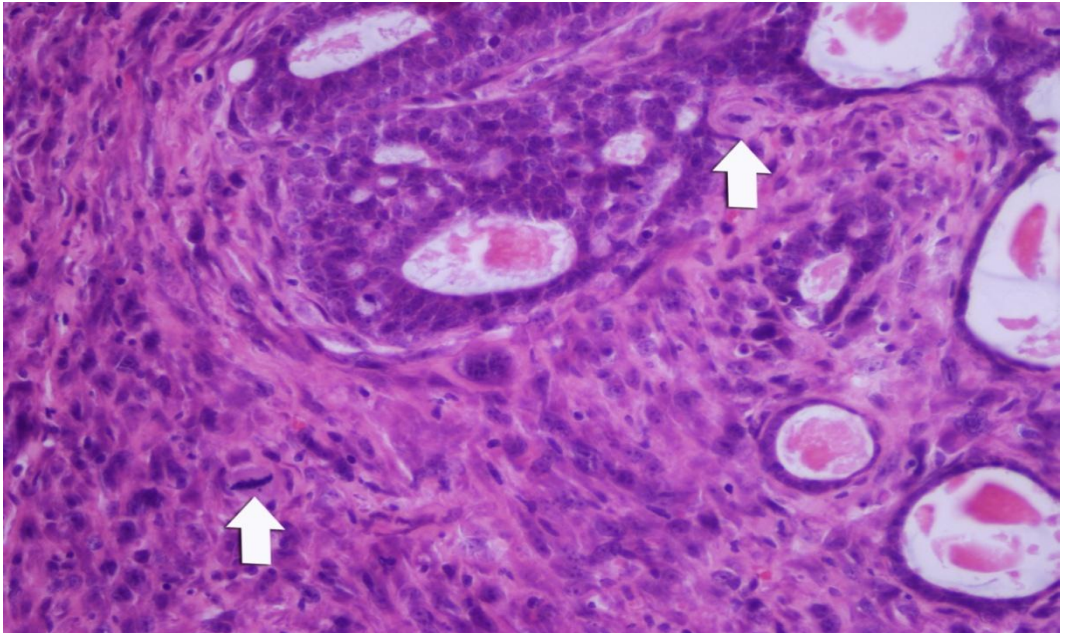


Resim 27. Hiçbir ilaç uygulaması yapılamamış meme tümörlü sıçanlardan alınan meme tümörü görüntüsü (oklar: gland formasyonu)

Raloksifen dimetil- β -CD lipozom uygulanan sıçanlardan alınan örnekler incelenerek Resim 28 ve 29'da verilen görüntüler elde edilmiştir.

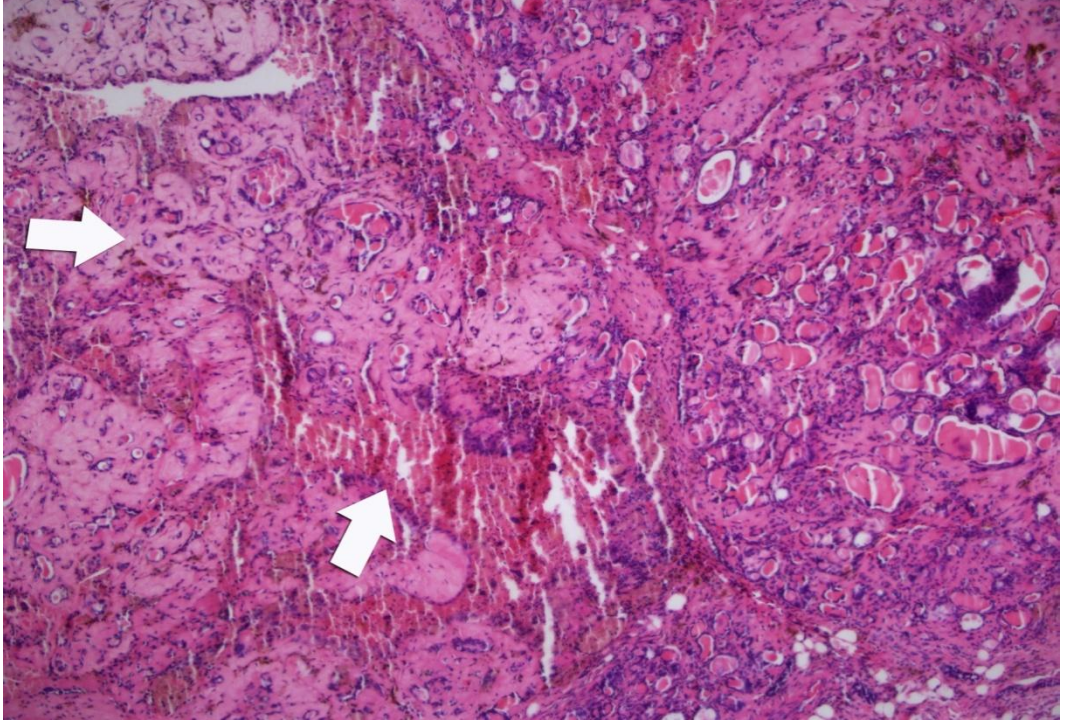


Resim 28. Raloksifen dimetil- β -CD lipozom uygulanan sıçanlardan alınan meme dokusunun görüntüsü (x100) (okların arası: malign epitelyum adaları)



Resim 29. Raloksifen dimetil- β -CD lipozom uygulanan sıçanlardan alınan meme dokusunun görüntüsü (x400) (oklar: malign stromada iki adet mitotik hücre)

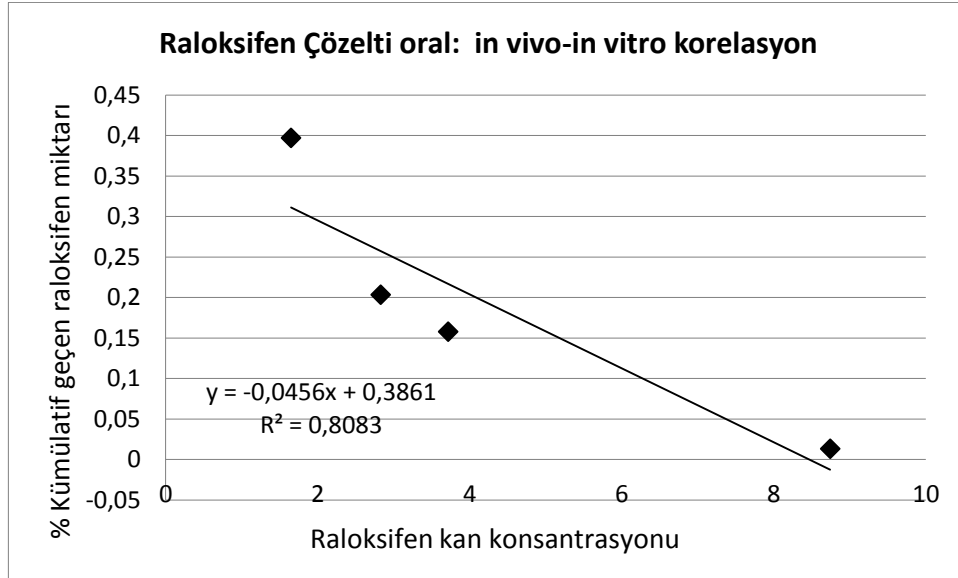
Raloksifen dimetil- β -CD koheleat uygulanan sıçanlardan alınan örnekler incelenerek Resim 30'da verilen görüntü elde edilmiştir.



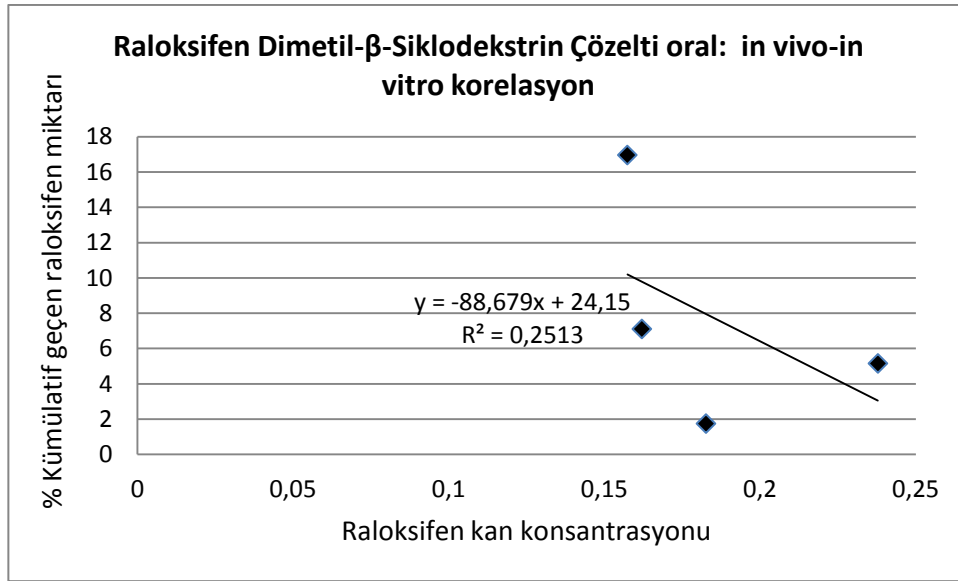
Resim 30. Raloksifen dimetil- β -CD koheleat uygulanan sıçanlardan alınan meme dokusunun görüntüsü (x100) (sol ok: fibrotik alanlar, sağ alt ok: nekrotik alanlar)

4.1.3. İn Vitro-İn Vivo Korelasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

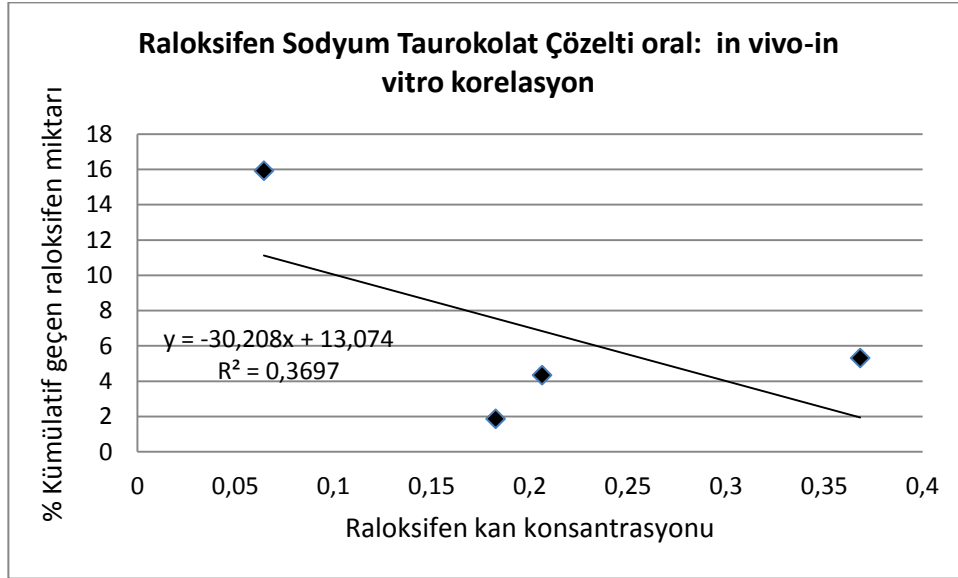
Aynı örnek alma zamanlarında, hücre kültürlerinde hesaplanan %kümülatif geçen raloksifen miktarı ile kandaki raloksifen grafiğe geçirilerek korelasyon çalışması oral yolla verilen tüm formülasyon tipleri için gerçekleştirildi^{202,203}. Oral yolla hayvanlara verilen formülasyonlar üzerinde korelasyon çalışması yapmamızdaki amaç, Caco-2 hücrelerinin oral ilaç absorpsiyonunun in vitro olarak değerlendirilmesinde kullanılan bir model olmasıdır. Bu yüzden intraperitoneal yolla verilen formülasyonlar için korelasyon çalışması yapılmamıştır. Korelasyon sonuçları Şekil 118-129'de verilmiştir.



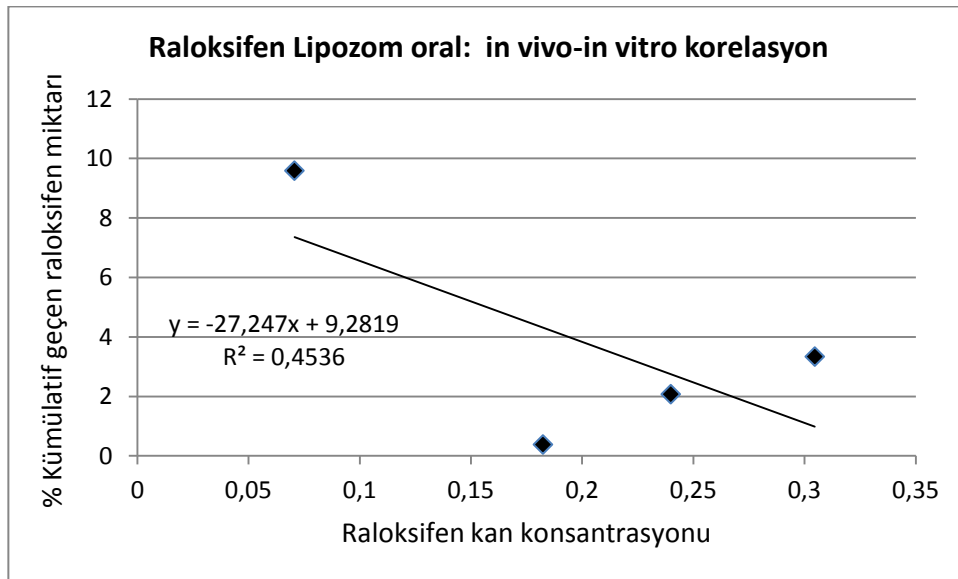
Şekil 118. Raloksifen çözeltisi için in vivo-in vitro korelasyon grafiği



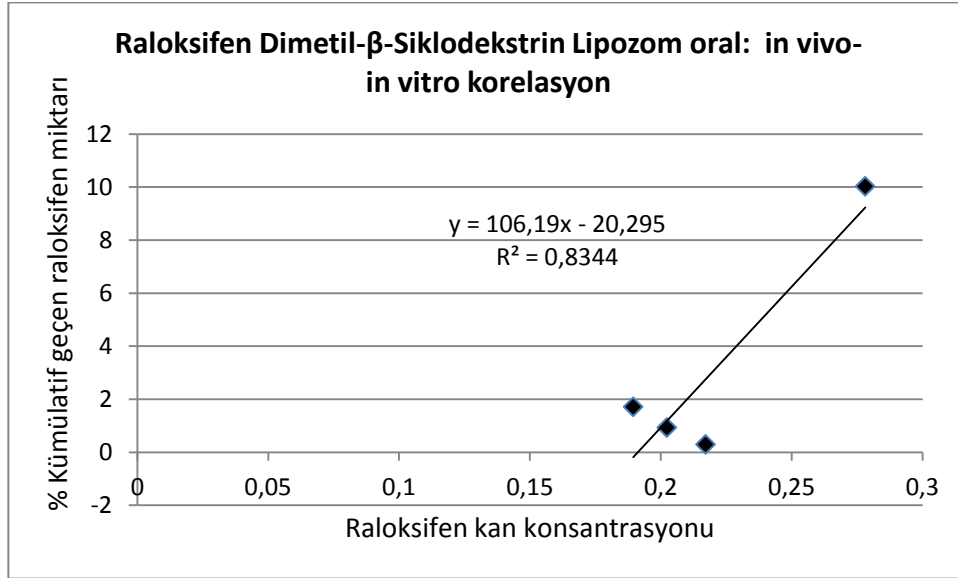
Şekil 119. Raloksifen Dimetil-β-Siklodekstrin çözeltisi için in vivo-in vitro korelasyon grafiği



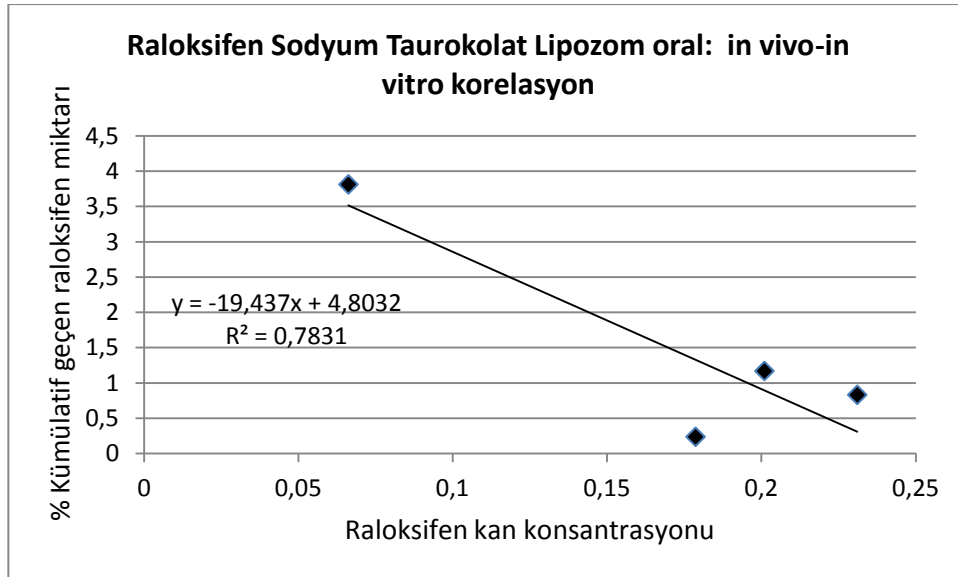
Şekil 120. Raloksifen Sodyum Taurokolat çözeltisi için in vivo-in vitro korelasyon grafiği



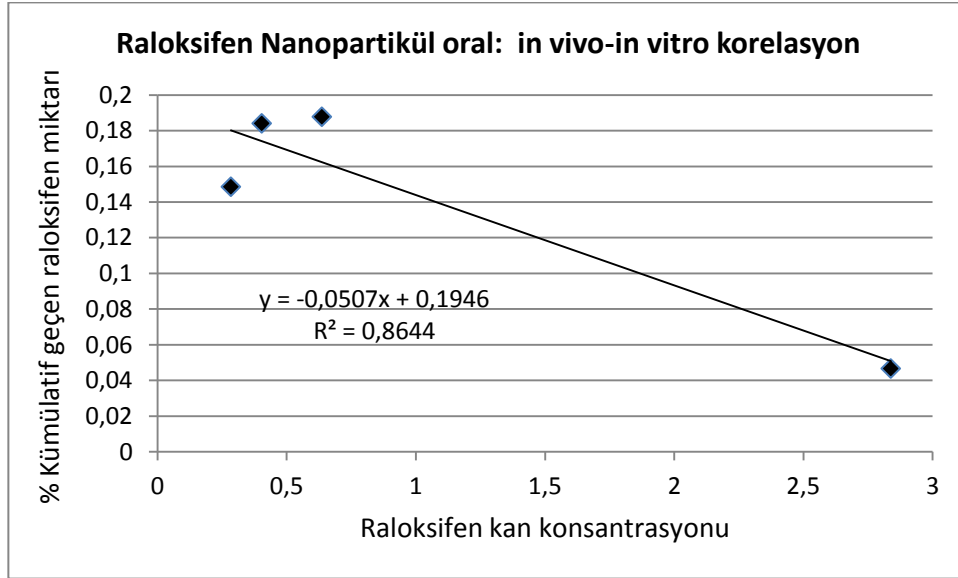
Şekil 121. Raloksifen lipozom için in vivo-in vitro korelasyon grafiği



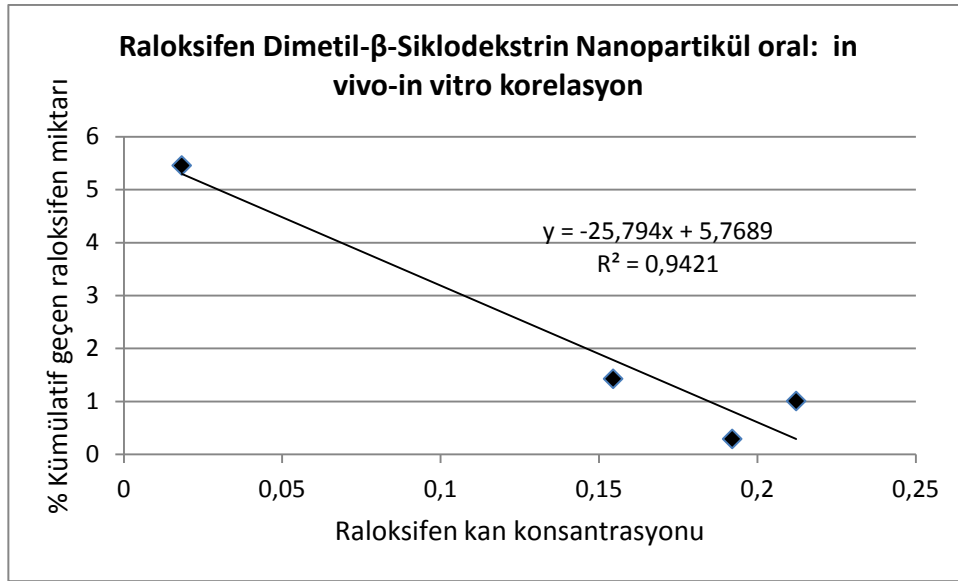
Şekil 122. Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin lipozom için in vivo-in vitro korelasyon grafiği



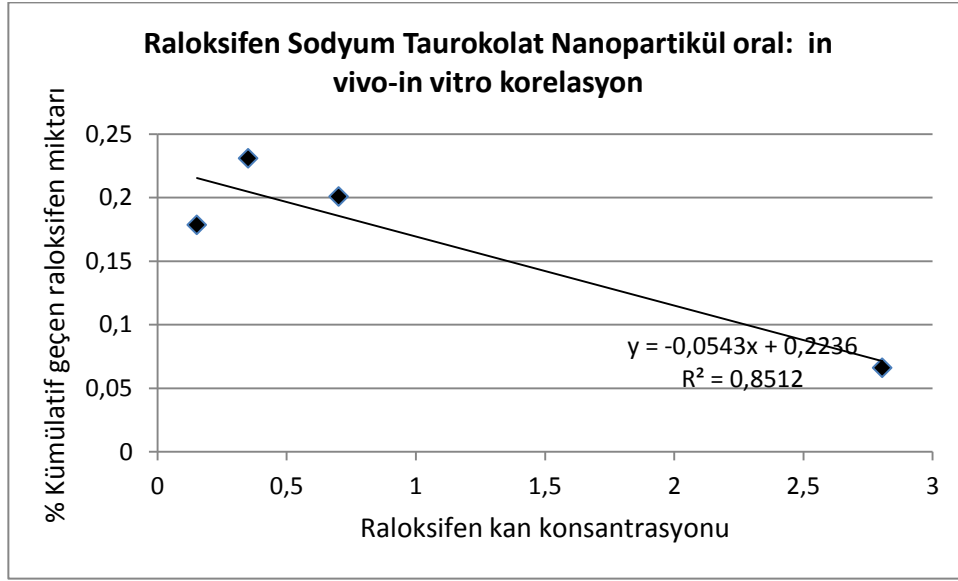
Şekil 123. Raloksifen Sodyum Taurokolat lipozom için in vivo-in vitro korelasyon grafiği



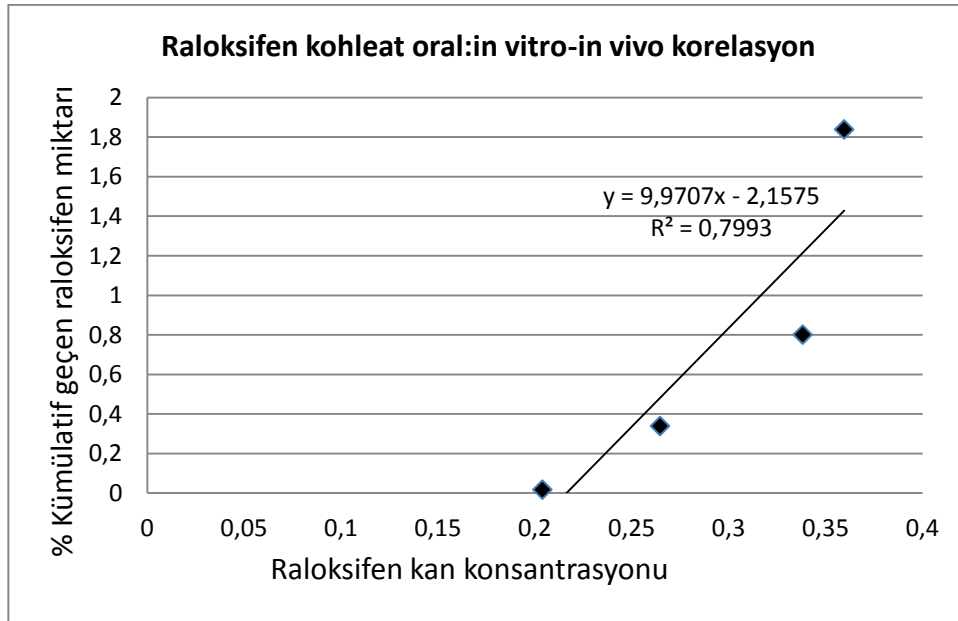
Şekil 124. Raloksifen nanopartikül için in vivo-in vitro korelasyon grafiği



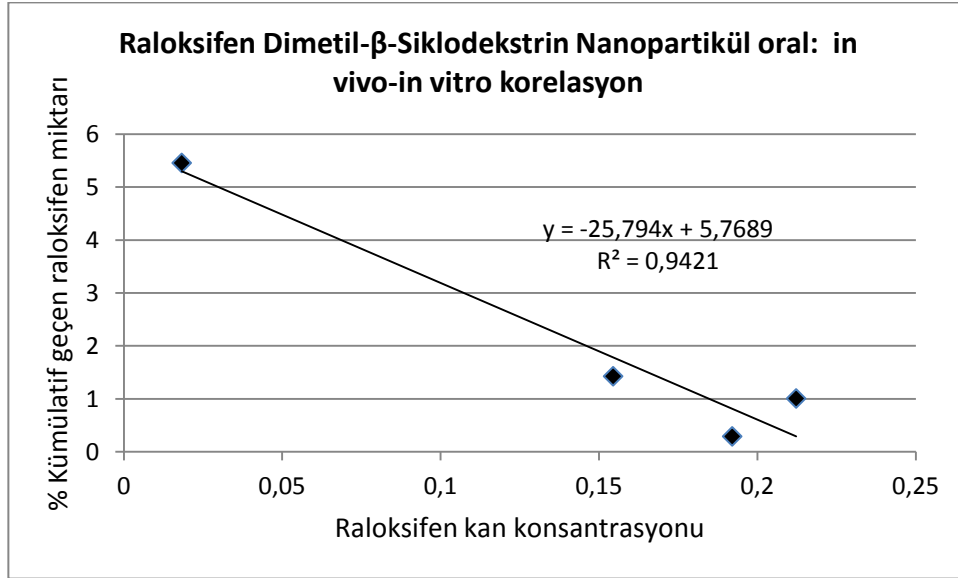
Şekil 125. Raloksifen Dimetil-β-Siklodekstrin nanopartikül için in vivo-in vitro korelasyon grafiği



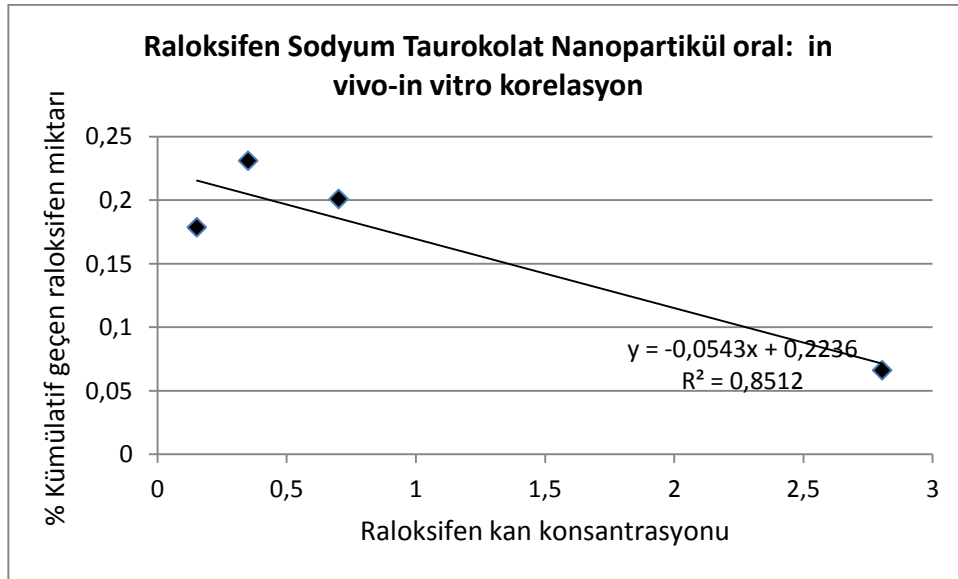
Şekil 126. Raloksifen Sodyum Taurokolat nanopartikül için in vivo-in vitro korelasyon grafiği



Şekil 127. Raloksifen kohleat için in vivo-in vitro korelasyon grafiği



Şekil 128. Raloksifen Dimetil-β-Siklodekstrin kohleat için in vivo-in vitro korelasyon grafiği



Şekil 129. Raloksifen sodyum taurokolat kohleat için in vivo-in vitro korelasyon grafiği

4.1.4. Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular

En iyi permeabilite katsayısına ve in vivo etkinliğe sahip formülasyonlar olan raloksifen dimetil- β -CD lipozom ve raloksifen dimetil- β -CD kohleatları ile kıyaslama yapabilmek amacıyla raloksifen dimetil- β -CD çözelti formülasyonları ile 6 ay süreyle hızlandırılmış stabilite çalışması yapılmıştır. Stabilite test koşulları:

- 4°C
- 25°C $\pm$ %60 bağıl nem
- 40°C $\pm$ %75 bağıl nem olarak çalışılmıştır.

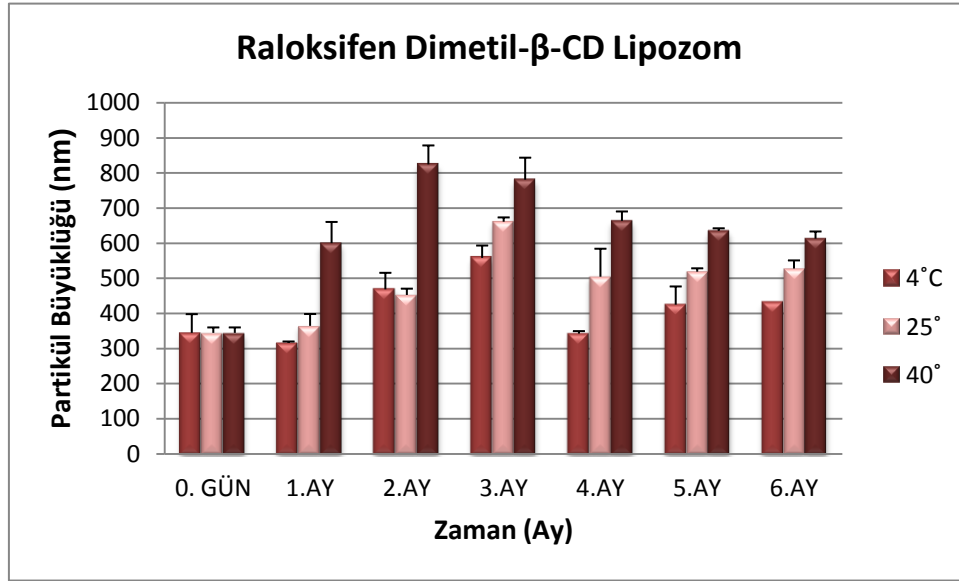
4.1.4.1. Formülasyonların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımlarına Ait Bulgular

4.1.4.1.1 Raloksifen Dimetil- β -CD Lipozomlarının Partikül Büyüklüğü ve Dağılımlarına Ait Bulgular

Farklı saklama koşullarında (4°C, 25°C $\pm$ %60 bağıl nem, 40°C $\pm$ %75 bağıl nem) saklanan lipozomların, 0., 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. aylarda Malvern Zeta Sizer- Nano ZS ile ölçülen partikül büyüklüğü ve dağılımı sonuçları Tablo 39'da verilmiştir. Şekil 130'da partikül büyüklüğü ve dağılımındaki 6 aylık değişim grafikte gösterilmiştir.

Tablo 39. Raloksifen Dimetil- β -CD lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları (n=3)

Zaman (Ay)	Ortalama ϕ ap (nm) $\pm$ S.S (4°C)	Ortalama ϕ ap (nm) $\pm$ S.S (25°C)	Ortalama ϕ ap (nm) $\pm$ S.S (40°C)
0	344.7 $\pm$ 15.5	344.7 $\pm$ 15.5	344.7 $\pm$ 15.5
1	349.7 $\pm$ 6.8	364.7 $\pm$ 7.3	633.7 $\pm$ 6.4
2	468.7 $\pm$ 3.8	452.7 $\pm$ 8.0	824.7 $\pm$ 8.7
3	525.0 $\pm$ 9.5	661.0 $\pm$ 12.5	781.0 $\pm$ 9.2
4	342.7 $\pm$ 35.1	504.7 $\pm$ 9.7	663.7 $\pm$ 12.5
5	425.0 $\pm$ 7.0	519.0 $\pm$ 9.5	635.0 $\pm$ 7.5
6	432 $\pm$ 15	528.0 $\pm$ 13.1	613.0 $\pm$ 20.5



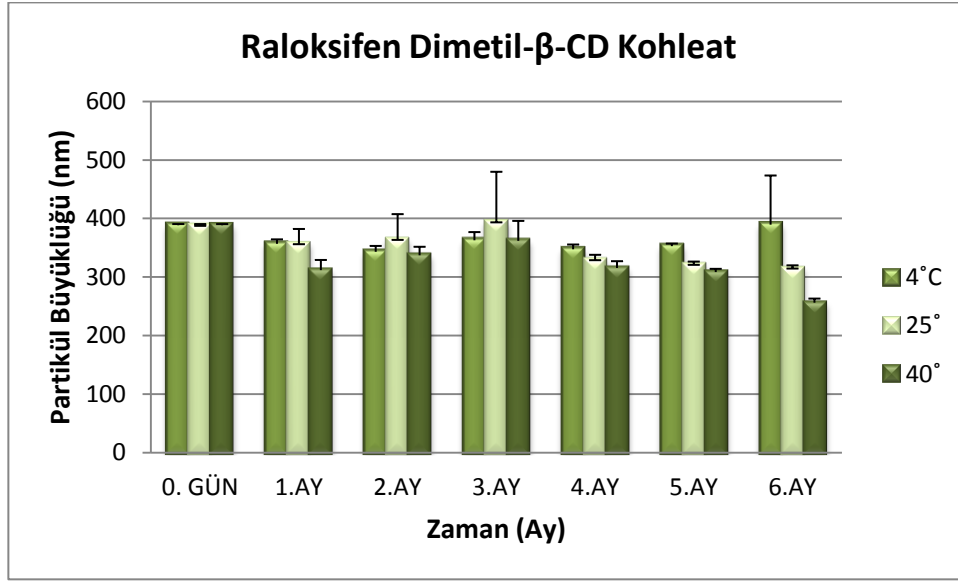
Şekil 130. Raloksifen Dimetil-β-CD lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçlarının 6 aylık süre içindeki değişimi

4.1.4.1.2. Raloksifen Dimetil-β-CD Kohleatlarının Partikül Büyüklüğü ve Dağılımlarına Ait Bulgular

Farklı saklama koşullarında (4°C, 25°C ± %60 bağıl nem, 40°C ± %75 bağıl nem) koşullarında saklanan kohleatların, 0., 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. aylarda ölçülen partikül büyüklüğü ve dağılımı sonuçları Tablo 41'de verilmiştir. Şekil 131'de partikül büyüklüğü ve dağılımındaki 6 aylık değişim grafikte gösterilmiştir.

Tablo 40. Raloksifen Dimetil-β-CD kohleatlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları (n=3)

Zaman (Ay)	Ortalama çap (nm) ± S.S (4°C)	Ortalama çap (nm) ± S.S (25°C)	Ortalama çap (nm) ± S.S (40°C)
0	388.7 ± 2.1	388.7 ± 2.1	388.7 ± 2.1
1	357.0 ± 7.6	357.3 ± 23.0	317.0 ± 7.3
2	343.1 ± 10.0	364.7 ± 4.3	337.3 ± 4.5
3	363.0 ± 14.0	394.7 ± 8.5	362.0 ± 4.1
4	347.7 ± 8.1	330.0 ± 8.2	315.7 ± 11.6
5	353.0 ± 4.4	322.0 ± 4.6	308.7 ± 5.5
6	389.7 ± 18.4	315.7 ± 4.5	256.3 ± 7.0



Şekil 131. Raloksifen Dimetil-β-CD kohleatlarına ait partikül büyüklüğü sonuçlarının 6 aylık süre içindeki değişimi

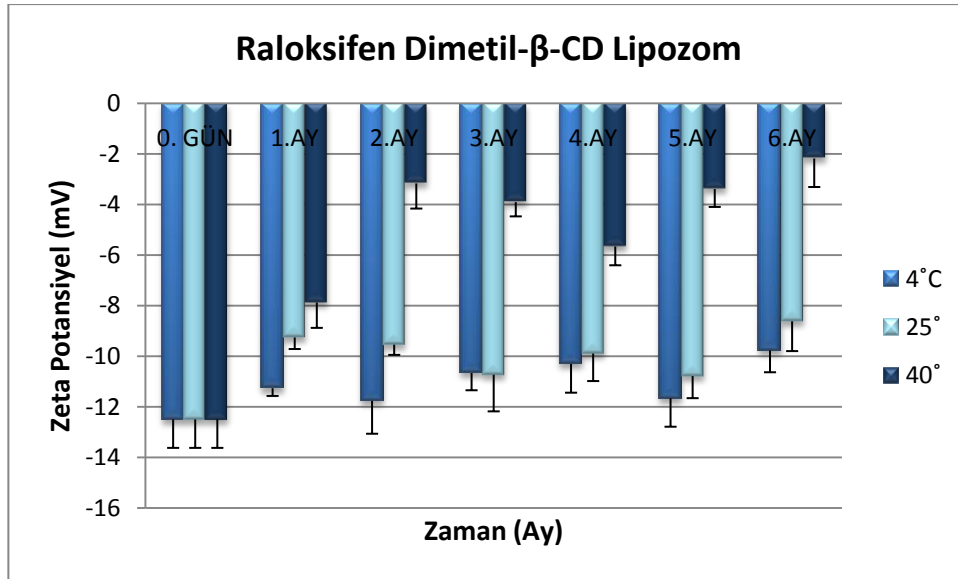
4.1.4.2. Formülasyonların Zeta Potansiyelleri Ait Bulgular

4.1.4.2.1. Raloksifen Dimetil-β-CD Lipozomlarının Zeta Potansiyel Ölçümlerine Ait Bulgular

Farklı saklama koşullarında (4°C, 25°C ± %60 bağıl nem, 40°C ± %75 bağıl nem)saklanan lipozomların, 0., 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. aylarda Malvern Zeta Sizer- Nano ZS ile ölçülen zeta potansiyel sonuçları Tablo 41'de verilmiştir. Şekil 132'de zeta potansiyelindeki 6 aylık değişim grafikte gösterilmiştir.

Tablo 41. Raloksifen Dimetil- β -CD lipozomlarına ait zeta potansiyel sonuçları (n=3)

Zaman (Ay)	Zeta Potansiyel (mV) $\pm$ S.S (4°C)	Zeta Potansiyel (mV) $\pm$ S.S (25°C)	Zeta Potansiyel (mV) $\pm$ S.S (40°C)
0	-12.5 $\pm$ -1.1	-12.5 $\pm$ -1.1	-12.5 $\pm$ -1.1
1	-11.3 $\pm$ -0.3	-9.26 $\pm$ -0.46	-7.88 $\pm$ -1.00
2	-11.8 $\pm$ -1.3	-9.54 $\pm$ -0.51	-3.17 $\pm$ 0.99
3	-10.7 $\pm$ -0.7	-10.7 $\pm$ -1.45	-3.91 $\pm$ -0.56
4	-10.3 $\pm$ -1.1	-9.90 $\pm$ -1.09	-5.66 $\pm$ -0.75
5	-11.7 $\pm$ 1.1	-10.8 $\pm$ -0.9	-3.39 $\pm$ -0.71
6	9.77 $\pm$ 0.86	-8.62 $\pm$ -1.62	-2.18 $\pm$ -1.23



Şekil 132. Raloksifen Dimetil- β -CD lipozomlarına ait zeta potansiyel sonuçlarının 6 aylık süre içindeki değişimi

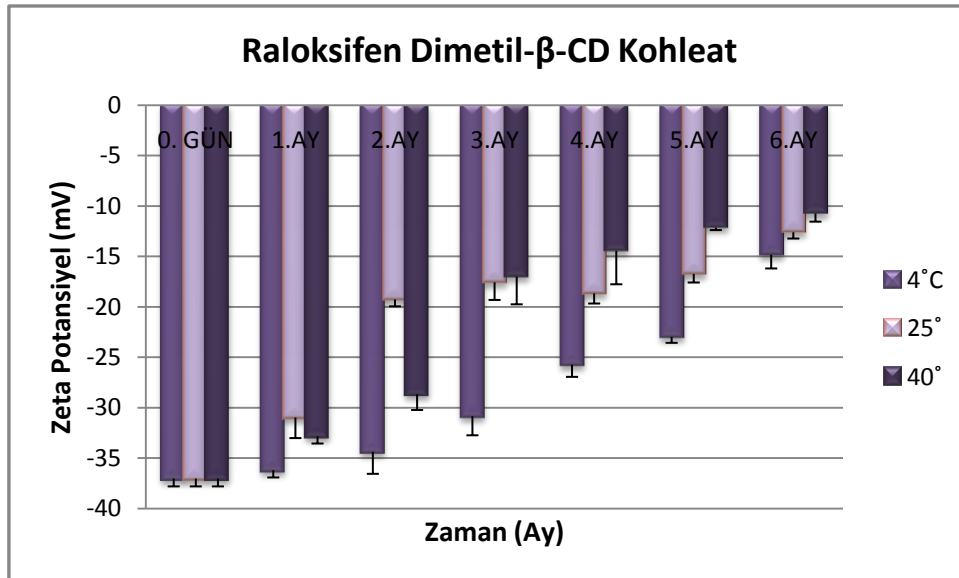
4.1.4.2.2. Raloksifen Dimetil- β -CD Kohleatlarının Zeta Potansiyel Ölçümlerine Ait Bulgular

Farklı saklama koşullarında (4°C, 25°C $\pm$ %60 bağıl nem, 40°C $\pm$ %75 bağıl nem) koşullarında saklanan lipozomların, 0., 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. aylarda Malvern Zeta Sizer-Nano ZS ile ölçülen zeta potansiyel

sonuçları Tablo 42’de verilmiştir. Şekil 133’de zeta potansiyelindeki 6 aylık değişim grafikte gösterilmiştir.

Tablo 42. Raloksifen Dimetil-β-CD kohleatlarına ait zeta potansiyel sonuçları (n=3)

Zaman (Ay)	Zeta Potansiyel (mV) ± S.S (4°C)	Zeta Potansiyel (mV) ± S.S (25°C)	Zeta Potansiyel (mV) ± S.S (40°C)
0	-37.0 ± -0.8	-37.0 ± -0.8	-37.0 ± -0.8
1	-36.2 ± -0.7	-31.0 ± -2.1	-32.8 ± -0.7
2	-34.4 ± -2.2	-19.3 ± -0.7	-28.7 ± -1.6
3	-30.8 ± -1.9	-17.6 ± -1.8	-17.0 ± -2.8
4	-25.7 ± -1.2	-18.7 ± -1.0	-14.4 ± -3.3
5	-23.0 ± -0.6	-16.7 ± -0.8	-12.1 ± -0.3
6	-14.8 ± -1.4	-12.6 ± 0.6	-10.7 ± 0.8



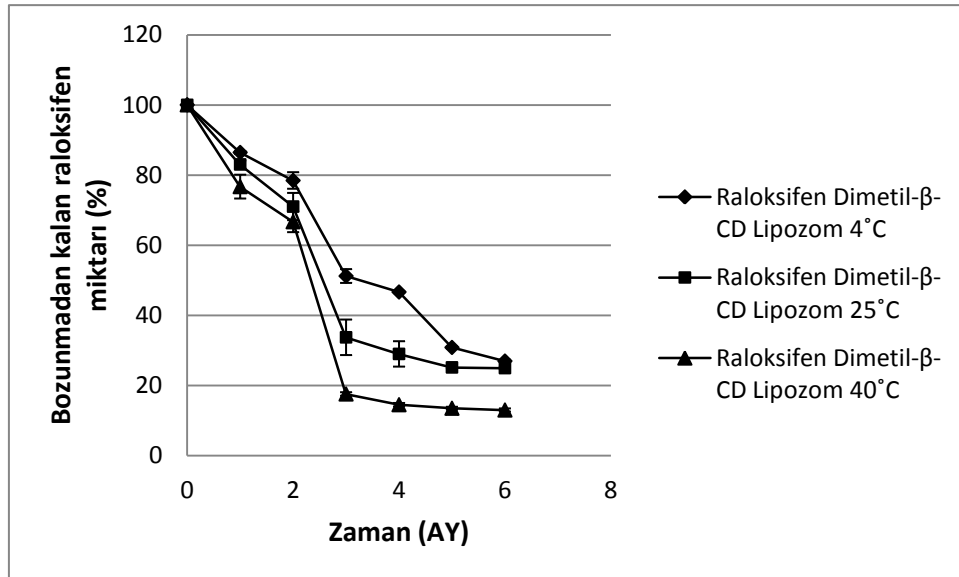
Şekil 133. Raloksifen Dimetil-β-CD kohleatlarına ait zeta potansiyel sonuçlarının 6 aylık süre içindeki değişimi

4.1.4.3. Raloksifenin Formülasyonlar İçindeki Stabilitesine Ait Bulgular

Farklı saklama koşullarında (4°C, 25°C ± %60 bağıl nem, 40°C ± %75 bağıl nem) saklanan formülasyonlardaki, raloksifen miktarının değişimi 6 ay süreyle incelenmiştir.

4.1.4.3.1. Raloksifenin, Raloksifen Dimetil-β-Siklodekstrin Lipozom Formülasyonu İçindeki Stabilitesine Ait Bulgular

Farklı saklama koşullarında (4°C, 25°C ± %60 bağıl nem, 40°C ± %75 bağıl nem) saklanan lipozomlardaki, raloksifen miktarının değişimi 6 ay süreyle incelenmiştir. Raloksifenin, dimetil-β-siklodekstrin içeren lipozom formülasyonu içindeki stabilitesine ait sonuçlar Şekil 134’de görülmektedir.



Şekil 134. Stabilité çalışmalarında raloksifen ve dimetil-β-siklodekstrin içeren lipozomların içindeki raloksifen miktarının zamana göre değişimi

Determinasyon katsayısı, sapma kareleri toplamı gibi uyum ölçütleri incelenerek elde edilen profiller kinetik açıdan incelenmiş, +4°C

'de saklanan dimetil- β -CD içeren lipozom formülasyonu içindeki raloksifenin sıfırınca derece kinetikle, +25°C ve +40°C de saklanan dimetil- β -CD içeren lipozom formülasyonu içindeki raloksifenin ise birinci derece kinetikle bozulduğu görülmüştür. Kinetik hesapları Tablo 43'de gösterilmiştir. 6 aylık stabilite çalışması süresince 4°C'de saklanan lipozomların raf ömrü 13.6 gün, 25°C'de saklanan çözeltilerin raf ömrü 11.8 gün, 40°C'de saklanan çözeltilerin raf ömrü ise 7.95 gün olarak hesaplanmıştır.

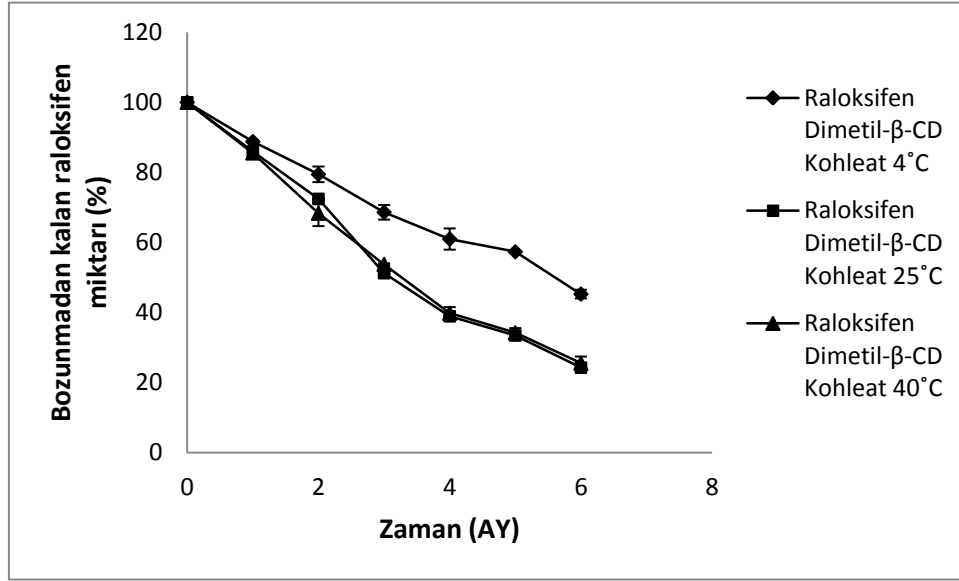
Tablo 43. Raloksifenin dimetil- β -CD içeren lipozom formülasyonu içindeki stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri

Reaksiyon Derecesi ve Denklemi	Sıcaklık (°C)	Eğim (k)	Kesişim (C_0)	Determinasyon Katsayısı (R^2)	Sapma Kareleri Toplamı (SKT)
Sıfır derece $C = C_0 - k.t$	4	12.9	98.9	0.971	153.3
	25	13.7	93.4	0.881	706.8
	40	15.7	90.2	0.844	1274.6
Birinci derece $C = C_0 \cdot e^{-kt}$	4	0.233	4.69	0.968	211.1
	25	0.266	4.60	0.908	379.4
	40	0.398	4.59	0.863	780.3
İkinci derece $C^{-1} = (C_0^{-1} + k.t)^{-1}$	4	4.71×10^{-3}	6.57×10^{-3}	0.962	3060.6
	25	5.94×10^{-3}	7.93×10^{-3}	0.962	1262.7
	40	1.35×10^{-2}	4.58×10^{-3}	0.886	15755.7

4.1.4.3.2. Raloksifenin, Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin Kohleat Formülasyonu İçindeki Stabilitesine Ait Bulgular

Farklı saklama koşullarında (4°C, 25°C $\pm$ %60 bağıl nem, 40°C $\pm$ %75 bağıl nem) saklanan kohleatlardaki, raloksifen miktarının değişimi 6 ay süreyle incelenmiştir. Raloksifenin, dimetil- β -siklodekstrin

içeren kohleat formülasyonu içindeki stabilitesine ait sonuçlar Şekil 135’de görülmektedir.



Şekil 135. Stabilite çalışmalarında raloksifen ve dimetil-β-siklodekstrin içeren kohleatların içindeki raloksifen miktarının zamana göre değişimi

Determinasyon katsayısı, sapma kareleri toplamı gibi uyum ölçütleri incelenerek elde edilen profiller kinetik açıdan incelenmiş, dimetil-β-CD içeren kohleat formülasyonu içindeki raloksifenin birinci derece kinetikle bozunduğu görülmüştür. Kinetik hesapları Tablo 44’de gösterilmiştir. 6 aylık stabilite çalışması süresince 4°C’de saklanan kohleatların raf ömrü 25.2 gün, 25°C’de saklanan kohleatların raf ömrü 13.8 gün, 40°C’de saklanan kohleatların raf ömrü ise 13.1 gün olarak hesaplanmıştır.

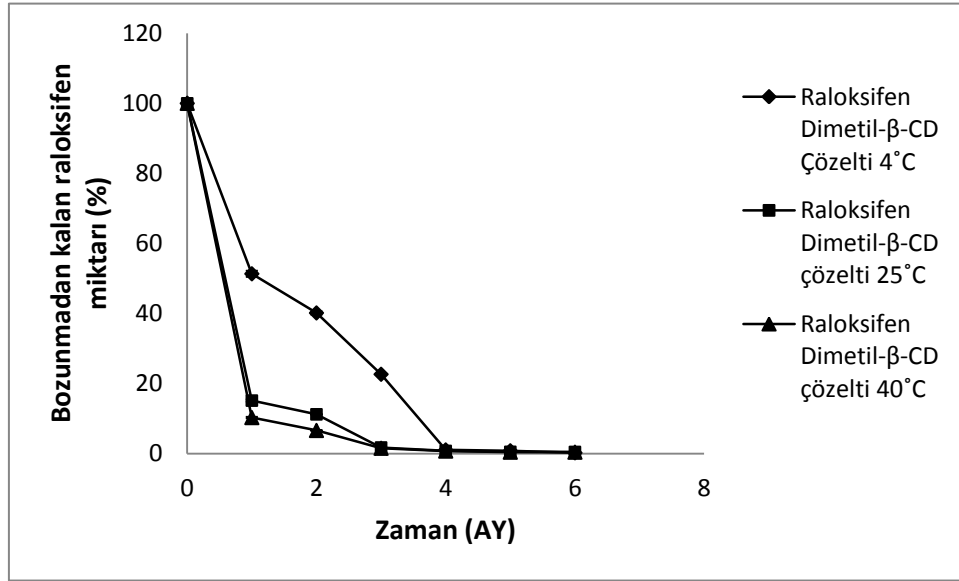
Tablo 44. Raloksifenin dimetil-β-CD içeren kohleat formülasyonu içindeki stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri

Reaksiyon Derecesi ve Denklemi	Sıcaklık (°C)	Eğim (k)	Kesişim (C ₀)	Determinasyon Katsayısı (R ²)	Sapma Kareleri Toplamı (SKT)
Sıfır derece C= C₀ - k.t	4 25 40	8.84 13.004 12.7	98.9 93.4 90.2	0.982 0.973 0.977	253.3 706.8 1274.6
Birinci derece C= C₀ . e^{-kt}	4 25 40	0.126 0.241 0.231	4.69 4.60 4.59	0.985 0.988 0.994	211.1 379.4 780.3
İkinci derece C⁻¹= (C₀⁻¹ + k.t)*	4 25 40	1.87x10 ³ 5.17x10 ⁻³ 4.75x10 ⁻²	9.29x10 ⁻³ 6.46x10 ⁻³ 6.94x10 ⁻³	0.976 0.937 0.946	197.3 3199.9 2053.1

4.1.4.3.3. Raloksifenin, Raloksifen Dimetil-β-Siklodekstrin Çözelti Formülasyonu İçindeki Stabilitesine Ait Bulgular

Farklı saklama koşullarında (4°C, 25°C ± %60 bağıl nem, 40°C ± %75 bağıl nem) saklanan çözeltilerdeki, raloksifen miktarının değişimi 6 ay süreyle incelenmiştir. Raloksifenin, dimetil-β-siklodekstrin içeren çözelti formülasyonu içindeki stabilitesine ait sonuçlar Şekil 136'da görülmektedir.

Determinasyon katsayısı, sapma kareleri toplamı gibi uyum ölçütleri incelenerek elde edilen profiller kinetik açıdan incelenmiş, dimetil-β-CD içeren çözelti formülasyonu içindeki raloksifenin birinci derece kinetikle bozunduğu görülmüştür. Kinetik hesapları Tablo 45'de gösterilmiştir. 6 aylık stabilite çalışması süresince 4°C'de saklanan çözeltilerin raf ömrü 3.69 gün, 25°C'de saklanan çözeltilerin raf ömrü 3.63 gün, 40°C'de saklanan çözeltilerin raf ömrü ise 3 gün olarak hesaplanmıştır.



Şekil 136. Stabilité çalışmalarında raloksifen ve dimetil-β-siklodekstrin içeren çözeltiler içindeki raloksifen miktarının zamana göre değişimi

Tablo 45. Raloksifenin dimetil-β-CD içeren çözelti formülasyonu içindeki stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri

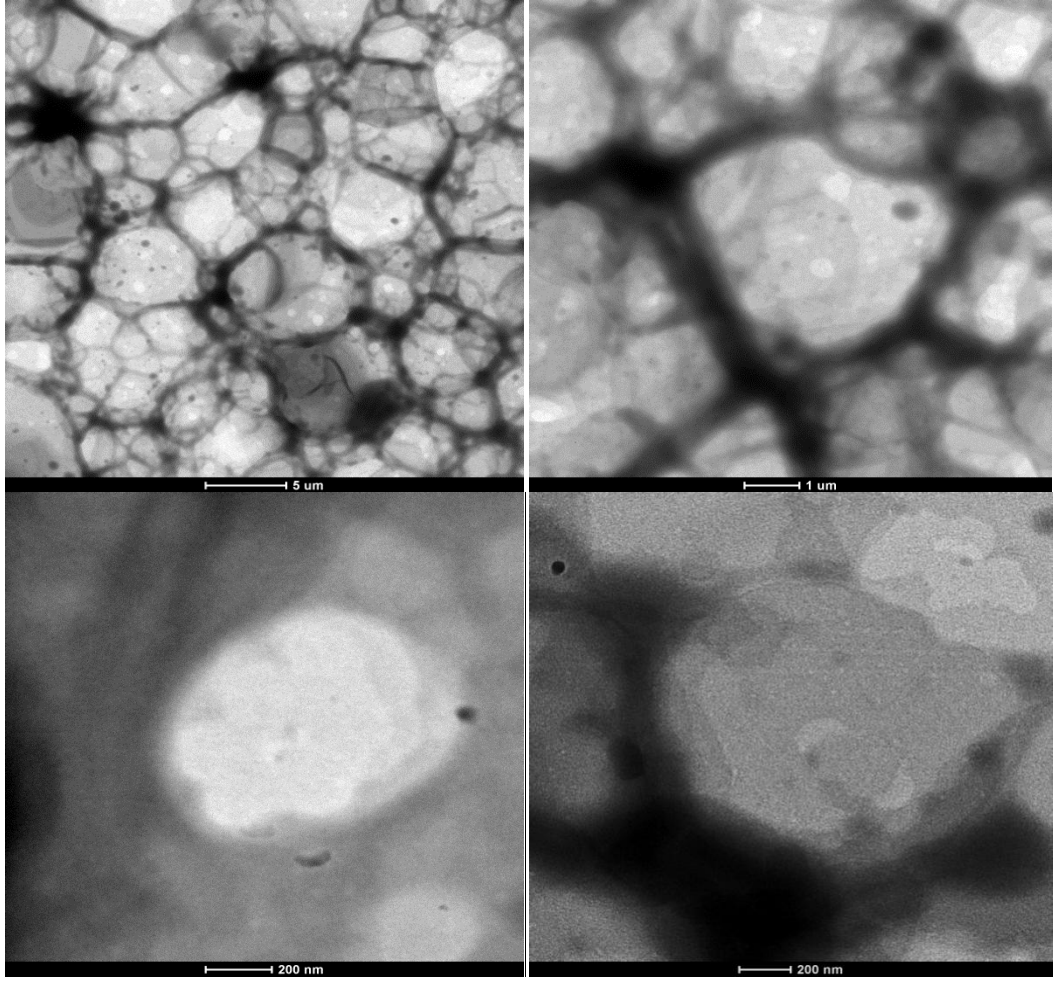
Reaksiyon Derecesi ve Denklemi	Sıcaklık (°C)	Eğim (k)	Kesişim (C ₀)	Determinasyon Katsayısı (R ²)	Sapma Kareleri Toplamı (SKT)
Sıfır derece $C = C_0 - k.t$	4	11.6	77.9	0.853	6515.2
	25	12.1	54.8	0.514	3861.5
	40	15.7	51.9	0.464	4334.9
Birinci derece $C = C_0 \cdot e^{-kt}$	4	1.061	5.17	0.918	6458.8
	25	0.902	3.96	0.919	2326.7
	40	0.885	3.71	0.908	3566.8
İkinci derece $C^{-1} = (C_0^{-1} + k.t)^{-1}$	4	0.527	-0.715	0.658	15341.1
	25	0.385	-0.315	0.913	10727.1
	40	0.442	-0.355	0.906	10595.5

4.1.4.4. Formülasyonların TEM Görüntülerine Ait Bulgular

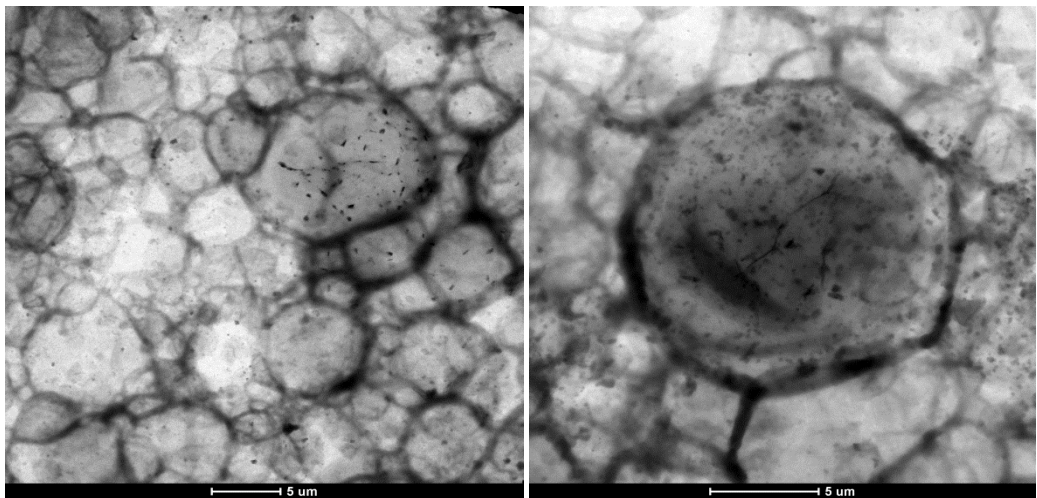
6 aylık stabilite çalışması süresinin başlangıcında ve sonunda dimetil- β -CD içeren lipozom ve kohleat formülasyonlarının TEM mikroskopu ile görüntülenmiştir. Lipozom ve kohleatlara ek olarak raloksifen dimetil- β -siklodekstrin nanopartikülleri de 6 ayın sonunda TEM mikroskopuyla görüntülenmiştir.

4.1.4.4.1. Stabilite Süresi Başlangıcında ve Sonunda Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin Lipozomlarının TEM Mikroskopu Görüntüleri

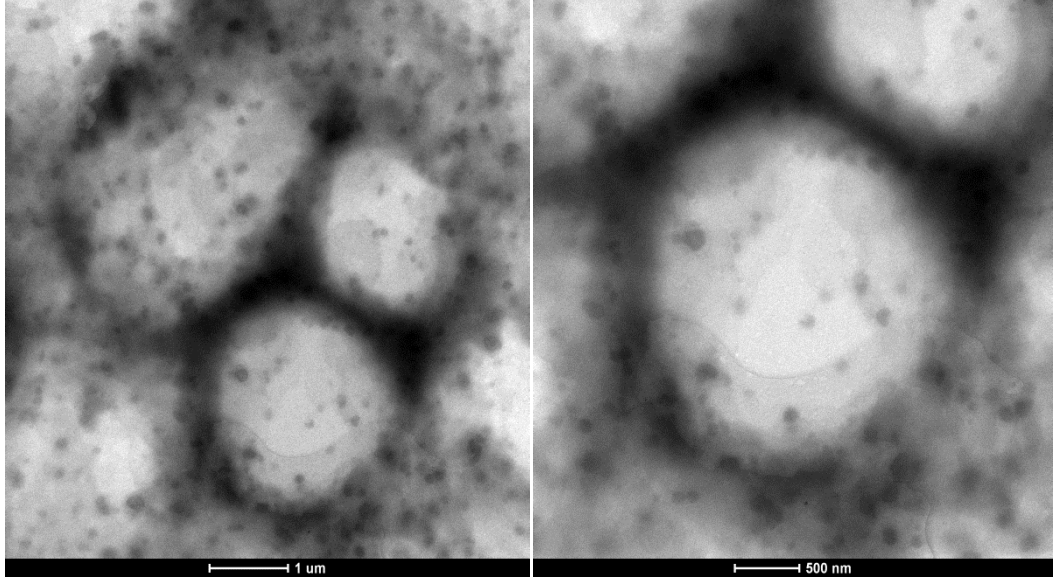
6 aylık stabilite çalışması süresinin başlangıcında ve sonunda, raloksifen dimetil- β -siklodekstrin lipozom formülasyonlarının TEM mikroskopu ile görüntüleri alınmıştır. Resim 31'de stabilite çalışmasının başlangıcında, Resim 32'da 6 aylık süresi boyunca +4°C'de saklanan lipozomların fotoğrafları görülmektedir. Resim 33'de 6 aylık süresi boyunca +25°C'de saklanan lipozomların fotoğrafları görülmektedir.



Resim 31. 6 aylık stabilite çalışması süresinin başlangıcında, raloksifen dimetil-β-siklodekstrin lipozom formülasyonlarının TEM görüntüleri



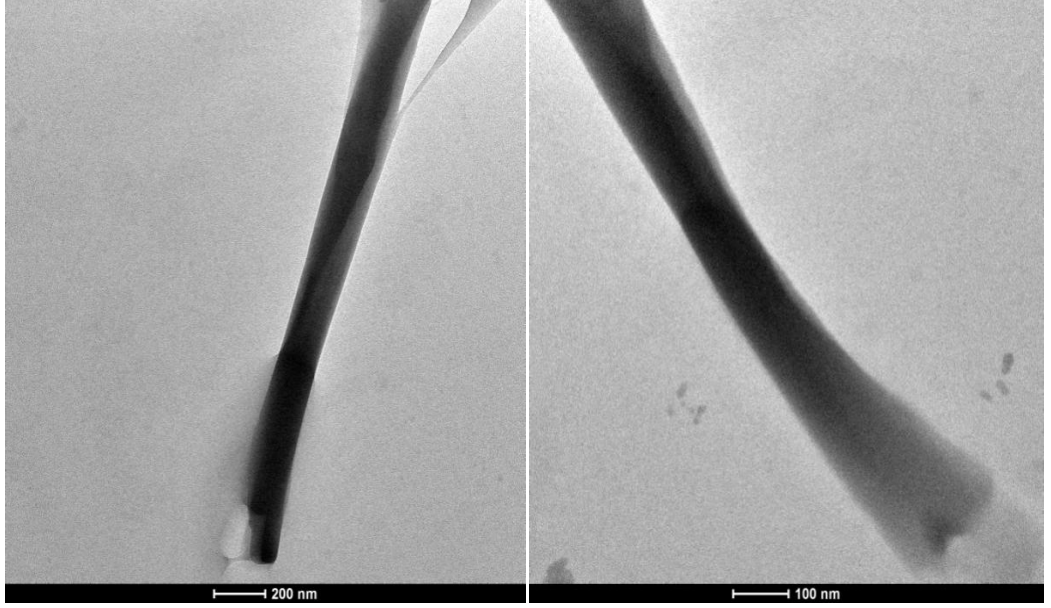
Resim 32. 6 aylık stabilite çalışması süresinin sonunda, +4°C'de saklanan raloksifen dimetil-β-siklodekstrin lipozom formülasyonlarının TEM görüntüleri



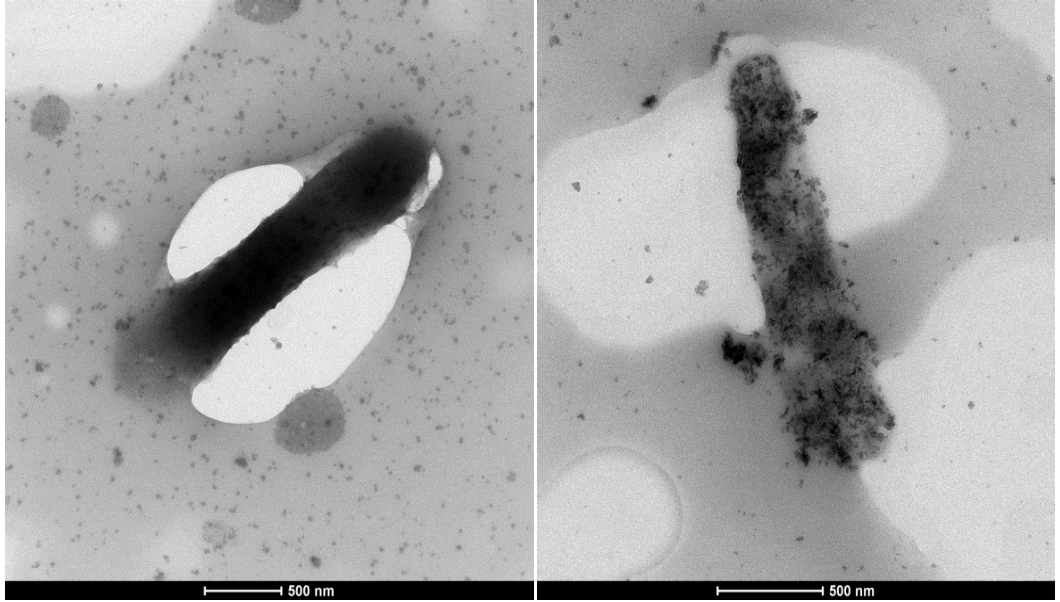
Resim 33. 6 aylık stabilite çalışması süresinin sonunda, +25°C'de saklanan raloksifen dimetil-β-siklodekstrin lipozom formülasyonlarının TEM görüntüleri

4.1.4.4.2. Stabilite Süresi Başlangıcında ve Sonunda Raloksifen Dimetil-β-Siklodekstrin Kohleatlarının TEM Mikroskobu Görüntüleri

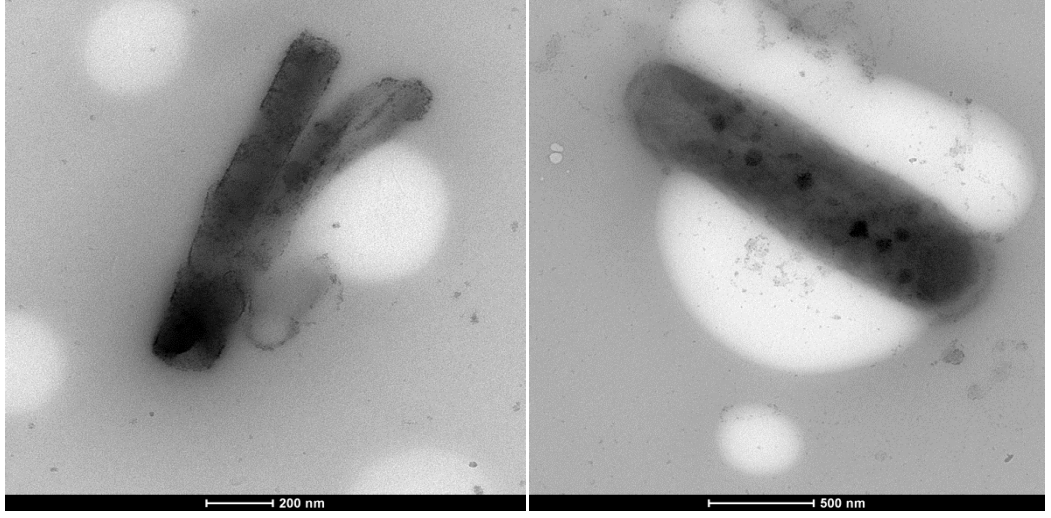
6 aylık stabilite çalışması süresinin başlangıcında ve sonunda, raloksifen dimetil-β-siklodekstrin kohleat formülasyonlarının TEM mikroskobu ile görüntüleri alınmıştır. Resim 34'de stabilite çalışmasının başlangıcında, Resim 35'de 6 aylık süresi boyunca +4°C'de saklanan kohleatların fotoğrafları görülmektedir. Resim 36'da 6 aylık süresi boyunca +25°C'de saklanan kohleatların fotoğrafları görülmektedir.



Resim 34. 6 aylık stabilite çalışması süresinin başlangıcında, raloksifen dimetil- β -siklodekstrin kohleat formülasyonlarının TEM görüntüleri



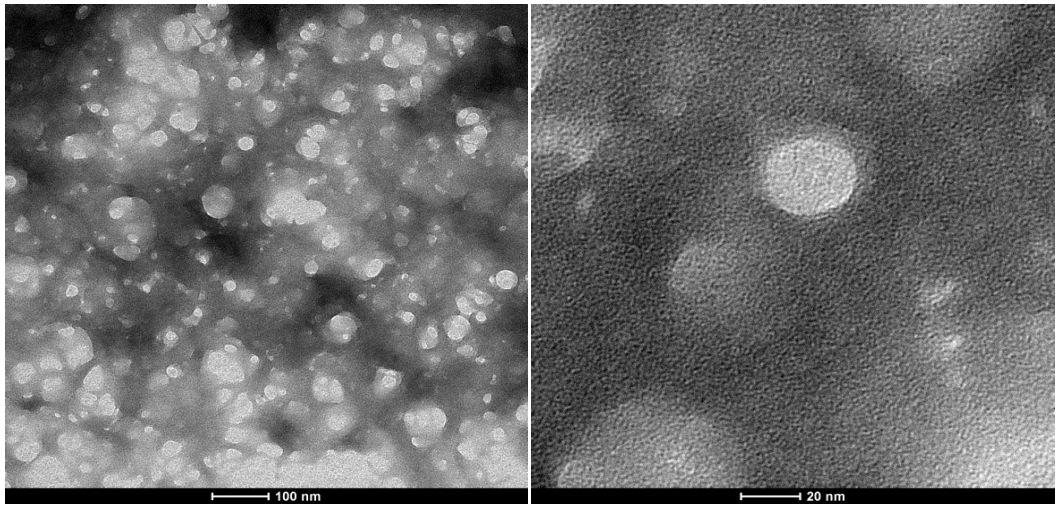
Resim 35. 6 aylık stabilite çalışması süresinin sonunda, +4°C'de saklanan raloksifen dimetil- β -siklodekstrin kohleat formülasyonlarının TEM görüntüleri



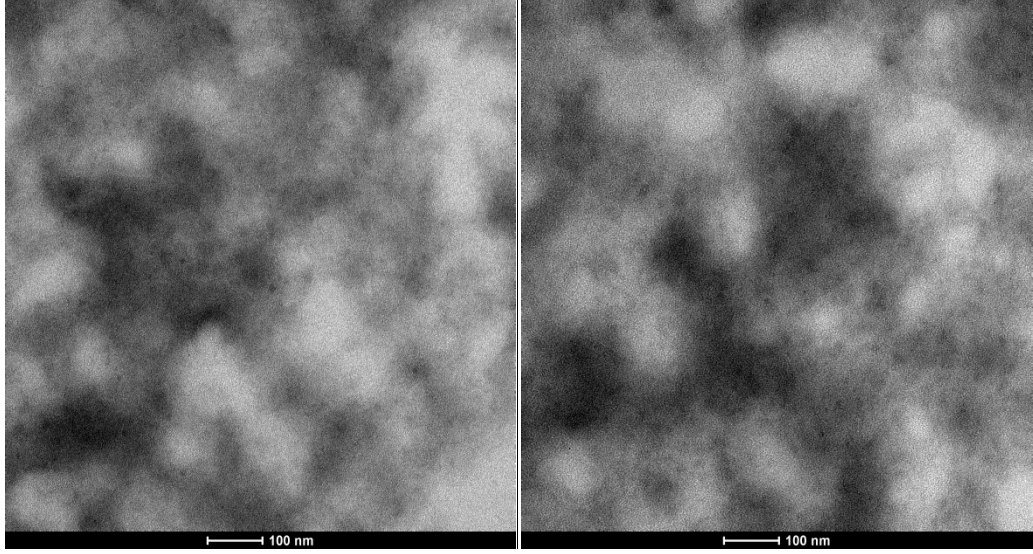
Resim 36. 6 aylık stabilite çalışması süresinin sonunda, +25°C’de saklanan raloksifen dimetil-β-siklodekstrin kohleat formülasyonlarının TEM görüntüleri

4.1.4.4.3. Stabilite Süresi Başlangıcında ve Sonunda Etkin Madde İçermeyen Nanopartiküllerinin TEM Mikroskobu Görüntüleri

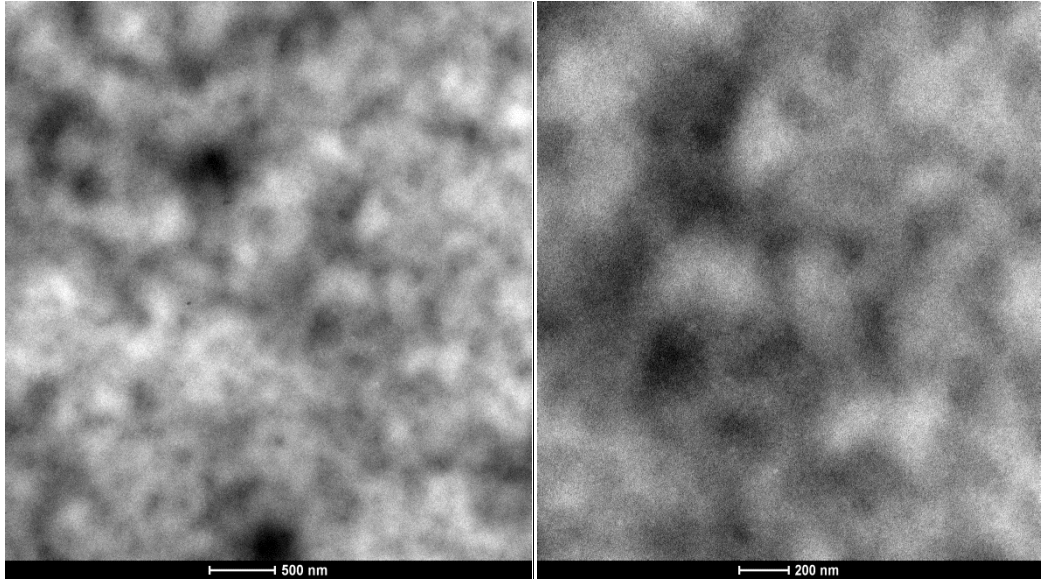
Resim 37’de stabilite çalışmasının başlangıcında, Resim 38’de 6 aylık süresi boyunca +4°C’de saklanan nanopartiküllerin fotoğrafları görülmektedir. Resim 39’da 6 aylık süresi boyunca +25°C’de saklanan nanopartiküllerin fotoğrafları görülmektedir.



Resim 37. 6 aylık stabilite çalışması süresinin başlangıcında, etkin madde içermeyen nanopartikül formülasyonlarının TEM görüntüleri



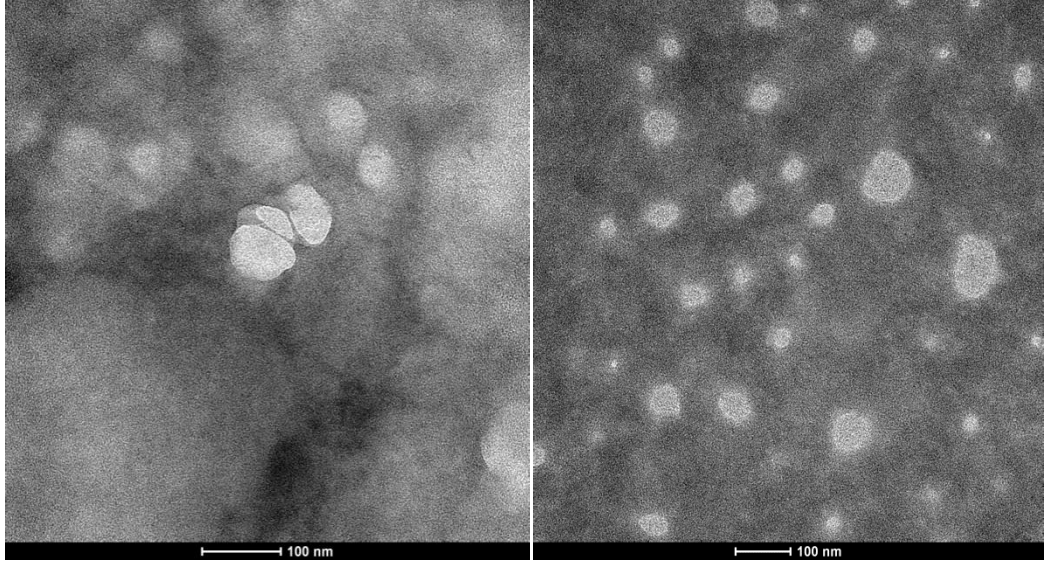
Resim 38. 6 aylık stabilite çalışması süresinin sonunda, +4°C'de saklanan etkin madde içermeyen nanopartikül formülasyonlarının TEM görüntüleri



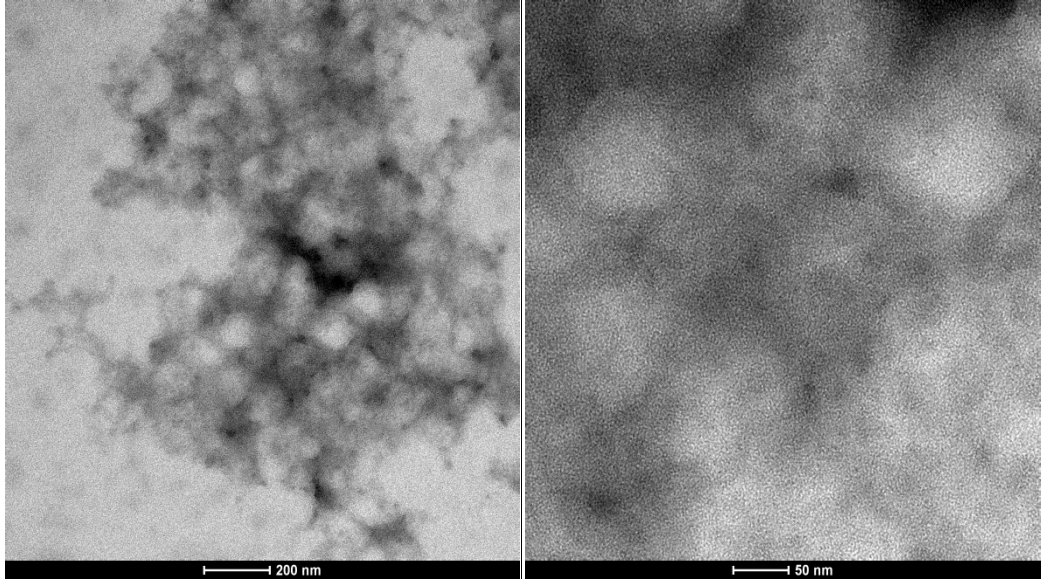
Şekil 39. 6 aylık stabilite çalışması süresinin sonunda, +25°C'de saklanan etkin madde içermeyen nanopartikül formülasyonlarının TEM görüntüleri

4.1.4.4.4. Stabilite Süresi Başlangıcında ve Sonunda Raloksifen Dimetil- β -Siklodekstrin Nanopartiküllerinin TEM Mikroskobu Görüntüleri

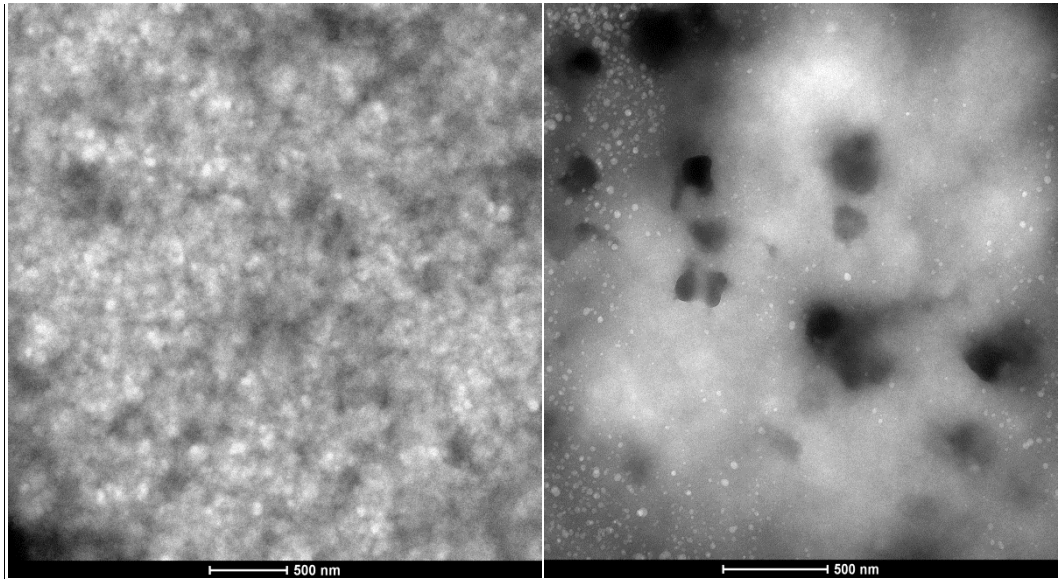
Resim 40'da stabilite çalışmasının başlangıcında, Resim 41'de 6 aylık süresi boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan raloksifen dimetil- β -siklodekstrin nanopartiküllerinin görülmektedir. Resim 42'de 6 aylık süresi boyunca $+25^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan raloksifen dimetil- β -siklodekstrin nanopartiküllerinin fotoğrafları görülmektedir.



Resim 40. 6 aylık stabilite çalışması süresinin başlangıcında, raloksifen dimetil- β -siklodekstrin nanopartikül formülasyonlarının TEM görüntüleri



Resim 41. 6 aylık süre sonunda, +4°C'de saklanan raloksifen dimetil-β-siklodekstrin nanopartikül formülasyonlarının TEM görüntüleri



Resim 42. 6 aylık süre sonunda, +25°C'de raloksifen dimetil-β-siklodekstrin nanopartikül formülasyonlarının TEM görüntüleri

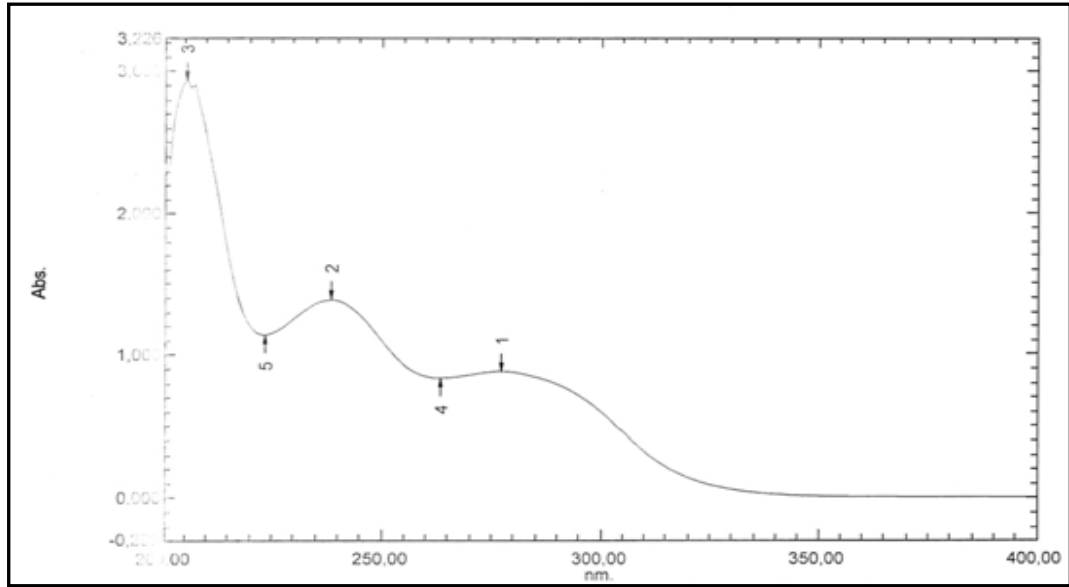
4.2. Tamoksifen Sitrata Ait Çalışmalarla İlgili Bulgular

4.2.1. Tamoksifen Sitrata Etkin Maddesi ile Yapılan İn Vitro Çalışmalar

4.2.1.1. Tamoksifen Sitrata Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesine Ait Bulgular

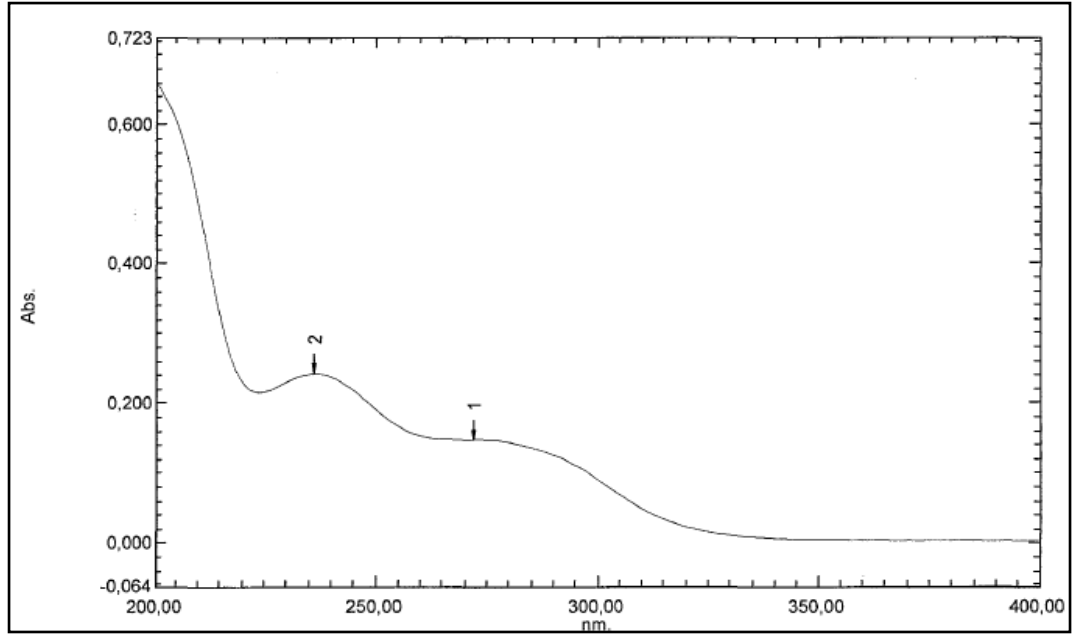
4.2.1.1.1. UV Spektrumuna Ait Bulgular

Tamoksifen sitratin PG/DMEM (%60/%40) içindeki spektrumu Şekil 137’de gösterilmiştir. Dalga boyu taraması sonucunda tamoksifen sitratin maksimum dalga boyu verdiği absorbansın (λ_{max}) 238 nm olduğu görüldü.



Şekil 137. Tamoksifen sitrata ait PG/DMEM (%60/%40) içindeki 200-400 nm arası dalga boyu taraması

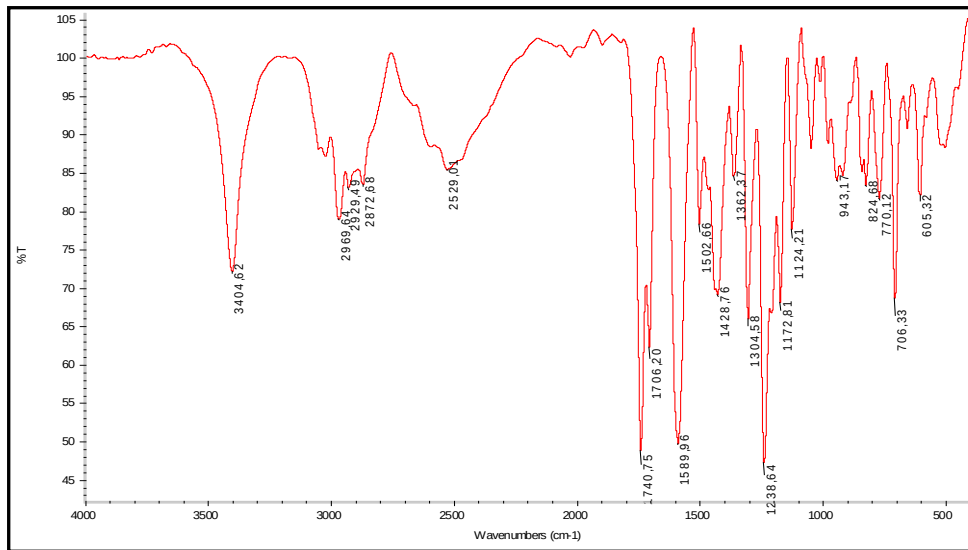
Tamoksifen sitratin pH 7.4 fosfat tamponu içindeki spektrumu Şekil 138’de gösterilmiştir. Dalga boyu taraması sonucunda raloksifen hidroklorürün maksimum dalga boyu verdiği absorbansın (λ_{max}) 238 nm olduğu görüldü.



Şekil 138. Tamoksifen sitrata ait pH 7.4 fosfat tamponu içindeki içindeki 200-400 nm arası dalga boyu taraması

4.2.1.1.2. FT-IR Spektrumuna Ait Bulgular

Toz tamoksifen sitrat kullanılarak FT-IR ile Şekil 139'da görülen spektrum elde edilmiştir.

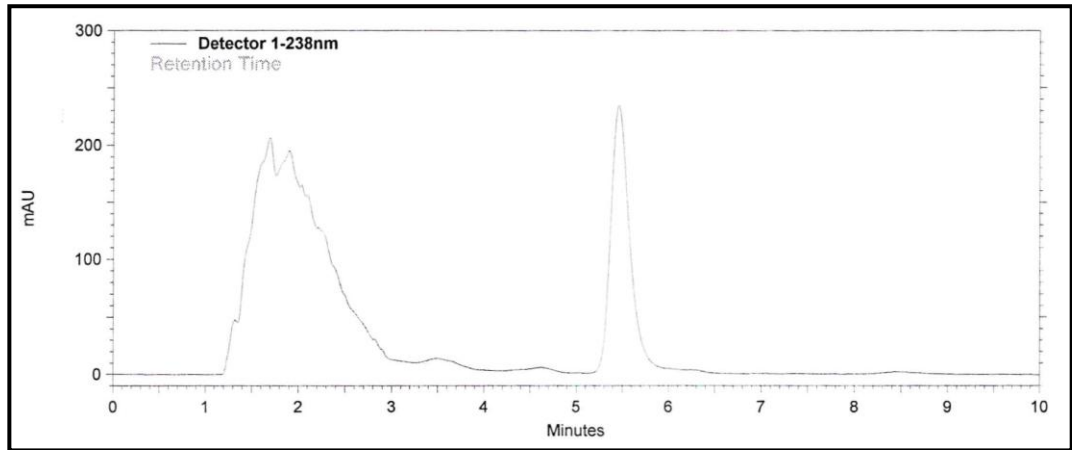


Şekil 139. Tamoksifen sitrata ait FT-IR spektrumu

4.2.1.1.3. Tamoksifen Sitratin HPLC ile Miktar Tayini Yönteminin Validasyonuna Ait Bulgular

4.2.1.1.3.1. Tamoksifen Sitratin PG/DMEM (%60/%40) İçinde Validasyonuna Ait Bulgular

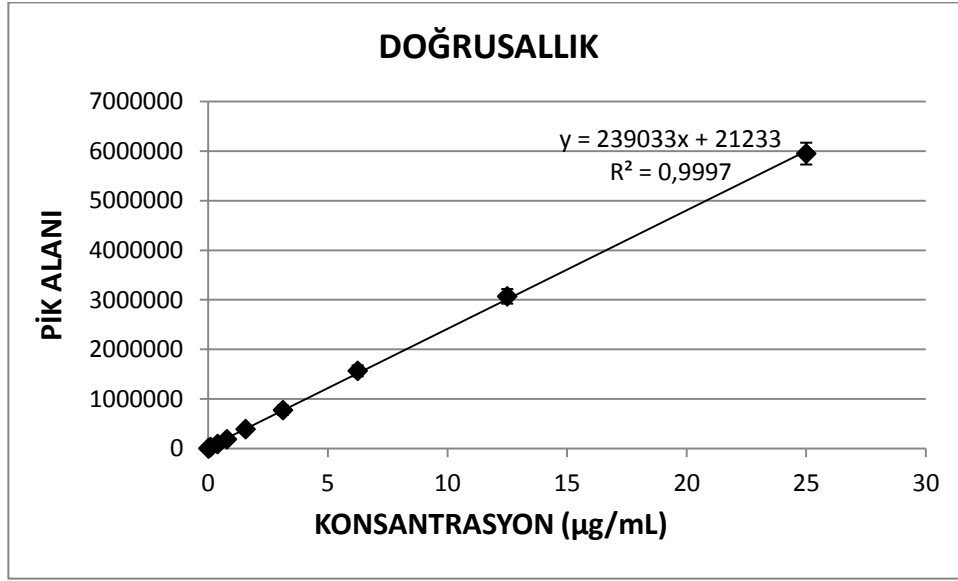
Tamoksifenin PG/DMEM' de hazırlanan çözeltilerinin HPLC'ye enjekte edilmesiyle elde edilen pik örneği Şekil 140'da görülmektedir.



Şekil 140. PG/DMEM içerisinde 6.25 µg/mL'nin tamoksifen piki

4.2.1.1.3.1.1. Doğrusallık

Çalışmalar, Bölüm 3.2.2.1.1.1'de anlatıldığı gibi yapıldı. Hesaplanan pik alanlarına karşılık konsantrasyonlar grafiğe geçirildi. En küçük kareler yöntemine göre değerlendirilip, standart doğru denklemi bulundu ve doğrusallığı kanıtlandı. Elde edilen konsantrasyon pik alanı grafiği Şekil 141'de verilmiştir.



Şekil 141. Tamoksifenin PG/DMEM (%60/%40) içinde HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği (n=6)

4.2.1.1.3.1.2. Doğruluk ve Geri Elde

Çalışmalar Bölüm 3.2.2.1.1.1.2'de anlatıldığı gibi yapıldı. Sonuçlar Tablo 46'da verilmiştir.

Tablo 46. Tamoksifenin PG/DMEM (%60/%40) içindeki çözeltisinden geri elde ile hesaplanan miktarları (n=3)

Çözeltideki Tamoksifen Yüzdesi	Çözeltideki Tamoksifen Miktarı (µg/mL)	Hesapla Bulunan Tamoksifen Miktarı ± G.S	Bağıl Sapma Ortalama
%80	0.8	0.811 ± 0.015	1.63
%100	1.0	0.994± 0.006	0.644
%120	1.2	1.19 ± 0.03	0.249

4.2.1.1.3.1.3. Kesinlik

a. Deney İçi Kesinlik

Çalışmalar Bölüm 3.2.1.2.3'de anlatıldığı gibi yapıldı. Tamoksifenin pH 7.4 fosfat tamponu içindeki deney içi kesinlik sonuçları Tablo 47'de verilmiştir.

Tablo 47. Tamoksifenin PG/DMEM içindeki deney içi kesinlik sonuçları

Örnek No	Tamoksifen Çözeltilisinin Derişimi (µg/mL)	Hesapla Bulunan Tamoksifen Çözeltilisi Derişimi (µg/mL)
1	1	0.937
2	1	1.027
3	1	1.014
4	1	1.031
5	1	1.022
6	1	1.097
7	1	0.982
8	1	0.974
9	1	1.011
10	1	0.989
Ortalama	1	1.084
Standart Sapma		0.041
Bağıl Sapma		4.11

b. Deneyler Arası Kesinlik

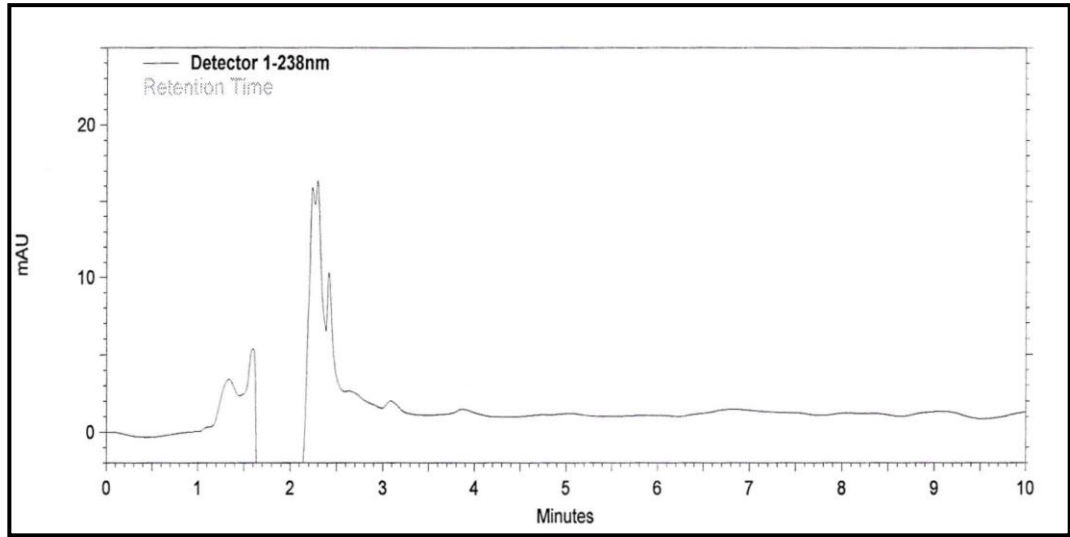
Tamoksifenin PG/DMEM (%60/%40) içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları Tablo 48'de verilmiştir.

Tablo 48. Tamoksifenin PG/DMEM (%60/%40) içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları

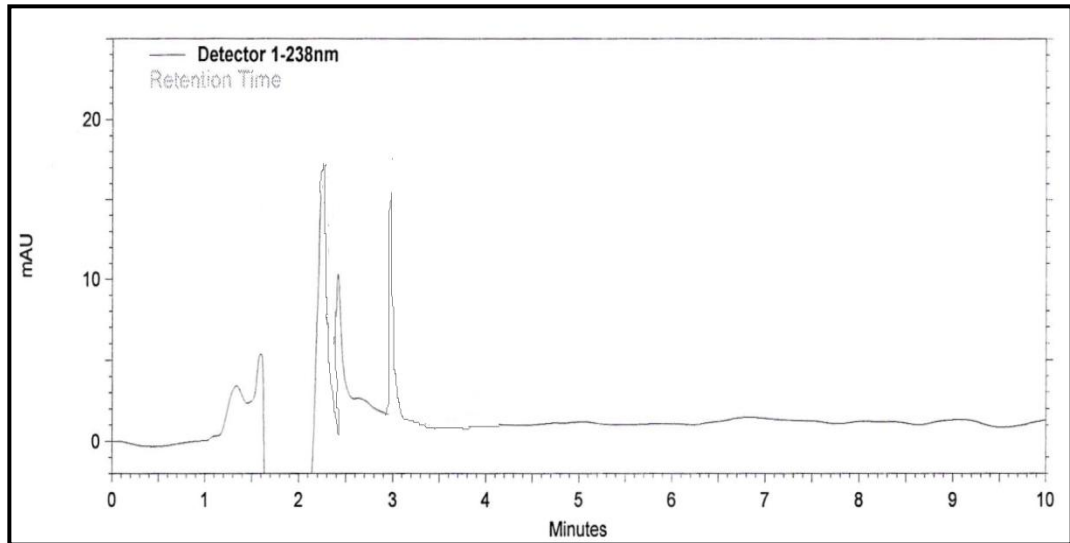
Derişim(µg/mL)	1.gün	2.gün	3.gün	ORT	S.S	B.S
25	24.0	24.1	26.6	24.9	1.2	4.77
6.25	6.58	6.62	6.17	6.46	0.21	3.19
1.56	1.83	1.77	1.86	1.82	0.04	2.12
0.39	0.411	0.379	0.407	0.399	0.015	3.75

4.2.1.1.3.1.4. Özgünlük ve Seçicilik

Çalışmalar bölüm 3.2.2.1.1.4'de anlatıldığı gibi yapıldı. Tamoksifenin pik verdiği dalga boyunda sodyum taurokolat'ın ve dimetil- β -CD'nin pik vermediği gösterildi. Yöntemin tamoksifen tayinine uygun oluşuna karar verildi. Şekil 142'de sodyum taurokolat ve şekil 143'de dimetil- β -CD'ye ait pikler görülmektedir.



Şekil 142. Sodyum taurokolat enjeksiyonu ile elde edilen pik



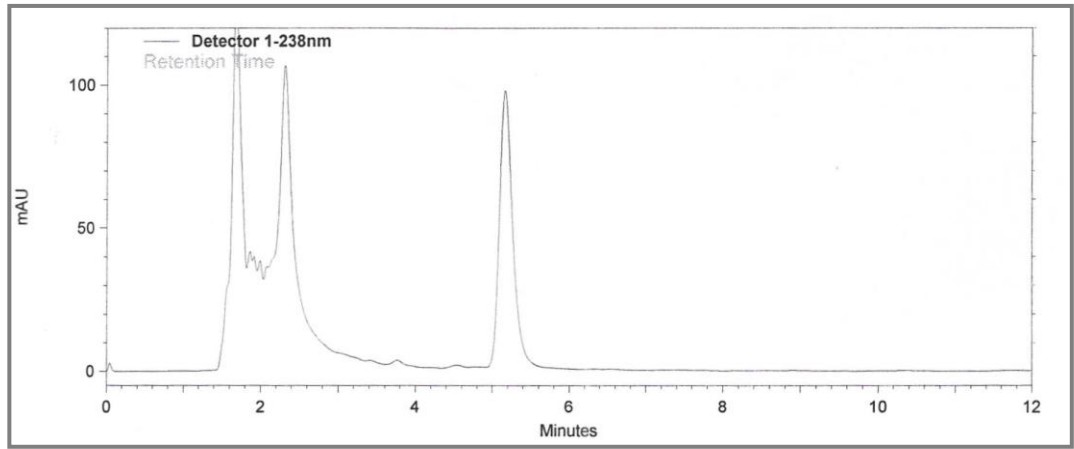
Şekil 143. Dimetil- β -CD enjeksiyonu ile elde edilen pik

4.2.1.1.3.1.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı

Hesaplar Bölüm 3.2.1.2.4'te verilen formüllere göre yapıldı. Analitik yöntemin duyarlılığı 0.0196 µg/mL, saptama sınırı 0.0595 µg/mL olarak bulundu.

4.2.1.1.3.2. Tamoksifen Sitratin pH 7.4 Fosfat Tamponu İçinde Validasyonuna Ait Bulgular

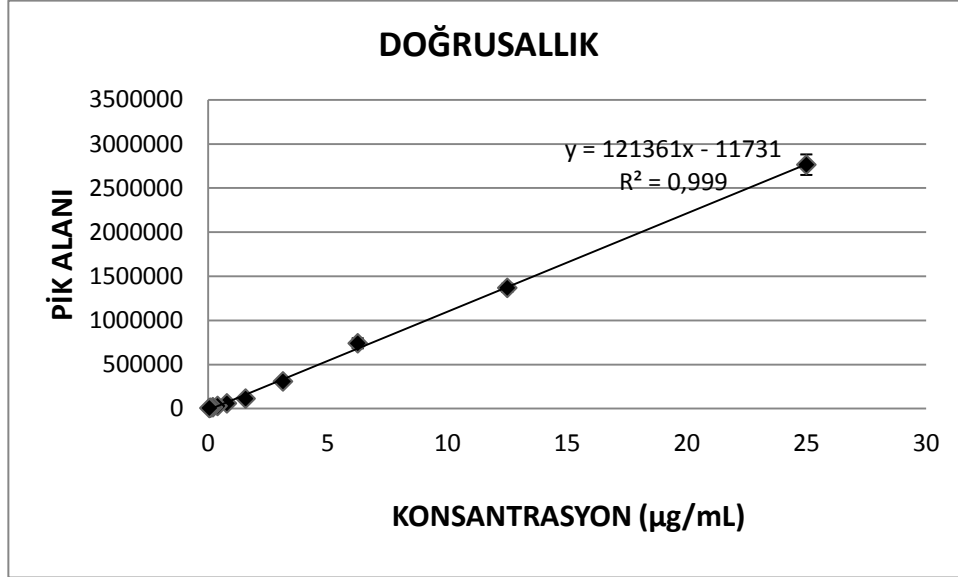
Tamoksifenin pH 7.4 fosfat tamponu içinde hazırlanan çözeltilerinin HPLC'ye enjekte edilmesiyle elde edilen pik örneği Şekil 144'de görülmektedir.



Şekil 144. pH 7.4 fosfat tamponu içerisinde 6.25 µg/mL'nin tamoksifen piki

4.2.1.1.3.2.1. Doğrusallık

Çalışmalar, Bölüm 3.2.2.1.1.1.1'de anlatıldığı gibi yapıldı. Hesaplanan pik alanlarına karşılık konsantrasyonlar grafiğe geçirildi. En küçük kareler yöntemine göre değerlendirilip, standart doğru denklemi bulundu ve doğrusallığı kanıtlandı. Elde edilen konsantrasyon pik alanı grafiği Şekil 145'de verilmiştir.



Şekil 145. Tamoksifenin pH 7.4 fosfat tamponunda HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği (n=6)

4.2.1.1.3.2.2. Doğruluk ve Geri Elde

Çalışmalar Bölüm 3.2.2.1.1.1.2'de anlatıldığı gibi yapıldı. Sonuçlar Tablo 49'da verilmiştir.

Tablo 49. Tamoksifenin pH 7.4 fosfat tamponu içindeki çözeltisinden geri elde ile hesaplanan miktarları (n=3)

Çözeltideki Tamoksifen Yüzdesi	Çözeltideki Tamoksifen Miktarı (µg/mL)	Hesapla Bulunan Tamoksifen Miktarı ± G.S	Bağıl Sapma Ortalama
%80	0.8	0.803 ± 0.007	0.598
%100	1.0	0.981± 0.037	3.76
%120	1.2	1.24 ± 0.04	4.71

4.2.1.1.3.2.3. Kesinlik

a. Deney İçi Kesinlik

Çalışmalar Bölüm 3.2.2.1.1.1.3' 'de anlatıldığı gibi yapıldı. Tamoksifenin pH 7.4 fosfat tamponu içindeki deney içi kesinlik sonuçları Tablo 50'de verilmiştir.

Tablo 50. Tamoksifenin pH 7.4 fosfat tamponu içindeki deney içi kesinlik sonuçları

Örnek No	Tamoksifen Çözeltilisinin Derişimi (µg/mL)	Hesapla Bulunan Tamoksifen Çözeltilisi Derişimi (µg/mL)
1	1	0.925
2	1	1.019
3	1	1.036
4	1	1.076
5	1	1.048
6	1	1.019
7	1	0.969
8	1	0.990
9	1	1.045
10	1	0.981
Ortalama	1	1.021
Standart Sapma		0.042
Bağıl Sapma		4.15

b. Deneyler Arası Kesinlik

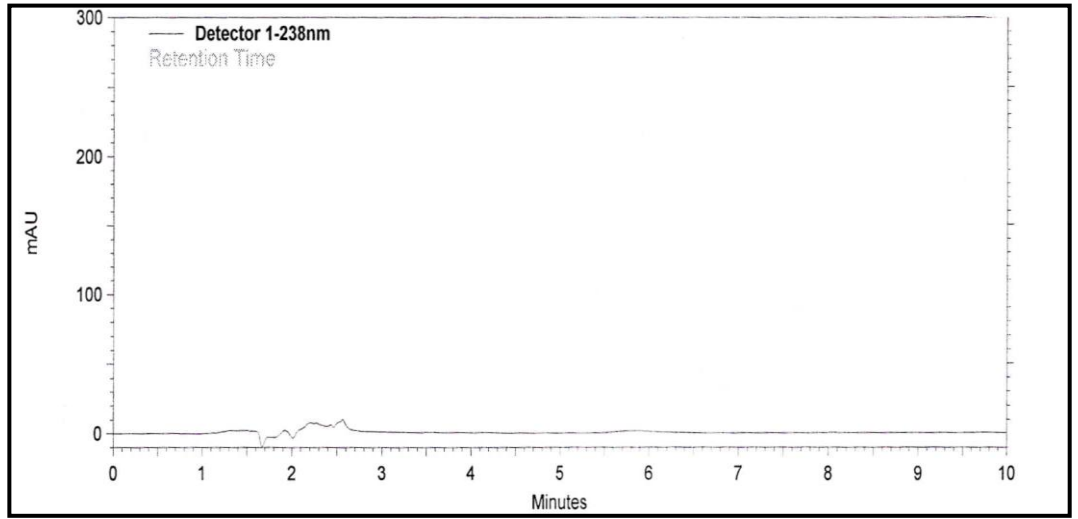
Tamoksifenin pH 7.4 fosfat tamponu içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları Tablo 51'de verilmiştir.

Tablo 51. Tamoksifenin pH 7.4 fosfat tamponu içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları

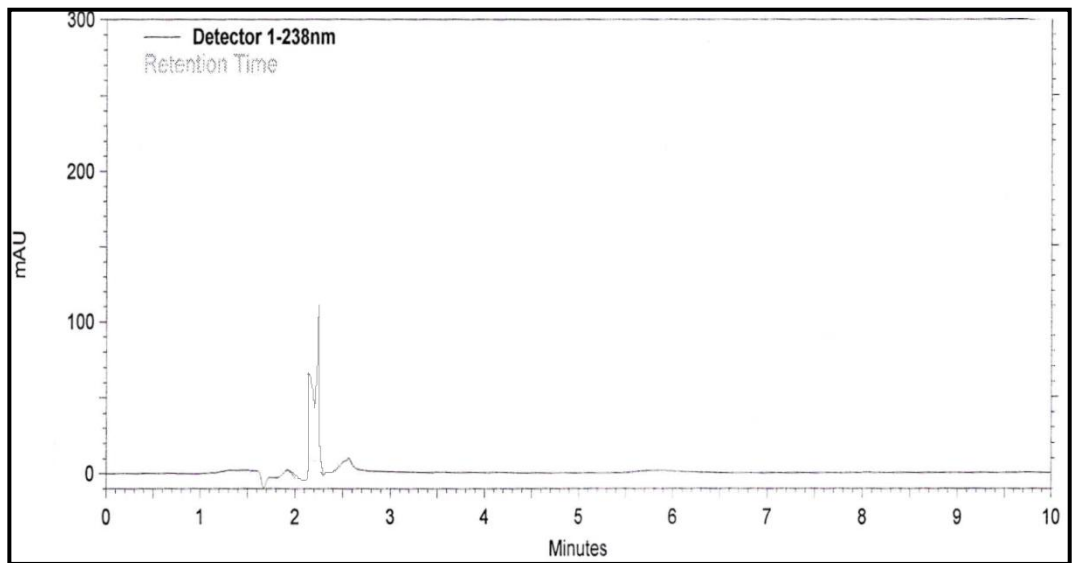
Derişim(µg/mL)	1.gün	2.gün	3.gün	ORT	S.S	B.S
25	26.04	24.30	24.05	24.80	1.08	4.35
6.25	6.34	6.21	6.32	6.29	0.07	1.14
1.56	1.62	1.54	1.51	1.56	0.05	3.56
0.39	0.393	0.391	0.376	0.387	0.009	2.45

4.2.1.1.3.2.4. Özgünlük ve Seçicilik

Çalışmalar bölüm 3.2.2.1.1.1.4'de anlatıldığı gibi yapıldı. Tamoksifenin pik verdiği dalga boyunda sodyum taurokolat'ın ve dimetil- β -CD'nin pik vermediği gösterildi. Yöntemin tamoksifen tayinine uygun oluşuna karar verildi. Şekil 146'da sodyum taurokolat ve Şekil 147'de dimetil- β -CD'ye ait pikler görülmektedir.



Şekil 146. Sodyum taurokolat enjeksiyonu ile elde edilen pik



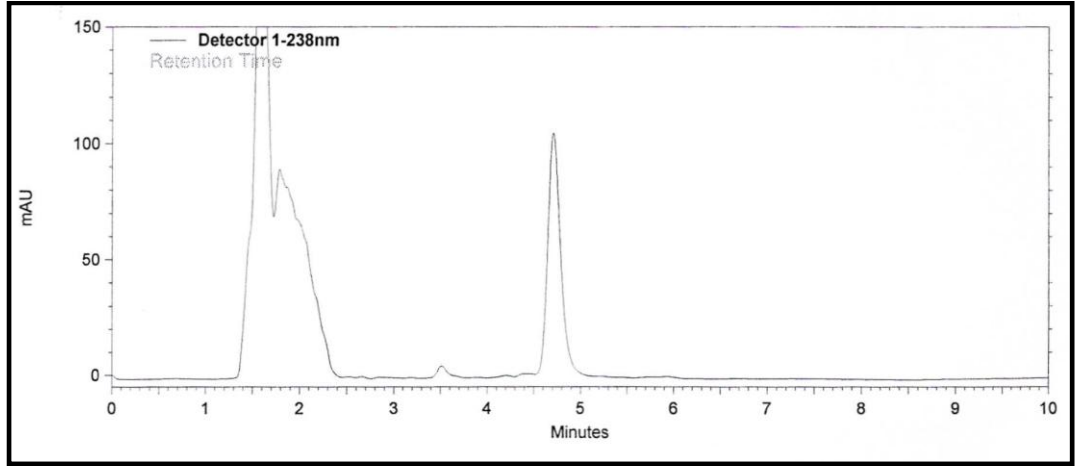
Şekil 147. Dimetil- β -CD enjeksiyonu ile elde edilen pik

4.2.1.1.3.2.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı

Hesaplar Bölüm 3.2.1.1.1.1.5'de verilen formüllere göre yapıldı. Analitik yöntemin duyarlılığı 0.0257 µg/mL, saptama sınırı 0.0779 µg/mL olarak bulundu.

4.2.1.1.3.3. Tamoksifen Sitratın Fare Plazması İçinde Validasyonuna Ait Bulgular

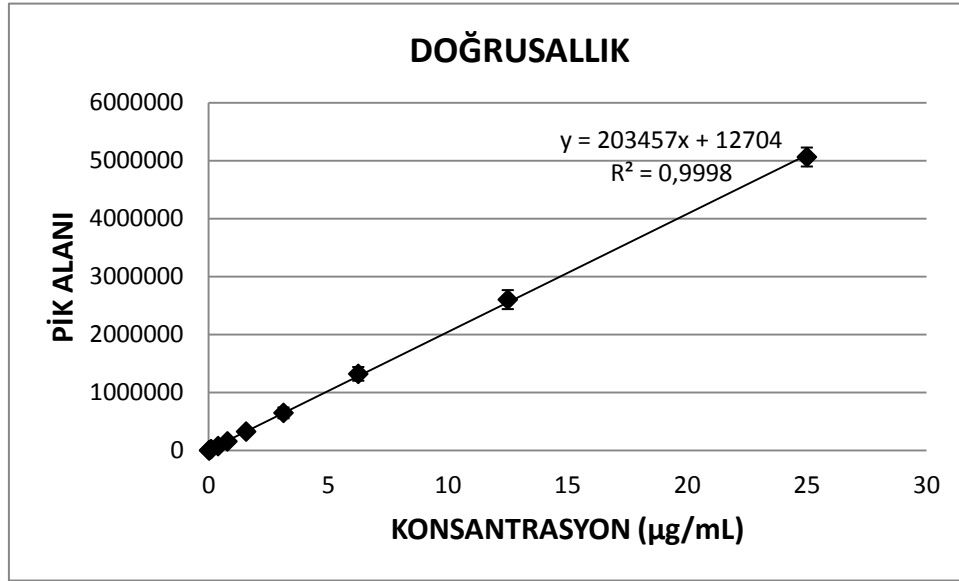
Tamoksifenin plazma içinde hazırlanan çözeltilerinin HPLC'ye enjekte edilmesiyle elde edilen pik örneği Şekil 148'de görülmektedir.



Şekil 148. Plazmada 6.25 µg/mL derişimde tamoksifen piki

4.2.1.1.3.3.1. Doğrusallık

Çalışmalar, Bölüm 3.2.2.1.1.1.1'de anlatıldığı gibi yapıldı. Hesaplanan pik alanlarına karşılık konsantrasyonlar grafiğe geçirildi. En küçük kareler yöntemine göre değerlendirilip, standart doğru denklemi bulundu ve doğrusallığı kanıtlandı. Elde edilen konsantrasyon pik alanı grafiği Şekil 149'da verilmiştir.



Şekil 149. Tamoksifenin plazmada HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği (n=6)

4.2.1.1.3.3.2. Doğruluk ve Geri Elde

Çalışmalar Bölüm 3.2.2.1.1.1.2’de anlatıldığı gibi yapıldı. Sonuçlar Tablo 52’de verilmiştir.

Tablo 52. Tamoksifenin plazma içindeki çözeltisinden geri elde ile hesaplanan miktarları (n=3)

Çözeltideki Tamoksifen Yüzdesi	Çözeltideki Tamoksifen Miktarı (µg/mL)	Hesapla Bulunan Tamoksifen Miktarı ± G.S	Bağıl Sapma Ortalama
%80	0.12	0.112 ±0.001	1.12
%100	0.15	0.147±0.002	1.59
%120	0.18	0.185±0.003	1.27

4.2.1.1.3.3.3. Kesinlik

a. Deney İçi Kesinlik

Çalışmalar Bölüm 3.2.2.1.1.1.3'de anlatıldığı gibi yapıldı. Tamoksifenin plazma içindeki deney içi kesinlik sonuçları Tablo 53'de verilmiştir.

Tablo 53. Tamoksifenin plazma içindeki deney içi kesinlik sonuçları

Örnek No	Tamoksifen Çözeltisinin Derişimi (µg/mL)	Hesapla Bulunan Tamoksifen Çözeltisi Derişimi (µg/mL)
1	0.150	0.148
2	0.150	0.147
3	0.150	0.145
4	0.150	0.141
5	0.150	0.165
6	0.150	0.155
7	0.150	0.152
8	0.150	0.156
9	0.150	0.150
10	0.150	0.158
Ortalama	0.150	0.151
Standart Sapma		0.004
Bağıl Sapma		2.59

b. Deneyler Arası Kesinlik

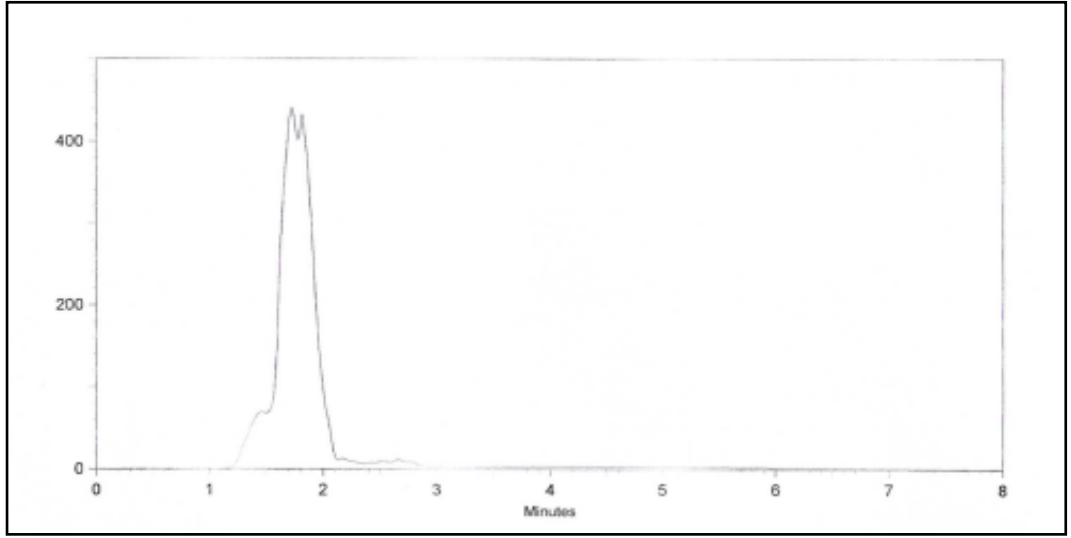
Tamoksifenin plazma içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları Tablo 54'de verilmiştir.

Tablo 54. Tamoksifenin plazma içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları

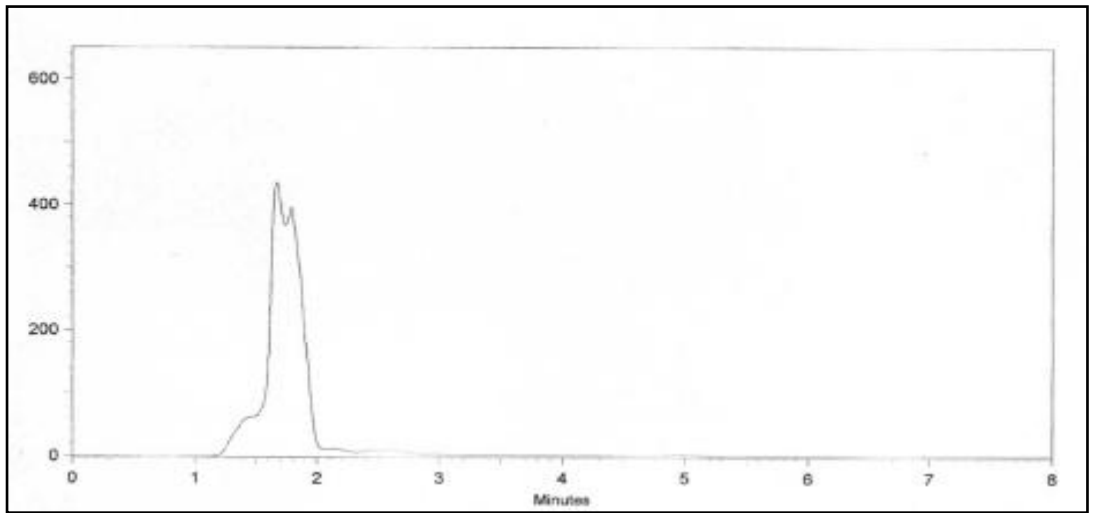
Derişim(µg/mL)	1.gün	2.gün	3.gün	ORT	S.S	B.S
25	25.6	25.8	24.3	25.2	0.8	3.4
6.25	6.06	6.04	5.96	6.02	0.06	0.91
1.56	1.37	1.41	1.35	1.38	0.03	2.15
0.39	0.386	0.419	0.385	0.397	0.019	4.880

4.2.1.1.3.3.4. Özgünlük ve Seçicilik

Çalışmalar bölüm 3.2.2.1.1.1.4'de anlatıldığı gibi yapıldı. Tamoksifenin pik verdiği dalga boyunda sodyum taurokolat'ın ve dimetil- β -CD'nin pik vermediği gösterildi. Yöntemin tamoksifen tayinine uygun oluşuna karar verildi. Şekil 150'de sodyum taurokolat ve 151'de dimetil- β -CD'ye ait pikler görülmektedir.



Şekil 150. Sodyum taurokolat enjeksiyonu ile elde edilen pik



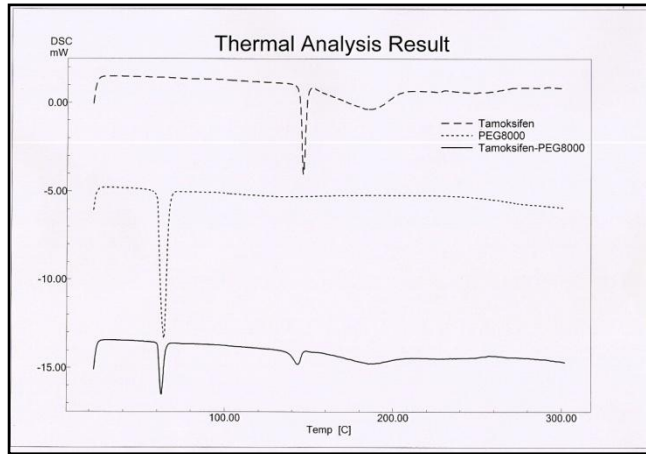
Şekil 151. Dimetil- β -CD enjeksiyonu ile elde edilen pik

4.2.1.1.3.3.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı

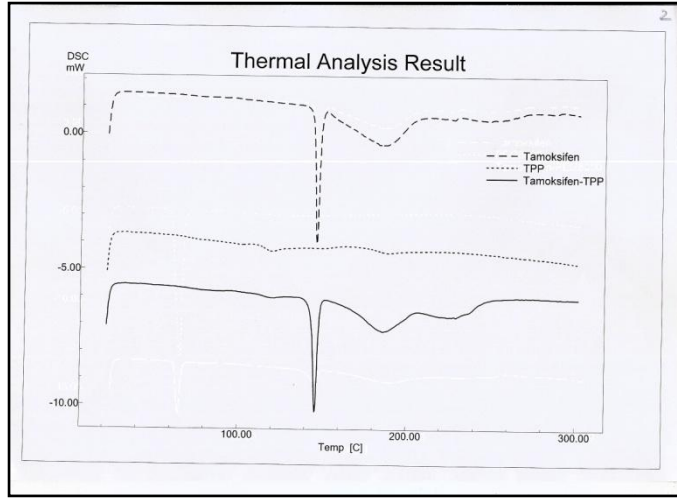
Hesaplar Bölüm 3.2.1.1.1.5'de verilen formüllere göre yapıldı. Analitik yöntemin duyarlılığı 0.0184 µg/mL, saptama sınırı 0.0559 µg/mL olarak bulundu.

4.2.1.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizine Ait Bulgular

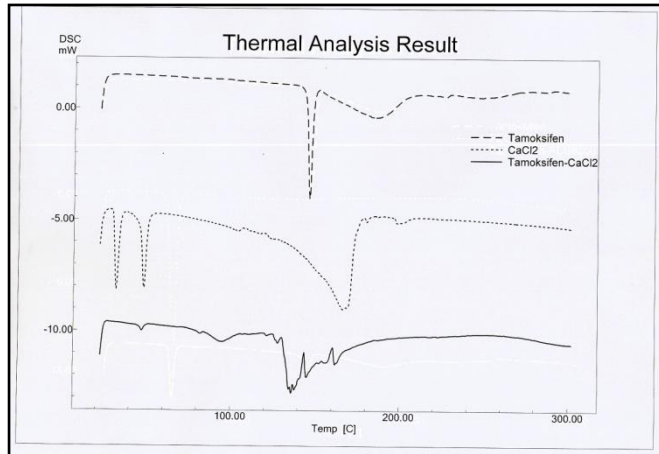
Çalışmalar, DSC (Differrantial Scanning Calorimetry) kullanılarak 10°C/dk tarama hızında ve 300°C'ye kadar yapıldı. Tamoksifen ve formülasyon hazırlamada kullanılan tüm yardımcı maddelerin tek başına ve etkin maddeyle 1:1 oranındaki karışımları kullanarak yapıldı. Çalışmanın nasıl yapıldığı ve çalışmada kullanılan maddeler Bölüm 3.2.2.1.2 'de belirtilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen grafikler Şekil 152-160 arasında görülmektedir.



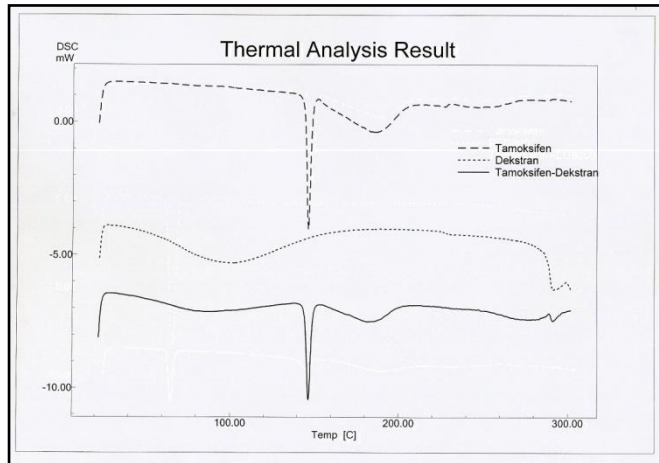
Şekil 152. Tamoksifen, PEG 8000 ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı



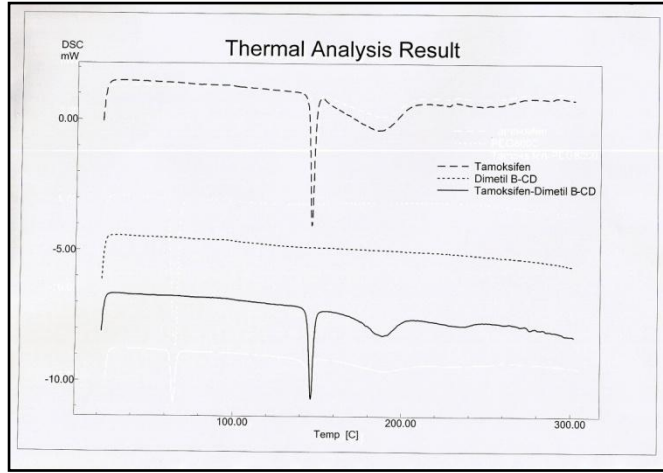
Şekil 153. Tamoksifen, TPP ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı



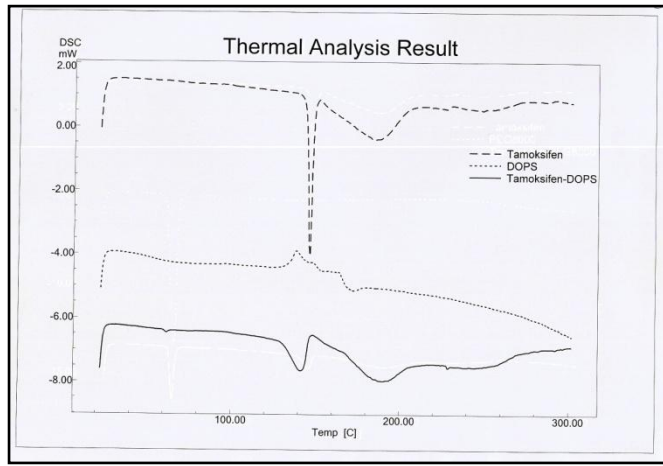
Şekil 154. Tamoksifen, CaCl_2 ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı



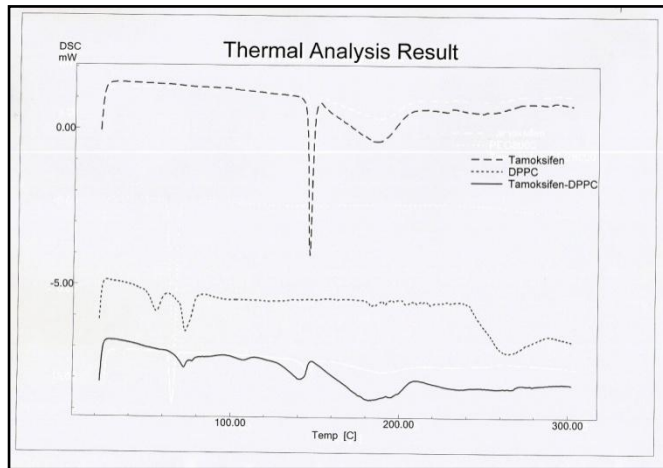
Şekil 155. Tamoksifen, Dekstran ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı



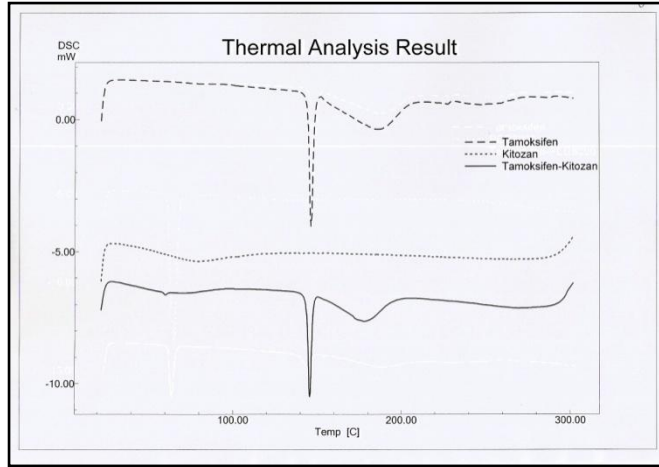
Şekil 156. Tamoksifen, Dimetil-β-siklodekstrin ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı



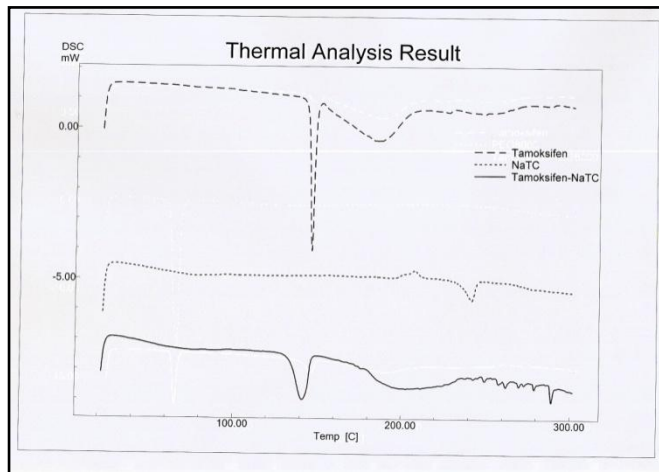
Şekil 157. Tamoksifen, DOPS ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı



Şekil 158. Tamoksifen, DPPC ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı



Şekil 159. Tamoksifen, Kitozan ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı



Şekil 160. Tamoksifen, Sodyum taurokolat ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı

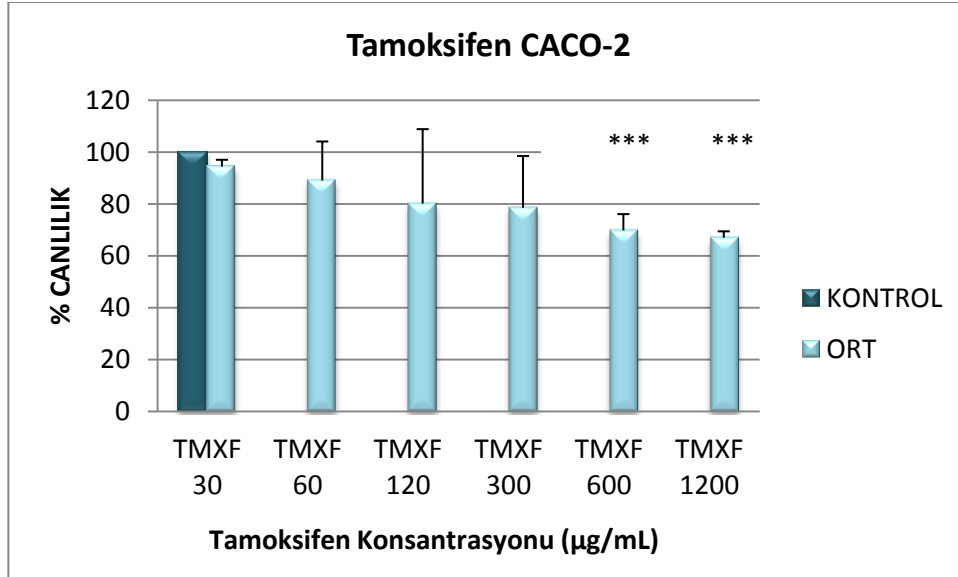
4.2.1.3. MTT Testine Ait Bulgular

MTT testine tabi tutulan absorpsiyon artırıcıların Caco-2, MDA MB-231 ve MCF-7 hücrelerine olan toksik etkileri incelendi. Etkin madde içermeyen lipozom, kohleat ve nanopartikül formülasyonlarının %25, %50 ve %75 oranındaki miktarlarının ve ayrıca hücre kültürü geçişlerinde kullanılan ortam olan PG/DMEM (%60/%40)'in de hücreler üzerine etkileri incelenmiş ve bulgular Bölüm 4.1.1.3'de sunulmuştur. Bu

bölümde sadece tamoksifen sitrat ile yapılan MTT testi ile ilgili bulgular sunulacaktır.

4.2.1.3.1. Caco-2 Hücreleriyle Yapılan MTT Testine Ait Bulgular

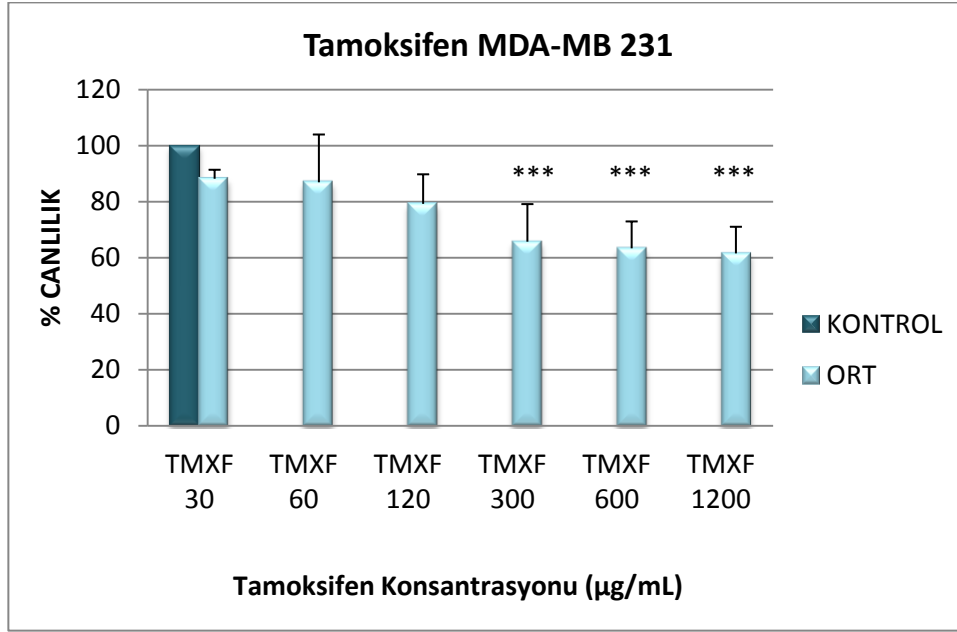
Caco-2 hücreleriyle yapılan MTT testi sonucunda 24 saat süreyle tamoksifene maruz bırakılan hücrelerin 24 saatlik süre sonunda elde edilen %canlılık değerlerine ait bulguların grafikleri Şekil 161’de verilmiştir.



Şekil 161. Tamoksifenin Caco-2 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları (p<0.001)**

4.2.4.2. MDA-MB 231 Hücreleriyle Yapılan MTT Testine Ait Bulgular

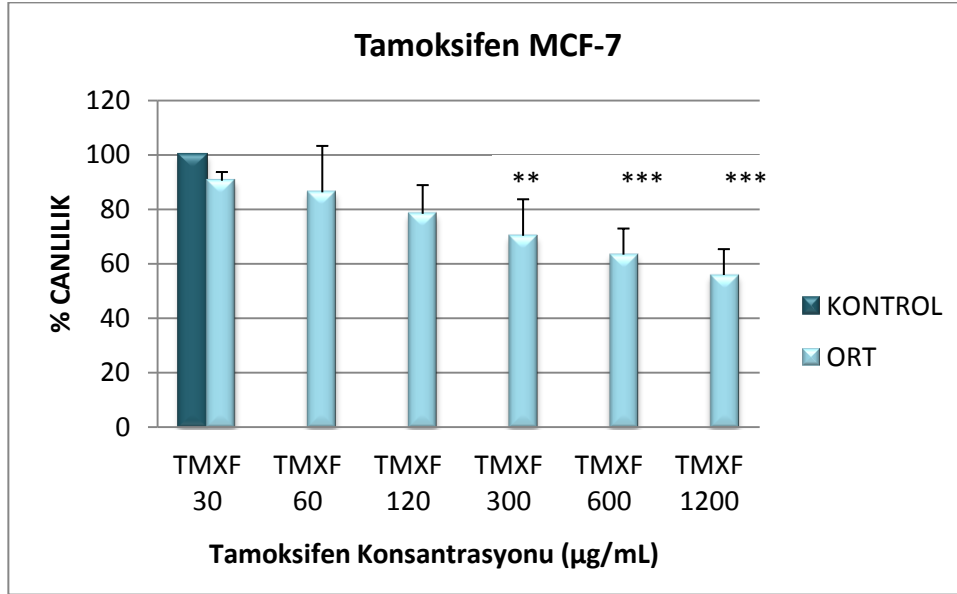
MDA-MB 231 hücreleriyle yapılan MTT testi sonucunda 24 saat süreyle tamoksifene maruz bırakılan hücrelerin 24 saatlik süre sonunda elde edilen %canlılık değerlerine ait bulguların grafikleri Şekil 162’de verilmiştir.



Şekil 162. Tamoksifenin MDA-MB 231 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları (*) $p<0.001$)**

4.2.4.3. MCF-7 Hücreleriyle Yapılan MTT Testine Ait Bulgular

MCF-7 hücreleriyle yapılan MTT testi sonucunda 24 saat süreyle tamoksifene maruz bırakılan hücrelerin 24 saatlik süre sonunda elde edilen %canlılık değerlerine ait bulguların grafikleri Şekil 163'de verilmiştir.



Şekil 163. Tamoksifenin MCF-7 hücrelerindeki 24 saatlik MTT testi sonuçları (**p<0.01, ***p<0.001)

4.2.1.4. Çalışmalarda Kullanılan Tamoksifen Formülasyonlarına Ait Bulgular

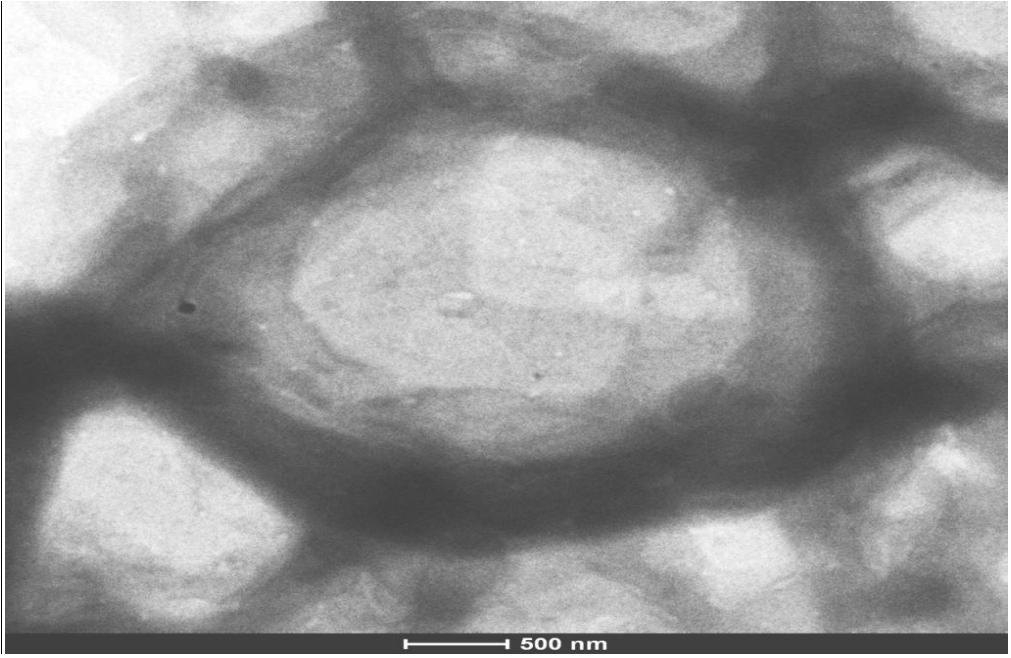
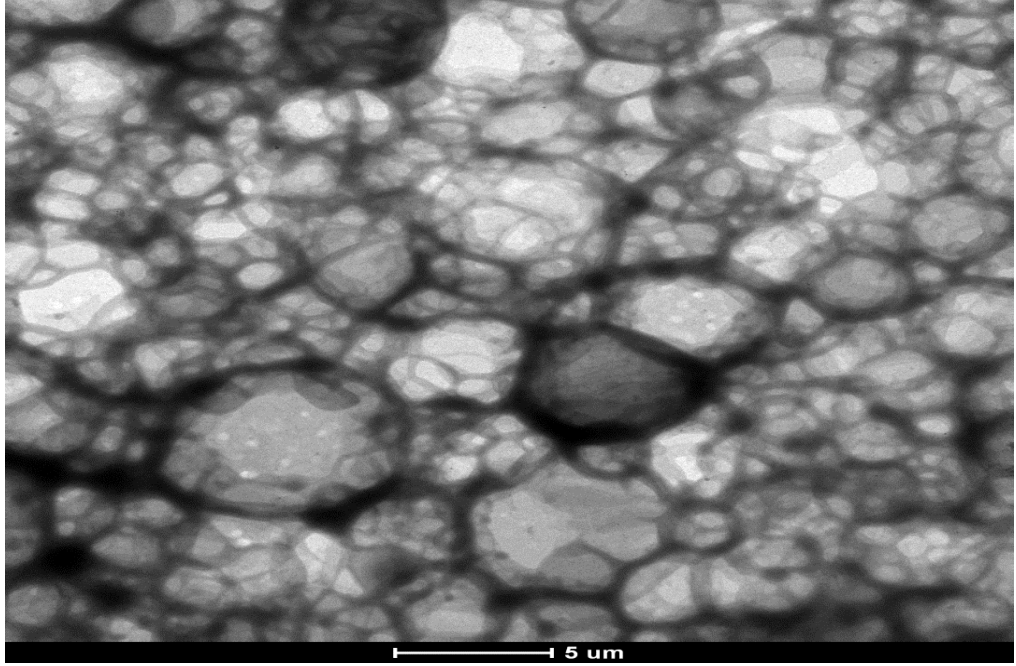
4.2.1.4.1. Çalışmalarda Kullanılan Tamoksifen Lipozomlarının Karakterizasyonuna Ait Bulgular

4.2.1.4.1.1. Lipozomların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular

Lipozomların partikül büyüklüğü ve dağılımları Malvern Zeta Sizer Nano ZS ile ölçüldü. Alınan sonuçların ortalaması hesaplanarak polidispersite indeksi ile birlikte Tablo 55’de verilmiştir.

4.2.1.4.1.2. Lipozomların Şekline Ait Bulgular

Lipozomların şekilleri TEM mikroskobu ile incelendi. Elde edilen görüntüler Resim 43’de verilmiştir.



Resim 43. Tamoksifen ve dimetil- β -CD içeren lipozomların TEM görüntüleri

4.2.1.4.1.3. Lipozomların İçine Hapsedilen Tamoksifen Sitrat Miktar Tayinine Ait Bulgular

Lipozomların içine hapsedilen tamoksifen miktarı ortalamaları hesaplanarak Tablo 55’de verilmiştir.

4.2.1.4.1.4. Lipozomların Zeta Potansiyeli lümlerine Ait Bulgular

Lipozomların zeta potansiyelleri Malvern Zeta Sizer Nano ZS ile ölçüldü. Alınan sonuçların ortalaması hesaplanarak Tablo 55’de verilmiştir.

4.2.1.4.2. Çalışmalarda Kullanılan Tamoksifen Nanopartiküllerinin Karakterizasyonuna Ait Bulgular

4.2.1.4.2.1. Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular

Nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve dağılımları Malvern Zeta Sizer Nano ZS ile ölçüldü. Alınan sonuçların ortalaması hesaplanarak Polidispersite indeksi ile birlikte Tablo 55’de verilmiştir.

4.2.1.4.2.2. Nanopartiküllerin İçine Hapsedilen Tamoksifen Sitrat Miktar Tayinine Ait Bulgular

Nanopartiküllerin içine hapsedilen tamoksifen miktarı ortalamaları hesaplanarak Tablo 55’de verilmiştir.

4.2.1.4.2.3. Nanopartiküllerin Zeta Potansiyeli Ölçümlerine Ait Bulgular

Nanopartiküllerin zeta potansiyelleri Malvern Zeta Sizer Nano ZS ile ölçüldü. Alınan sonuçların ortalaması hesaplanarak Tablo 55’de verilmiştir.

4.2.1.4.3. Çalışmalarda Kullanılan Tamoksifen Kohleatlarının Karakterizasyonuna Ait Bulgular

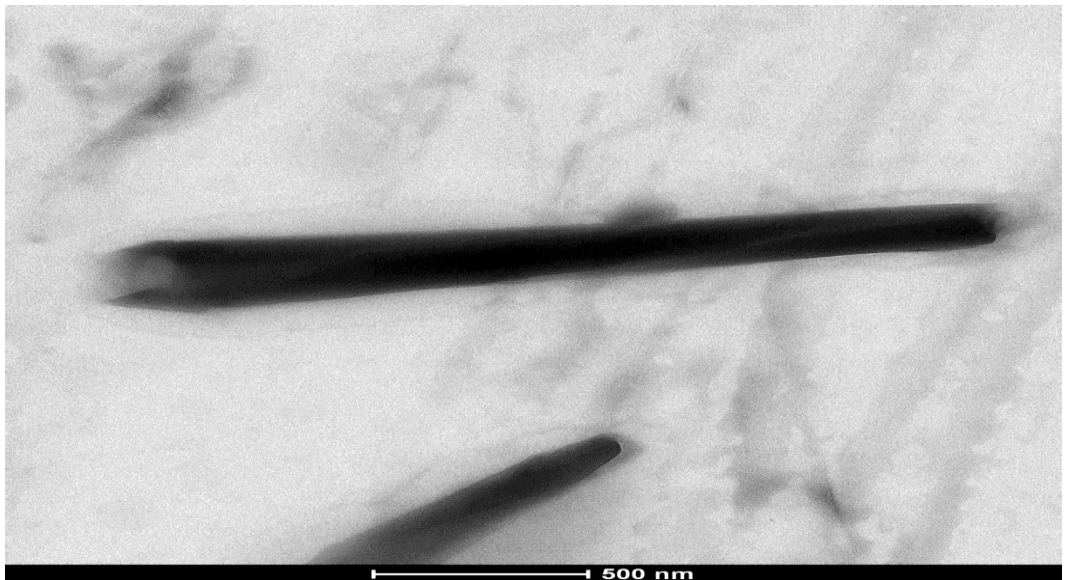
4.2.1.4.3.1. Kohleatların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular

Kohleatların partikül büyüklüğü ve dağılımları Malvern Zeta Sizer Nano ZS ile ölçüldü. Alınan sonuçların ortalaması hesaplanarak Polidispersite indeksi ile birlikte Tablo 55’de verilmiştir.

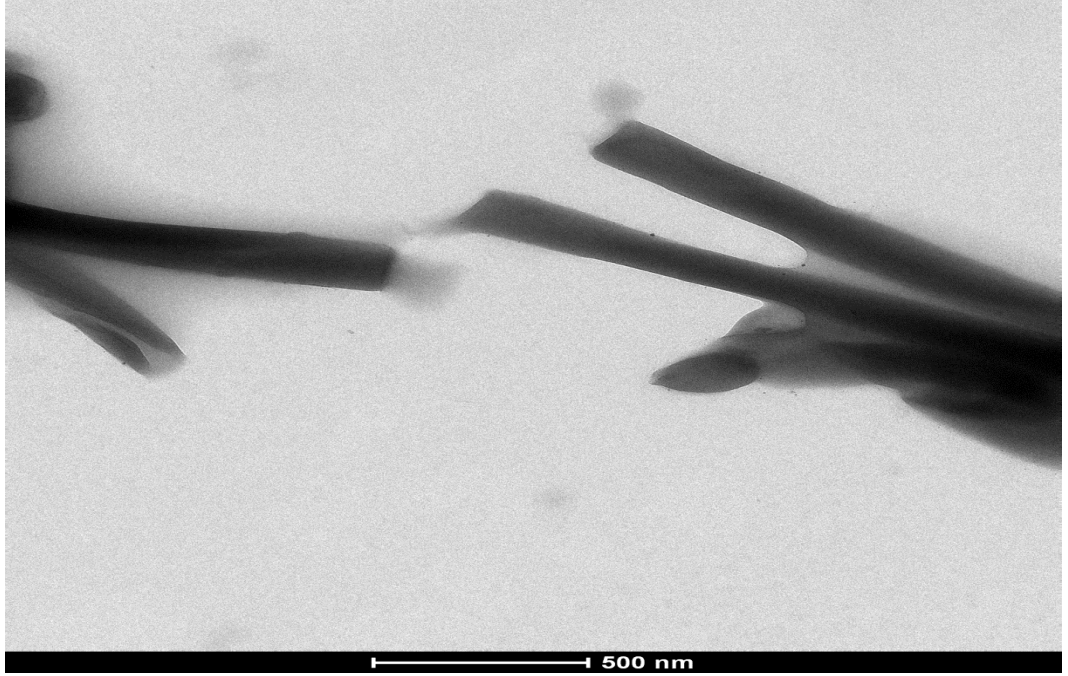
4.2.1.4.3.2. Kohleatların Şekline Ait Bulgular

Kohleatların şekilleri TEM mikroskobu ile incelendi. Elde edilen görüntüler Resim 44 a ve b’de verilmiştir.

a.



b.



Resim 44. Tamoksifen ve dimetil-β-siklodekstrin içeren kohleatların TEM görüntüleri

4.2.1.4.3.3. Kohleatların İçine Hapsedilen Tamoksifen Sitrat Miktar Tayinine Ait Bulgular

Kohleatların içine hapsedilen raloksifen miktarı ortalamaları hesaplanarak Tablo 55’de verilmiştir.

4.2.1.4.3.4. Kohleatların Zeta Potansiyeli Ölçümlerine Ait Bulgular

Kohleatların zeta potansiyelleri Malvern Zeta Sizer Nano ZS ile ölçüldü. Alınan sonuçların ortalaması hesaplanarak Tablo 55’de verilmiştir.

Tablo 55. Tamoksifen içeren formülasyonların karakterizasyon parametreleri

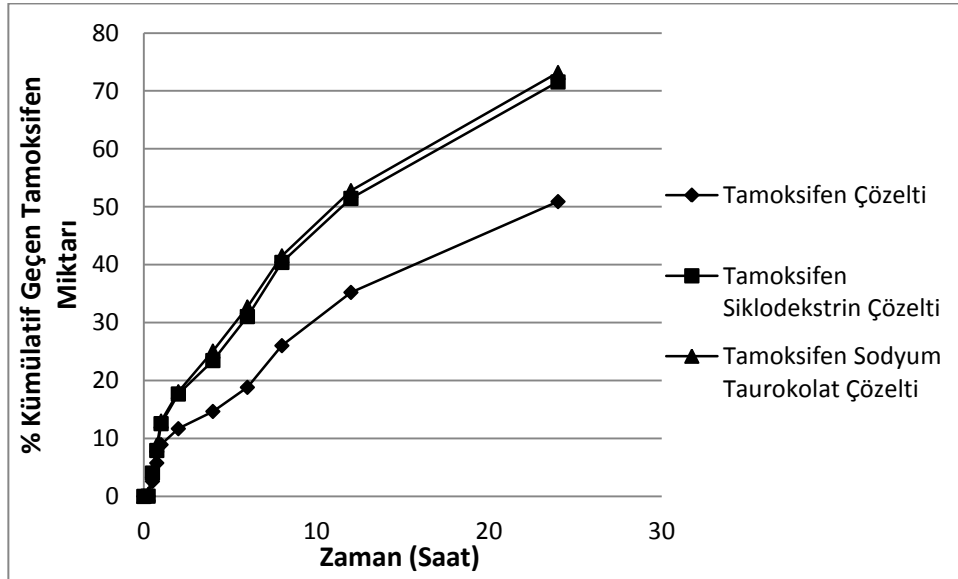
Formülasyon Tipi	Partikül Büyüklüğü $\pm$ S.S. (n=3)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)	Enkapsülasyon Verimi (%)
Tamoksifen içeren lipozomlar	208.0 $\pm$ 4.0	0.374	11.7 $\pm$ 2.1	81.8 $\pm$ 4.6
Tamoksifen ve dimetil- β -CD içeren lipozomlar	244.7 $\pm$ 8.1	0.332	-14.8 $\pm$ -0.3	45.1 $\pm$ 6.1
Tamoksifen ve sodyum taurokolat içeren lipozomlar	243.3 $\pm$ 5.0	0.214	29.3 $\pm$ 7.9	70.3 $\pm$ 6.3
Tamoksifen içeren nanopartiküller	253.0 $\pm$ 6.0	0.252	34.5 $\pm$ 2.2	81.2 $\pm$ 2.4
Tamoksifen ve dimetil- β -CD içeren nanopartiküller	457.3 $\pm$ 19.1	0.352	45.6 $\pm$ 2.8	43.8 $\pm$ 6.6
Tamoksifen ve sodyum taurokolat içeren nanopartiküller	357.3 $\pm$ 17.2	0.272	8.38 $\pm$ 0.79	74.1 $\pm$ 8.9
Tamoksifen içeren kohleatlar	228.7 $\pm$ 15.1	1.000	-19.2 $\pm$ -0.3	75.9 $\pm$ 3.8
Tamoksifen ve dimetil- β -CD içeren kohleatlar	421.7 $\pm$ 6.1	1.000	-36.3 $\pm$ -0.7	51.1 $\pm$ 6.1
Tamoksifen ve sodyum taurokolat içeren kohleatlar	288.0 $\pm$ 12.0	1.000	5.58 $\pm$ 1.43	74.4 $\pm$ 4.2

4.2.1.5. İn Vitro Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular

4.2.1.5.1.Hücre Tek Tabakası İçermeyen Filtrelerden Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular

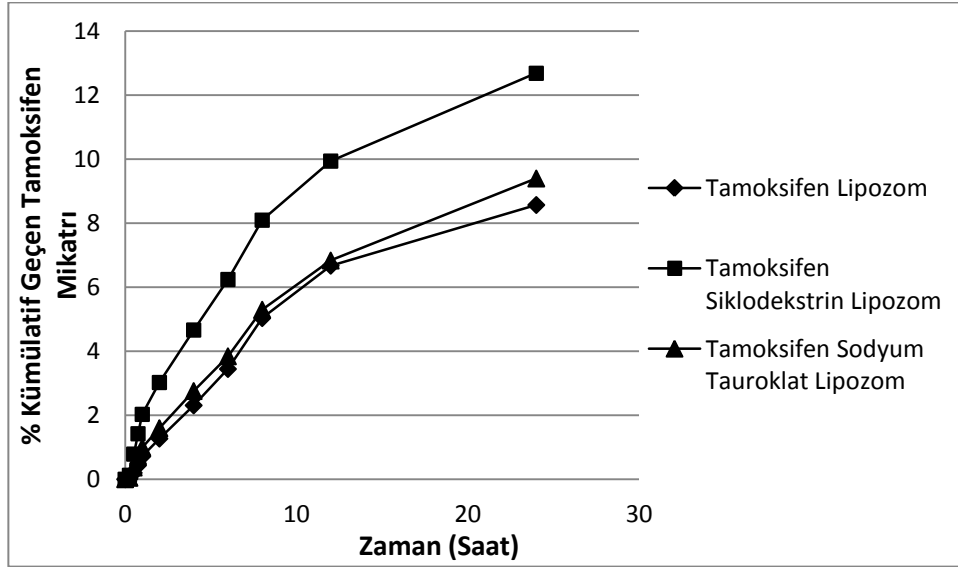
Caco-2 hücre tabakası içermeyen membranlardan tamoksifen ve absorpsiyon artırıcıları içeren çözelti, lipozom, nanopartikül ve kohleat geçişleri, Bölüm 3.2.2.1.4'de belirtilen formülasyonlarla, Bölüm 3.2.1.1.5.1'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. .

PG/DMEM içerisinde 30 µg/mL derişimde tamoksifen ve belirtilen miktarlarda absorpsiyon artırıcı içeren çözeltiler ile elde edilen %kümülatif geçen tamoksifen miktarlarını gösteren grafik Şekil 164'de görülmektedir.



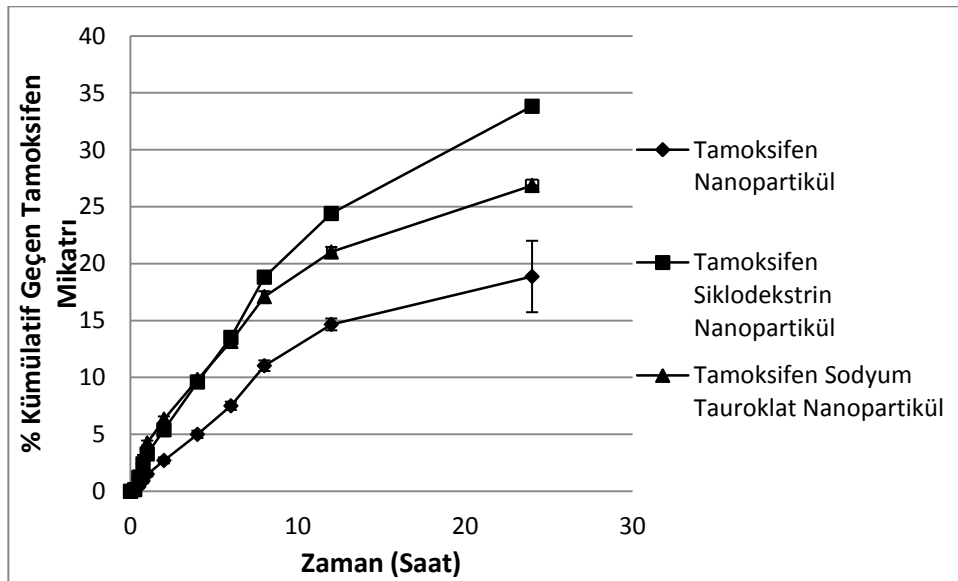
Şekil 164. Tamoksifen içeren çözeltilerin boş polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik (n=3)

Tamoksifen içeren lipozomların PG/DMEM içerisinde dağıtıldıktan sonra üzerinde Caco-2 tek tabakası içermeyen polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucu elde edilen grafik Şekil 165'de görülmektedir.



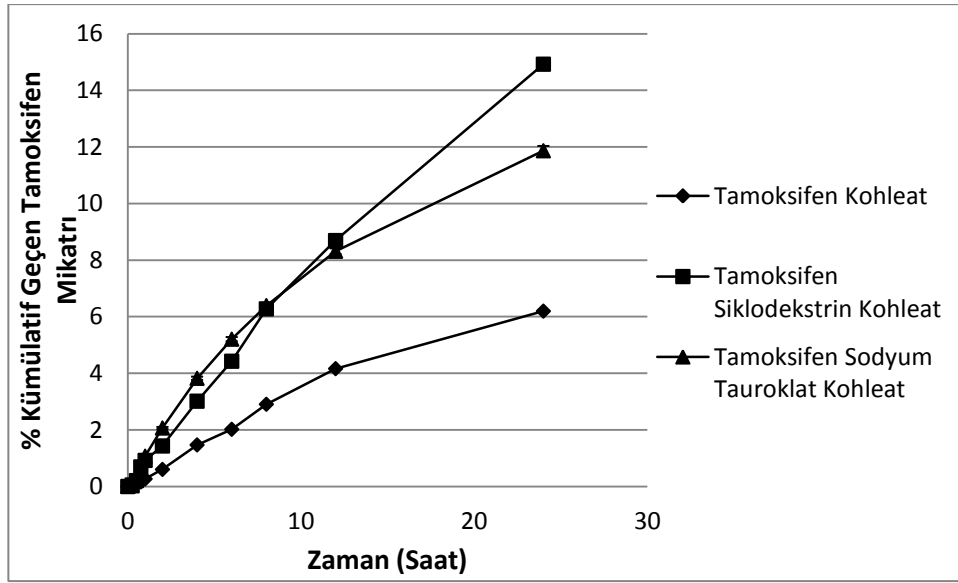
Şekil 165. Tamoksifen içeren lipozomların boş polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik (n=3)

Tamoksifen içeren nanopartiküllerin PG/DMEM içerisinde dağıtıldıktan sonra üzerinde Caco-2 tek tabakası içermeyen polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucu elde edilen grafik Şekil 166'da görülmektedir.



Şekil 166. Tamoksifen içeren nanopartiküllerin üzerinde boş polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik (n=3)

Tamoksifen içeren kohleatların PG/DMEM içerisinde dağıtıldıktan sonra üzerinde Caco-2 tek tabakası içermeyen polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucu elde edilen grafik Şekil 167’de görülmektedir.

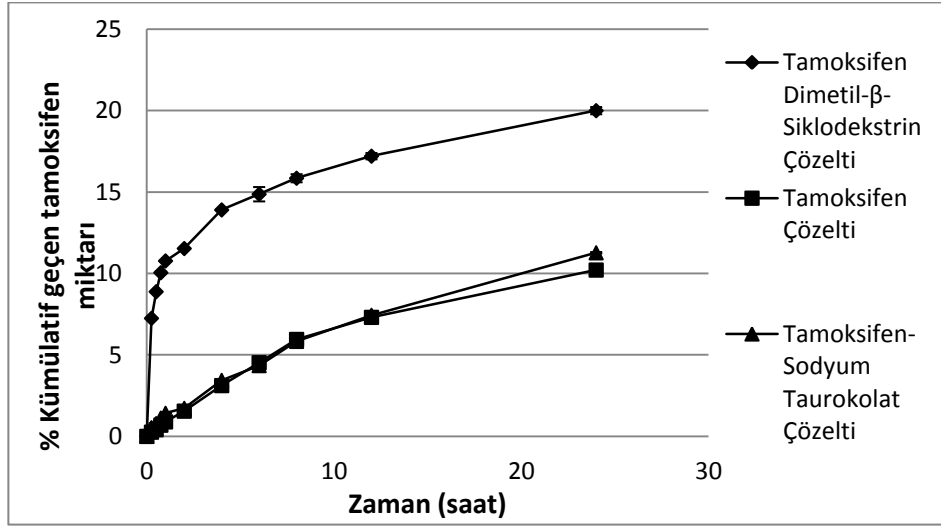


Şekil 167. Tamoksifen içeren kohleatların boş polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik (n=3)

4.2.1.5.2. Tamoksifenin Caco-2 Hücrelerinden Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular

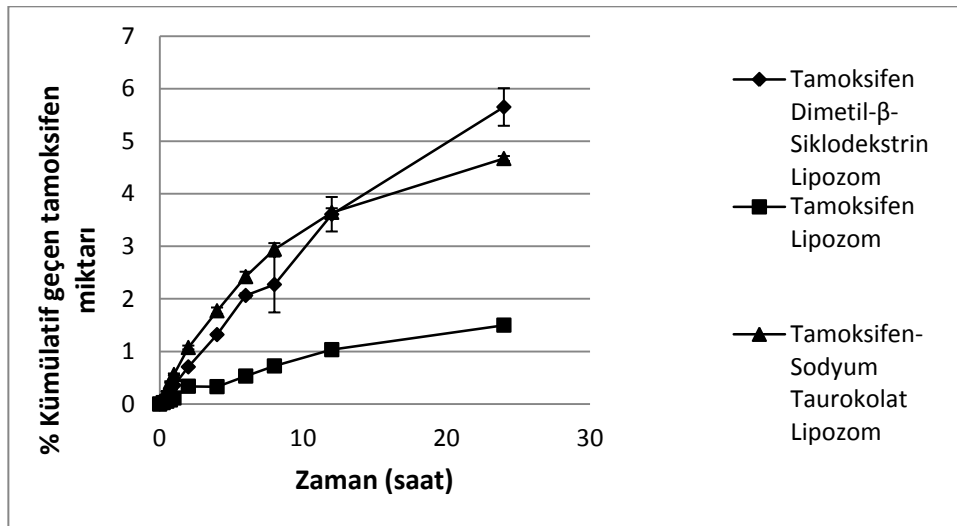
80000 hücre/mL yoğunlukta Caco-2 hücre tek tabakası içeren membranlardan tamoksifen ve absorpsiyon artırıcıları içeren çözelti, lipozom ve nanopartikül geçişleri Bölüm 3.2.1.1.5.2.1’de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

PG/DMEM içerisinde 30 µg/mL derişimde tamoksifen ve belirtilen miktarlarda absorpsiyon artırıcı içeren çözeltiler ile elde edilen %kümülatif geçen tamoksifen miktarlarını gösteren grafik Şekil 168’de görülmektedir.



Şekil 168. Tamoksifen içeren çözeltilerin üzerinde Caco-2 tek tabakası üretilen polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik (n=3)

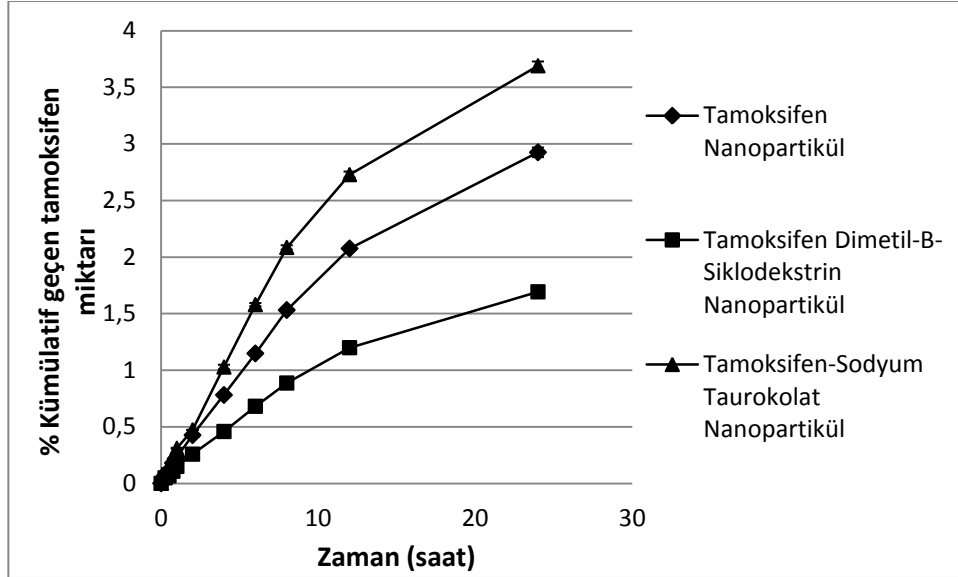
Tamoksifen içeren lipozomların PG/DMEM içerisinde dağıtıldıktan sonra üzerinde Caco-2 tek tabakası üretilen polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucu elde edilen grafik Şekil 169'da görülmektedir.



Şekil 169. Tamoksifen içeren lipozomların üzerinde Caco-2 tek tabakası üretilen polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik

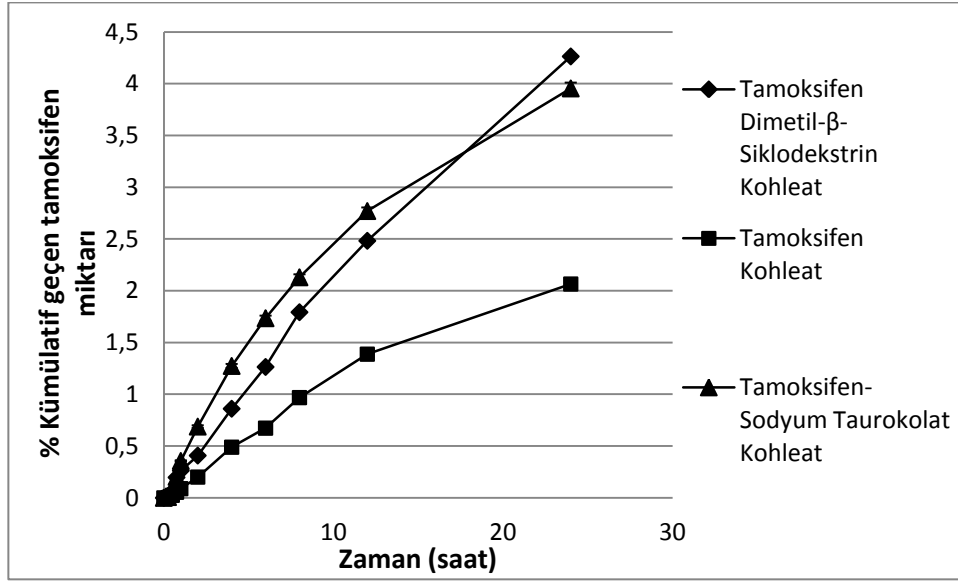
Tamoksifen içeren nanopartiküllerin PG/DMEM içerisinde dağıtıldıktan sonra üzerinde Caco-2 tek tabakası üretilen polikarbonat

membranlardan geçiş çalışmaları sonucu elde edilen grafik şekil 170’de görülmektedir.



şekil 170. Tamoksifen içeren nanopartiküllerin üzerinde Caco-2 tek tabakası üretilen polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik

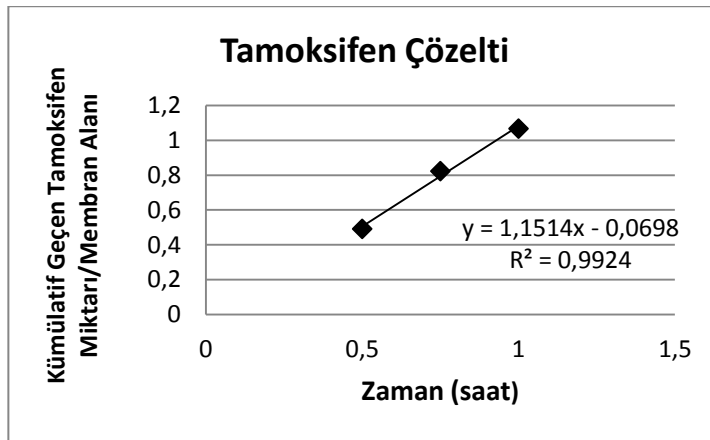
Tamoksifen içeren kohleatların PG/DMEM içerisinde dağıtıldıktan sonra üzerinde Caco-2 tek tabakası üretilen polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucu elde edilen grafik şekil 171’de görülmektedir.



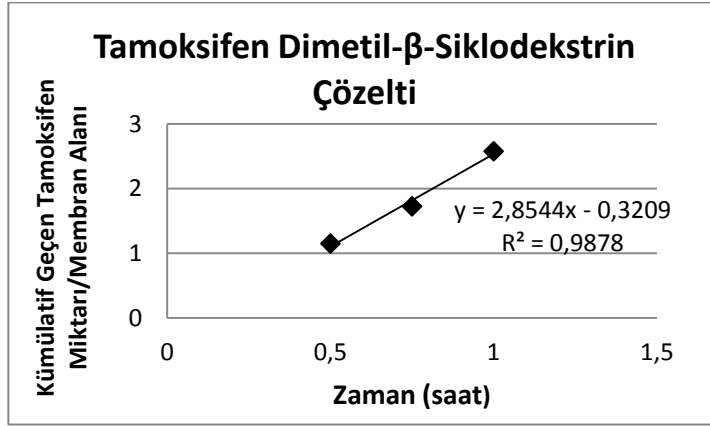
Şekil 171. Tamoksifen içeren kohleatların üzerinde Caco-2 tek tabakası üretilen polikarbonat membranlardan geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik

4.2.1.5.2.1.Caco-2 Hücrelerinden Geçirgenlik Katsayısının ($k=P_{app}$) Hesaplanmasına Ait Bulgular

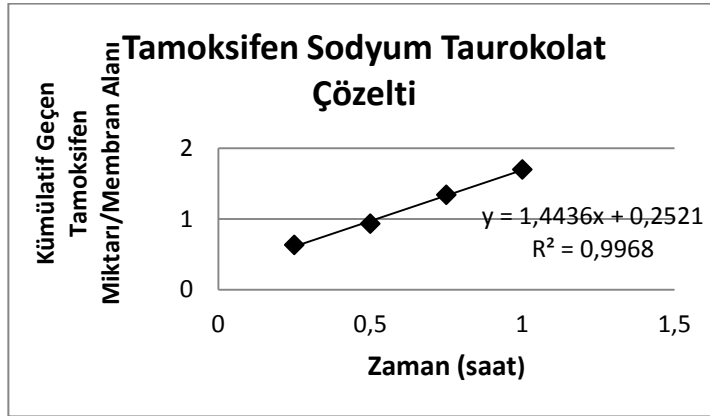
Log k değerlerinin Bölüm 3.2.1.1.5.2.2’de anlatıldığı gibi hesaplanmasında kullanılan grafikler Şekil 172-183’de, hesaplanan permeabilite katsayıları Tablo 56’da görülmektedir.



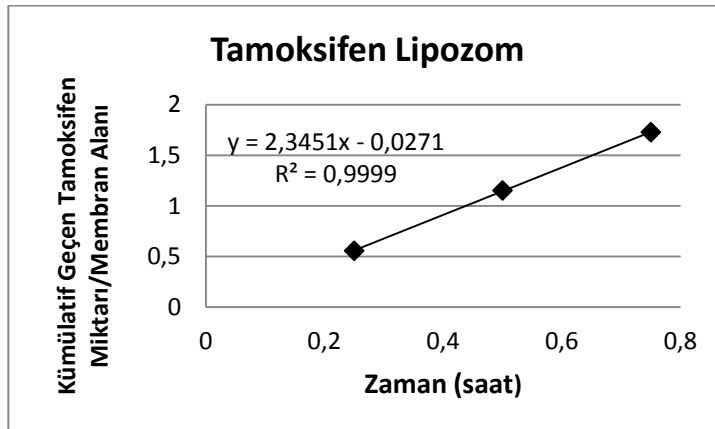
Şekil 172. Tamoksifen çözeltisi ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik



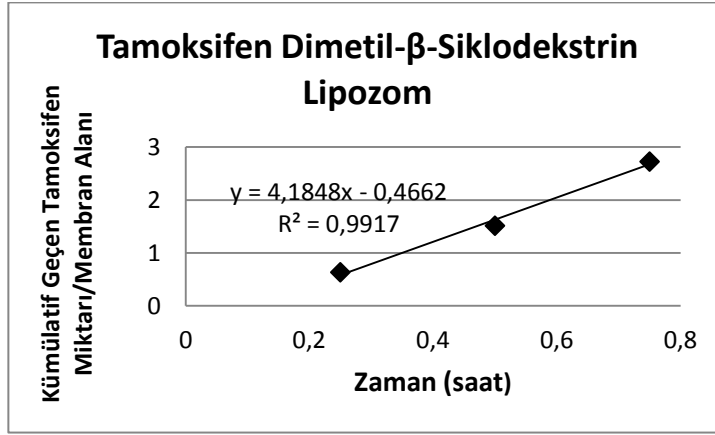
Şekil 173. Tamoksifen ve dimetil-β-siklodekstrin çözeltisi ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik



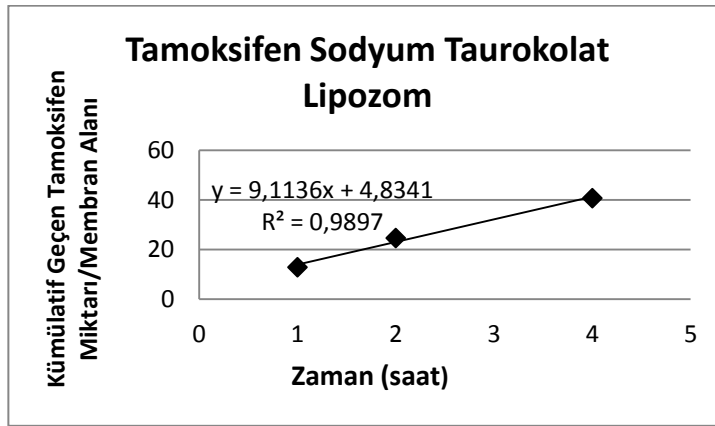
Şekil 174. Tamoksifen ve sodyum taurokolat çözeltisi ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik



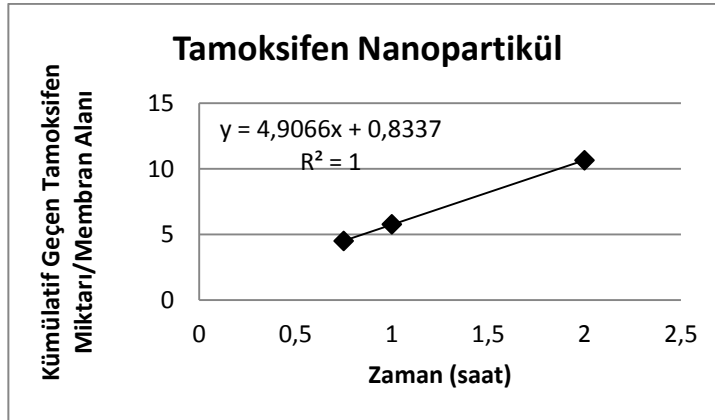
Şekil 175. Tamoksifen lipozom ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik



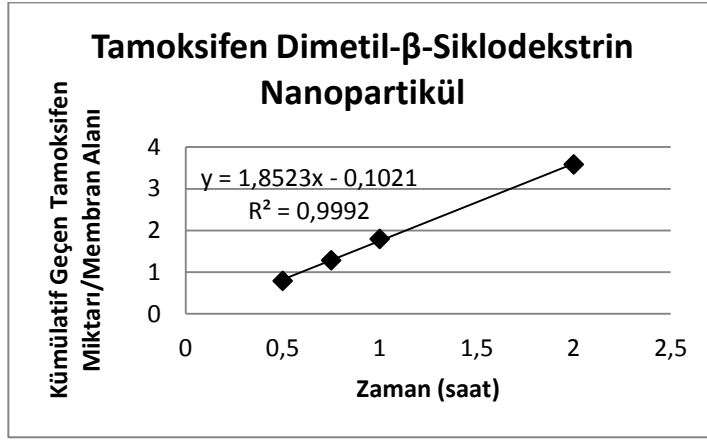
Şekil 176. Tamoksifen ve dimetil-β-siklodekstrin içeren lipozomlar ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik



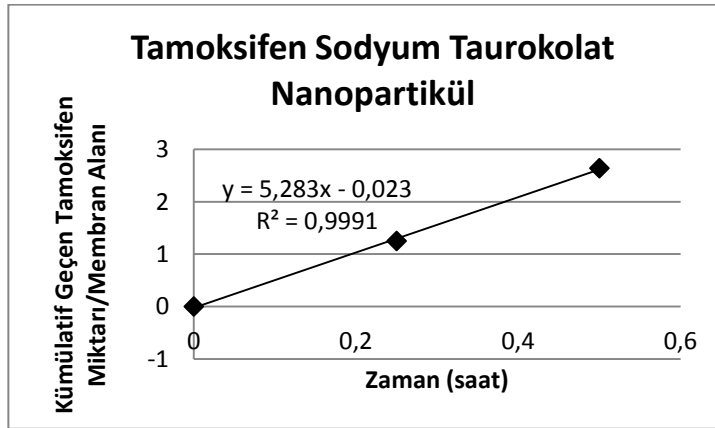
Şekil 177. Tamoksifen ve sodyum taurokolat içeren lipozomlar ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik



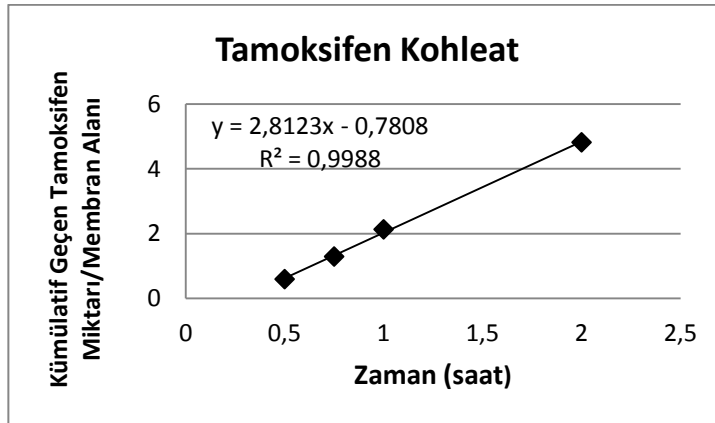
Şekil 178. Tamoksifen nanopartikülleri ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik



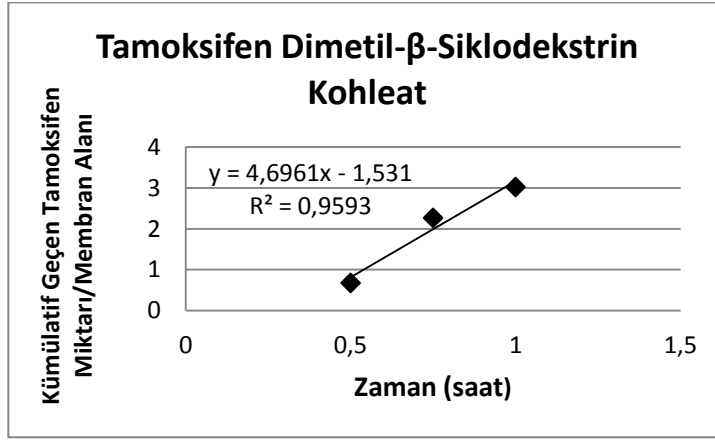
Şekil 179. Tamoksifen ve dimetil-β-siklodekstrin içeren nanopartiküller ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik



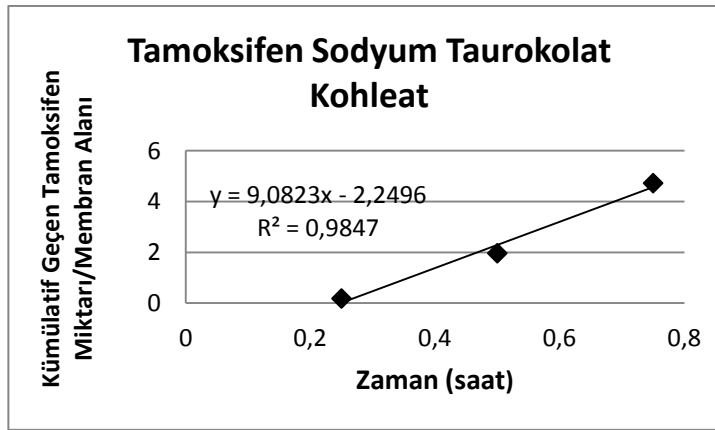
Şekil 180. Tamoksifen ve sodyum taurokolat içeren nanopartiküller ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik



Şekil 181. Tamoksifen içeren kohleatlar ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik



Şekil 182. Tamoksifen ve dimetil-β-siklodekstrin içeren kohleatlar ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik



Şekil 183. Tamoksifen ve sodyum taurokolat içeren kohleatlar ile yapılan Caco-2 geçiş deneyleri sonucu elde edilen ve permeabilite katsayısının hesaplanması için oluşturulan grafik

Tablo 56. Tamoksifen formülasyonları için hesaplanan permeabilite katsayıları

Formülasyon Tipi	Permeabilite Katsayısı (cm/saat) (n=3)
Tamoksifen çözeltisi	1.58 ± 0.01
Tamoksifen ve dimetil-β-siklodekstrin içeren çözelti	1.98 ± 0.01
Tamoksifen ve sodyum taurokolat içeren çözelti	1.68 ± 0.03
Tamoksifen lipozomları	0.611 ± 0.020
Tamoksifen ve dimetil-β-siklodekstrin lipozomları	1.22 ± 0.06
Tamoksifen ve sodyum taurokolat içeren lipozomlar	1.20 ± 0.02
Tamoksifen nanopartikülleri	0.864 ± 0.019
Tamoksifen ve dimetil-β-siklodekstrin nanopartiküller	0.791 ± 0.012
Tamoksifen ve sodyum taurokolat içeren nanopartiküller	0.945 ± 0.035
Tamoksifen kohleatlar	0.689 ± 0.021
Tamoksifen ve dimetil-β-siklodekstrin kohleatlar	1.22 ± 0.03
Tamoksifen ve sodyum taurokolat içeren kohleatlar	1.19 ± 0.04

4.2.1.5.2.2. Caco-2 Hücrelerinin Bütünlüklerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular

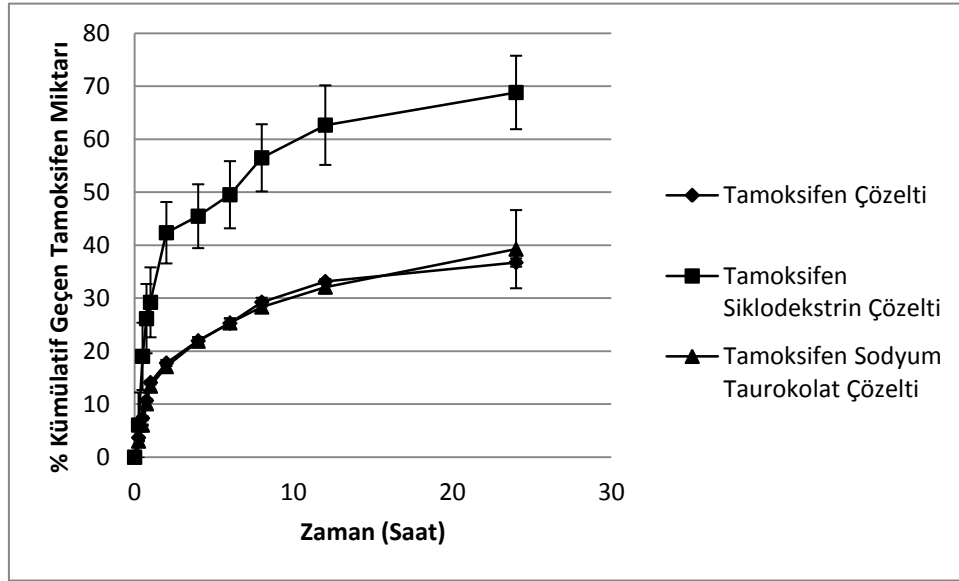
Caco-2 hücreleri polikarbonat membranlarda geçiş için hazırlandıktan önce ve belirtilen formülasyonların geçiş çalışmaları yapıldıktan sonra TEER değerleri ölçülmüş ve aşağıdaki tabloda belirtilen sonuçlar elde edilmiştir. Hiçbir formülasyon geçişi yapılmayan ancak deney süresince geçiş koşullarına tabi tutulan hücrelerin TEER değeri ise 285 Ω olarak ölçüldü. Ölçülen TEER değerleri Tablo 57’de görülmektedir.

Tablo 57. Tamoksifen formülasyonları ile yapılan hücre geçişlerinden sonra elde edilen TEER değerleri

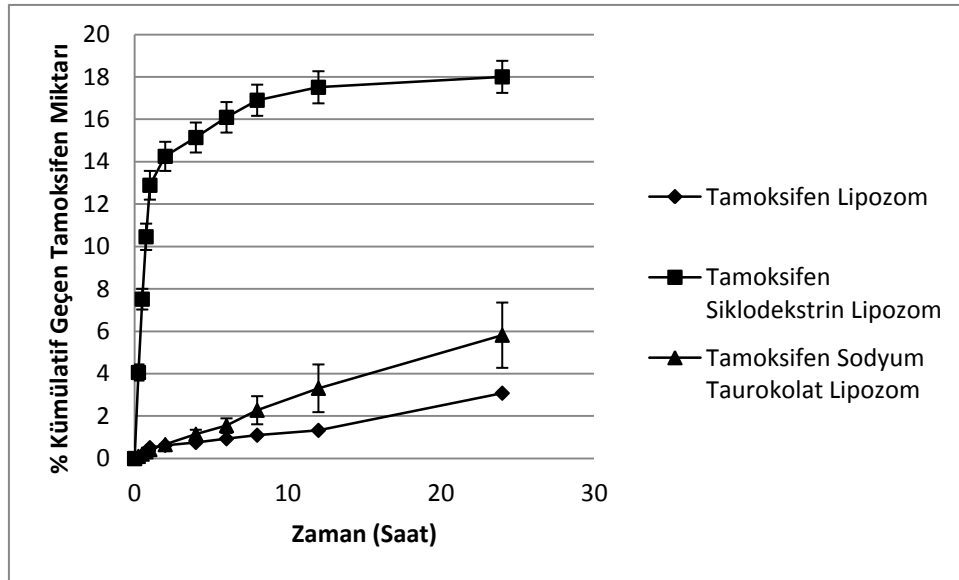
Formülasyon Tipi	TEER Değeri (Ω)
Tamoksifen çözeltisi	244
Tamoksifen ve sodyum taurokolat içeren çözelti	252
Tamoksifen ve dimetil- β -siklodekstrin içeren çözelti	226
Tamoksifen lipozomları	255
Tamoksifen ve sodyum taurokolat içeren lipozomlar	253
Tamoksifen ve dimetil- β -siklodekstrin lipozomları	226
Tamoksifen nanopartikülleri	242
Tamoksifen ve sodyum taurokolat içeren nanopartiküller	220
Tamoksifen ve dimetil- β -siklodekstrin nanopartiküller	252
Tamoksifen kohleatlar	260
Tamoksifen ve sodyum taurokolat içeren kohleatlar	235
Tamoksifen ve dimetil- β -siklodekstrin kohleatlar	223

4.2.1.5.3. Diyaliz Membran Geçişlerine Ait Bulgular

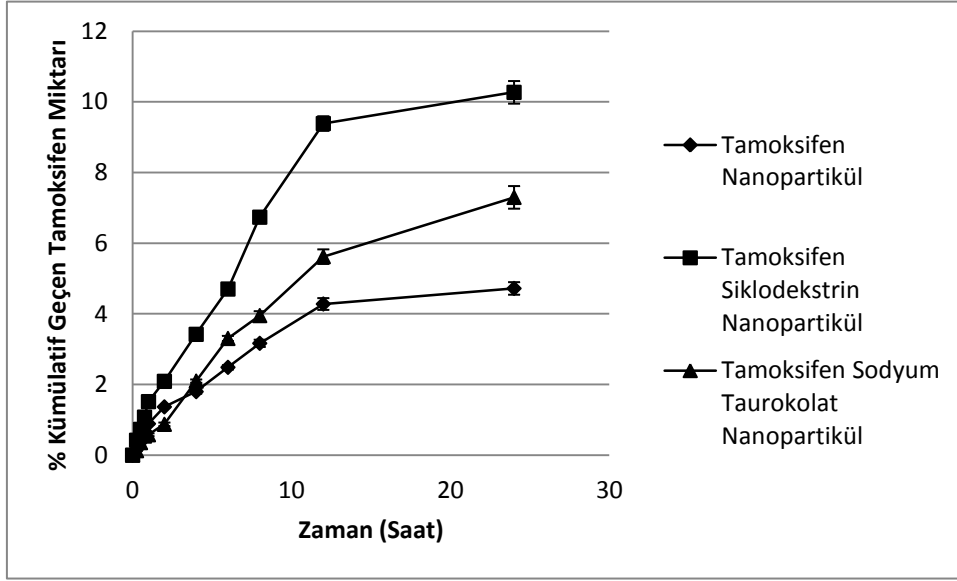
Diyaliz membran geçişleri Bölüm 3.2.1.1.5.3’de anlatıldığı şekilde çözelti, lipozom, nanopartikül ve kohleat formülasyonları için gerçekleştirildi. Tüm formülasyon tiplerinden raloksifenin salım profilleri incelenmiş ve kümülatif salınan tamoksifen miktarının değişik kinetiklere uyumu incelenmiştir. Şekil 184-187’de tamoksifen formülasyonlarının salım profilleri görülmektedir.



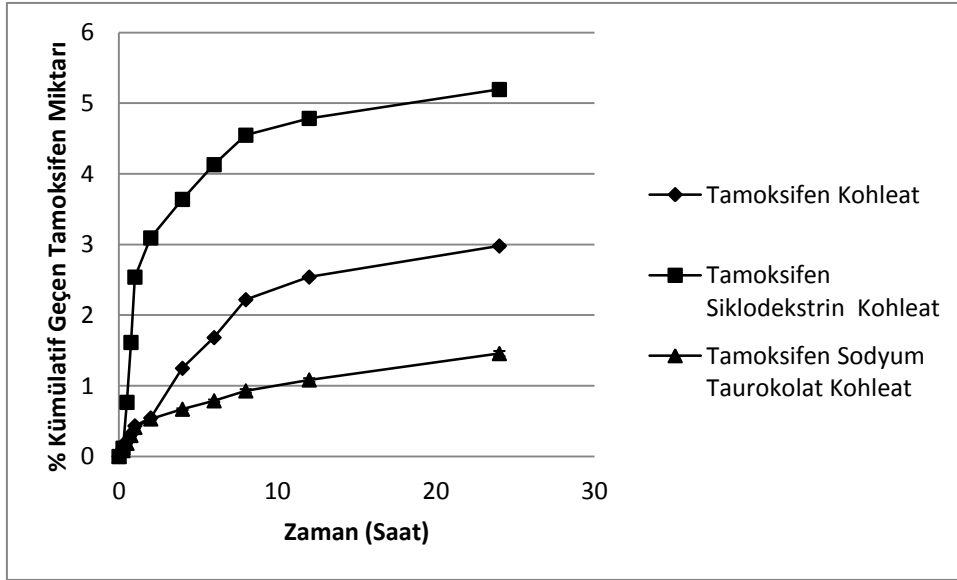
Şekil 184. Tamoksifen içeren çözeltilerin pH 7.4 fosfat tamponunda 37±0.5°C'deki geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik (n=3)



Şekil 185. Tamoksifen içeren lipozomların pH 7.4 fosfat tamponunda 37±0.5°C'deki geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik (n=3)



Şekil 186. Tamoksifen içeren nanopartiküllerin pH 7.4 fosfat tamponunda $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 'deki geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik (n=3)



Şekil 187. Tamoksifen içeren kohleatların pH 7.4 fosfat tamponunda $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 'deki geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen grafik (n=3)

4.2.1.5.3.1. Diyaliz Membran Geçişlerinden Elde Edilen Sonuçların Kinetik Olarak Değerlendirilmesine Ait Bulgular

Diyaliz membran geçiş çalışmaları sonucunda çözeltiler ve tüm formülasyonlar için de zamana karşı %kümülatif salınan Tamoksifen miktarının değişik kinetiklere olan uyumu incelenmiştir. Çözeltiler için elde edilen kinetik tabloları (Tablo 58, 59, 60) ve Tamoksifenin salımının sadece tamoksifen içeren çözeltide ve tamoksifen dimetil- β -siklodekstrin içeren çözelti geçişlerinde RRSWB ve sodyum taurokolat içeren çözelti geçişlerinde ise Higuchi salım kinetiğine uyum sağladığı görülmüştür.

Tablo 58. Tamoksifen çözelti formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, tamoksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	-0.0169	4.47	0.786	243
Hixson Crowel	0.0238	0.202	0.772	1606
Sıfır derece	1.29	12.4	0.742	1835
RRSBW	0.516	-2.17	0.937	85.8
BTA	0.508	-5.34	0.932	101.4
Higuchi	7.58	4.72	0.921	88.6

Tablo 59. Tamoksifen ve dimetil- β -siklodekstrin çözelti formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, tamoksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	-0.0423	4.28	0.801	905
Hixson Crowel	0.0523	0.479	0.759	6638
Sıfır derece	2.21	27.6	0.672	8827
RRSBW	0.548	-1.32	0.877	303
BTA	0.511	-4.56	0.860	389
Higuchi	13.2	13.9	0.864	496

Tablo 60. Tamoksifen ve sodyum taurokolat çözelti formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, raloksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	-0.0185	4.48	0.842	213
Hixson Crowel	0.0261	0.183	0.825	1340
Sıfır derece	1.41	11.4	0.789	1568
RRSBW	0.566	-2.27	0.935	86.4
BTA	0.549	-5.65	0.929	104
Higuchi	8.11	3.32	0.947	66.6

Lipozomlar için elde edilen kinetik tabloları (Tablo 61, 62, 63) ve tamoksifenin salımının, sadece tamoksifen içeren formülasyonlarda birinci derece, dimetil- β -siklodekstrin ve sodyum tauroklat içeren formülasyonlarda ise RRSWB salım kinetiğine uyum sağladığı görülmüştür.

Tablo 61. Tamoksifen lipozom formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, tamoksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	-0.00120	4.60	0.970	0.212
Hixson Crowel	0.00180	0.00320	0.970	0.623
Sıfır derece	0.116	0.206	0.969	0.635
RRSBW	0.734	-5.88	0.920	0.344
BTA	0.733	-9.98	0.920	0.342
Higuchi	0.589	-0.305	0.910	0.621

Tablo 62. Tamoksifen ve dimetil- β -siklodekstrin lipozom formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, tamoksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	-0.00250	4.60	0.996	0.114
Hixson Crowel	0.00380	0.00240	0.996	0.350
Sıfır derece	0.242	0.161	0.995	0.403
RRSBW	0.870	-5.60	0.996	0.0737
BTA	0.868	-10.3	0.996	0.0794
Higuchi	1.25	-0.940	0.955	1.32

Tablo 63. Tamoksifen ve sodyum taurokolat lipozom formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, tamoksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	-0.00490	4.49	0.483	100.3
Hixson Crowel	0.00720	0.175	0.477	1230
Sıfır derece	0.423	10.8	0.466	1270
RRSBW	0.294	-2.30	0.779	50.4
BTA	0.288	-4.60	0.776	51.9
Higuchi	2.695	7.86	0.680	61.5

Nanopartiküller için elde edilen kinetik tabloları (Tablo 64, 65, 66) ve tamoksifenin salımının tüm nanopartikül geçişlerinde Higuchi salım kinetiğine uyum sağladığı görülmüştür.

Tablo 64. Tamoksifen nanopartikül formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, tamoksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	-0.00210	4.60	0.849	3.53
Hixson Crowel	0.00310	0.0127	0.848	10.2
Sıfır derece	0.199	0.823	0.845	10.4
RRSBW	0.721	-4.99	0.958	3.36
BTA	0.719	-9.037	0.957	3.44
Higuchi	1.13	-0.273	0.965	0.836

Tablo 65. Tamoksifen ve dimetil-β-siklodekstrin nanopartikül formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, tamoksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	-0.00480	4.59	0.867	15.1
Hixson Crowel	0.00730	0.0214	0.865	33.7
Sıfır derece	0.452	1.39	0.861	35.7
RRSBW	0.742	-4.34	0.987	9.75
BTA	0.738	-8.47	0.986	10.2
Higuchi	2.51	-1.019	0.957	5.13

Tablo 66. Tamoksifen ve sodyum taurokolat nanopartikül formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, tamoksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	-0.00330	4.60	0.925	4.11
Hixson Crowel	0.00510	0.00910	0.924	7.53
Sıfır derece	0.321	0.593	0.921	7.97
RRSBW	0.895	-5.159	0.983	5.90
BTA	0.893	-9.91	0.982	5.34
Higuchi	1.75	-1.048	0.982	0.996

Kohleatlar için elde edilen kinetik tabloları (Tablo 67, 68, 69) ve raloksifenin salımının tüm kohleat geçişlerinde Higuchi salım kinetiğine uyum sağladığı görülmüştür.

Tablo 67. Tamoksifen kohleat formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, tamoksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	-0.00130	4.60	0.829	1.73
Hixson Crowel	0.00200	0.00730	0.828	3.93
Sıfır derece	0.130	0.472	0.827	3.99
RRSBW	0.753	-5.56	0.978	1.53
BTA	0.752	-9.74	0.978	1.55
Higuchi	0.735	-0.250	0.957	0.438

Tablo 68. Tamoksifen ve dimetil-β-siklodekstrin kohleat formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, tamoksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	-0.00200	4.59	0.597	11.1
Hixson Crowel	0.00300	0.0310	0.595	50.1
Sıfır derece	0.180	1.99	0.591	50.7
RRSBW	0.672	-4.45	0.720	23.5
BTA	0.670	-8.30	0.719	24.08
Higuchi	1.11	0.810	0.805	5.38

Tablo 69. Tamoksifen ve sodyum taurokolat kohleat formülasyonundan pH 7.4 fosfat tamponunda, tamoksifenin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

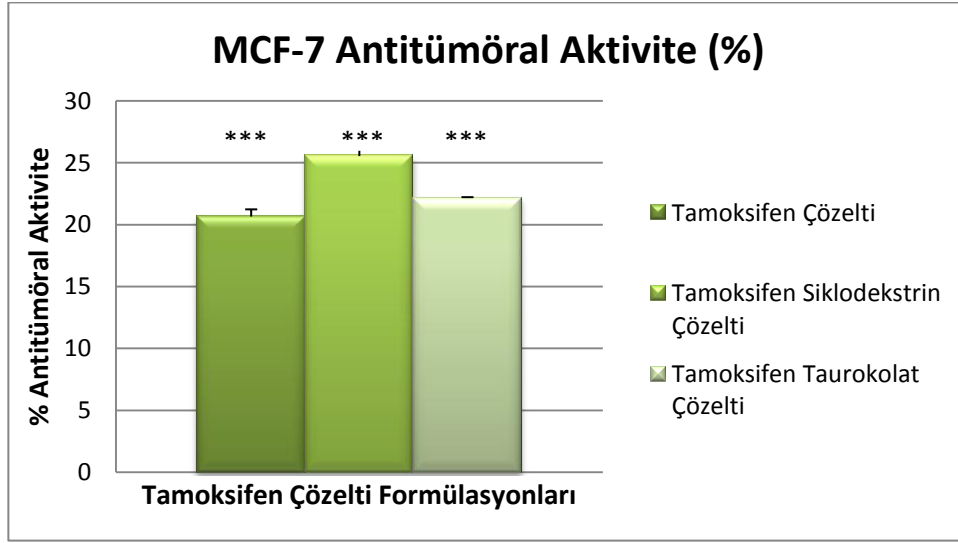
Kinetik model	Kinetik Ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	-0.000500	4.601	0.874	0.211
Hixson Crowel	0.000800	0.0051	0.874	1.28
Sıfır derece	0.0540	0.328	0.873	1.29
RRSBW	0.568	-5.84	0.933	0.125
BTA	0.567	-9.27	0.933	0.126
Higuchi	0.302	0.0362	0.982	0.0307

4.2.1.6. MCF-7 ve MDA MB-231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan Antitümoral Aktivite Tayinine Ait Bulgular

4.2.1.6.1. MCF-7 Hücreleri Kullanılarak Yapılan Antitümoral Aktivite Tayinine Ait Bulgular

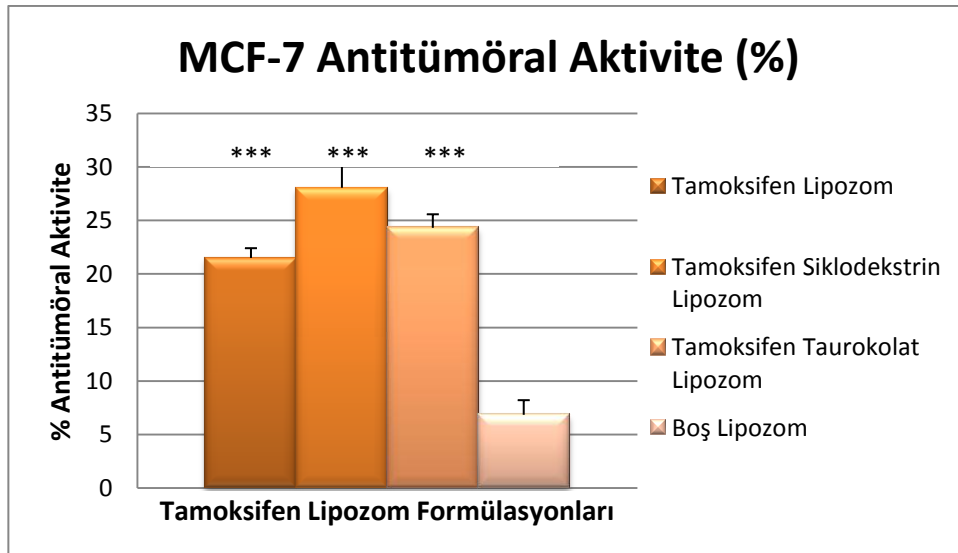
Antitümöral aktivite çalışmalarının yapılışı Bölüm 3.2.1.1.6'da açıklanmıştır. Formülasyonlarda in vivo deneylerde kullanılan doz olan 120 µg, 0.1 mL'de olacak şekilde ayarlanmıştır. Sonuçlar kontrol grupları yani yalnızca DMEM ile inkübe edilmiş kuyucuklar ile karşılaştırılarak Bölüm 3.2.2.1.6'da belirtildiği gibi 3.2.1.1.6'da verilen formüle göre yapılmıştır.

Tamoksifen çözelti formülasyonları ile MCF-7 hücre serilerinde elde edilen antitumoral aktivite sonuçları Şekil 188'de verilmiştir.



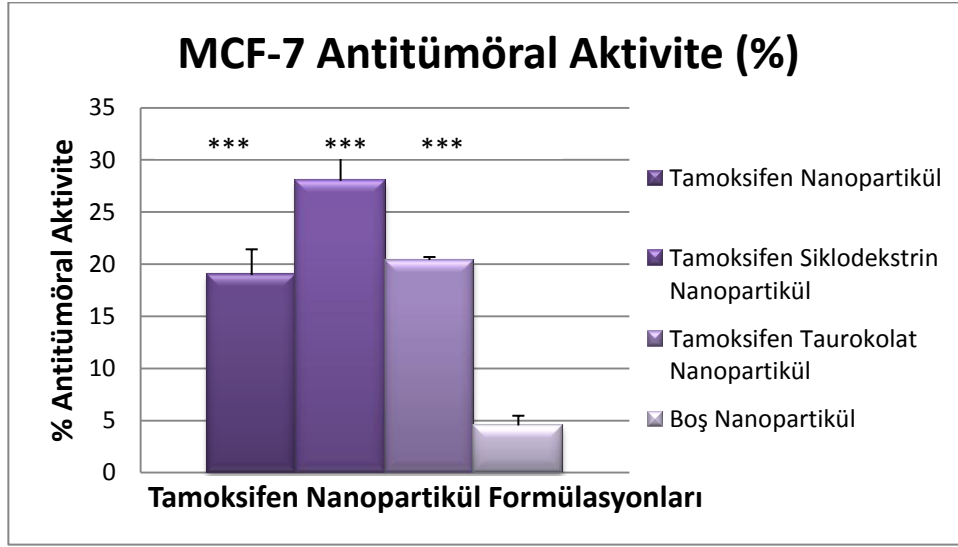
Şekil 188. Tamoksifen çözelti formülasyonları ile MCF-7 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları (***) $p < 0.001$) (Başlangıç hücre sayısı 1×10^4)

Tamoksifen lipozom formülasyonları ile elde edilen antitumoral aktivite sonuçları Şekil 189’da verilmiştir.



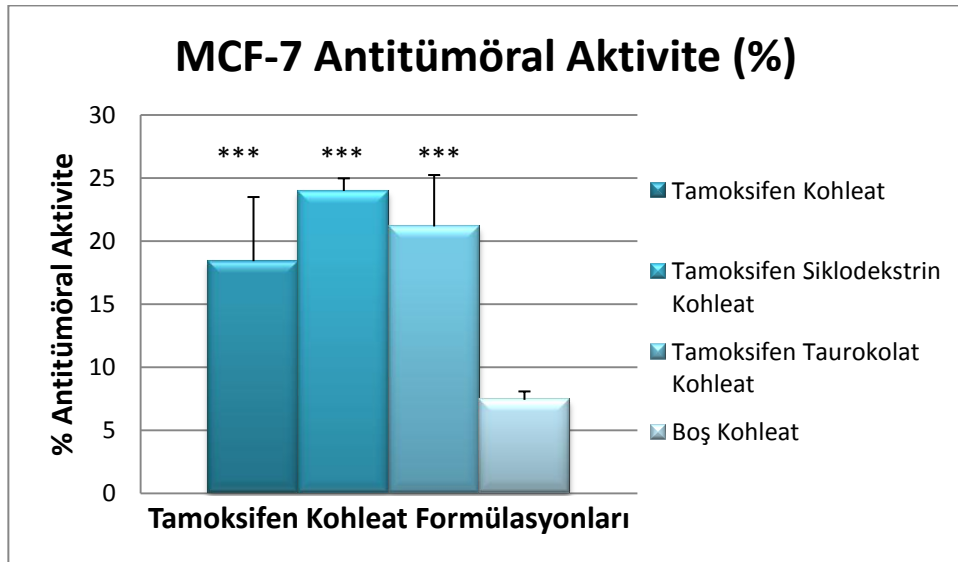
Şekil 189. Tamoksifen lipozom formülasyonları ile MCF-7 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları (***) $p < 0.001$) (Başlangıç hücre sayısı 1×10^4)

Tamoksifen nanopartikül formülasyonları ile elde edilen antitumoral aktivite sonuçları Şekil 190’da verilmiştir.



Şekil 190. Tamoksifen nanopartikül formülasyonları ile MCF-7 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları (***) ($p < 0.001$) (Başlangıç hücre sayısı 1×10^4)

Tamoksifen kohleat formülasyonları ile elde edilen antitümöral aktivite sonuçları Şekil 191’de verilmiştir.

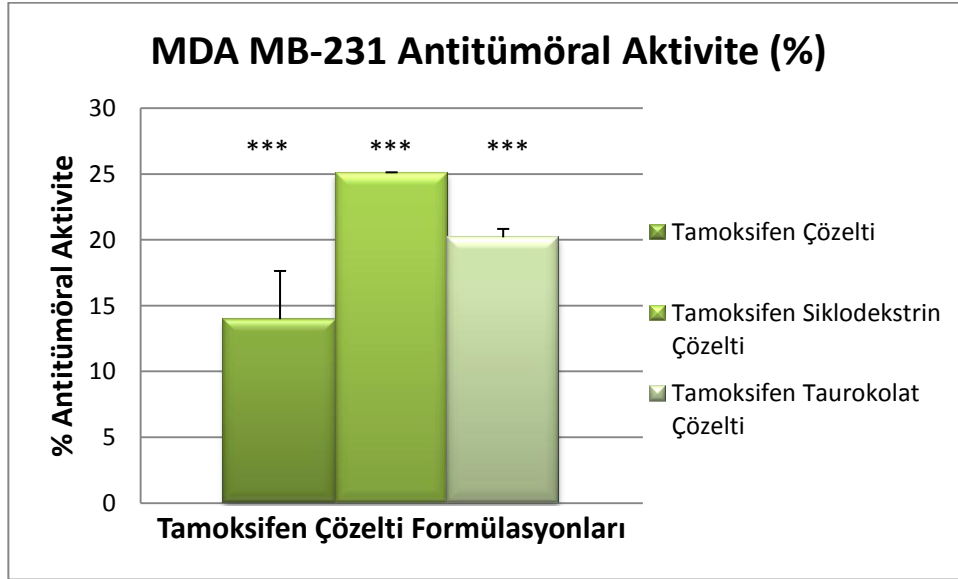


Şekil 191. Tamoksifen kohleat formülasyonları ile MCF-7 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları (***) ($p < 0.001$) (Başlangıç hücre sayısı 1×10^4)

4.2.1.6.2. MDA MB-231 Kullanılarak Yapılan Antitümöral Aktivite Tayinine Ait Bulgular

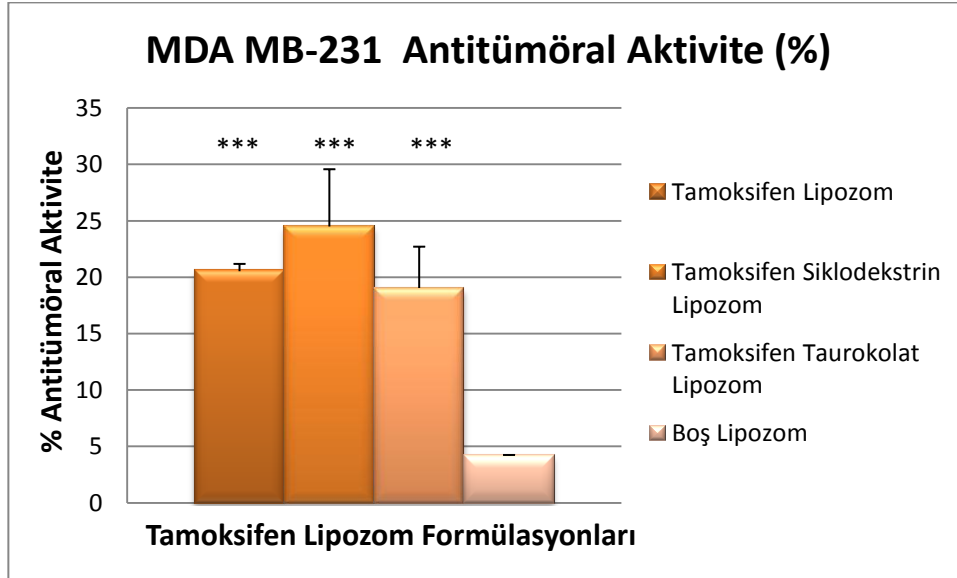
Antitümöral aktivite çalışmalarının yapılışı Bölüm 3.2.2.1.6'da açıklanmıştır. Formülasyonlarda in vivo deneylerde kullanılan doz 0.1 mL'de olacak şekilde ayarlanmıştır. Sonuçlar kontrol grupları yani yalnızca DMEM ile inkübe edilmiş kuyucuklar ile karşılaştırılarak Bölüm 3.2.1.1.6'daki formüle göre yapılmıştır.

Tamoksifen çözelti formülasyonları ile MDA MB-231 hücre serilerinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları Şekil 192'de verilmiştir.



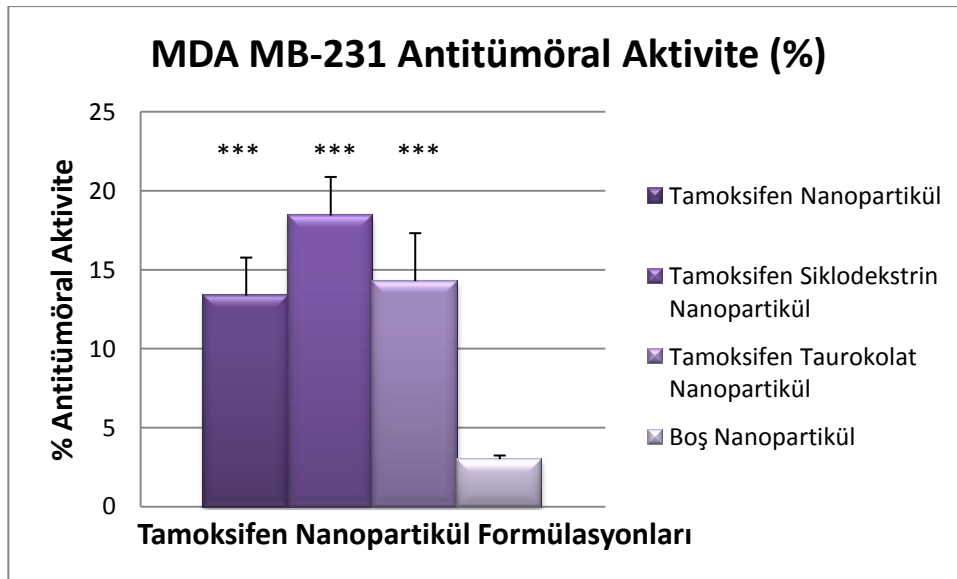
Şekil 192. Tamoksifen çözelti formülasyonları ile MDA MB-231 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları (*) ($p < 0.001$) (Başlangıç hücre sayısı 1×10^4)**

Tamoksifen lipozom formülasyonları ile elde edilen antitümöral aktivite sonuçları Şekil 193'de verilmiştir.



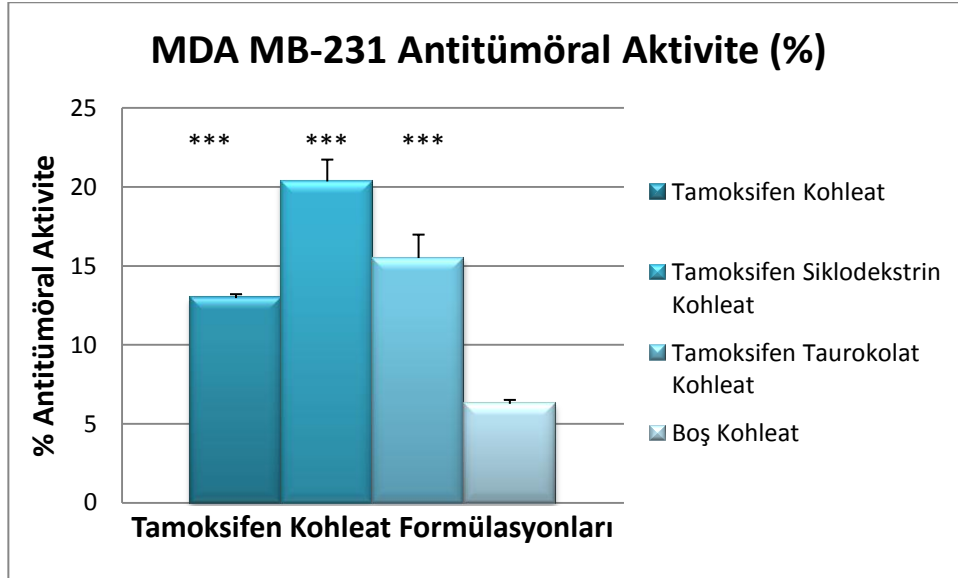
Şekil 193. Tamoksifen lipozom formülasyonları ile MDA MB-231 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları (***) ($p < 0.001$) (Başlangıç hücre sayısı 1×10^4)

Tamoksifen nanopartikül formülasyonları ile elde edilen antitumoral aktivite sonuçları Şekil 194’de verilmiştir.



Şekil 194. Tamoksifen nanopartikül formülasyonları ile MDA MB-231 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları (***) ($p < 0.001$) (Başlangıç hücre sayısı 1×10^4)

Tamoksifen kohleat formülasyonları ile elde edilen antitümoral aktivite sonuçları Şekil 195’de verilmiştir.



Şekil 195. Tamoksifen kohleat formülasyonları ile MDA MB-231 hücre serisinde elde edilen antitümöral aktivite sonuçları (***) ($p < 0.001$) (Başlangıç hücre sayısı 1×10^4)

4.2.1.7. MCF-7 ve MDA MB-231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan MMP-2 Enzim İnhibisyonu Çalışmalarına Ait Bulgular

Bölüm 4.1.1.7, Şekil 91’de belirtilen kalibrasyon grafiği kullanarak Tamoksifen formülasyonlarının MCF 7 ve MDA-MB 231 hücrelerindeki %MMP inhibisyonu değerleri kontrol gruplarıyla kıyaslanarak hesaplanmıştır.

4.2.1.7.1. MCF-7 Hücreleri Kullanılarak Yapılan MMP-2 Enzim İnhibisyonu Çalışmalarına Ait Bulgular

Tamoksifen formülasyonlarının MCF 7 hücrelerindeki %MMP-2 inhibisyonu değerleri kontrol gruplarıyla kıyaslanarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 70’de görülmektedir.

Tablo 70. Tamoksifen formülasyonlarının MCF 7 hücrelerindeki %MMP 2 inhibisyonu değerleri (n=3)

Formülasyon Tipi	%MMP 2 İnhibisyonu $\pm$ S.S
Tamoksifen çözeltisi	27.7 $\pm$ 4.5
Tamoksifen ve sodyum taurokolat içeren çözelti	29.9 $\pm$ 4.8
Tamoksifen ve dimetil- β -siklodekstrin içeren çözelti	33.9 $\pm$ 1.4
Tamoksifen lipozomları	29.4 $\pm$ 2.2
Tamoksifen ve sodyum taurokolat içeren lipozomlar	30.1 $\pm$ 4.3
Tamoksifen ve dimetil- β -siklodekstrin lipozomları	39.4 $\pm$ 4.9
Tamoksifen içermeyen lipozomlar	8.58 $\pm$ 1.29
Tamoksifen nanopartikülleri	29.2 $\pm$ 5.2
Tamoksifen ve sodyum taurokolat içeren nanopartiküller	30.1 $\pm$ 2.1
Tamoksifen ve dimetil- β -siklodekstrin nanopartiküller	32.7 $\pm$ 1.8
Tamoksifen içermeyen nanopartiküller	6.36 $\pm$ 2.25
Tamoksifen kohleatlar	21.3 $\pm$ 4.5
Tamoksifen ve sodyum taurokolat içeren kohleatlar	20.1 $\pm$ 1.7
Tamoksifen ve dimetil- β -siklodekstrin kohleatlar	32.3 $\pm$ 3.5
Tamoksifen içermeyen kohleatlar	10.1 $\pm$ 2.4

4.2.1.7.2. MDA MB-231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan MMP-2 Enzim İnhibisyonu Çalışmalarına Ait Bulgular

Tamoksifen formülasyonlarının MDA-MB 231 hücrelerindeki %MMP-2 inhibisyonu değerleri kontrol gruplarıyla kıyaslanarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 71’de görülmektedir.

Tablo 71. Tamoksifen formülasyonlarının MDA-MB 231 hücrelerindeki %MMP 2 inhibisyonu değerleri (n=3)

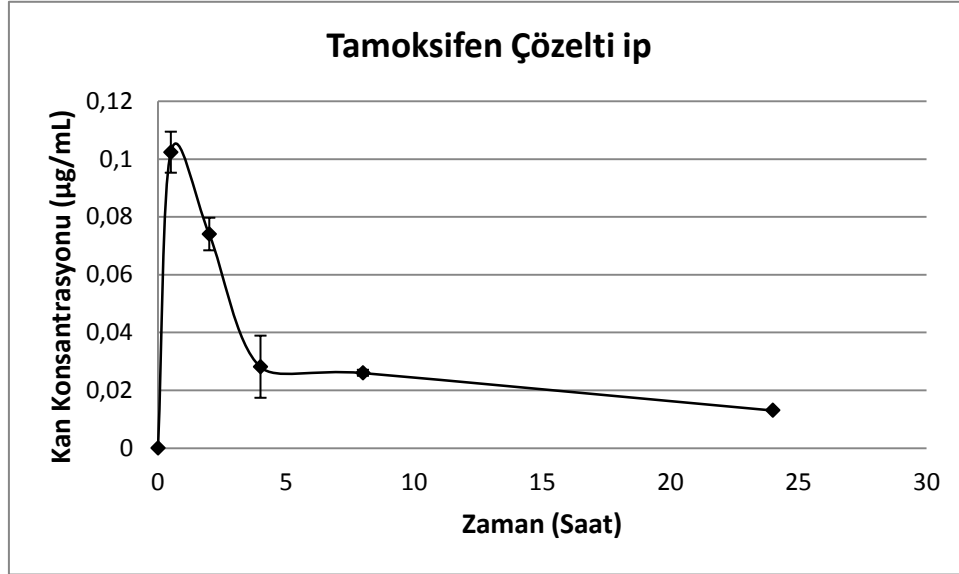
Formülasyon Tipi	%MMP 2 İnhibisyonu $\pm$ S.S
Tamoksifen çözeltisi	16.2 $\pm$ 2.9
Tamoksifen ve sodyum taurokolat içeren çözelti	17.6 $\pm$ 1.5
Tamoksifen ve dimetil- β -siklodekstrin içeren çözelti	20.4 $\pm$ 1.7
Tamoksifen lipozomları	16.1 $\pm$ 1.7
Tamoksifen ve sodyum taurokolat içeren lipozomlar	20.1 $\pm$ 1.9
Tamoksifen ve dimetil- β -siklodekstrin lipozomları	28.4 $\pm$ 3.2
Tamoksifen içermeyen lipozomlar	8.92 $\pm$ 2.66
Tamoksifen nanopartikülleri	18.1 $\pm$ 2.3
Tamoksifen ve sodyum taurokolat içeren nanopartiküller	24.7 $\pm$ 1.6
Tamoksifen ve dimetil- β -siklodekstrin nanopartiküller	24.03 $\pm$ 3.16
Tamoksifen içermeyen nanopartiküller	5.31 $\pm$ 2.25
Tamoksifen kohleatlar	10.3 $\pm$ 2.6
Tamoksifen ve sodyum taurokolat içeren kohleatlar	14.2 $\pm$ 3.0
Tamoksifen ve dimetil- β -siklodekstrin kohleatlar	18.2 $\pm$ 1.2
Tamoksifen içermeyen kohleatlar	6.83 $\pm$ 2.92

4.2.2. Tamoksifen Sitrat Etkin Maddesi ile Yapılan İn Vivo Çalışmalara Ait Bulgular

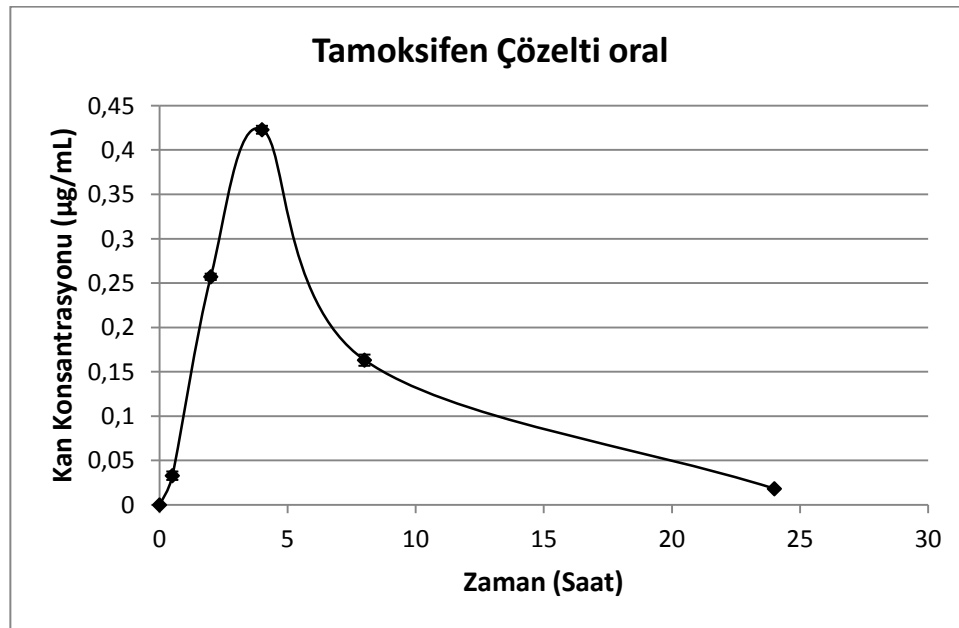
4.2.2.1. Balb-C tipi Sağlıklı Dişi Farelerle Yapılan İn Vivo Çalışmalara Ait Bulgular

İn vivo çalışmalar Bölüm 3.2.2.2’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş, farelere 0.1 mL serum fizyolojik içinde, raloksifen formülasyonlarıyla kıyaslama yapabilmek için raloksifen dozu olarak

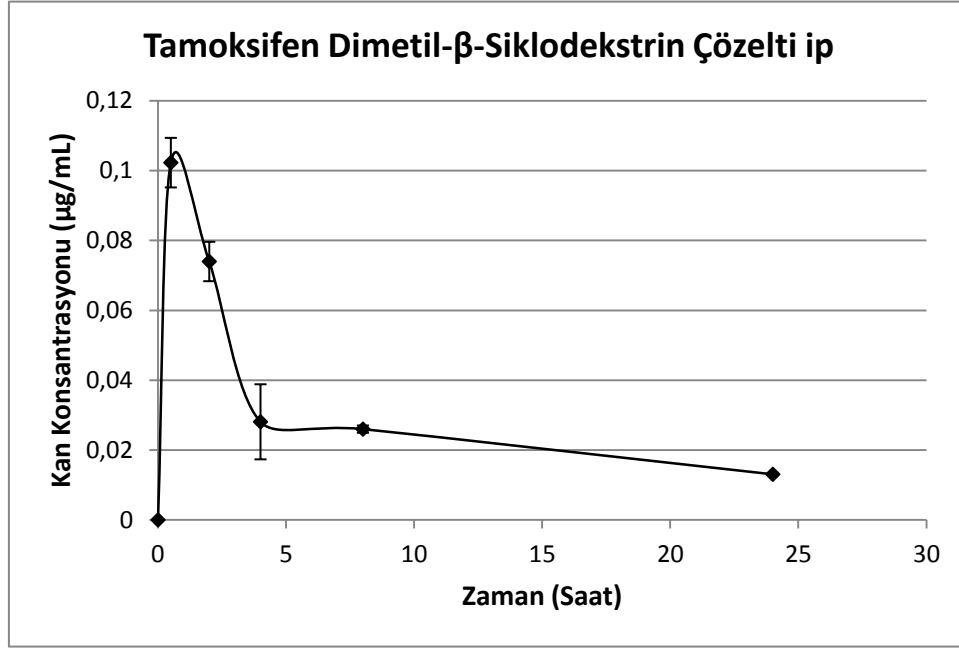
belirlenen 120 µg, tamoksifen formülasyonlarında da uygulanmıştır. Tamoksifen içeren formülasyonlar intraperitoneal ve oral yollarla uygulanarak Şekil 196-219'da verilen plazma konsantrasyon-zaman profilleri elde edilmiştir.



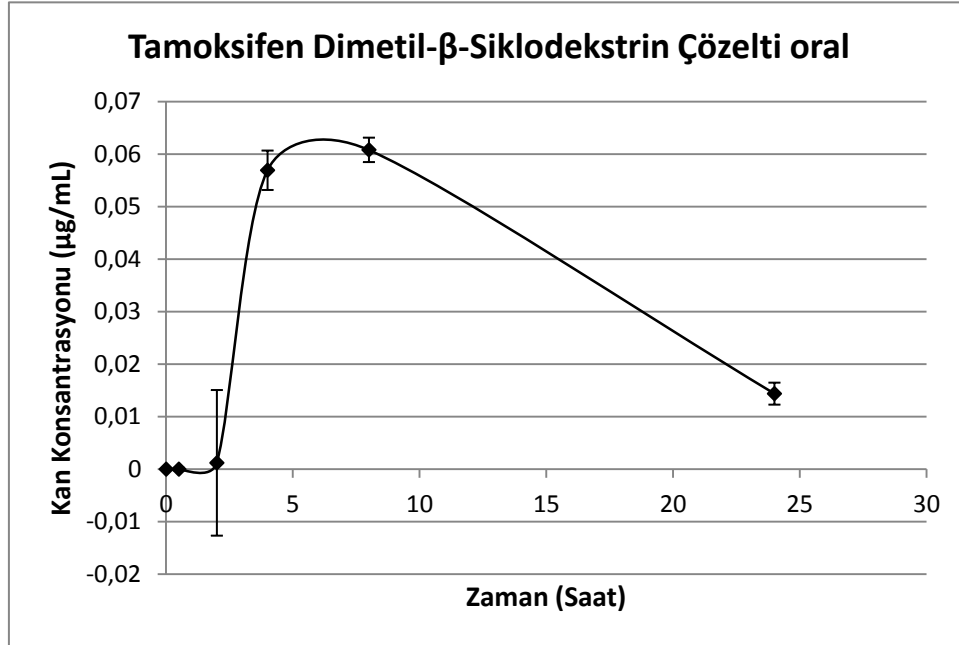
Şekil 196. Tamoksifen çözeltisinin ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



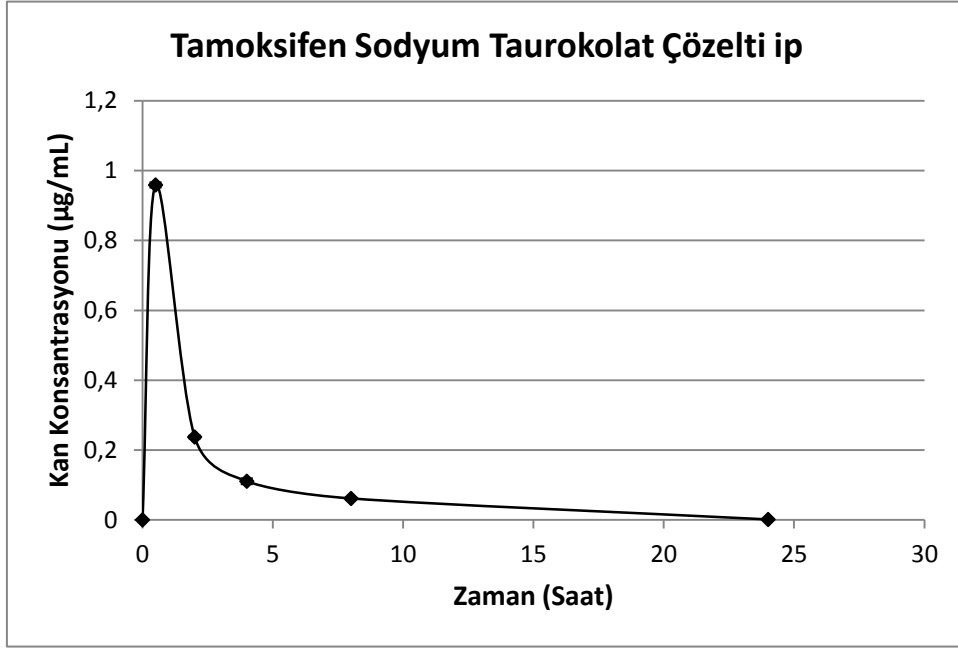
Şekil 197. Tamoksifen çözeltisinin oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



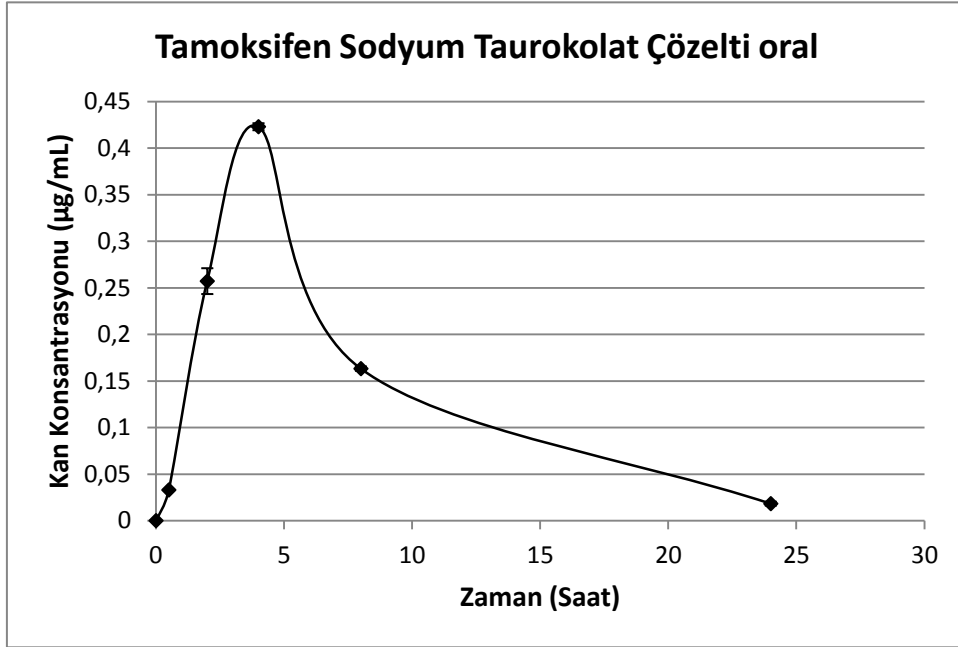
Şekil 198. Tamoksifen dimetil- β -siklodekstrin çözeltisinin ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



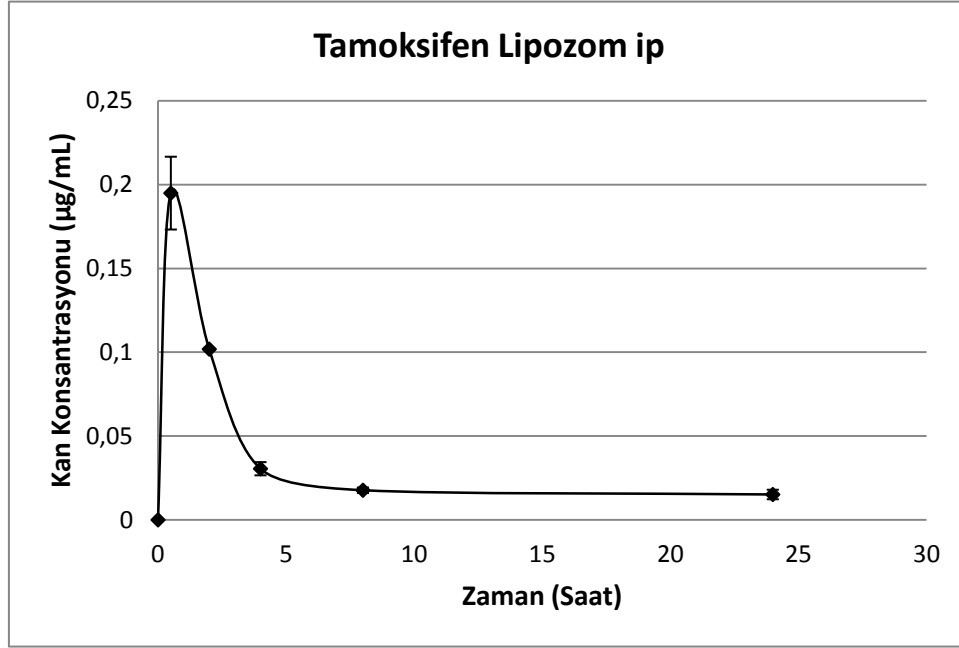
Şekil 199. Tamoksifen dimetil- β -siklodekstrin çözeltisinin oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



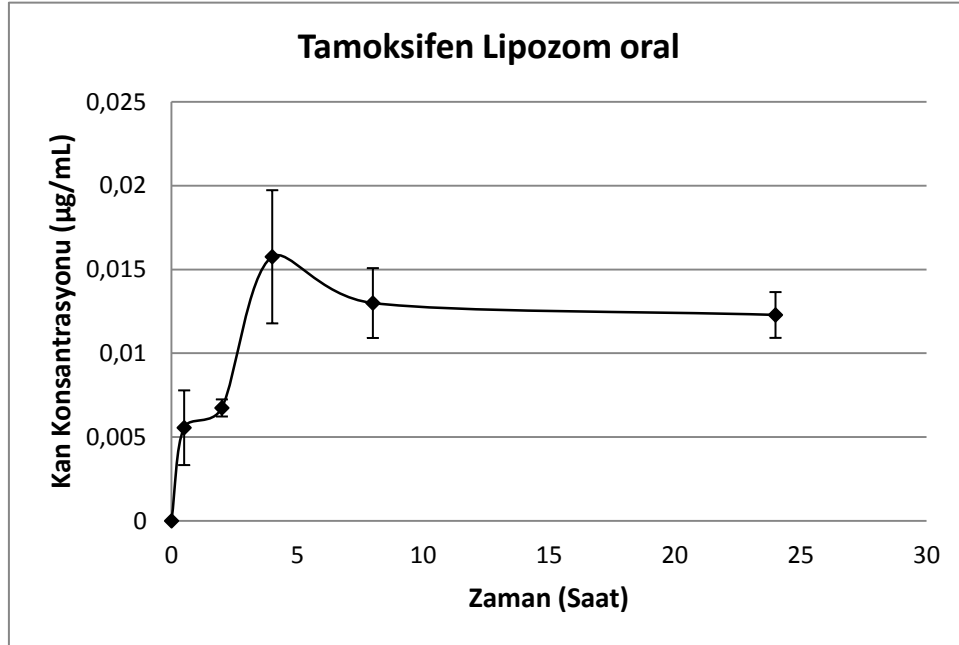
Şekil 200. Tamoksifen sodyum taurokolat çözeltisinin ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



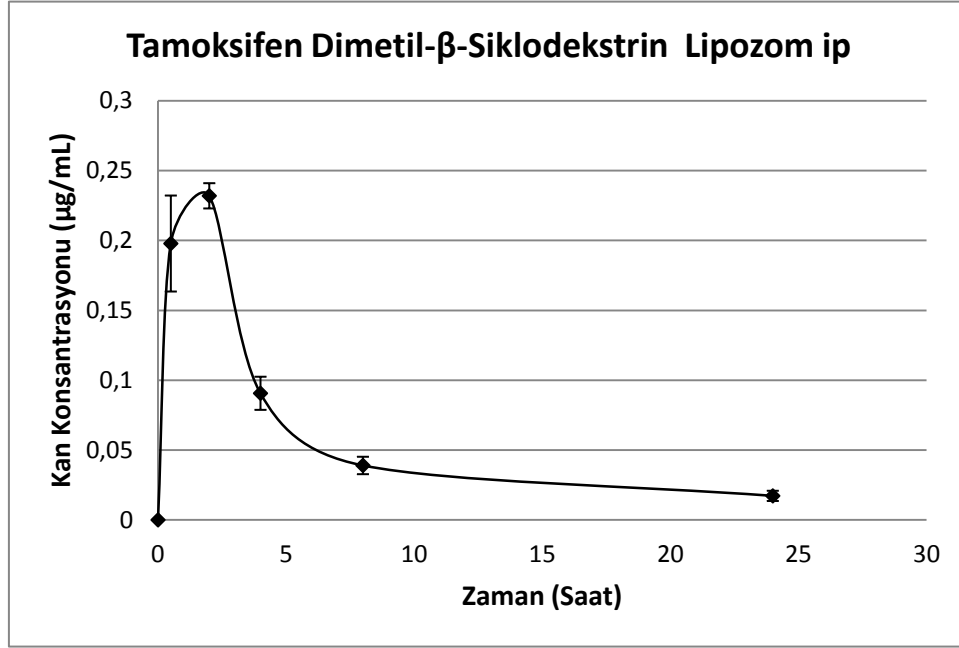
Şekil 201. Tamoksifen sodyum taurokolat çözeltisinin oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



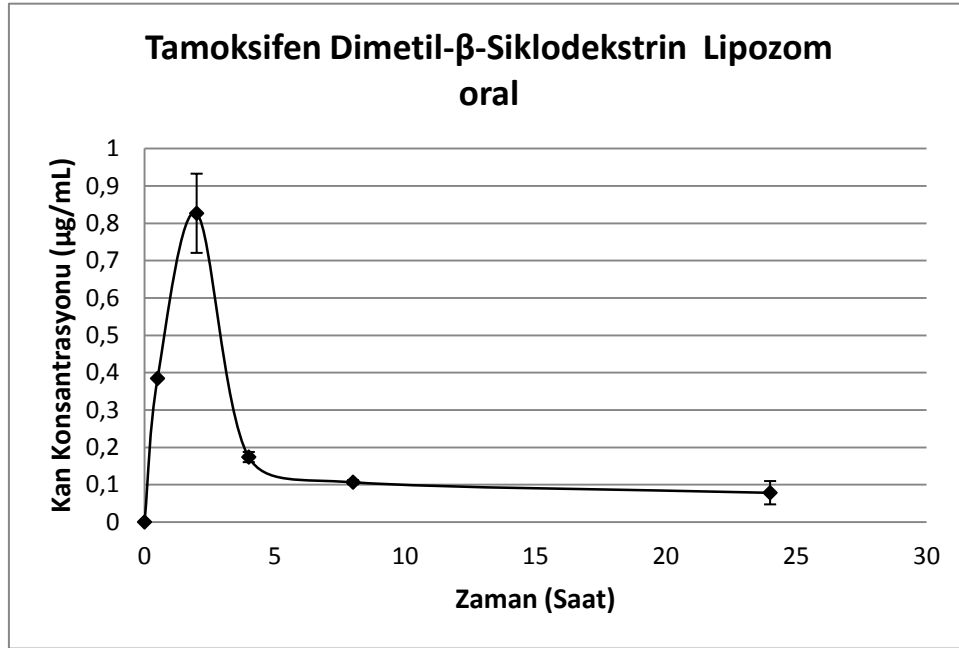
Şekil 202. Tamoksifen lipozomlarının ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



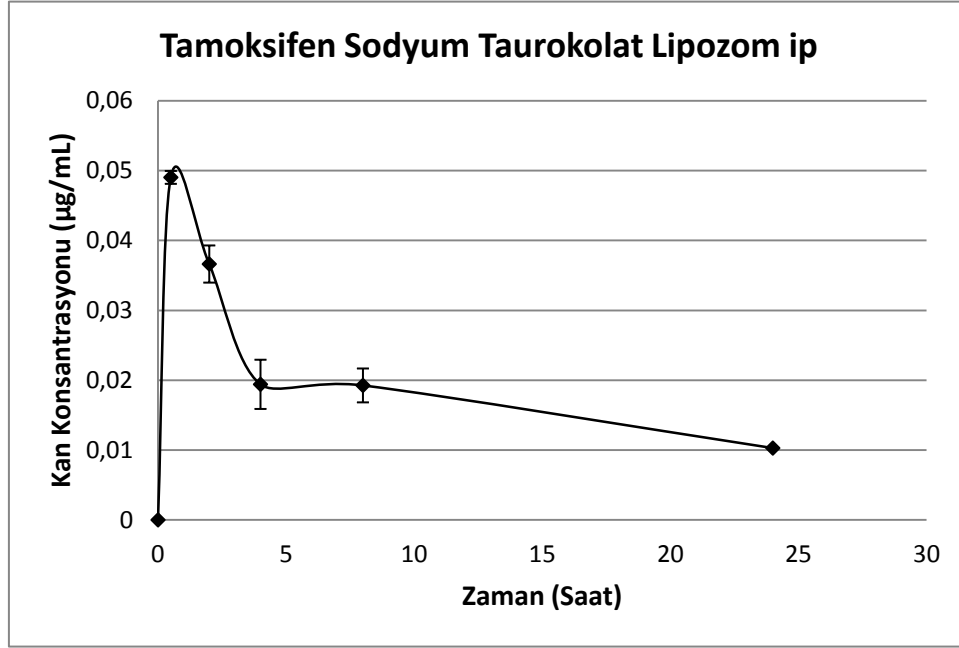
Şekil 203. Tamoksifen lipozomlarının oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



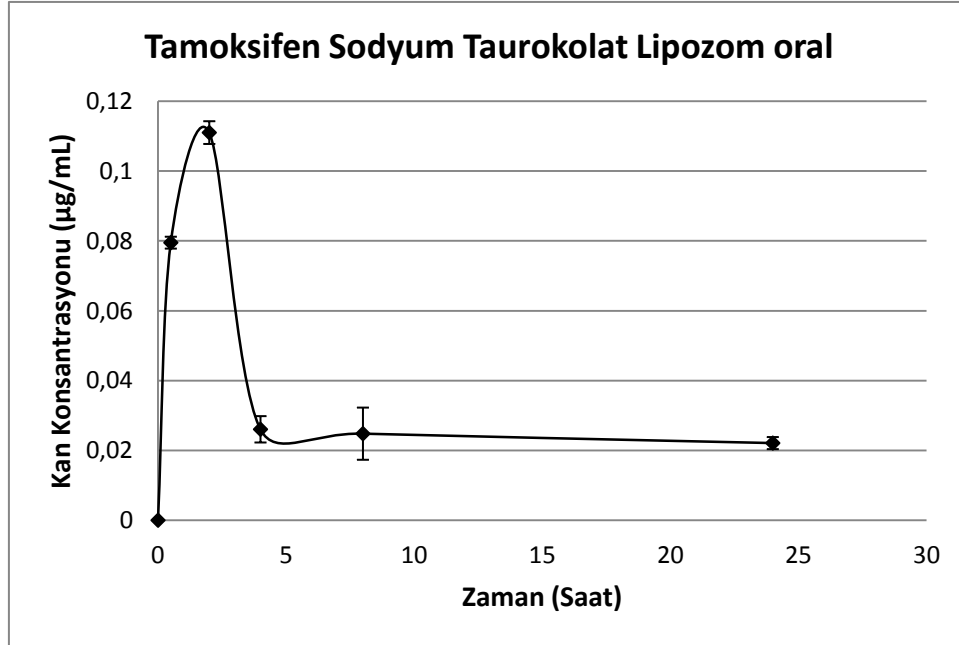
Şekil 204. Tamoksifen dimetil- β -siklodekstrin lipozomlarının ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



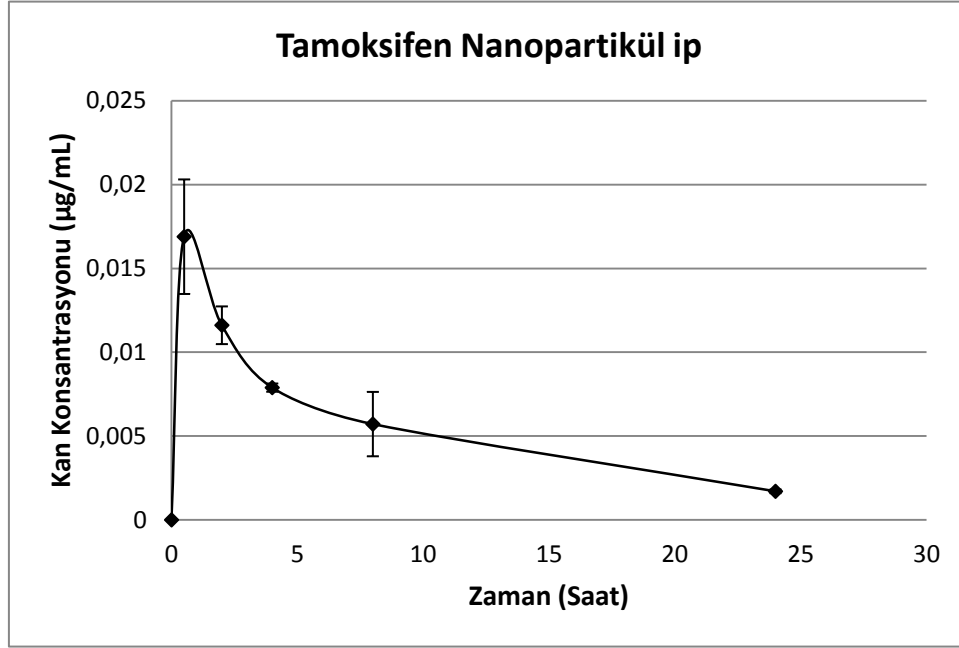
Şekil 205. Tamoksifen dimetil- β -siklodekstrin lipozomlarının oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



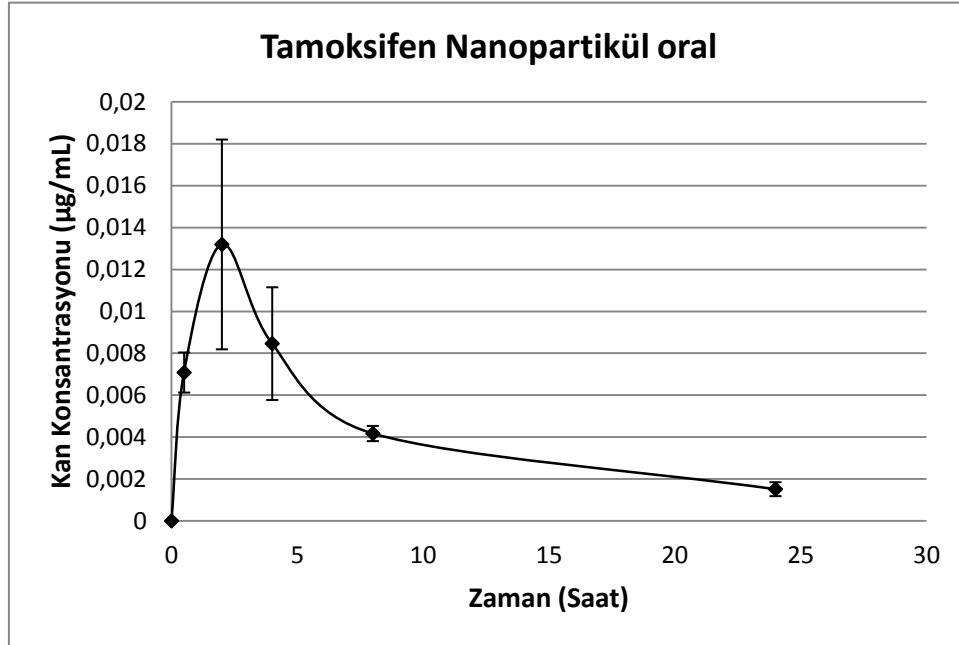
Şekil 206. Tamoksifen sodyum taurokolat lipozomlarının ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



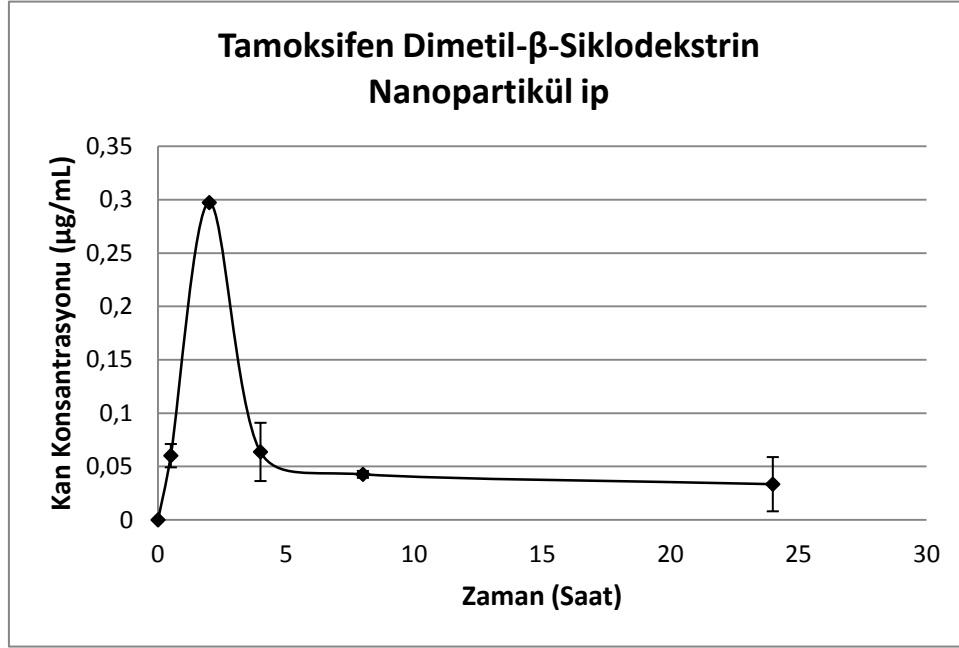
Şekil 207. Tamoksifen sodyum taurokolat lipozomlarının oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



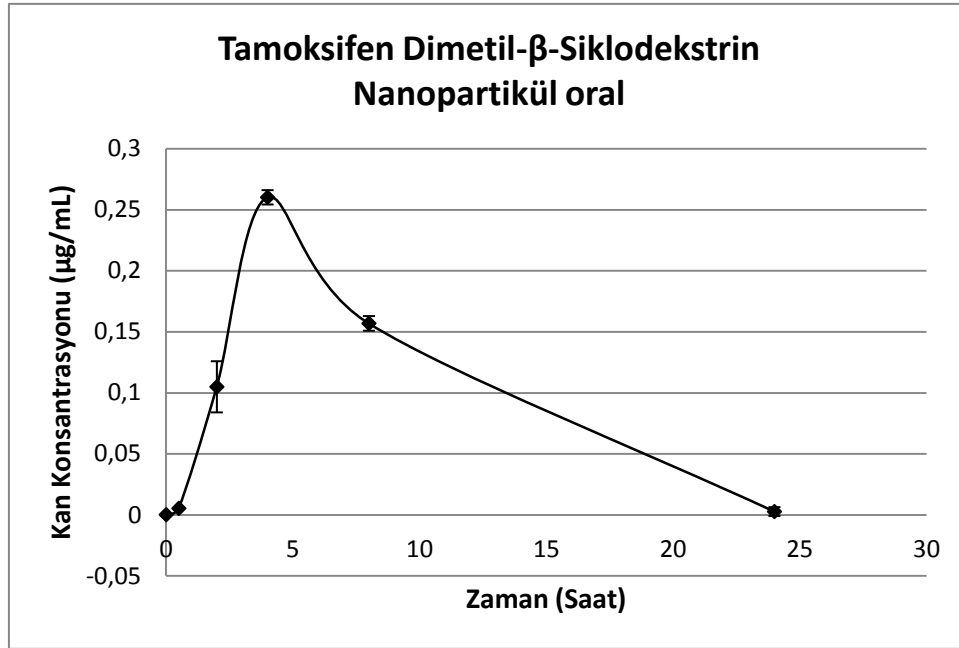
Şekil 208. Tamoksifen nanopartiküllerinin ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



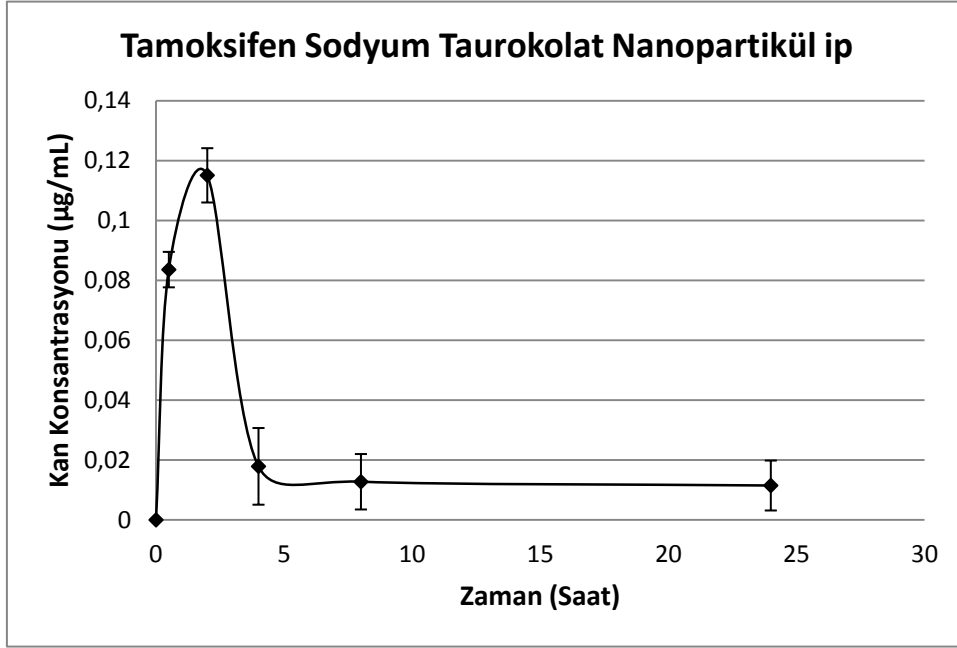
Şekil 209. Tamoksifen nanopartiküllerinin oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



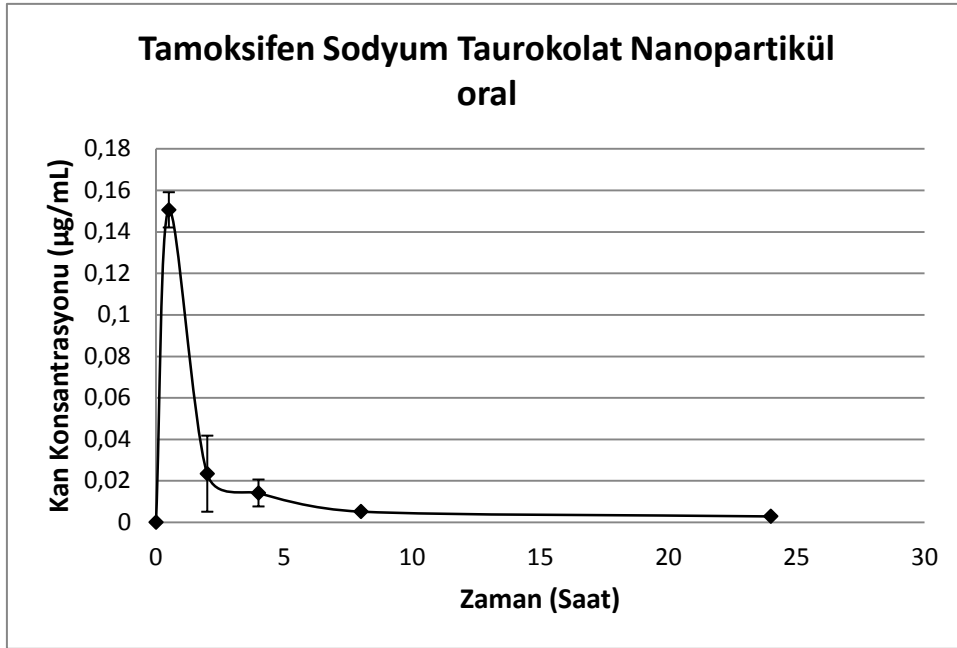
Şekil 210. Tamoksifen dimetil- β -diklodekstrin nanopartiküllerinin ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



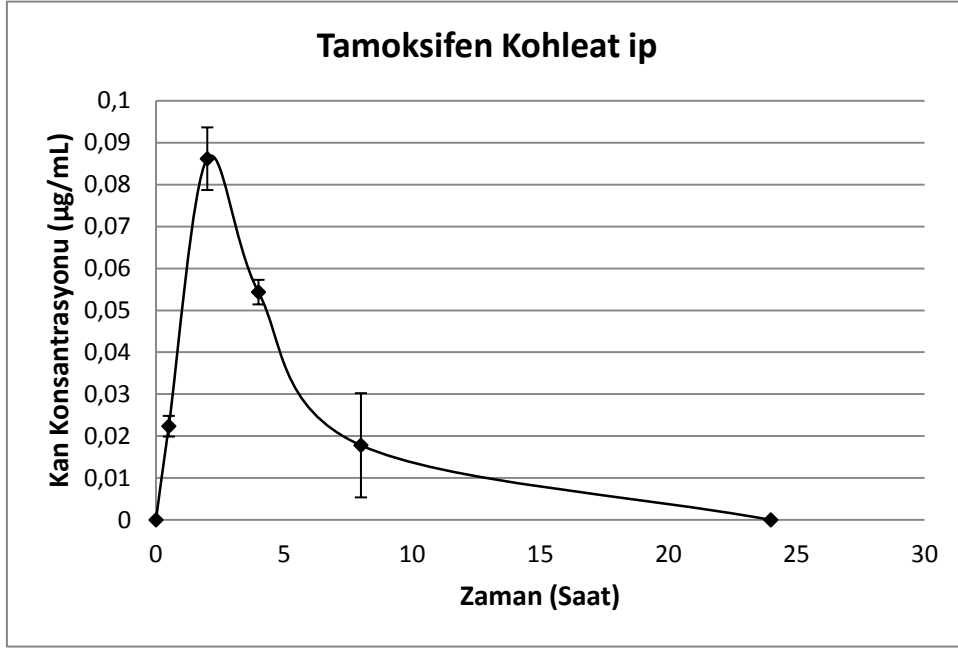
Şekil 211. Tamoksifen dimetil- β -diklodekstrin nanopartiküllerinin oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



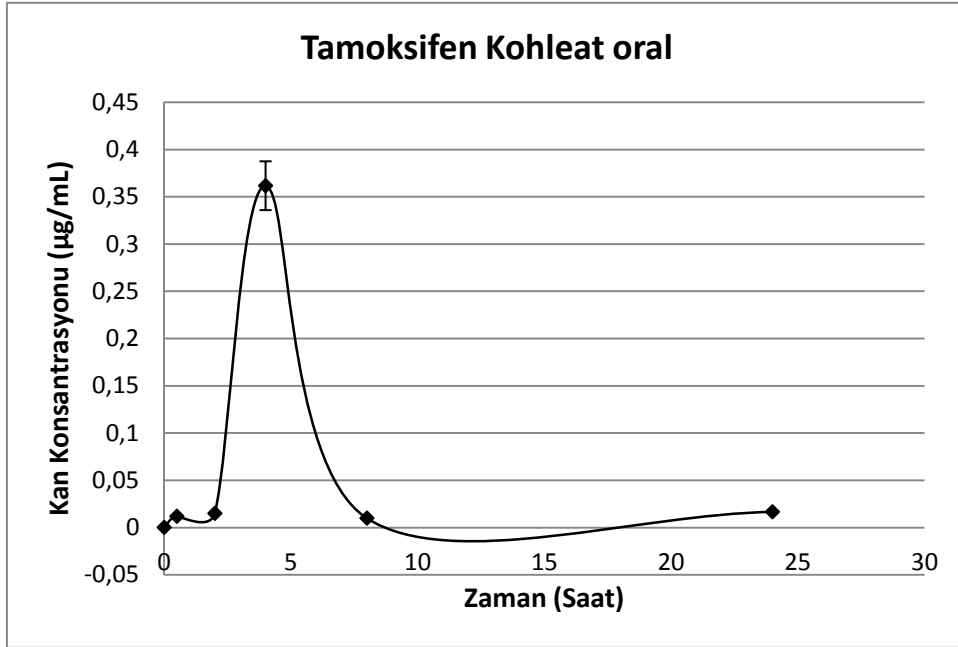
Şekil 212. Tamoksifen sodyum taurokolat nanopartiküllerinin ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



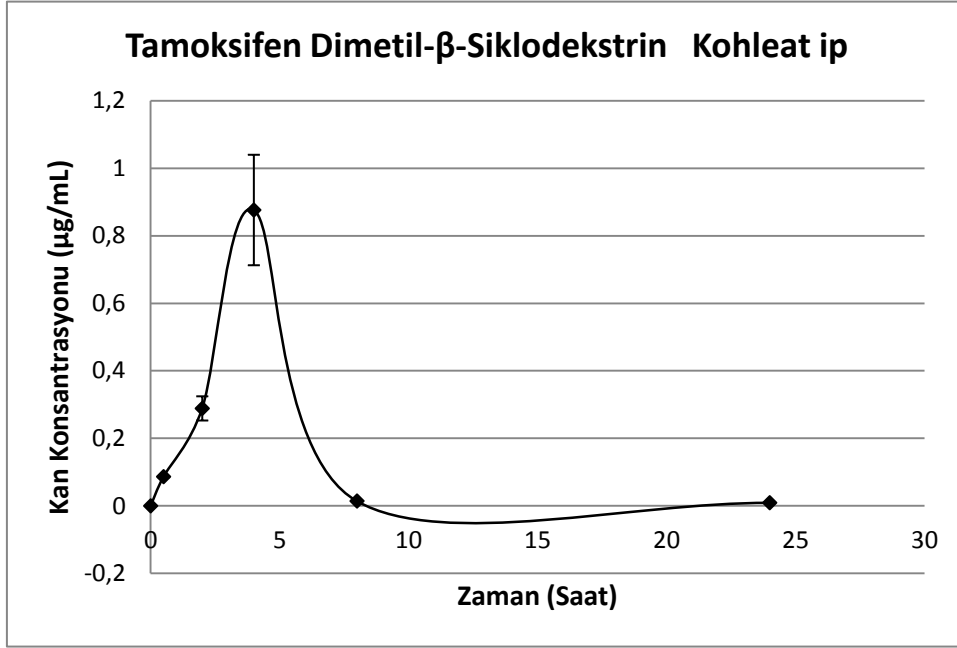
Şekil 213. Tamoksifen sodyum taurokolat nanopartiküllerinin oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



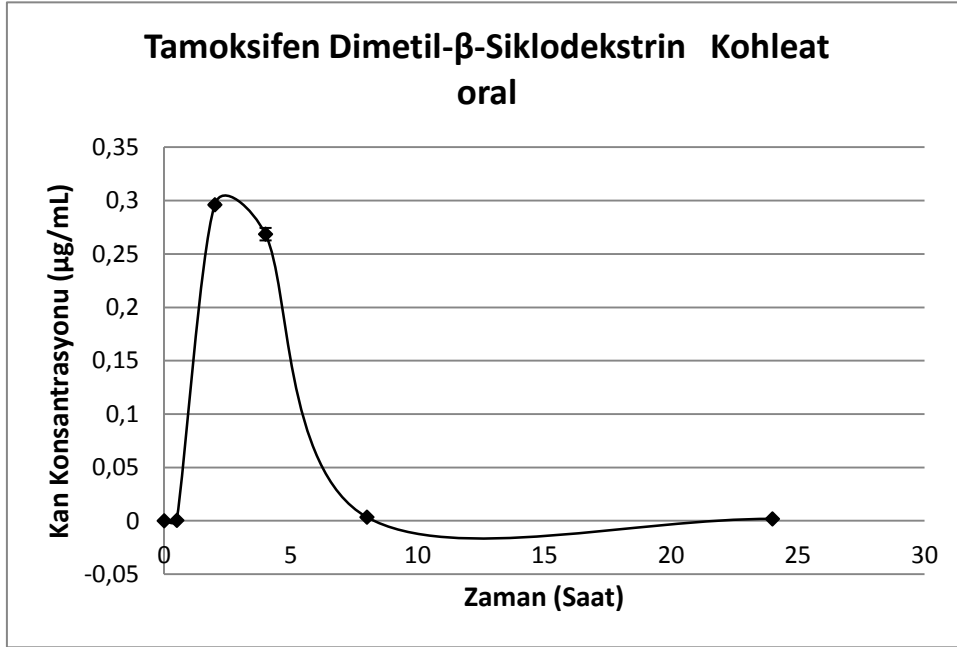
Şekil 214. Tamoksifen kohleatlarının ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



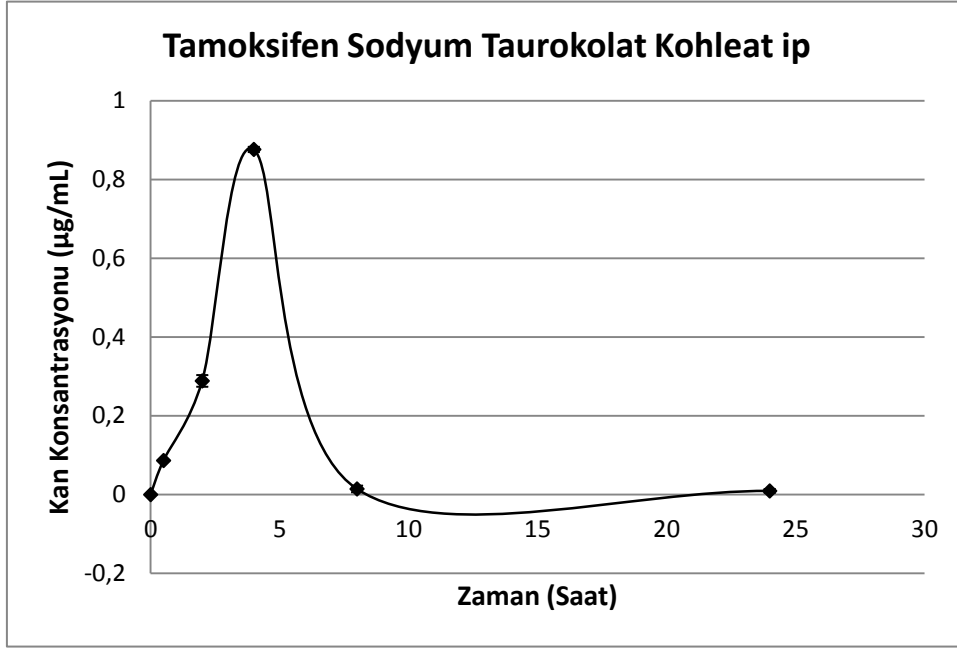
Şekil 215. Tamoksifen kohleatlarının oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



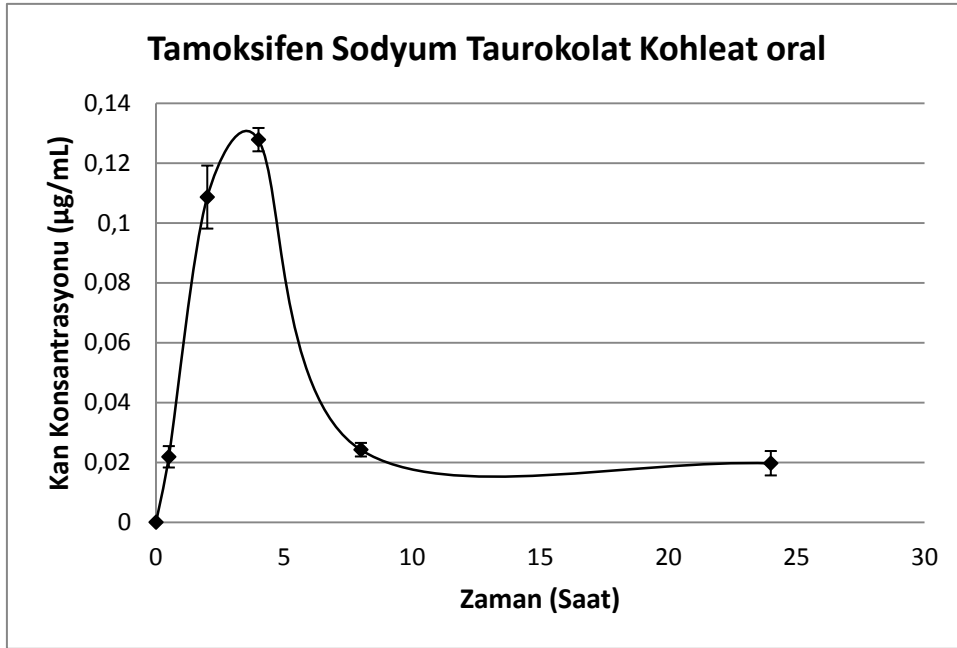
Şekil 216. Tamoksifen dimetil- β -siklodekstrin kohleatlarının ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



Şekil 217. Tamoksifen dimetil- β -siklodekstrin kohleatlarının oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)



Şekil 218. Tamoksifen sodyum taurokolat nanopartiküllerinin ip olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)

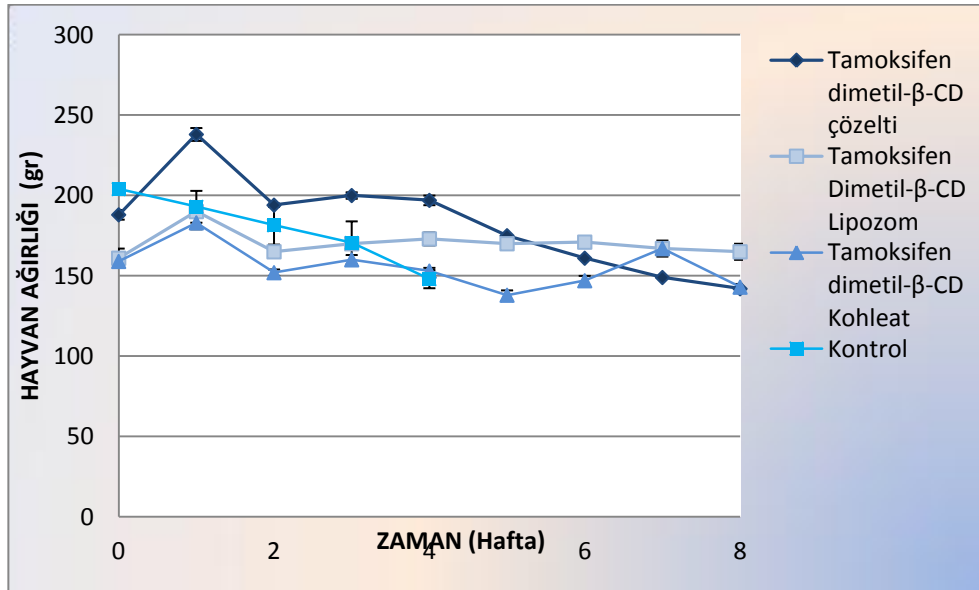


Şekil 219. Tamoksifen sodyum taurokolat nanopartiküllerinin oral olarak farelere uygulanması sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman grafiği (n=6)

4.2.2.2. Sprague Dawley Cinsi Meme Tümörü Oluşturulmuş Dişi Sıçanlarla Yapılan İn Vivo Çalışmalara Ait Bulgular

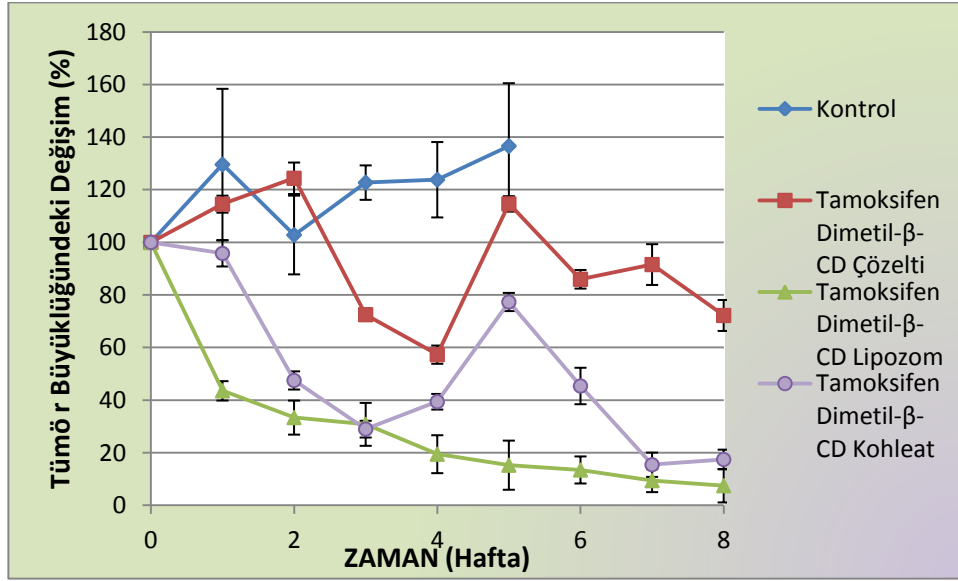
Çalışmanın bu kısmında, in vitro çalışmalarda en iyi permeabilite katsayısına sahip formülasyonlar tamoksifen dimetil- β -CD lipozom ve tamoksifen dimetil- β -CD kohleatları ile kıyaslama yapabilmek amacıyla tamoksifen dimetil- β -CD çözelti formülasyonları meme tümörlü sıçanlara 8 hafta boyunca oral yolla uygulandı.

Çalışma Bölüm 3.2.2.2.2'de açıklandığı gibi yapılmıştır. Şekil 220'de hayvan ağırlıklarının hiçbir uygulama yapılmayan tümörlü sıçan kontrol grubu kabul edilerek çizilen grafiği görülmektedir.



Şekil 220. 8 hafta süresince oral uygulama yapılan sıçanların ağırlıklarındaki değişim (n=3)

Sıçanların tümörleri 8 hafta boyunca her hafta düzenli ölçülerek tümör alanları hesaplanmıştır. Başlangıç tümör alanları her grup için 100 birim kabul edilerek tümör alanlarındaki %değişim hesaplanmıştır. Tümör alanlarındaki %değişim Şekil 221'de görülmektedir.

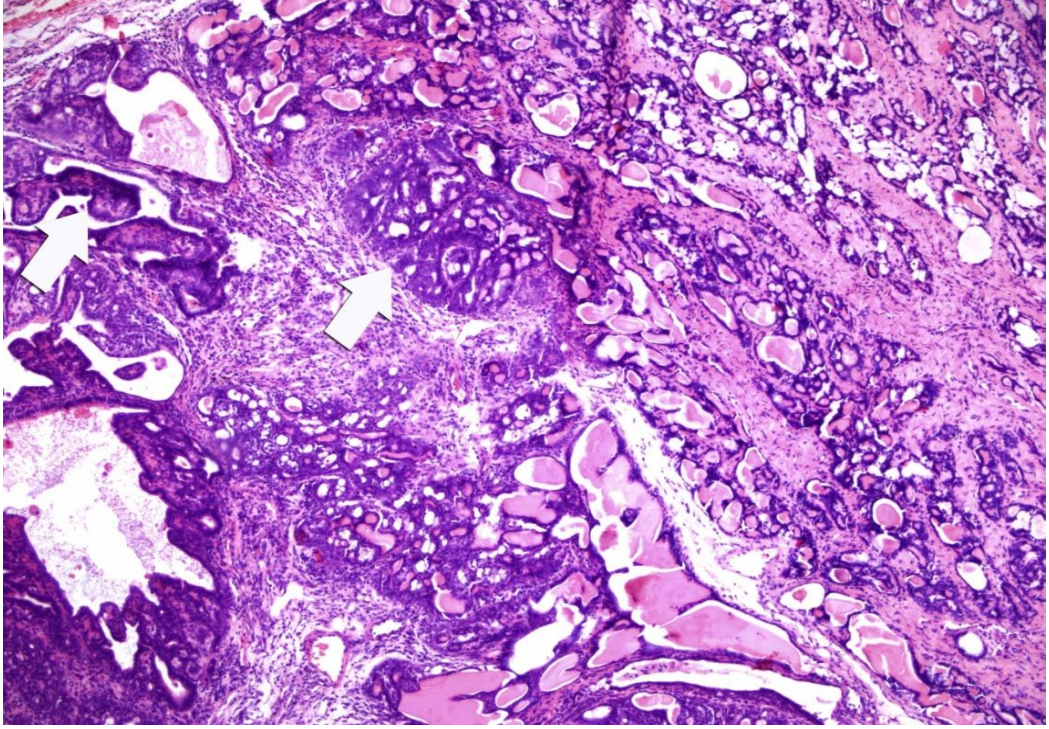


Şekil 221. 8 hafta süresince oral uygulama yapılan sıçanların tümör alanlarındaki değişim (n=3)

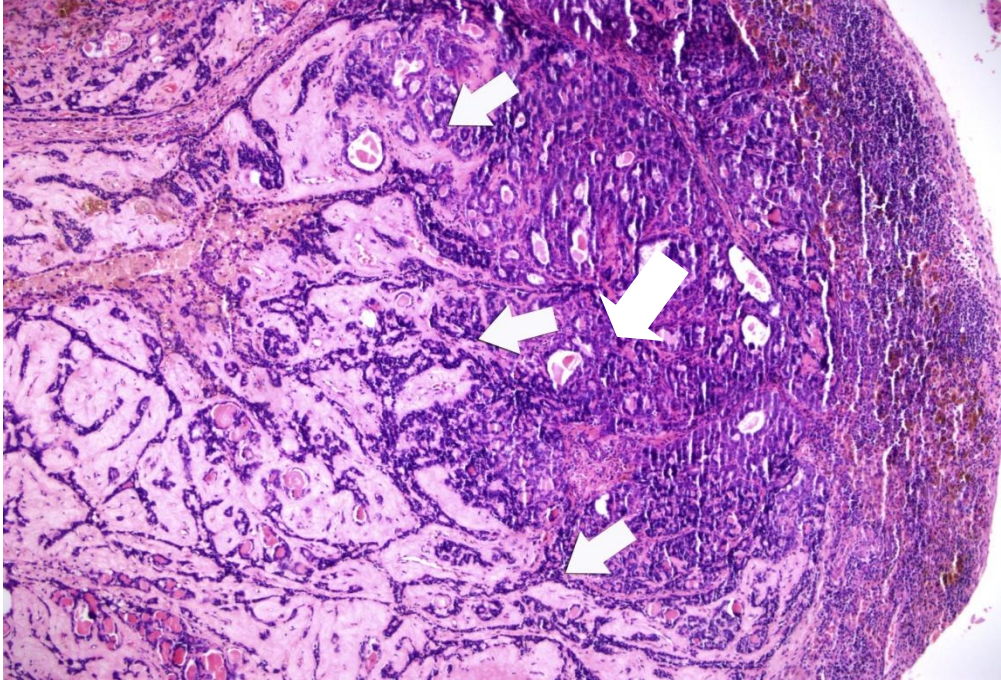
4.2.2.3. Histopatoloji Çalışmalarına Ait Bulgular

Yapılan incelemede malignite olup olmadığı, varsa malignitenin cinsi ve tedaviye yanıtı değerlendirildi. Tedaviye yanıt tümörün içerdiği fibrozis ve nekroz oranları ile değerlendirildi.

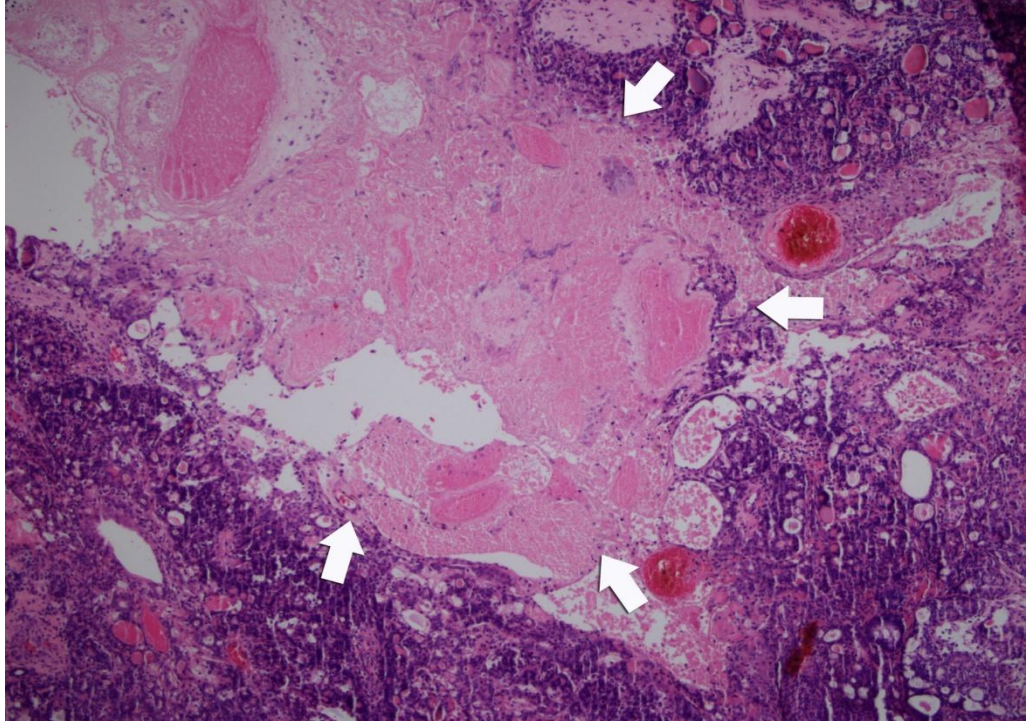
Kıyaslama yapabilmek için sağlıklı meme dokusu ve hiçbir uygulama yapılmamış meme tümürlü sıçandan alınan kesitler de incelenmiştir. İncelenen sağlıklı meme dokusu ve hiçbir uygulama yapılmamış meme tümürlü sıçandan alınan kesitler ile ilgili veriler Bölüm 4.1.2.3.'de verilmiştir (Resim 26 ve 27). Sıçanlara 8 haftalık formülasyon uygulamasının ardından alınan meme tümörü kesitlerinin patolojik incelenmesi sonucu Resim 45-47'de verilen görüntüler elde edilmiştir.



Resim 45. Tamoksifen dimetil-β-CD çözelti uygulanan sıçanlardan alınan meme dokusunun görüntüleri (x100) (sol ok: hiperplastik galndlar, sağ ok: neoplastik glandlar)



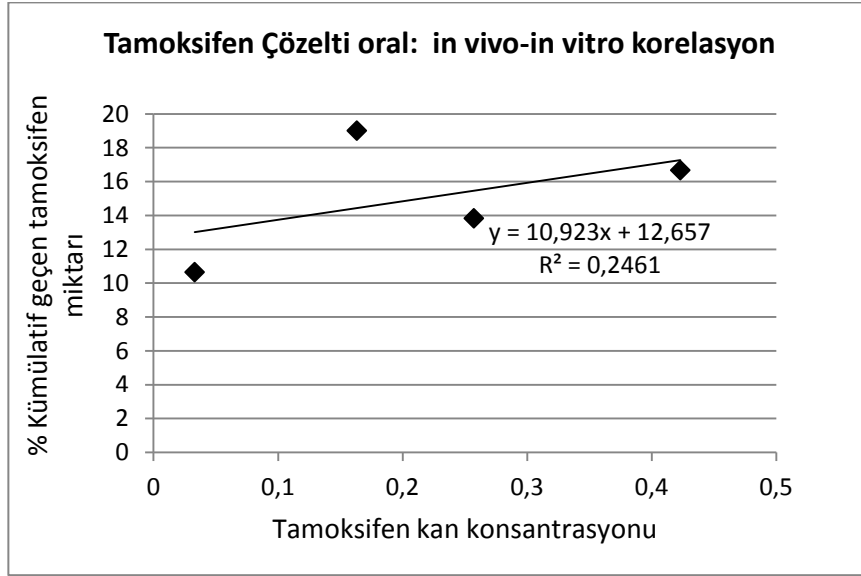
Resim 46. Tamoksifen dimetil-β-CD lipozom uygulanan sıçanlardan alınan meme dokusunun görüntüsü (x100) (üst ok: fibrotik bir alan) (diğer iki ok: nekrotik alanlar)



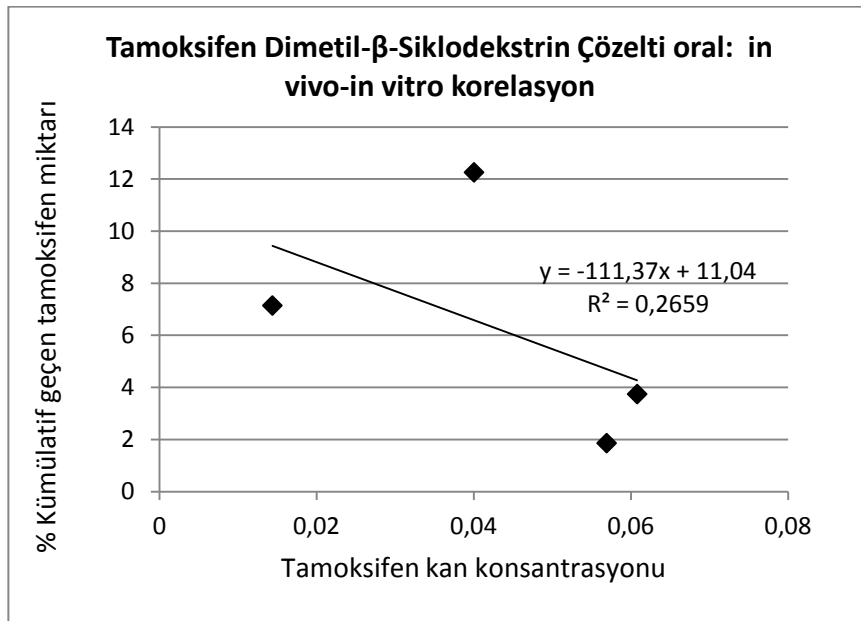
Resim 47. Tamoksifen dimetil- β -CD kohleat uygulanan sıçanlardan alınan meme dokusunun görüntüsü (x100) (oklar arası: geniş bir nekroz alanı)

4.2.3. İn Vitro-İn Vivo Korelasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

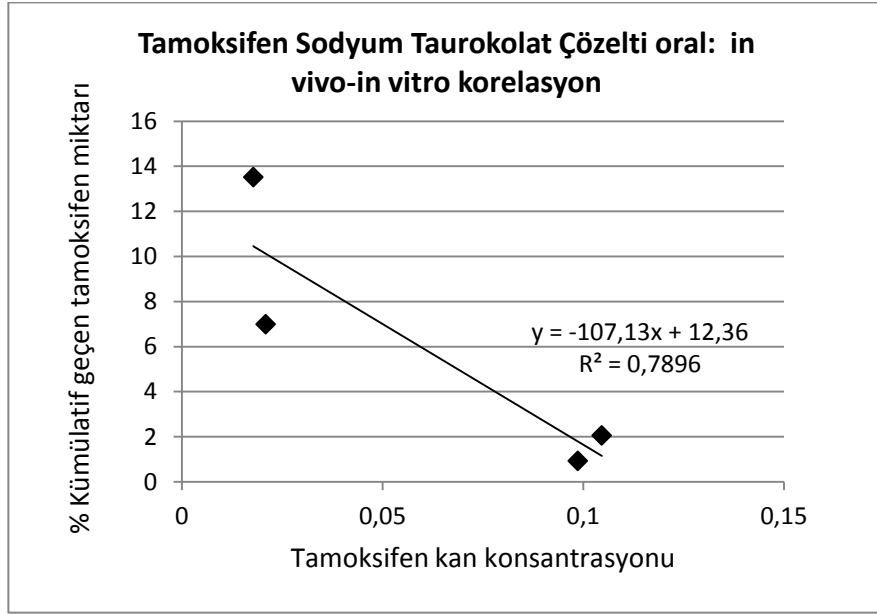
Aynı örnek alma zamanlarında, hücre kültürlerinde hesaplanan %kümülatif geçen tamoksifen miktarı ile kandaki raloksifen grafiğe geçirilerek korelasyon çalışması oral yolla verilen tüm formülasyon tipleri için gerçekleştirildi^{202,203}. Oral yolla hayvanlara verilen formülasyonlar üzerinde korelasyon çalışması yapmamızdaki amaç, Caco-2 hücrelerinin oral ilaç absorpsiyonunun in vitro olarak değerlendirilmesinde kullanılan bir model olmasıdır. Bu yüzden intraperitoneal yolla verilen formülasyonlar için korelasyon çalışması yapılmamıştır. Korelasyon sonuçları Şekil 222-233'de verilmiştir.



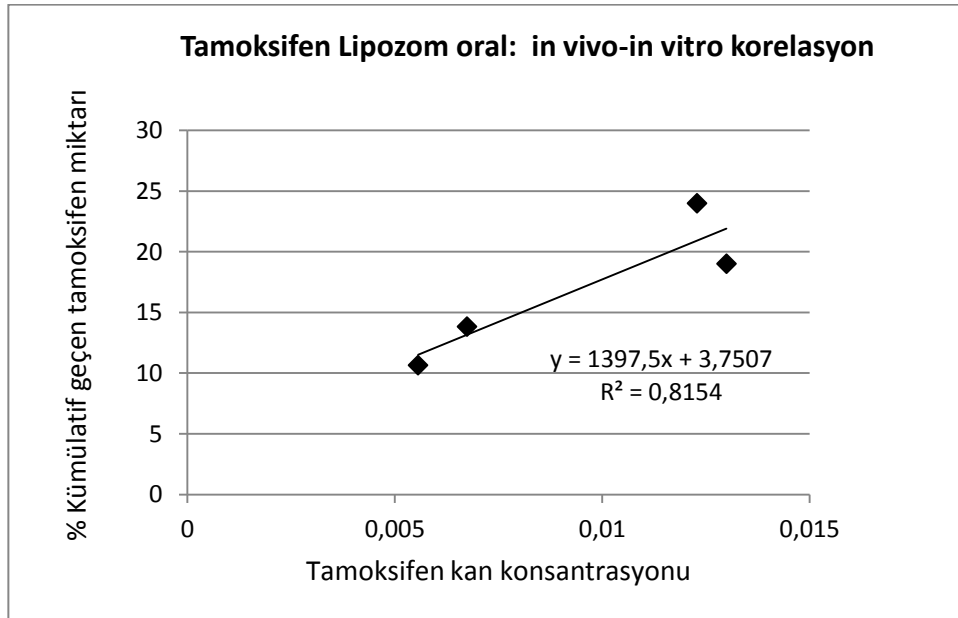
Şekil 222. Tamoksifen çözeltisi için in vivo-in vitro korelasyon grafiği



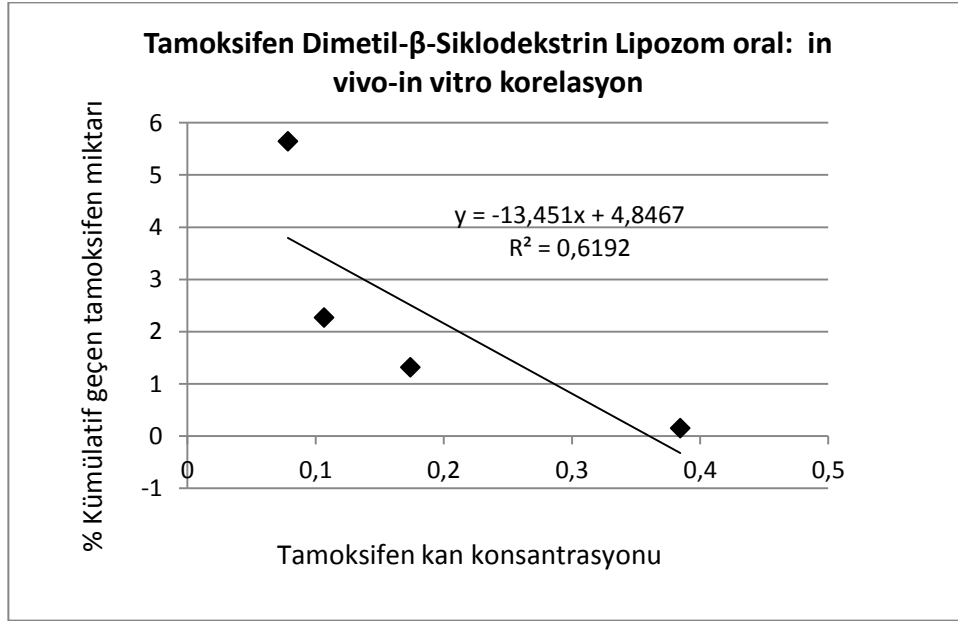
Şekil 223. Tamoksifen dimetil-β-siklodekstrin çözeltisi için in vivo-in vitro korelasyon grafiği



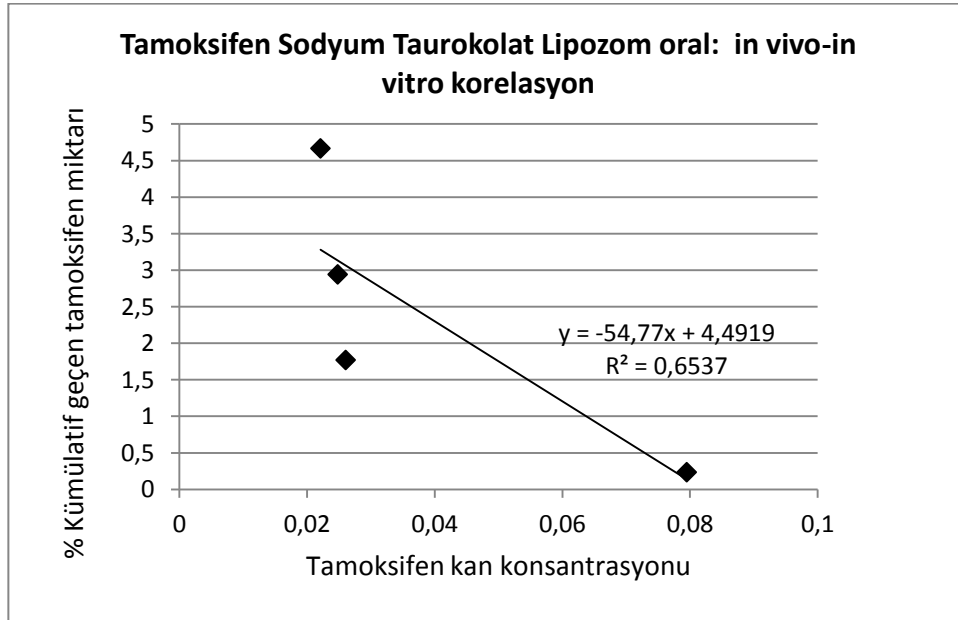
Şekil 224. Tamoksifen sodyum taurokolat çözeltisi için in vivo-in vitro korelasyon grafiği



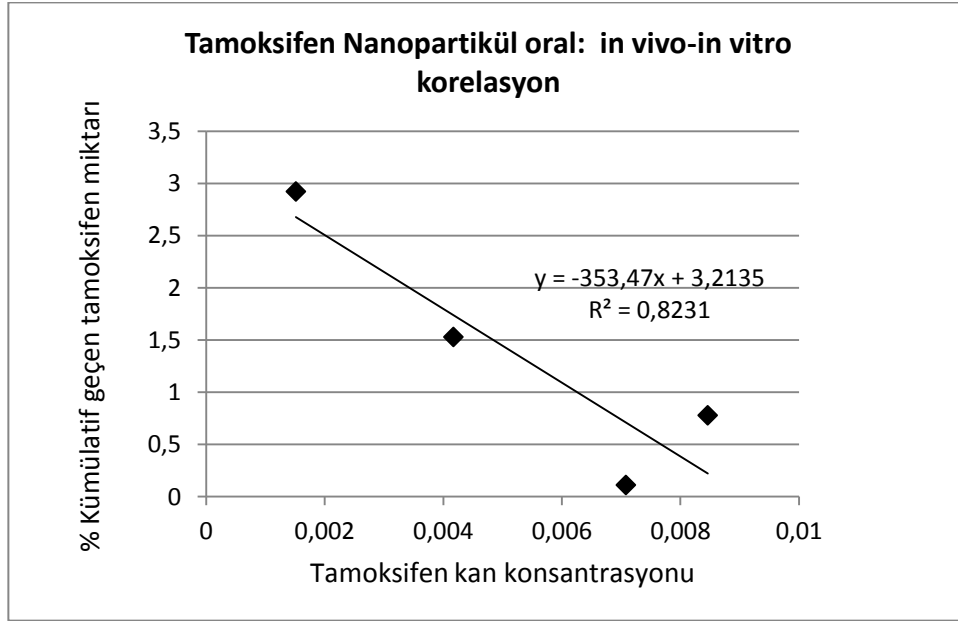
Şekil 225. Tamoksifen lipozom için in vivo-in vitro korelasyon grafiği



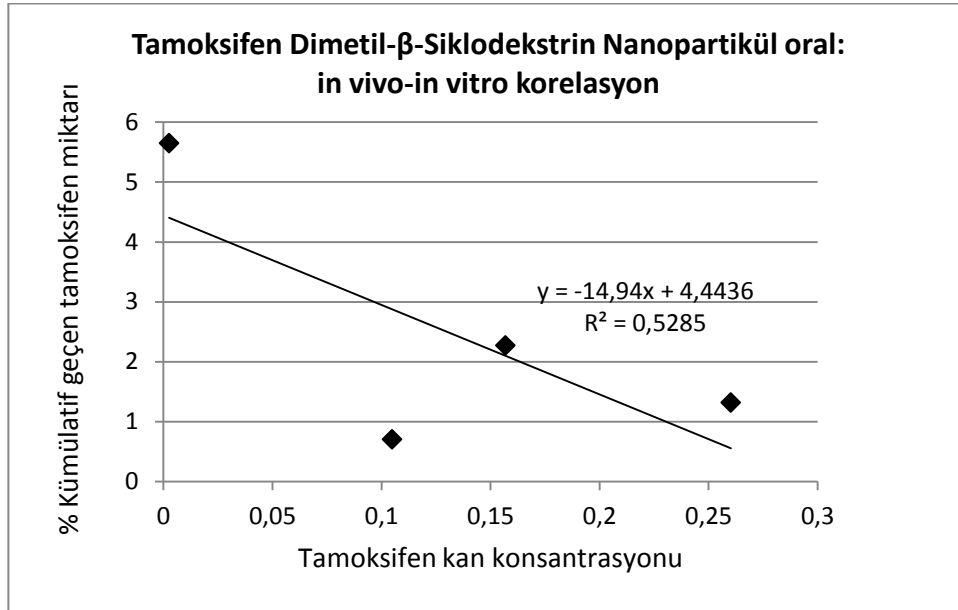
Şekil 226. Tamoksifen dimetil-β-siklodekstrin lipozom için in vivo-in vitro korelasyon grafiği



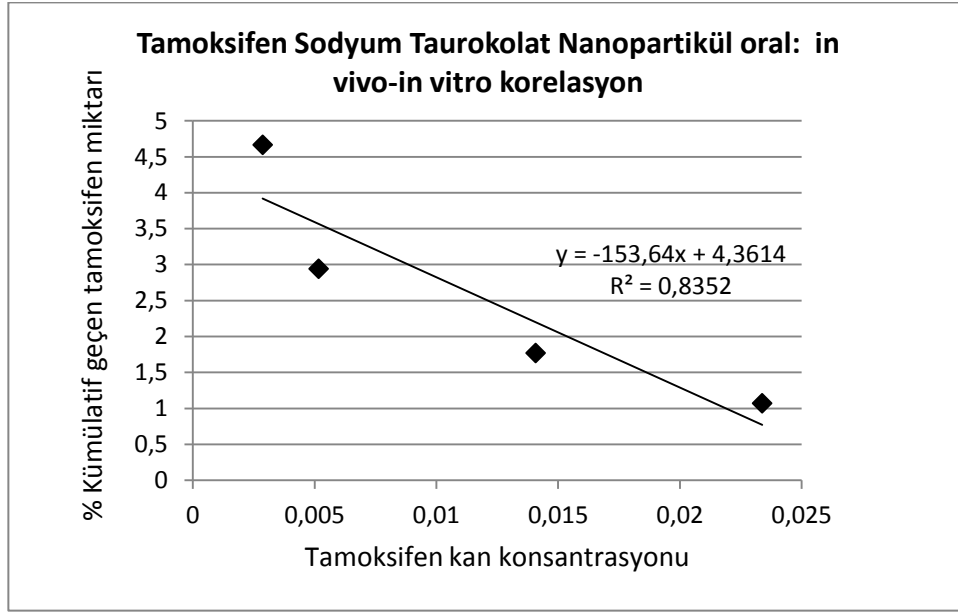
Şekil 227. Tamoksifen sodyum taurokolat lipozom için in vivo-in vitro korelasyon grafiği



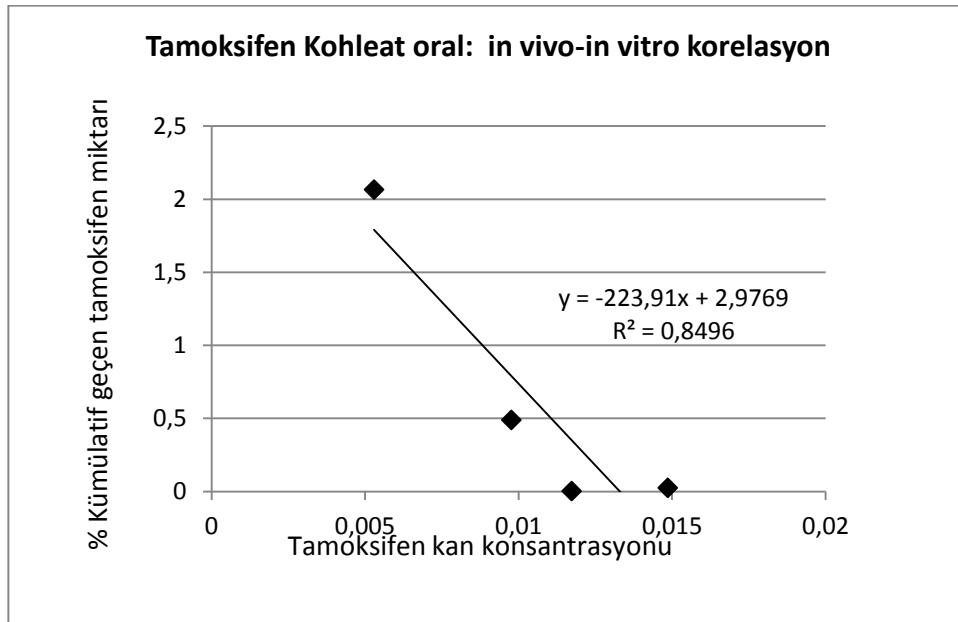
Şekil 228. Tamoksifen nanopartikül için in vivo-in vitro korelasyon grafiği



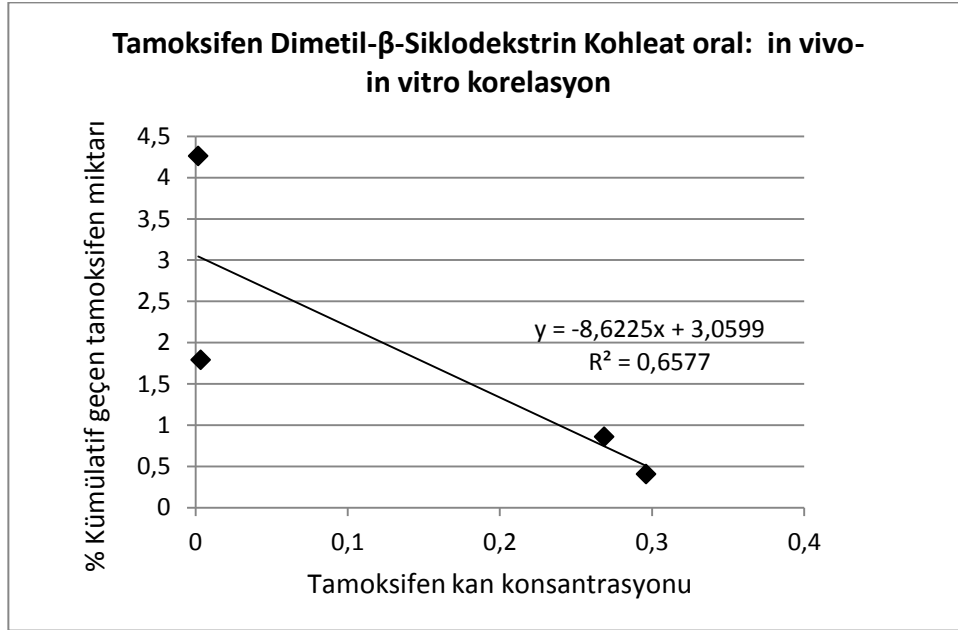
Şekil 229. Tamoksifen dimetil-β-siklodekstrin nanopartikül için in vivo-in vitro korelasyon grafiği



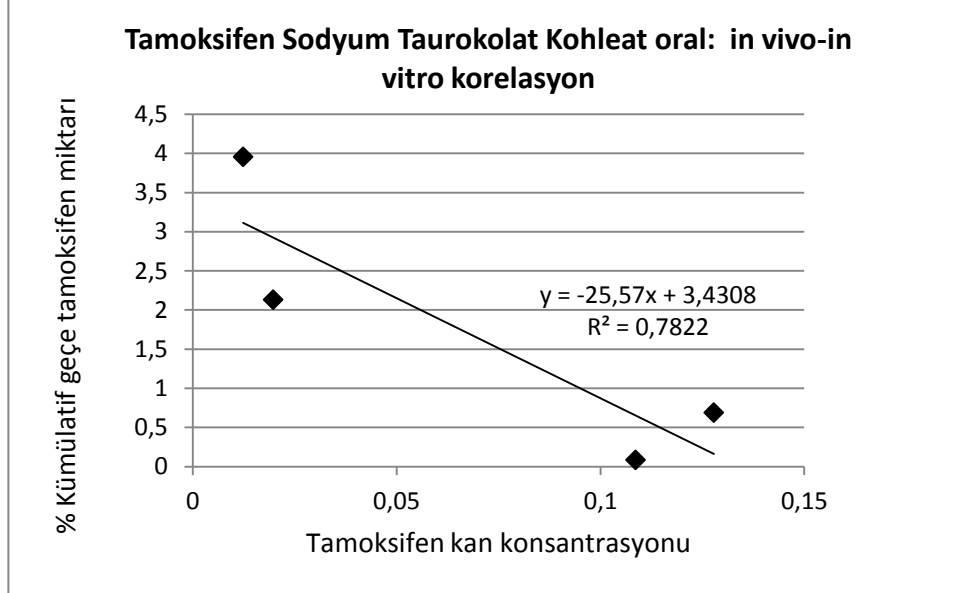
Şekil 230. Tamoksifen sodyum taurokolat nanopartikül için in vivo-in vitro korelasyon grafiği



Şekil 231. Tamoksifen kohleat için in vivo-in vitro korelasyon grafiği



Şekil 232. Tamoksifen dimetil-β-siklodekstrin kohleat için in vivo-in vitro korelasyon grafiği



Şekil 233. Tamoksifen sodyum taurokolat kohleat için in vivo-in vitro korelasyon grafiği

4.2.4. Stabilité Çalışmalarına Ait Bulgular

En iyi permeabilite katsayısına ve in vivo etkinliğe sahip formülasyonlar olan tamoksifen dimetil-β-CD lipozom ve tamoksifen

dimetil- β -CD kohleatları ile kıyaslama yapabilmek amacıyla tamoksifen dimetil- β -CD çözelti formülasyonları ile 6 ay süreyle hızlandırılmış stabilite çalışması yapılmıştır. Stabilite test koşulları:

- 4°C
- 25°C $\pm$ %60 bağıl nem
- 40°C $\pm$ %75 bağıl nem olarak çalışılmıştır.

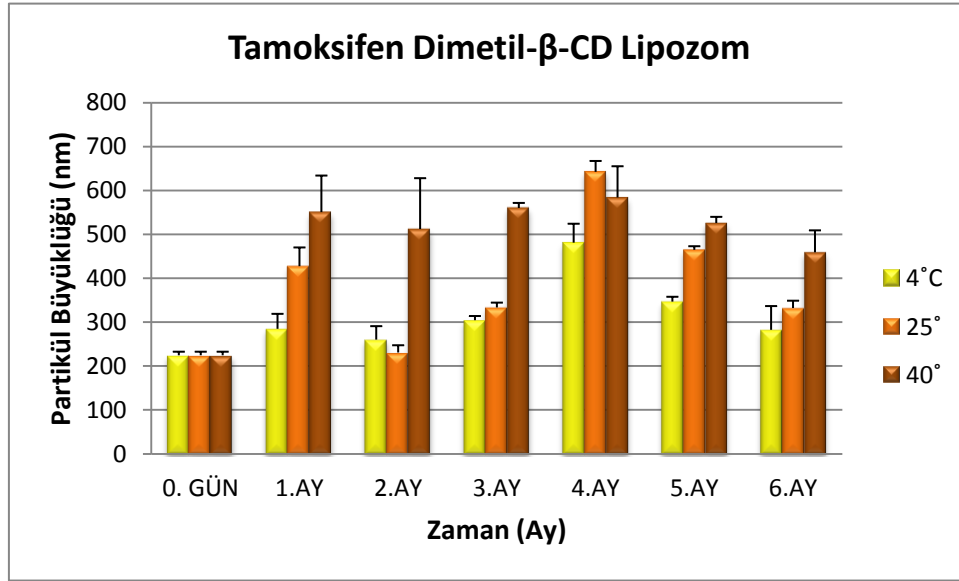
4.2.4.1. Formülasyonların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımlarına Ait Bulgular

4.2.4.1.1 Tamoksifen Dimetil- β -CD Lipozomlarının Partikül Büyüklüğü ve Dağılımlarına Ait Bulgular

Farklı saklama koşullarında (4°C, 25°C $\pm$ %60 bağıl nem, 40°C $\pm$ %75 bağıl nem) saklanan lipozomların, 0., 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. aylarda Malvern Zeta Sizer Nano ZS ile ölçülen partikül büyüklüğü ve dağılımı sonuçları Tablo 72’de, partikül büyüklüğünün zamana göre değişimine ait grafik ise Şekil 234’de görülmektedir.

Tablo 72. Tamoksifen lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları (n=3)

Zaman (Ay)	Ortalama ϕ ap (nm) $\pm$ S.S (4°C)	Ortalama ϕ ap (nm) $\pm$ S.S (25°C)	Ortalama ϕ ap (nm) $\pm$ S.S (40°C)
0	224.7 $\pm$ 8.1	224.7 $\pm$ 8.1	224.7 $\pm$ 8.1
1	285.0 $\pm$ 13.4	427.6 $\pm$ 12.1	551.0 $\pm$ 10.2
2	260.0 $\pm$ 12.4	231.0 $\pm$ 16.5	512.3 $\pm$ 19.3
3	304.7 $\pm$ 9.5	333.7 $\pm$ 11.0	560.3 $\pm$ 11.5
4	481.3 $\pm$ 23.8	642.7 $\pm$ 24.8	584.3 $\pm$ 10.4
5	347.0 $\pm$ 11.0	465.0 $\pm$ 8.2	526.0 $\pm$ 14.1
6	282.7 $\pm$ 12.1	332.3 $\pm$ 16.7	459.3 $\pm$ 20.7



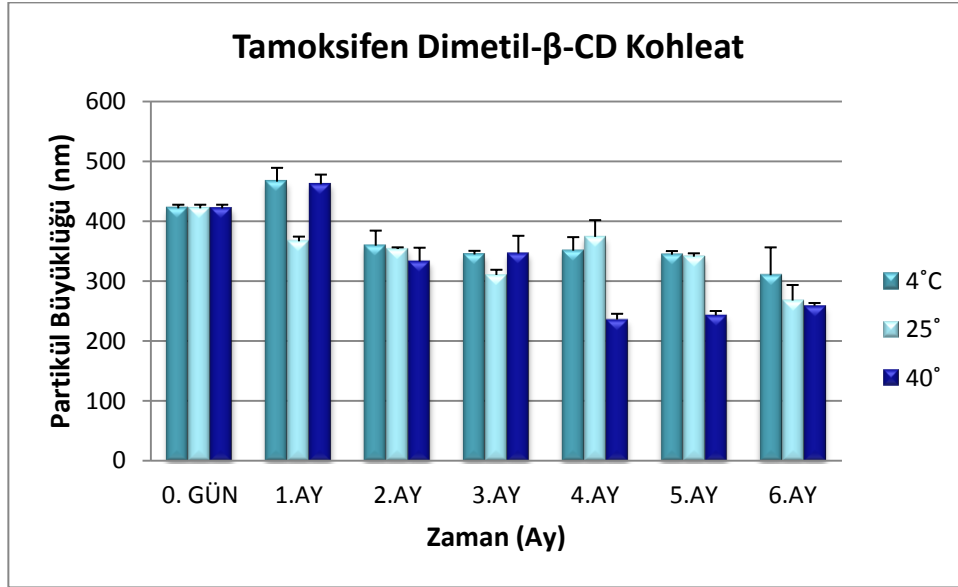
Şekil 234. Tamoksifen Dimetil-β-CD lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçlarının 6 aylık süre içindeki değişimi

4.2.4.1.2. Tamoksifen Dimetil-β-CD Kohleatlarının Partikül Büyüklüğü ve Dağılımlarına Ait Bulgular

Farklı saklama koşullarında (4°C, 25°C ± %60 bağıl nem, 40°C ± %75 bağıl nem) koşullarında saklanan kohleatların, 0., 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. aylarda ölçülen partikül büyüklüğü ve dağılımı sonuçları Tablo 73’de, partikül büyüklüğünün zamana göre değişimine ait grafik ise Şekil 235’de görülmektedir verilmiştir.

Tablo 73. Tamoksifen kohleatlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları (n=3)

Zaman (Ay)	Ortalama çap (nm) ± S.S (4°C)	Ortalama çap (nm) ± S.S (25°C)	Ortalama çap (nm) ± S.S (40°C)
0	421.7 ± 6.1	421.7 ± 6.1	421.7 ± 6.1
1	466.0 ± 23.0	367.7 ± 7.7	462.0 ± 16.1
2	359.0 ± 25.2	353.7 ± 2.9	333.0 ± 12.9
3	344.7 ± 6.0	310.3 ± 8.7	346.3 ± 10.9
4	351.0 ± 22.6	374.0 ± 18.0	236.0 ± 9.5
5	344.3 ± 6.3	341.0 ± 5.6	243.0 ± 7.2
6	310.0 ± 24.6	267.7 ± 26.0	259.0 ± 4.6



Şekil 235. Tamoksifen Dimetil-β-CD kohleatlarına ait partikül büyüklüğü sonuçlarının 6 aylık süre içindeki değişimi

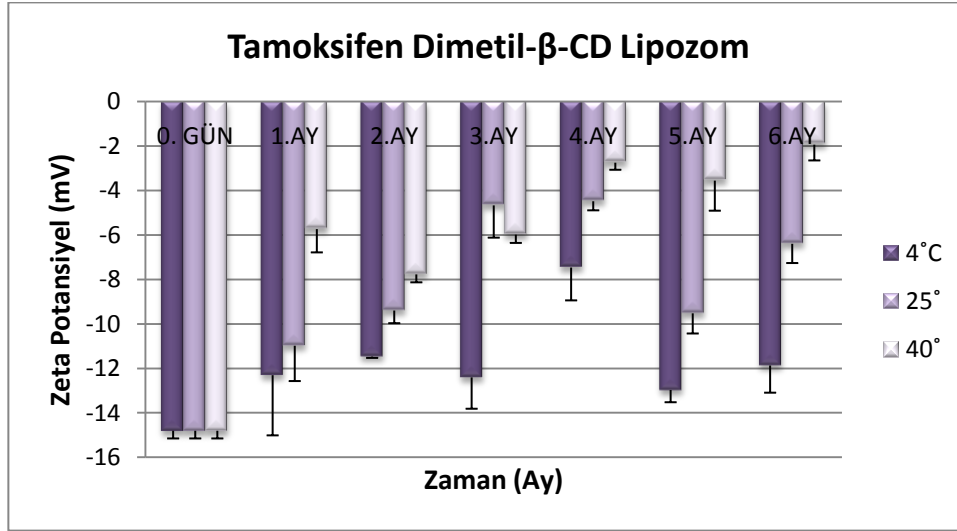
4.2.4.2. Formülasyonların Zeta Potansiyelleri Ait Bulgular

4.2.4.2.1. Tamoksifen Dimetil-β-CD Lipozomlarının Zeta Potansiyel Ölçümlerine Ait Bulgular

Farklı saklama koşullarında (4°C, 25°C ± %60 bağıl nem, 40°C ± %75 bağıl nem) saklanan lipozomların, 0., 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. aylarda Malvern Zeta Sizer Nano ZS ile ölçülen zeta potansiyel sonuçları Tablo 74'de, 6 aylık süre içindeki değişimin gösterildiği grafik ise Şekil 236'da verilmiştir.

Tablo 74. Tamoksifen lipozomlarına ait zeta potansiyel sonuçları (n=3)

Zaman (Ay)	Zeta Potansiyel (mV) ± S.S (4°C)	Zeta Potansiyel (mV) ± S.S (25°C)	Zeta Potansiyel (mV) ± S.S (40°C)
0	-14.8 ± -0.3	-14.8 ± -0.3	-14.8 ± -0.3
1	-12.3 ± -2.7	-11.0 ± -1.6	-5.73 ± -1.05
2	-11.5 ± -0.1	-9.39 ± -0.57	-7.77 ± -0.36
3	-12.4 ± -1.4	-4.67 ± -1.45	-5.98 ± -0.37
4	-7.46 ± -1.47	-4.48 ± -0.41	-2.75 ± -0.35
5	-12.9 ± -0.6	-9.52 ± 0.91	-3.55 ± -1.35
6	-11.9 ± -1.2	-6.39 ± -0.87	-1.94 ± -0.71



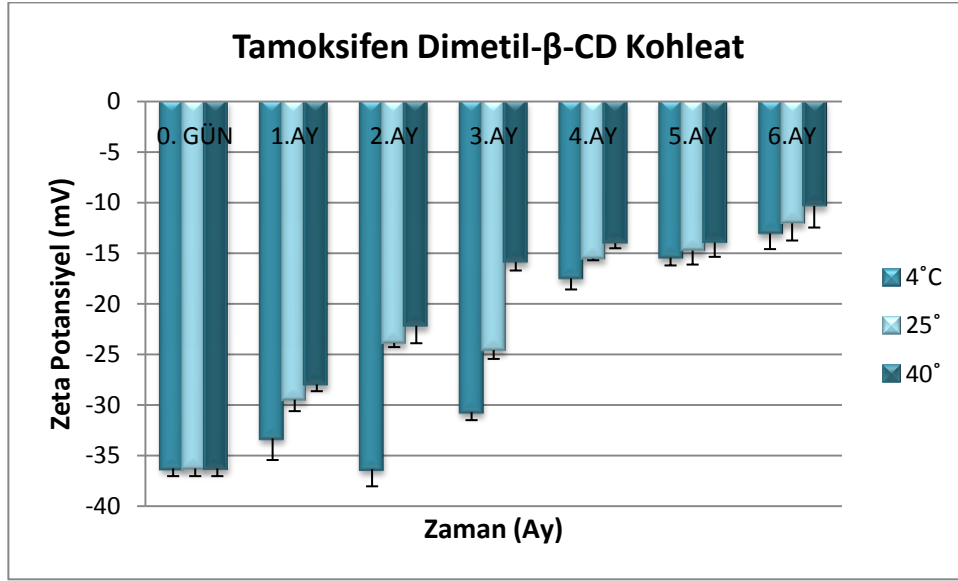
Şekil 236. Tamoksifen Dimetil-β-CD lipozomlarına ait zeta potansiyel sonuçlarının 6 aylık süre içindeki değişimi

4.2.4.2.2. Tamoksifen Dimetil-β-CD Kohleatlarının Zeta Potansiyel Ölçümlerine Ait Bulgular

Farklı saklama koşullarında (4°C, 25°C ± %60 bağıl nem, 40°C ± %75 bağıl nem) koşullarında saklanan lipozomların, 0., 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. aylarda Malvern Zeta Sizer Nano ZS ile ölçülen zeta potansiyel sonuçları Tablo 75’de verilmiştir. Şekil 237’de zeta potansiyelindeki 6 aylık değişim grafikte gösterilmiştir.

Tablo 75. Tamoksifen kohleatlarına ait zeta potansiyel sonuçları (n=3)

Zaman (Ay)	Zeta Potansiyel (mV) ± S.S (4°C)	Zeta Potansiyel (mV) ± S.S (25°C)	Zeta Potansiyel (mV) ± S.S (40°C)
0	-36.7 ± -0.8	-36.7 ± -0.8	-36.7 ± -0.8
1	-33.4 ± -2.1	-29.5 ± -1.1	-27.4 ± -0.7
2	-36.3 ± -1.7	-23.9 ± -0.4	-22.2 ± -1.7
3	-30.7 ± -0.8	-24.6 ± -0.9	-15.9 ± -0.8
4	-17.5 ± -1.1	-15.5 ± -0.2	-15.5 ± -0.2
5	-15.4 ± -0.7	-14.7 ± -1.4	-13.9 ± -1.4
6	-13.0 ± -1.6	-12.0 ± -1.7	-10.3 ± -2.1



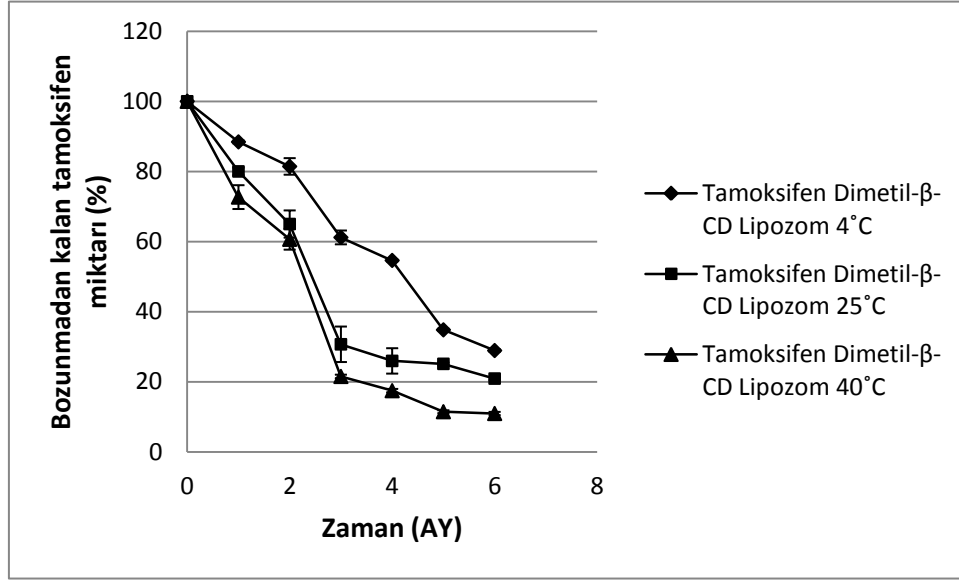
Şekil 237. Tamoksifen Dimetil-β-CD kohleatlarına ait zeta potansiyel sonuçlarının 6 aylık süre içindeki değişimi

4.2.4.3. Tamoksifenin Formülasyonlar İçindeki Stabilitésine Ait Bulgular

Farklı saklama koşullarında (4°C, 25°C ± %60 bağıl nem, 40°C ± %75 bağıl nem) saklanan formülasyonlardaki, tamoksifen miktarının değişimi 6 ay süreyle incelenmiştir.

4.2.4.3.1. Tamoksifenin, Tamoksifen Dimetil-β-Siklodekstrin Lipozom Formülasyonu İçindeki Stabilitésine Ait Bulgular

Farklı saklama koşullarında (4°C, 25°C ± %60 bağıl nem, 40°C ± %75 bağıl nem) saklanan lipozomlardaki, tamoksifen miktarının değişimi 6 ay süreyle incelenmiştir. Tamoksifenin, dimetil-β-siklodekstrin içeren lipozom formülasyonu içindeki stabilitiesine ait sonuçlar Şekil 238’de görülmektedir.



Şekil 238. Stabilite çalışmalarında tamoksifen ve dimetil-β-siklodekstrin içeren lipozomların içindeki tamoksifen miktarının zamana göre değişimi

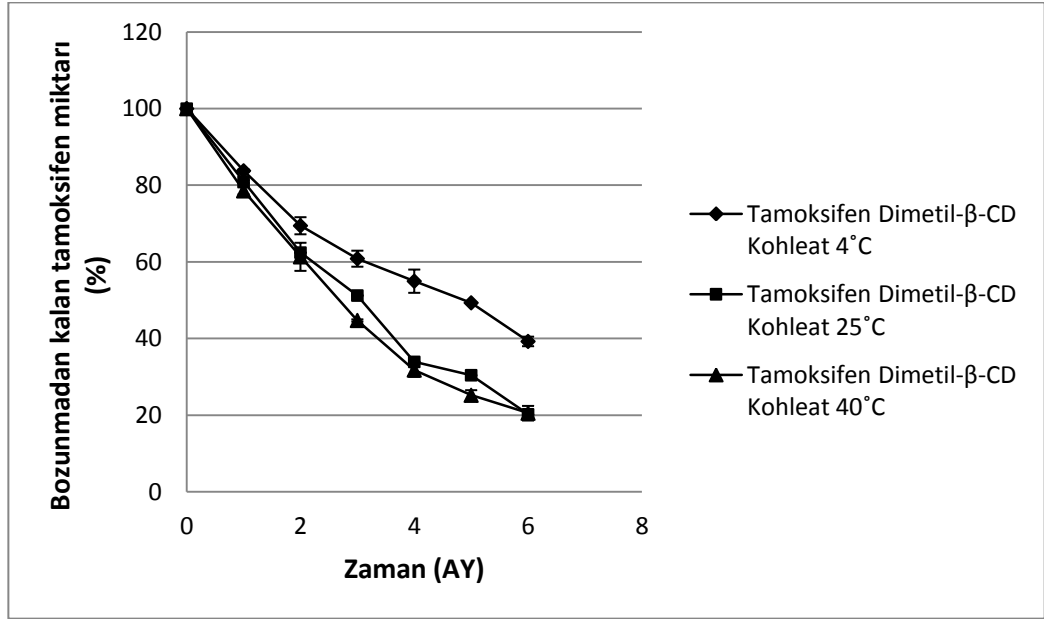
Determinasyon katsayısı, sapma kareleri toplamı gibi uyum ölçütleri incelenerek elde edilen profiller kinetik açıdan incelenmiş, dimetil-β-CD içeren çözelti formülasyonu içindeki tamoksifenin, +4°C'de saklanan lipozomların sıfırıncı derece kinetikle, +25°C ve +40°C derecede saklanan lipozomların ise birinci derece kinetikle bozunduğu görülmüştür. Kinetik hesapları Tablo 76'da gösterilmiştir. 6 aylık stabilite çalışması süresince 4°C'de saklanan lipozomların raf ömrü 14.8 gün, 25°C'de saklanan lipozomların raf ömrü 11.3 gün, 40°C'de saklanan lipozomların raf ömrü ise 7.65 gün olarak hesaplanmıştır.

Tablo 76. Tamoksifenin dimetil- β -CD içeren lipozom formülasyonu içindeki stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri

Reaksiyon Derecesi ve Denklemi	Sıcaklık (°C)	Eğim (k)	Kesişim (C ₀)	Determinasyon Katsayısı (R ²)	Sapma Kareleri Toplamı (SKT)
Sıfır derece $C = C_0 - k.t$	4	12.4	101.4	0.985	67.4
	25	13.8	91.03	0.881	717.2
	40	15.5	88.5	0.883	982.2
Birinci derece $C = C_0 \cdot e^{-kt}$	4	0.214	4.72	0.955	286.2
	25	0.279	4.61	0.855	698.9
	40	0.413	4.63	0.943	354.9
İkinci derece $C^{-1} = (C_0^{-1} + k.t)^*$	4	4.095×10^{-3}	6.51×10^{-3}	0.885	3282.5
	25	6.83×10^{-3}	7.60×10^{-3}	0.941	1467.1
	40	1.54×10^{-2}	1.81×10^{-4}	0.968	3.14×10^7

4.2.4.3.2. Tamoksifenin, Tamoksifen Dimetil- β -Siklodekstrin Kohleat Formülasyonu İçindeki Stabilitesine Ait Bulgular

Farklı saklama koşullarında (4°C, 25°C $\pm$ %60 bağıl nem, 40°C $\pm$ %75 bağıl nem) saklanan kohleatlardaki, tamoksifen miktarının değişimi 6 ay süreyle incelenmiştir. Tamoksifenin, dimetil- β -siklodekstrin içeren kohleat formülasyonu içindeki stabilitesine ait sonuçlar Şekil 239’da görülmektedir.



Şekil 239. Stabilite çalışmalarında tamoksifen ve dimetil-β-siklodekstrin içeren kohleatların içindeki tamoksifen miktarının zamana göre değişimi

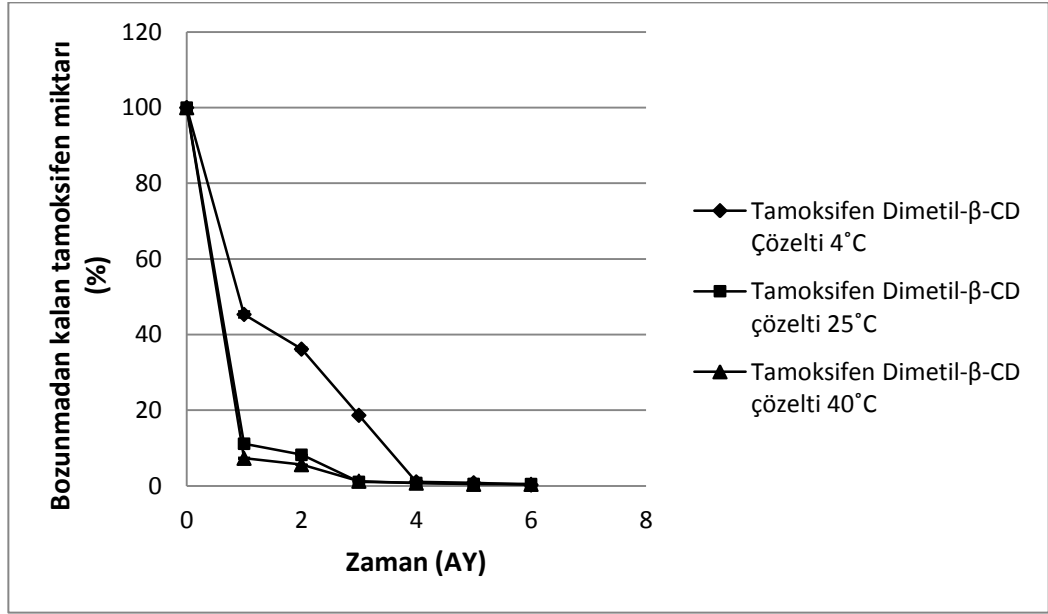
Determinasyon katsayısı, sapma kareleri toplamı gibi uyum ölçütleri incelenerek elde edilen profiller kinetik açıdan incelenmiş, dimetil-β-CD içeren kohleat formülasyonu içindeki tamoksifenin birinci derece kinetikle bozunduğu görülmüştür. Kinetik hesapları Tablo 77’de gösterilmiştir. 6 aylık stabilite çalışması süresince 4°C’de saklanan kohleatların raf ömrü 21.6 gün, 25°C’de saklanan kohleatların raf ömrü 12 gün, 40°C’de saklanan kohleatların raf ömrü ise 11.5 gün olarak hesaplanmıştır.

Tablo 77. Tamoksifenin dimetil-β-CD içeren kohleat formülasyonu içindeki stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri

Reaksiyon Derecesi ve Denklemi	Sıcaklık (°C)	Eğim (k)	Kesişim (C ₀)	Determinasyon Katsayısı (R ²)	Sapma Kareleri Toplamı (SKT)
Sıfır derece C= C₀ - k.t	4 25 40	9.49 13.2 13.4	93.8 93.7 91.9	0.961 0.968 0.952	102.9 160.9 252.3
Birinci derece C= C₀ . e^{-kt}	4 25 40	0.146 0.262 0.274	4.58 4.65 4.62	0.988 0.988 0.997	29.3 48.3 16.4
İkinci derece C⁻¹= (C₀⁻¹ + k.t)*	4 25 40	2.39x10 ⁻³ 6.16x10 ⁻³ 6.60x10 ⁻³	9.51x10 ⁻³ 5.74x10 ⁻³ 6.066x10 ⁻³	0.969 0.911 0.963	48.9 5681.7 4335.9

4.2.4.3.3. Tamoksifenin, Tamoksifen Dimetil-β-Siklodekstrin Çözelti Formülasyonu İçindeki Stabilitesine Ait Bulgular

Farklı saklama koşullarında (4°C, 25°C ± %60 bağıl nem, 40°C ± %75 bağıl nem) saklanan çözeltilerdeki, tamoksifen miktarının değişimi 6 ay süreyle incelenmiştir. Tamoksifenin, dimetil-β-siklodekstrin içeren çözelti formülasyonu içindeki stabilitesine ait sonuçlar Şekil 240'da görülmektedir.



Şekil 240. Stabilite çalışmalarında tamoksifen ve dimetil-β-siklodekstrin içeren çözeltiler içindeki tamoksifen miktarının zamana göre değişimi

Determinasyon katsayısı, sapma kareleri toplamı gibi uyum ölçütleri incelenerek elde edilen profiller kinetik açıdan incelenmiş, dimetil-β-CD içeren çözelti formülasyonu içindeki tamoksifenin birinci derece kinetikle bozunduğu görülmüştür. Kinetik hesapları Tablo 78’de gösterilmiştir. 6 aylık stabilite çalışması süresince 4°C’de saklanan çözeltilerin raf ömrü 3.6 gün, 25°C’de saklanan çözeltilerin raf ömrü 3 gün, 40°C’de saklanan çözeltilerin raf ömrü ise 1.8 gün olarak hesaplanmıştır.

Tablo 94. Tamoksifenin dimetil-β-CD içeren çözelti formülasyonu içindeki stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri

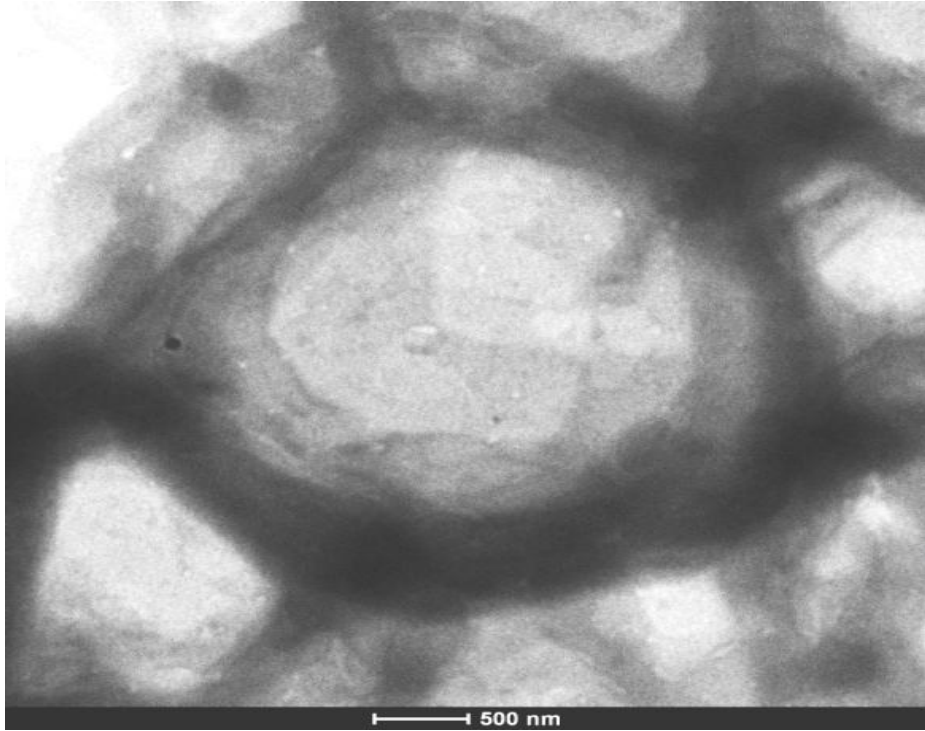
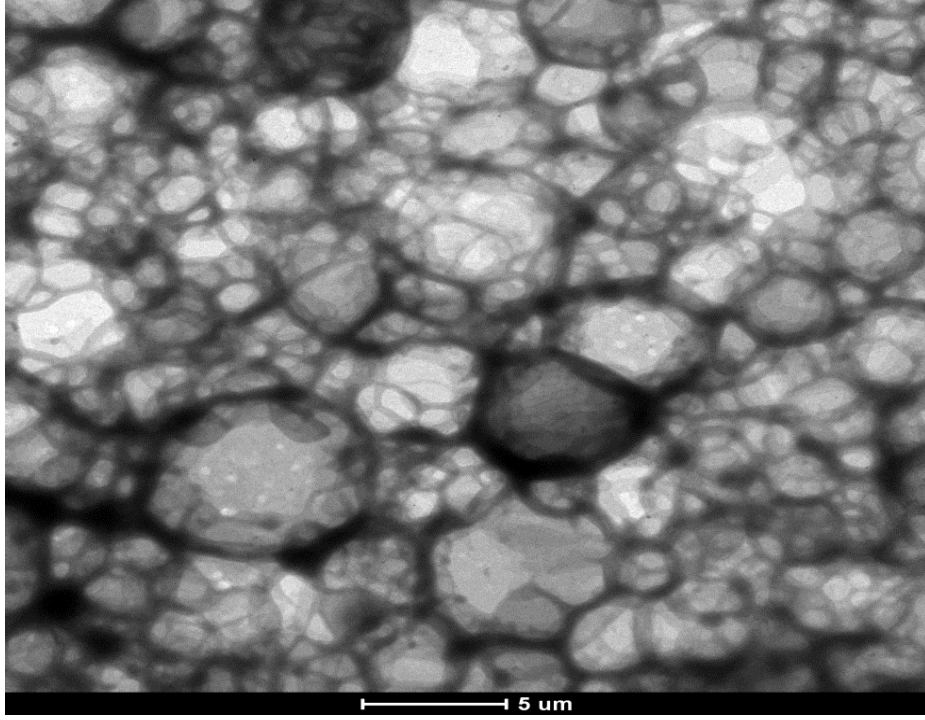
Reaksiyon Derecesi ve Denklemi	Sıcaklık (°C)	Eğim (k)	Kesişim (C ₀)	Determinasyon Katsayısı (R ²)	Sapma Kareleri Toplamı (SKT)
Sıfır derece C= C₀ - k.t	4 25 40	15.1 11.7 11.4	74.3 52.8 50.6	0.814 0.481 0.441	4061.7 4184.4 4570.4
Birinci derece C= C₀ . e^{-kt}	4 25 40	1.048 0.871 0.855	5.072 3.71 3.51	0.931 0.937 0.875	1464.7 3518.8 4478.2
İkinci derece C⁻¹= (C₀⁻¹ + k.t)*	4 25 40	0.527 0.382 0.653	-0.712 -0.248 -0.661	0.659 0.934 0.829	14270.4 10883.6 26336.7

4.2.4.4. Formülasyonların TEM Görüntülerine Ait Bulgular

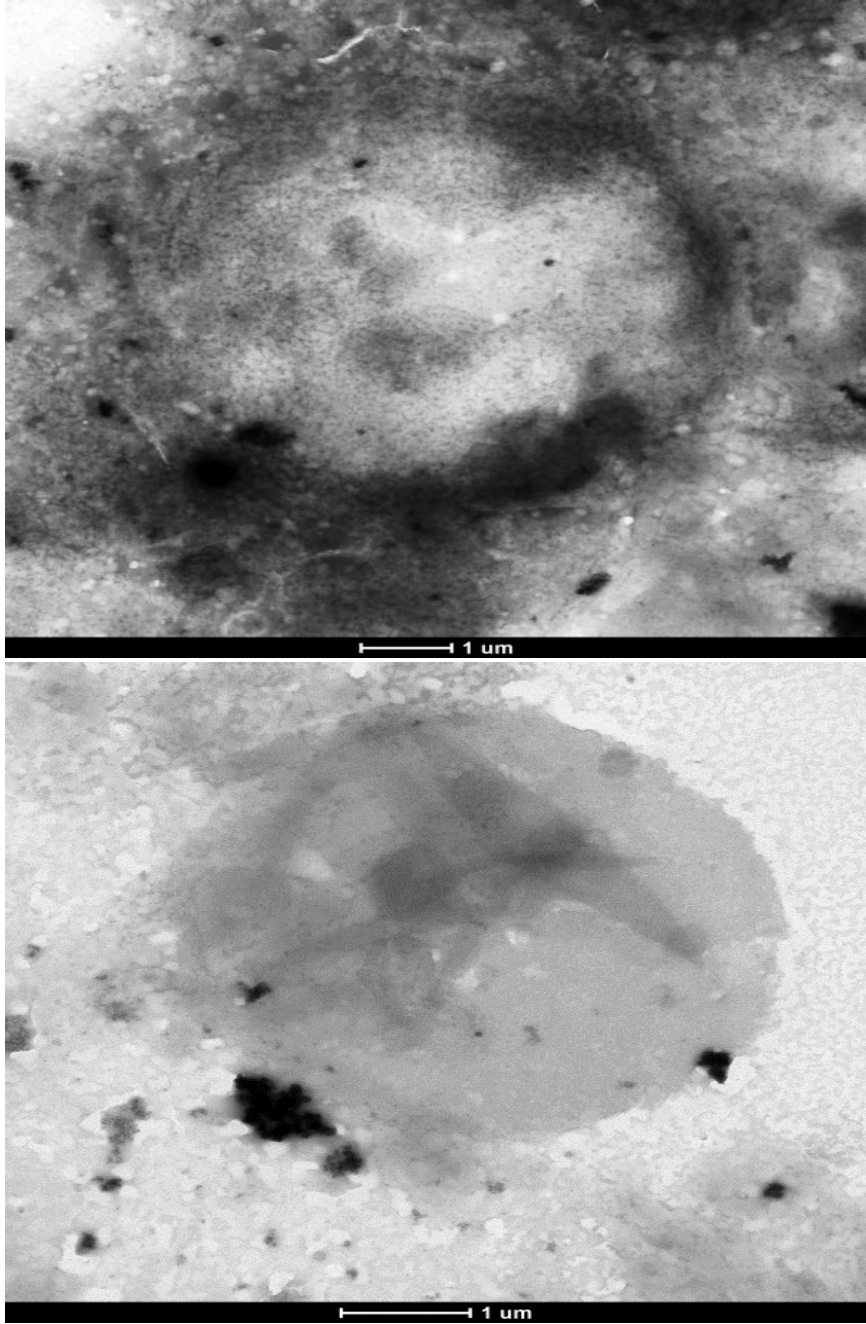
6 aylık stabilite çalışması süresinin başlangıcında ve sonunda dimetil-β-CD içeren lipozom ve kohleat formülasyonlarının TEM mikrokosbu ile görüntülenmiştir.

4.2.4.4.1. Stabilite Süresinin Başlangıcında ve Sonunda Tamoksifen Dimetil-β-Siklodekstrin Lipozomlarının TEM Mikroskobu Görüntüleri

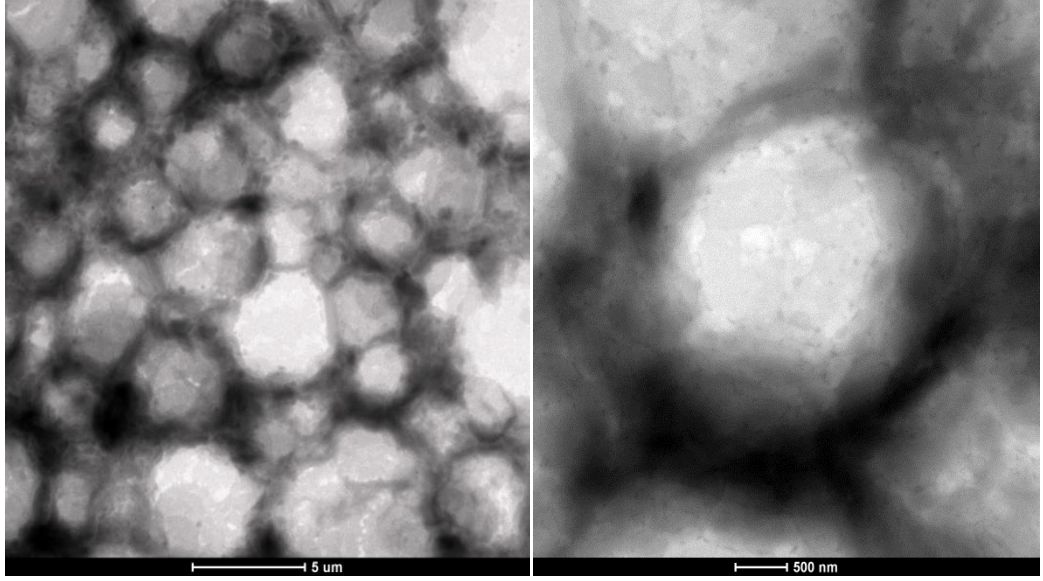
6 aylık stabilite çalışması süresinin başlangıcında ve sonunda, tamoksifen dimetil-β-siklodekstrin lipozom formülasyonlarının TEM mikrokosbu ile görüntüleri alınmıştır. Resim 48’de stabilite çalışmasının başlangıcında, Resim 49’da 6 aylık süresi boyunca +4°C’de saklanan lipozomların fotoğrafları görülmektedir. Resim 50’de 6 aylık süresi boyunca +25°C’de saklanan lipozomların fotoğrafları görülmektedir.



Resim 48. 6 aylık stabilite çalışması süresinin başlangıcında, tamoksifen dimetil- β -siklodekstrin lipozom formülasyonlarının TEM görüntüleri



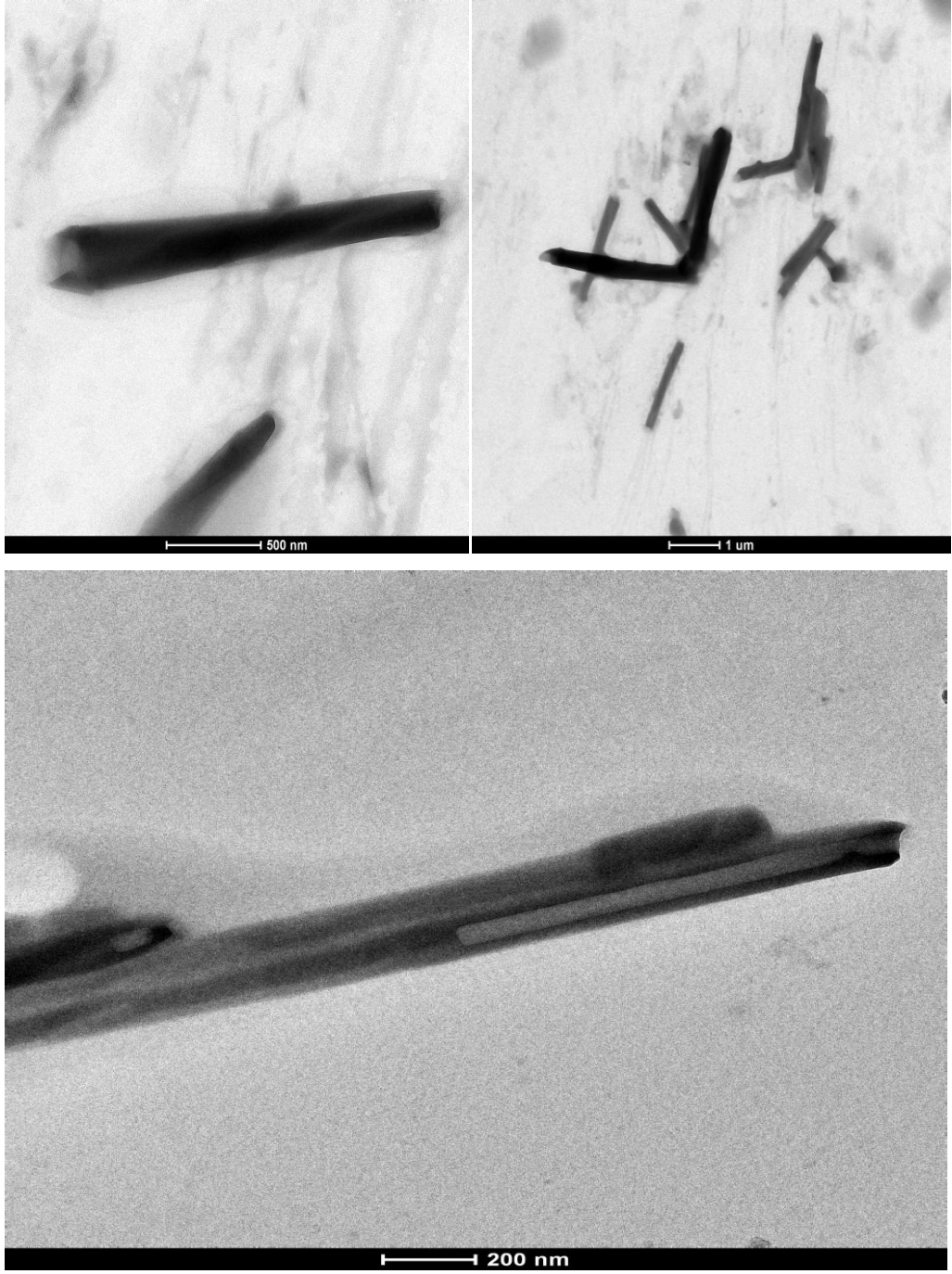
Resim 49. 6 aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +4°C'de saklanan, tamoksifen dimetil-β-siklodekstrin lipozom formülasyonlarının TEM görüntüleri



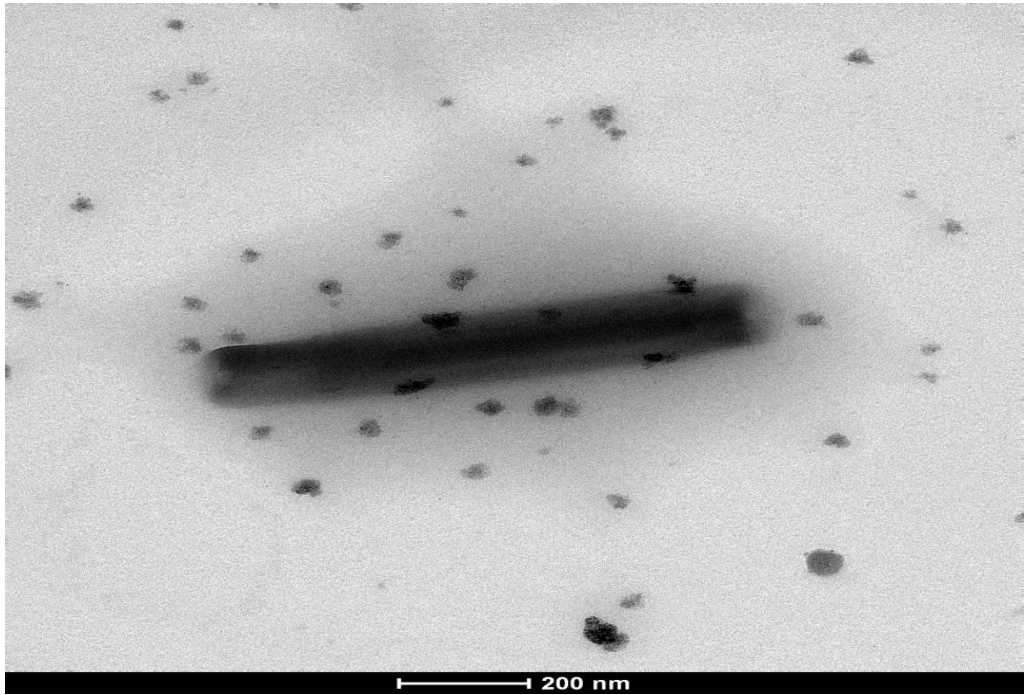
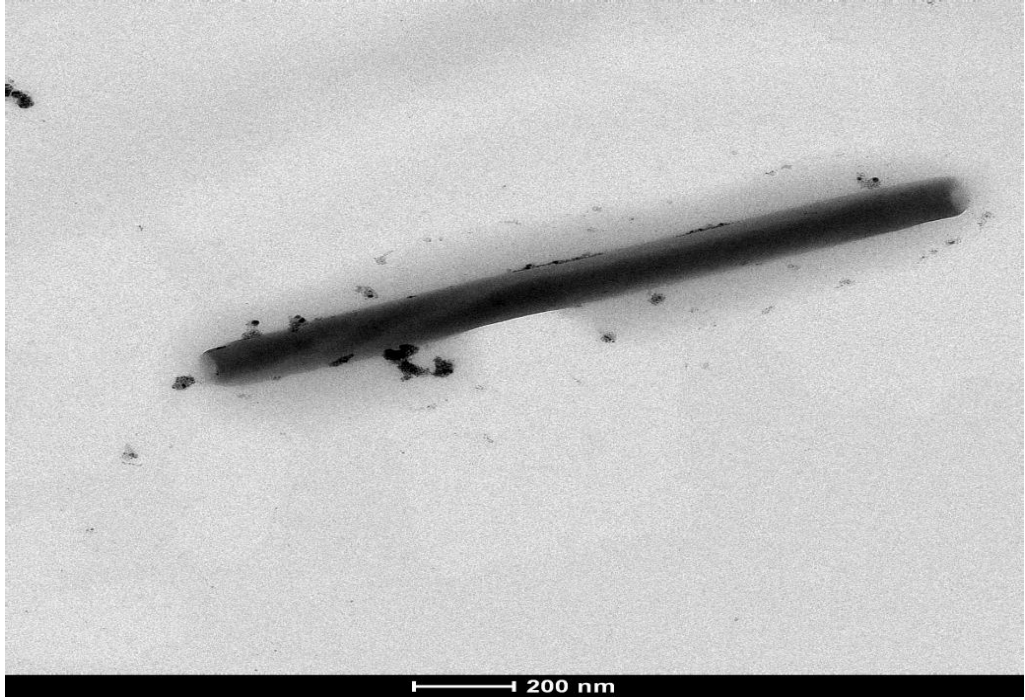
Resim 50. 6 aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +25°C’de saklanan, tamoksifen dimetil-β-siklodekstrin lipozom formülasyonlarının TEM görüntüleri

4.2.4.4.2. Stabilite Süresi Sonunda Tamoksifen Dimetil-β-Siklodekstrin Kohleatlarının TEM Mikroskobu Görüntüleri

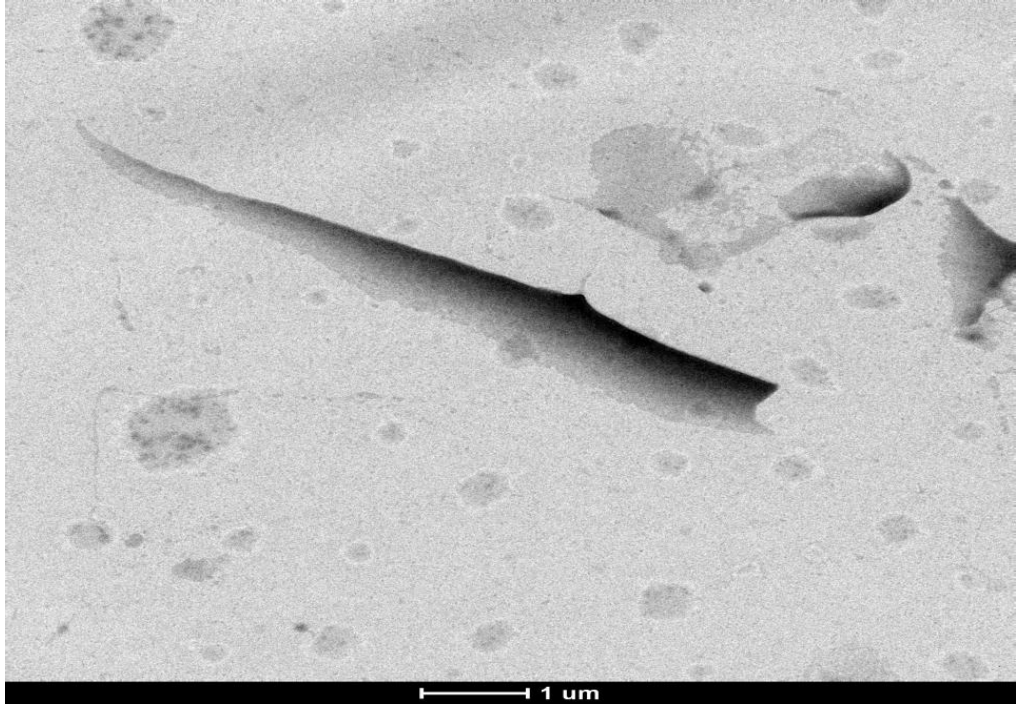
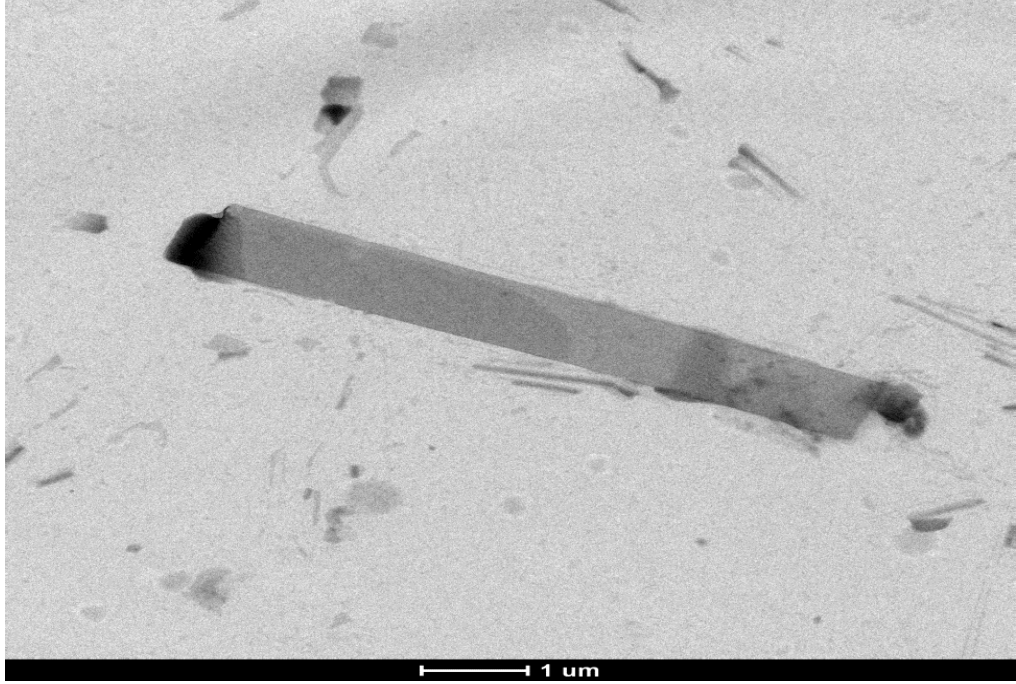
6 aylık stabilite çalışması süresinin başlangıcında ve sonunda, tamoksifen dimetil-β-siklodekstrin kohleat formülasyonlarının TEM mikroskobu ile görüntüleri alınmıştır. Resim 51’de stabilite çalışmasının başlangıcında, Resim 52’de 6 aylık süresi boyunca +4°C’de saklanan lipozomların fotoğrafları görülmektedir. Resim 53’de 6 aylık süresi boyunca +25°C’de saklanan kohleatların fotoğrafları görülmektedir.



Resim 51. 6 aylık stabilite çalışması süresinin başlangıcında, tamoksifen dimetil- β -siklodekstrin kohleat formülasyonlarının TEM görüntüleri



Resim 5. 6 aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +4°C'de saklanan, tamoksifen dimetil-β-siklodekstrin kohleat formülasyonlarının TEM görüntüleri



Resim 57. 6 aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +25°C'de saklanan, tamoksifen dimetil- β -siklodekstrin kohleat formülasyonlarının TEM görüntüleri

5. TARTIŞMA

5. 1. In Vitro Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi

5.1.1. Analiz Yöntemlerinin Seçimi

5.1.1.1. Raloksifen Hidroklorür için Analiz Yönteminin Seçimi

Çalışmamızda, raloksifen hidroklorür miktar tayini için HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) analizi kullanıldı. HPLC yöntemi, etkin maddenin hücre kültüründen geçiş çalışmalarında, in vitro diyaliz membran geçiş çalışmalarında, in vivo çalışmalarda ve stabilite çalışmalarında kullanıldı. HPLC çalışmalarına başlamadan önce UV spektrofotometre kullanılarak her iki etkin madde için de dalga boyu taraması yapılarak çalışılacak dalga boyu belirlendi.

Raloksifen için dalga boyu taraması yapmak amacıyla raloksifen hidroklorürün; hücre kültürü geçişlerinde kullanılan ortam olan Propilen Glikol/Dulbecco's Modifies Eagle Medium (PG/DMEM) (%60/40) ve diyaliz membran-Franz difüzyon hücrelerinden geçiş deneylerinde ayrıca stabilite çalışmalarında kullanılan ortam olan pH 7.4 fosfat tamponu kullanıldı ve her iki ortam için de dalga boyu 287 nm olarak bulundu. Trontelj ve arkadaşlarının yaptığı çalışma da raloksifen için dalga boyu 287 nm olarak belirtilmiştir¹⁶⁸. Bu literatürdeki yöntem kullanılarak, 287 nm dalga boyunda, akış debisi 0.7 mL/dakika olarak C₁₈ kolon kullanılarak analizler yapılmıştır. Yang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, amonyum asetat:asetonitril mobil fazıyla pH 4'te çalışılmış ve raloksifenin dalga boyu 289 olarak belirtilmiştir¹⁶⁹. Plazma örneklerinin hazırlanması, Yang ve arkadaşlarının belirttiği gibi yapılmıştır.

Kullanılan yöntem doğrusallık yönünden (PG/DMEM) (%60/40) ortamında, pH 7.4 fosfat tamponunda ve plazmada değerlendirilmiştir. İki koşulda da kalibrasyon doğrusunun r^2 değerleri 0.999'un üstünde bulunmuştur. Formülasyonlarda bulunan absorpsiyon artırıcı maddelerin 287 nm dalga boyunda pik vermedikleri gözlenmiş, yöntemin raloksifen tayinine uygun olduğuna karar verilmiştir. HPLC yöntemi her üç ortam için doğru, kesin, özgün, hassas ve stabil bulunmuştur.

5.1.1.2. Tamoksifen Sitrat için Analiz Yönteminin Seçimi

Çalışmamızda, tamoksifen sitrat miktar tayini için HPLC analizi kullanıldı. HPLC yöntemi, etkin maddenin hücre kültüründen geçiş çalışmalarında, in vitro diyaliz membran geçiş çalışmalarında, in vivo çalışmalarda ve stabilite çalışmalarında kullanıldı.

Tamoksifen için dalga boyu taraması yapmak amacıyla raloksifen hidroklorürün, hücre kültürü geçişlerinde kullanılan ortam olan Propilen Glikol/Dulbecco's Modifies Eagle Medium (PG/DMEM) (%60/40) ve diyaliz membran-Franz difüzyon hücrelerinden geçiş deneylerinde ayrıca stabilite çalışmalarında kullanılan ortam olan pH 7.4 fosfat tamponu kullanıldı ve her iki ortam için de dalga boyu 238 nm olarak bulundu. Fontana ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada tamoksifen için dalga boyu 250 nm olarak belirtilmiştir²⁰⁴.

Çalışmamızda, Fontana ve arkadaşlarının uyguladığı yöntem tampon sisteminde modifikasyon yapılarak uygulanmıştır²⁰⁴. Fontana ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, tampon sistemi olarak CH₃OH/0.1M K₂HPO₄ (pH 8.7) (90/10) (v/v) akış hızı olarak ise 1.5 mL /dk kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda bu sistem modifiye edilerek, 0.1 M olan tampon derişimi dörtte birine (0.025 M) düşürülmüş, akış hızı olarak da 1 mL/dk

kullanılmıştır. Ayrıca Fontana ve arkadaşları C18 (4.6x250 mm) kolon kullanmışlardır. Bizim çalışmamızda ise, ODS 2, (4.6x150 mm) kolon kullanılmıştır.

Kullanılan yöntem doğrusallık yönünden (PG/DMEM) (%60/40) ortamında, pH 7.4 fosfat tamponunda ve plazmada değerlendirilmiştir. İki koşulda da kalibrasyon doğrusunun r^2 değerleri 0.999'un üstünde bulunmuştur. Formülasyonlarda bulunan absorpsiyon artırıcı maddelerin 238 nm dalga boyunda pik vermedikleri gözlenmiş, yöntemin tamoksifen tayinine uygun olduğuna karar verilmiştir. HPLC yöntemi her üç ortam için doğru, kesin, özgün, hassas ve stabil bulunmuştur.

5.1.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

DSC çalışmaları, 10°C/dk tarama hızında ve 300°C'ye kadar yapıldı. Etkin maddelerimiz raloksifen, tamoksifen ve formülasyon hazırlamada kullanılan tüm yardımcı maddelerin tek başına ve etkin maddelerle 1:1 oranındaki karışımları kullanarak gerçekleştirildi. Raloksifen tek başına 268.9°C'de, tamoksifen ise 146.3° C'de erimiştir.

Raloksifen CaCl₂ karışımında raloksifen piki 267.3°C'de, dekstran ile olan karışımında 260.9°C'de, dimetil-β-CD ile olan karışımında 268.5°C'de, DOPS ile olan karışımında 263.6°C'de, DPPC ile olan karışımında 257.8°C'de, kitozan ile olan karışımında 254.4°C'de, sodyum taurokolat ile olan karışımında 268.5°C'de, PEG 8000 ile olan karışımında 268.5°C'de, tripolifosfat ile olan karışımında 262.1°C'de gözlenmiştir.

Tamoksifen CaCl_2 karışımında tamoksifen piki 145.02°C 'de, dekstran ile olan karışımında 146.7°C 'de, dimetil- β -CD ile olan karışımında 146.2°C 'de, DOPS ile olan karışımında 141.2°C 'de, DPPC ile olan karışımında 140.9°C 'de, kitozan ile olan karışımında 145.7°C 'de, sodyum taurokolat ile olan karışımında 141.1°C 'de, PEG 8000 ile olan karışımında 143.1°C 'de, tripolifosfat ile olan karışımında 145.8°C 'de gözlenmiştir.

Bölüm 4.1.3 ve Bölüm 4.2.3'te verilen DSC termogramları incelendiğinde, etkin maddeler ve yardımcı madde karışımlarının hiç birinde etkin maddelere ait piklerin kaybolmadığı görülmektedir. İki etkin madde için de herhangi bir yardımcı madde ile etkileşime rastlanmamıştır.

5.1.3. MTT Testine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Hücre kültür çalışmaları yapılmadan önce, deneylerde kullanılması düşünülen maddelerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmeli, deneylerde kullanılacak etkin ve yardımcı madde miktarları buna göre seçilmelidir. Sitotoksikite testi sonucunda hücre canlılık oranları % 50'nin üzerinde olmalıdır^{210,234}.

Literatür incelendiğinde, hücre canlılığının izlenmesinde kullanılan yöntemleri boya bazlı testler ve biyoluminesans testler olmak üzere iki temel grupta toplamak mümkündür. Boya bazlı testler hücresel metabolik fonksiyonların ölçülmesine olanak sağlamaktadır. Genellikle tetrazolium tuzları kullanılmaktadır. Boya bazlı testlere örnek olarak başta MTT olmak üzere MTS, XTT verilebilir. Bu testler mitokondriyal aktiviteye dayalı ölçüm sağlarlar. WST-1 ve LDH testi ve mitokondriyal membran bütünlüğünün ölçümü de sıklıkla kullanılan yöntemlerdir. Tetrazolium tuzlarına ek olarak florasen boyalar da dikkati çekmektedir. Florasan boyalara örnek olarak Alamar Mavisi verilebilir. Biyoluminesans testlerin

en çok kullanılanı ATP tayinine yönelik olanıdır. Testin esası canlı hücrelerin ATP'ye ihtiyaç duymasıdır^{206,207}. Son yıllarda hücre canlılığını ölçmek için 96 kuyucuklu kullanıma hazır kitlere de rastlamak mümkündür²⁰⁸.

MTT testinin başlıca avantajları, uygulama kolaylığı, hızlı oluşu ve sonuçların microplate reader ile otomatik olarak alınabilmesine olanak sağlamasıdır²⁰⁹. Bu avantajlarından ve hücre canlılığının değerlendirilmesinde literatürde en sık karşılaşılan yöntem olduğundan, tez çalışmamızda bu metod seçilerek kullanılmıştır.

Çalışmamızda MTT testi yapılmasındaki amaç, hücrelerden geçiş çalışmasını, ve in vivo çalışmalarını yapacağımız çözelti, lipozom, nanopartikül ve formülasyonlarını oluşturan maddelerin, bunun yanı sıra absorpsiyon artırıcı olarak kullanılan maddelerin hücreler canlı kalacak şekilde, maksimum hangi miktarlarda kullanabileceğinin görülmesidir.

Raloksifen, tamoksifen ve absorpsiyon artırıcıların Caco-2, MDA MB-231ve MCF-7 hücrelerine olan toksik etkileri incelendi. Etkin madde içermeyen lipozom, kohleat ve nanopartikül formülasyonlarının %25, %50 ve %75 oranındaki miktarlarının ve ayrıca hücre kültürü geçişlerinde kullanılan ortam olan PG/DMEM (%60/%40)'in de hücreler üzerine etkileri incelendi. Caco-2 hücrelerinden geçiş çalışmaları ve in vivo çalışmalar 24 saat sürecek şekilde planlandığı için, MTT testi süresinin de 24 saat olmasına karar verilmiştir.

Test sonuçlarına göre, 60 ve 120 µg/mL raloksifenin Caco-2 hücrelerindeki % canlılık değerleri sırasıyla %74.4 ve %69.4 bulunmuş olup bu kontrasyonda raloksifenin güvenle kullanabileceğini göstermiştir. (p >0.05) Test sonuçları istatistiksel olarak incelendiğinde, raloksifenin 450 ve 900 µg/mL derişimlerinin Caco-2 hücre canlılığını anlamlı olarak

azalttığı görülmüştür ($p < 0.001$). Test sonuçlarına göre, 30, 60 ve 120 $\mu\text{g/mL}$ tamoksifenin Caco-2 hücrelerindeki % canlılık değerleri sırasıyla %90.6, %86.3 ve %78.4 bulunmuş olup bu konstrasyonda tamoksifenin güvenle kullanabileceğini göstermiştir ($p > 0.05$). Yapılan testlerin sonuçları istatistiksel olarak incelendiğinde, tamoksifen 600 ve 1200 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerinin Caco-2 hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmüştür ($p < 0.001$). Yapılan testlerin sonuçları istatistiksel olarak incelendiğinde, sodyum taurokolatın 3.75 ve 7.5 mM konsantrasyonlarının Caco-2 hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmüştür ($p < 0.01$). Test sonuçlarına göre, %0.15 konsantrasyonda dimetil- β -CD'nin Caco-2 hücrelerindeki % canlılık değeri %68.4 bulunmuş olup bu konstrasyonda dimetil- β -CD'nin güvenle kullanabileceğini göstermiştir ($p > 0.05$).Yapılan testlerin sonuçları istatistiksel olarak incelendiğinde, dimetil- β -CD'nin %0.15 dışında denenen tüm konsantrasyonlarının hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmüştür ($p < 0.001$)²¹⁰. Karamustafa F ve arkadaşları, çalışmalarında yaptıkları MTT testi sonucunda, sodyum taurokolat miktarını 5 mM, dimetil- β -CD miktarını ise, %0.3 olarak bildirmişlerdir²¹¹.

Yapılan testlerin sonuçları istatistiksel olarak incelendiğinde, lipozom, nanopartikül ve kohleat formülasyonlarının denenen hiçbir konsantrasyonunun Caco-2 hücre canlılığını anlamlı etkilemediği görülmüştür.

Test sonuçlarına göre, 60 ve 120 $\mu\text{g/mL}$ raloksifenin MDA-MB 231 hücrelerindeki % canlılık değerleri sırasıyla %98.7 ve %95.3 bulunmuş olup bu konstrasyonda raloksifenin güvenle kullanabileceğini göstermiştir. ($p > 0.05$) Test sonuçları istatistiksel olarak incelendiğinde, raloksifen 450 ve 900 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerinin MDA-MB 231 hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmüştür ($p < 0.001$). Test sonuçlarına göre, 30, 60 ve 120 $\mu\text{g/mL}$ tamoksifenin MDA-MB231 hücrelerindeki % canlılık değerleri sırasıyla %88.2, %86.9 ve %79.3 bulunmuş olup bu

konstrasyonda tamoksifenin güvenle kullanabileceğini göstermiştir ($p>0.05$). Yapılan testlerin sonuçları istatistiksel olarak incelendiğinde, tamoksifen için 300, 600 ve 1200 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerinin MDA-MB 231 hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmüştür ($p<0.001$). Test sonuçlarına göre, 0.005 ve 1.875 mM sodyum taurokolatın bu hücrelerdeki % canlılık değerleri sırasıyla %99.2 ve %79.6 bulunmuş olup bu konstrasyonlardada sodyum taurokolatın güvenle kullanabileceğini göstermiştir ($p>0.05$). Yapılan testlerin sonuçları istatistiksel olarak incelendiğinde, sodyum taurokolatın 1,875 3.75 ve 7.5 mM konsantrasyonlarının MDA-MB 231 hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmüştür ($p<0.01$). Test sonuçlarına göre, %0.15 konsantrasyonda dimetil- β -CD'nin MDA-MB 231 hücrelerindeki % canlılık değeri %80.1 bulunmuş olup bu konstrasyonda dimetil- β -CD'nin güvenle kullanabileceğini göstermiştir ($p>0.05$).Yapılan testlerin sonuçları istatistiksel olarak incelendiğinde, dimetil- β -CD'nin %0.15 dışında denenen tüm konsantrasyonlarının hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmüştür ($p<0.01$, $p<0.001$). Yapılan testlerin sonuçları istatistiksel olarak incelendiğinde, lipozom, nanopartikül ve kohleat formülasyonlarının denenen hiçbir konsantrasyonunun MDA-MB 231 hücre canlılığını anlamlı etkilemediği görülmüştür.

Test sonuçlarına göre, 60 ve 120 $\mu\text{g/mL}$ raloksifenin MCF-7 hücrelerindeki % canlılık değerleri sırasıyla %94.7 ve %89.6 bulunmuş olup bu konstrasyonda raloksifenin güvenle kullanabileceğini göstermiştir. ($p >0.05$) Test sonuçları istatistiksel olarak incelendiğinde, raloksifen 450 ve 900 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerinin MCF-7 hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmüştür ($p<0.01$, $p<0.001$). Test sonuçlarına göre, 30, 60 ve 120 $\mu\text{g/mL}$ tamoksifenin MCF-7 hücrelerindeki % canlılık değerleri sırasıyla %94.4, %89.1 ve %80.2 bulunmuş olup bu konsantrasyonda tamoksifenin güvenle kullanabileceğini göstermiştir ($p>0.05$). Yapılan testlerin sonuçları istatistiksel olarak incelendiğinde, tamoksifen için 300, 600 ve 1200 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerinin MCF-7 hücre canlılığını anlamlı olarak

azalttığı görülmüştür ($p<0.001$). Test sonuçlarına göre, 0.005 ve 1.875 mM sodyum taurokolatın bu hücrelerdeki %canlılık değerleri sırasıyla %93.8 ve %81.9 bulunmuş olup bu konsantrasyonlardada sodyum taurokolatın güvenle kullanabileceğini göstermiştir ($p>0.05$). Yapılan testlerin sonuçları istatistiksel olarak incelendiğinde, sodyum taurokolatın 3.75 ve 7.5 mM konsantrasyonlarının MCF-7 hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmüştür ($p<0.01$, $p<0.001$). Test sonuçlarına göre, %0.15 konsantrasyonda dimetil- β -CD'nin MCF-7 hücrelerindeki % canlılık değeri %66.7 bulunmuş olup bu konsantrasyonda dimetil- β -CD'nin güvenle kullanabileceğini göstermiştir ($p>0.05$).Yapılan testlerin sonuçları istatistiksel olarak incelendiğinde, dimetil- β -CD'nin %0.15 dışında denenen tüm konsantrasyonlarının hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmüştür ($p<0.01$, $p<0.001$). Yapılan testlerin sonuçları istatistiksel olarak incelendiğinde, lipozom, nanopartikül ve kohleat formülasyonlarının denenen hiçbir konsantrasyonunun MCF-7 hücre canlılığını anlamlı etkilemediği görülmüştür.

Caco-2 geçiş deneylerinde ortam olarak kullanılan PG/DMEM (%60/%40)'in Caco-2 hücrelerindeki canlılık değeri ise %77.4 olarak hesaplanmıştır.

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, raloksifen ve tamoksifeni 120 $\mu\text{g/mL}$ dozda, dimetil- β -CD'yi %0.15 oranda, sodyum taurokolatı ise 0.005 mM miktarda kullanımının uygun olduğuna karar verilmiştir. Geçiş deneylerinde kullanılması planlanan PG/DMEM (%60/%40)'in ise güvenle kullanılabileceğine karar verilmiştir. PG/DMEM (%60/%40)'in literatürde az çözünen moleküllerin geçiş çalışmalarında, sink koşulun sağlanması amacıyla güvenle kullanılabileceği belirtilmiştir. Bu yüzden hücre kültüründen geçiş çalışmalarında ortam olarak kullanılmıştır²¹².

5.1.4. İn vitro ve İn vivo Çalışmalarda Kullanılan Formülasyonların Lipozomların Karakterizasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi

5.1.4.1. İn vitro ve İn vivo Çalışmalarda Kullanılan Lipozomların Karakterizasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Literatürde kitozan ile lipozom hazırlanmasına dair çalışmalara rastlamak mümkündür. Yöntemler genellikle geleneksel yöntemlerle hazırlanan lipozomların kitozan ile kaplanması böylelikle etkin maddeyi salana kadar stabilitesinin artırılmasına yöneliktir. Yapay kırmızı kan hücresi olan hemazomların stabilize edilmesi ya da hedeflendirme amaçlı kullanımı da vardır^{213,214}. Bu çalışmada, raloksifen, tamoksifen ve absorpsiyon artırıcı olarak dimetil- β -CD ve sodyum taurokolat içeren lipozomlar, Mertins ve arkadaşlarının literatürde sunduğu yöntemle göre hazırlanmıştır¹⁷¹. Araştırmacılar hazırladıkları lipozomların partikül büyüklüğünü 269 nm, zeta potansiyellerini ise -34 mV olarak bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda sadece raloksifen içeren lipozomların partikül büyüklüğü 210 nm, zeta potansiyeli 7.94 mV, enkapsülasyon verimleri %51.9, bulunmuştur. Raloksifen ve dimetil- β -CD içeren lipozomların partikül büyüklüğü 344.6 nm, zeta potansiyeli -12.5 mV, enkapsülasyon verimleri % 42.9, bulunmuştur. Raloksifen ve sodyum taurokolat içeren lipozomların partikül büyüklüğü 224 nm, zeta potansiyeli 9.43 mV, enkapsülasyon verimleri %48.3, bulunmuştur.

Tamoksifen ile hazırlanan lipozomlar için ise, sadece tamoksifen içeren lipozomların partikül büyüklüğü 208 nm, zeta potansiyeli 11.7 mV, enkapsülasyon verimleri %81.8, bulunmuştur. Tamoksifen ve dimetil- β -CD içeren lipozomların partikül büyüklüğü 245 nm, zeta potansiyeli -14.3 mV, enkapsülasyon verimleri %45.1, bulunmuştur.

Tamoksifen ve sodyum taurokolat içeren lipozomların partikül büyüklüğü 243 nm, zeta potansiyeli 29 mV, enkapsülasyon verimleri %70.3, bulunmuştur. Tamoksifen ile hazırlanan lipozomların enkapsülasyon verimleri daha yüksek bulunmuştur. Teorik olarak düşünüldüğünde, benzer benzeri sever ilkesi uyarınca lipofilik etkin maddelerin lipozom formülasyonunun içinde enkapsülasyonunun yüksek olacağı akla gelir. Ancak pratikte genellikle öyle olmaz. Lasic tarafından yayınlanan bir derlemede, lipozomlarda enkapsülasyon veriminin teorik olarak %70'in üzerinde olabileceğinin düşünülmesine karşın, bu değer deneysel olarak hiçbir zaman sağlanamadığı belirtilmiştir. %50 civarında bulunan enkapsülasyon veriminin iyi bir sonuç olduğu ifade edilmiştir¹³⁵.

Yapılan bir çalışmada, tamoksifen ve DSPC-DMPC fosfolipitleri kullanılarak bir seri stealth lipozom hazırlanmış ve hazırlanan lipozomlar karakterize edilmiştir. 482-892 nm arasında partikül büyüklükleri elde edilmiştir. -37 ile -41 mV arasında değişen zeta potansiyelleri ve diyaliz ardından %6-9 arasında enkapsülasyon verimleri elde ettiklerini bildirmişlerdir²¹⁵. Bizim çalışmamızda kullanılan lipitten farklı lipitler kullanılarak yapılan bu çalışmada, enkapsülasyon verimleri bizim çalışmamızda hazırlanan lipozomlara göre oldukça düşük, zeta potansiyel değerleri biraz daha yüksek bulunmuştur. Bu tip farklar, kullanılan lipit ve etkin madde kaynağı farklarından, laboratuvar koşullarından ve kullanılan aletlerden kaynaklanabilmektedir.

5.1.4.2. İn vitro ve İn vivo Çalışmalarda Kullanılan Nanopartiküllerin Karakterizasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Kitozan pek çok alanda kullanımıyla karşımıza çıkan doğal ve biyoyeçimli bir polimerdir. İlaç taşınmasında, oral, parenteral, nazal, oküler yollarla hatta gen terapisinde kullanımına rastlamak mümkündür. Oral yolla kullanımında, mikropartiküller, lipozomlar, bukkal diskler,

çözeltiler, tabletleri kaplı tabletler, püskürtülerek kurutulmuş nanopartiküller karşımıza çıkmaktadır²¹⁶. Kontrollü ilaç salımı, mukoadesyon özelliği, in situ jelleşme özelliği (özellikle nasal ve oküler sistemlerde önemli), DNA ve RNA bazlı ilaçlarda transfeksiyonu artırma özelliği, permeasyonu artırma özelliği, eflux pompa inhibisyon özelliği, kolona ilaç hedeflendirmesi gibi özellikler kitozanın başlıca özellikleridir ²¹⁷. İntestinal absorpsiyonun özellikle oral yolla absorpsiyonun artırılmasında da kitozandan yararlanılmaktadır^{218, 219}.

Literatürde kitozan nanopartikül hazırlamada kullanılan pek çok yöntem bulunmaktadır^{172, 220-223}. Örneğin Muhammed ve arkadaşları, tüberküloz tedavisinde kullanılması amacıyla izoniyazid yüklü kitozan nanopartikülleri hazırlamışlardır. Tripolifosfat kullanarak iyonik jelasyon yöntemiyle hazırladıkları farklı oranlarda kitozan içeren nanopartiküllerin enkapsülasyon verimini %60-76.5, partikül büyüklüklerini 250-800 nm, zeta potansiyellerini de kitozan derişimine bağılı olarak pozitif değerlerde olarak bildirmişlerdir²²⁰.

Bu çalışmada, Qi ve arkadaşlarının kitozanın antibakteriyal etkisini izlemek için pozitif yüklü kitozan ile negatif yüklü tripolifosfat arasındaki iyonik etkileşmeye dayanarak iyonik jelasyon yöntemiyle hazırladıkları nanopartikül hazırlama yöntemi kullanılmıştır. Araştırmacılar hazırladıkları bakır yüklü nanopartiküllerin, partikül büyüklüklerini 65.2-663.8 nm, zeta potansiyellerini ortalama 96 mV olarak bildirmişlerdir¹⁷².

Literatürdeki hazırlama yöntemi kullanılarak, hazırlanan raloksifen ve dimetil-β-CD içeren nanopartiküllerin partikül büyüklüğü 345 nm, Zeta potansiyeli 57.7 mV, enkapsülasyon verimleri %82.7, bulunmuştur. Bu bulgular, çalışmamızda hazırlanan nanopartiküllerin partikül boyutunun daha küçük olmasından dolayı, bulunan zeta potansiyellerinin de neden daha düşük olduğunu açıklamaktadır.

Tamoksifen ve dimetil- β -CD içeren nanopartiküllerin partikül büyüklüğü 457.3 nm, Zeta potansiyeli 45.6 mV, enkapsülasyon verimleri %43.8, bulunmuştur. Ravikumaran ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, iyonik jelasyon yöntemiyle tamoksifen içeren kitozan nanopartikülleri hazırlanmıştır. Hazırladıkları nanopartiküllerin partikül büyüklüklerini farklı pH'larda ölçmüşler ve 187-389 nm arasında değişen sonuçlar elde etmişlerdir. Kitozan konsantrasyonu arttığında partikül boyutunun arttığını, TPP konsantrasyonunun da partikül boyutu üzerinde etkili olduğunu bildirmişlerdir. pH arttıkça zeta potansiyelin arttığını belirtmişlerdir. Kitozan ve TPP konsantrasyonlarının enkapsülasyon verimlerini de %40-%80 arasında değiştirdiği de araştırmacılar tarafından bildirilmiştir²²⁴. Bulunan %verim ve zeta potansiyeli sonuçlarının, literatüre göre yakın ve yeterli sonuçlar olduğu anlaşılmıştır^{172,219}.

5.1.4.3. İn vitro ve İn vivo Çalışmalarda Kullanılan Kohleatların Karakterizasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Kohleatlar oral ve sistemik etkili ilaç taşınmasında lipozom ve nanopartiküllere göre çok daha yeni olarak kullanılan sistemlerdir ¹⁴². Kohleatlar ile ilgili literatür taramasında, konu ile ilgili çok fazla çalışmaya rastlamak mümkün değildir^{99,141,142,173,174,225-227}. Literatür taramasında karşılaşılan çalışmalar, genellikle oral yolla kullanılacak ilaçların taşınması şeklindedir. Literatürler incelendiğinde benzer hazırlama metodları karşımıza çıkmaktadır. Çalışmaların hemen hemen hepsinde önce katyonik bir lipid olan DOPS kullanılarak lipozom hazırlanması ardından lipozomların dekstran (%20-%40 a/h) disperse edilerek PEG 8000 (%15 a/a) gibi yoğun viskoziteli bir çözeltiyle karıştırılması ve bir süre sonra multivalan (CaCl_2 gibi) katyon içeren bir çözeltinin karıştırma sırasında damla damla ilave edilmesine rastlanmaktadır^{99,141,142,173,174,225-227}. Yapılan bir çalışmada, kohleasyon ajanı olarak polilizin ve tobramisin gibi multivalan metal iyonu taşımayan ajanlar, CaCl_2 , EDTA gibi farklı maddeler

denenmiştir. Polilizin:lipozom oranlarını değiştirilerek farklı partikül büyüklüğü değerleri elde edilmiştir. 4:1 ve 3:1 yük oranlarıyla hazırlanan kohleatların partikül büyüklükleri sırasıyla 111.3 ± 57.8 ve 160.1 ± 88.9 olarak bildirmişlerdir. Partikül büyüklüklerinin farklı olmasına rağmen farkın anlamlı olmadığını ifade etmişlerdir. Özellikle, nanometre boyutlarında olan tobramisin yüklü kohleatların hücre membranlarıyla etkileşiminin çok başarılı olduğunu belirtmişler ve antimikrobiyal aktivitesinin yüksek olduğuna dikkat çekmişlerdir¹⁷³.

Çalışmamızda Segarra ve arkadaşlarının, oldukça hidrofobik bir etkin madde olan amfoterisin B ile kohleat hazırlanmasında kullandıkları metod kullanılmıştır. Araştırmacılar hazırladıkları kohleatların partikül büyüklüğünü 404 ± 233.8 nm olarak bildirmişlerdir. Farelere İV yolla tek seferlik uygulamanın ardından belirgin doku dağılımının hedef dokularda penetrasyonunun yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Özellikle karaciğerde birikiminin fazla olduğunu bu da fagosite edilerek karaciğer başta olmak üzere dalak, akciğer ve böbreklerde tutulmasıyla mononükleer fagosite sistem (MPS) ve retikulo endotelial sistem (RES)'in devreye girdiği şeklinde yorumlanmıştır¹⁷⁴. Bu hazırlama yöntemi kullanılarak, bizim çalışmamızda raloksifen ve dimetil- β -CD içeren nanopartiküllerin partikül büyüklüğü 288.7 nm, zeta potansiyeli 57.7 mV, enkapsülasyon verimleri %36.2, bulunmuştur. Literatürde kohleat formülasyonlarının enkapsülasyon verimlerine dair bir veriye rastlanmamıştır. Enkapsülasyon verimleri üzerinde düşünüldüğünde, kohleatların lipozomlardan hareketle hazırlandığı göz önünde bulundurulursa bulunan enkapsülasyon verimleri normaldir. Lasic¹³⁵ tarafından yapılan lipozomlarla ilgili çalışmaya göre, bizim çalışmamızda elde edilen yaklaşık %40 olan kohleat verimlerinin iyi olduğu düşünülebilir.

Tamoksifen ile hazırlanan kohleatlar için ise, tamoksifen ve dimetil- β -CD içeren kohleatların partikül büyüklüğü 421.7 nm, zeta

potansiyeli -36.3 mV, enkapsülasyon verimleri %51.1, bulunmuştur. Bulunan sonuçların literatürde yapılan çalışmalara göre yeterli olduğu anlaşılmıştır^{135,174}.

5.1.5. İn Vitro Geçiş Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

5.1.5.1. Hücre Tek Tabakası İçermeyen Filtrelerden Geçiş Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Hücre kültüründen geçiş çalışmalarında yaygın olarak kullanılan ortam DMEM'dir²²⁸⁻²³¹. DMEM'den sonra en sık karşılaşılan diğer bir ortam ise HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)'dir²³²⁻²³⁵. Yapılan literatür taramasında lipofilik etkin maddelerin membranlardan geçiş çalışmalarında propilen glikol ile hazırlanan ortamlardan daha doğru sonuçlar alınabileceği bulgusuna rastlanmıştır. Az çözünen tamoksifen ve daha az çözünen raloksifen ile çalışılacak olmasından dolayı etkin maddelerimizin kısmen daha rahat çözünmesini sağlayacak olan PG/DMEM (%60/%40) ile çalışılmıştır. Çalışmaya başlamadan önce yapılan MTT testinde bu ortamın hücre canlılığını anlamlı olarak değiştirmediği anlaşılmıştır. Bu yüzden bu ortamda da validasyon çalışması yapılarak geçiş çalışmaları bu ortamda gerçekleştirilmiştir²¹².

Hücre kültüründen geçiş çalışmalarına başlamadan önce hücre içermeyen boş membrandan geçiş yapılması membranın madde geçişine etkisi olup olmadığının anlaşılmasında önemlidir. Bu nedenle raloksifen ve tamoksifen çözeltilerinin, lipozomlarının, nanopartiküllerinin ve kohleatlarının hücre içermeyen boş membranlardan geçiş çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bölüm 4.1.1.5.1 ve Bölüm 4.2.1.5.1'de hücre içermeyen boş membrandan geçiş çalışmalarına ait grafikler verilmiştir.

Sonuçlar incelendiğinde, raloksifen çözelti formülasyonları için en fazla raloksifen geçişinin raloksifen ve sodyum taurokolat içeren çözelti ile sağlandığını görülmektedir (%40.8) ($p<0.001$). Bunun sebebinin sodyum taurokolatın bir safra tuzu olarak aynı zamanda yüzey etkin madde gibi davrandığı ve raloksifenin çözünürlüğünü artırarak geçişinin fazla olmasına sebep olduğu düşünülmüştür. Dimetil- β -CD'nin de sodyum taurokolat kadar olmasa da raloksifenin çözünürlüğünü artırmaya katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır. Tamoksifen çözeltileri için de sonuçlar benzer olmuştur. Ayrıca tamoksifenin çözünürlüğü raloksifene göre daha iyi olduğundan sodyum taurokolatın su fazındaki çözünürlüğünü de artırmasıyla oldukça yüksek (%73.2) ($p<0.01$) bir geçiş sağlamıştır. Aynı şekilde dimetil- β -CD tamoksifenin geçişini artırmada sodyum taurokolat kadar başarılı olmuştur.

Raloksifen lipozom formülasyonlarına ait sonuçlar incelendiğinde en fazla raloksifen geçişinin raloksifen ve dimetil- β -CD içeren lipozom ile sağlandığını görülmektedir (%8.54) ($p<0.01$). Lipozomlarda raloksifenin dimetil- β -CD'nin içine hapsolmasıyla raloksifenin, lipozomların hem sulu hem de yağlı fazlarında dağılmasını sağlayarak böylece raloksifen geçişini artırdığı düşünülmüştür. Sodyum taurokolat ise sadece sulu fazda raloksifenin çözünürlüğünü artırmış bunun sonucu olarak da geçişi artırmada daha az etkili olmuştur^{210,237}. Tamoksifen lipozomları için de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Dimetil- β -CD içine hapsolan tamoksifen, serbest tamoksifene göre daha iyi geçiş özelliği göstermiştir (%12.7) ($p<0.01$). Kohleat formülasyonları için de lipozomlar gibi düşünmek mümkündür. Çünkü kohleat formülasyonları lipozomlardan hareketle hazırlanmaktadır. Hem raloksifen (%19.2) ($p<0.001$) hem de tamoksifen (%14.9) ($p<0.001$) içeren kohleatlar için dimetil- β -CD'li formülasyonlar sadece etkin madde içeren ve etkin maddelerin yanı sıra sodyum taurokolat içeren formülasyonlara göre belirgin artmış bir geçiş sağlamıştır. Dimetil- β -CD yağ fazındaki

çözünürlüklerini artırarak %kümülatif geçen etkin madde miktarının da artmasına neden olmuştur.

Raloksifen nanopartikül formülasyonları için düşünüldüğünde, hazırladığımız nanopartiküller su bazlı olduğu için yağ bazlı formülasyonlar olan lipozom ve kohleatlara değil çözelti formülasyonlarına benzer olarak sodyum taurokolatın bir yüzey etkin madde olarak, hem raloksifen hem de tamoksifen içeren nanopartiküllerin geçişini artırdığı görülmektedir. Sodyum taurokolat raloksifenin nanopartiküllerin temel ortamı olan su fazındaki, zaten çözünürlüğü daha iyi olan tamoksifenin çözünürlüğünü iyice artırmıştır. Ayrıca nanopartikül yapımında kullanılan kitozanın da oral yolla absorpsiyonun artırılmasında yararlanılan bir polimer olduğu göz önünde bulundurulursa^{215,216} geçişi artırmış olabileceği düşünülebilir.

5.1.5.2. Caco-2 Hücrelerinden Geçiş Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Caco-2 hücrelerinden geçişini incelemeye başlamadan önce literatür taraması yapılarak Caco-2 hücrelerinin inkübasyon süresine ve hücre ekim yoğunluğuna karar verildi. Literatür taraması sonucunda 21 gün inkübe edilen Caco-2 hücrelerinin membrana daha iyi fikse olarak, tek tabaka oluşturduğu görüldü. Caco-2 hücrelerinden geçiş çalışmalarında 21 gün inkübe edilen Caco-2 hücrelerinin 80000 hücre/cm² yoğunlukta kullanılmasına karar verildi¹⁷⁵⁻¹⁷⁹.

Raloksifen çözeltilerinin, Caco-2 geçişleri incelendiğinde sodyum taurokolatın (%15.9) (p< 0.001) raloksifenin sudaki çözünürlüğünü artırarak sadece raloksifen içeren çözeltiye (%8.74) göre geçişinin daha iyi olmasına sebep olmuştur. Sodyum taurokolatlı çözeltiyle yakın %kümülatif

değerler bulunmuştur. Çözelti tipi formülasyonlar için aralarındaki fark anlamlı değildir ($p>0.05$). Ancak çözünürlüğün artması demek molekülün iyonize olması demektir. Dimetil- β -CD ise raloksifen çözünürlüğünü, sodyum taurokolata göre daha az artırmakla, böylelikle raloksifenin noniyonize halinin daha fazla olmasına ve sonuçta geçişin sodyum taurokolatlı çözeltiden daha fazla olmasına neden olmuştur (%16.9) ($p<0.001$). Çözünürlük üzerine olan etkilerinin yanı sıra sodyum taurokolat ve dimetil- β -CD'nin hücreler arasındaki sıkı bağlantı noktalarını açmada böylece geçişi artırmada olan etkileri de bilinmektedir²³⁷. Tamoksifen çözeltilerinin hücre kültürü geçiş çalışmalarında da benzer bulgulara rastlanmıştır. Siklodekstrinlerin çözünürlüğü ve geçişi artırdığına dair literatürde pek çok çalışma bulunmaktadır^{238,239}. Tamoksifenin sudaki çözünürlüğü raloksifene göre daha fazla olduğundan %kümülatif geçen tamoksifen miktarları biraz daha fazla olmakla birlikte sodyum taurokolat ve dimetil- β -CD için geçişi artırma mekanizmaları aynıdır.

Raloksifen lipozomları için Caco-2 hücrelerinden geçiş bulgularına göre, lipozom formülasyonu raloksifenin hücre kültürlerinden geçişini en fazla artıran formülasyon tipi olarak karşımıza çıkmaktadır. Hücre membranlarına yapı olarak benzerlik gösteren lipozomlar lipofilik bir etkin madde olan raloksifeni yapısında tutmuştur. Dimetil- β -CD içeren lipozomlar, dimetil- β -CD'nin sıkı bağlantı bölgelerini açması sayesinde raloksifenin geçişini artırmıştır (%9.98) ($p<0.001$). Sodyum taurokolat ise lipofilik bir etkin madde olan raloksifenin çözünürlüğünü artırmaya çalışmış, iyonize hale gelen raloksifen de hücre membranlarından daha az geçebilmiştir (%3.96). Tamoksifen lipozomlarında raloksifen lipozom formülasyonlarından farklı olarak sodyum taurokolat tamoksifenin (%4.74) ($p<0.001$) çözünürlüğünü artırmada raloksifende olduğundan daha başarılı olmuş, sıkı bağlantı bölgelerini açmada daha etkili olmuştur.

Raloksifen nanopartikülleri için Caco-2 hücrelerinden geçiş sonuçları değerlendirildiğinde, nanopartiküllerin en az % geçişe sahip formülasyonlar olduğu görülmektedir. Bu bulgu, nanopartiküllerde dimetil- β -CD'nin (%5.46) ($p<0.001$) raloksifenin çözünürlüğünü artırdığı ayrıca hücrelerdeki sıkı bağlantı bölgelerini açarak raloksifenin hücre içine girişini kolaylaştırdığı şeklinde yorumlanmıştır. Aynı etkiyi sodyum taurokolat raloksifen (%2.80) için sağlayamamıştır. Aynı tür özellikler tamoksifen içeren nanopartiküller için de gözlenmiştir. Sodyum taurokolat tamoksifen geçişini artırmayı başaramazken dimetil- β -CD, raloksifende olduğundan daha az olmakla birlikte yine de artışa neden olmuştur.

Kohleat formülasyonlarına ait veriler ise lipozomlardan daha düşük bir geçiş göstermektedir. Bunun nedeninin önce anyonik bir lipit olan DOPS'la lipozom hazırlanıp sonra da sarmal yapı kazandıran formülasyonların lipozomlara göre daha yavaş ve uzun sürede salım yapıyor olabileceğini gösteriyor olabilir. Literatür incelemesi yapıldığında kohleatların hücre membran etkileşimlerinin başarılı olduğu yorumuna rastlanmıştır⁹⁹.

5.1.5.2.1. Caco-2 Hücrelerinden Geçirgenlik Katsayılarının ($k=P_{app}$) Hesaplanmasına Ait Bulgular

Raloksifen içeren formülasyonlar için formülasyon grupları ayrı ayrı kendi içlerinde değerlendirildiğinde, dimetil- β -CD'nin her formülasyon grubu için en yüksek permeabilite katsayılarının elde edilmesine neden olduğu görülmektedir. Her grup kendi içinde, dimetil- β -CD içermeyen formülasyonun permeabilite katsayısıyla istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, raloksifen ve dimetil- β -CD içeren çözeltiler için 1.95 ($p<0.01$), raloksifen ve dimetil- β -CD içeren lipozomlar 4.14 ($p<0.001$), raloksifen ve dimetil- β -CD içeren kohleatlar 1.37 ($p<0.001$) ve raloksifen ve dimetil- β -CD içeren nanopartiküllerin 1.19 permeabilite

katsayılarını anlamlı olarak artırdığı bulunmuştur ($p<0.01$). Sodyum taurokolat içeren formülasyonlar için de sadece raloksifen içeren formülasyonlara göre yüksek permeabilite katsayıları hesaplanmıştır. Ancak bu yükseklik dimetil- β -CD içeren formülasyonların değerlerine göre anlamlı olarak düşüktür ($p<0.01$).

Tamoksifen formülasyonlarında, dimetil- β -CD'nin permeabilite katsayılarını artırma özelliği sadece lipit yapıdaki formülasyonlar olan lipozomlar (1.22) ($p<0.001$), kohleatlar (1.22) ($p<0.001$) ve bunun yanı sıra çözeltilerde (1.98) gözlenmiştir. Nanopartiküllerde ise sodyum taurokolat içeren nanopartiküller en yüksek permeabilite katsayısına sahip formülasyon olmuştur. Dimetil- β -CD'li nanopartiküllerin permeabilite katsayı da ona oldukça yakındır. Sodyum taurokolat içeren formülasyonlar için de sadece tamoksifen içeren formülasyonlara göre yüksek permeabilite katsayıları hesaplanmıştır. Sodyum taurokolatın meydana getirdiği artış sadece kohleat formülasyonu için anlamlı olmakla birlikte ($p<0.001$) dimetil- β -CD'li formülasyona göre düşüktür.

Permeabilite katsayıları üzerinde genel olarak düşünüldüğünde, hem sodyum taurokolatın hem de dimetil- β -CD'nin etkin maddelerin çözünürlüğünü artırdığı ve de sıkı bağlantı noktalarını açtığı görülmektedir. Ancak dimetil- β -CD molekülü, koruyuculuk görevi yaparak etkin maddenin bozunmasına engel olurken, çözünürlüğünü de artırarak daha fazla geçmesine neden olmuştur. Tamoksifene göre çok daha düşük çözünürlüğe sahip olan raloksifen, lipitlerde daha iyi çözündüğünden lipitlerle yapılan formülasyonlarda (lipozom ve kohleat) raloksifenin daha yüksek geçirgenlik katsayısına sahip olmasını sağlamış, dolayısıyla bu sonucun in vivo çalışmalarda daha fazla emilme sağlanmasında etkili olduğu gözlenmiştir.

5.1.5.2.2. Caco-2 Hücrelerinin Elektriksel Dirençlerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

24 saatlik Caco-2 geçiş deneylerinin tamamlanmasından hemen sonra TEER değerleri ölçülmüş, hiçbir formülasyon geçişi yapılmadan önce ölçülen TEER değerleri ile kıyaslanarak sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. En yüksek elektriksel direnç, geçiş başlamadan önce ölçülen TEER değeri olmuştur.

Raloksifen geçişi yapılan formülasyonlarla aynı anda deneye tabi tutulan hücrelerin başlangıç TEER değeri 245 Ω olarak ölçüldü. Raloksifen içeren tüm formülasyon gruplarına bakıldığında, en düşük TEER değerlerinin dimetil- β -CD içeren formülasyonlarda olduğu görülmektedir. Lipozomlar içinde dimetil- β -CD içeren lipozom (210 Ω), nanopartiküller içinde dimetil- β -CD içeren nanopartikül (209 Ω) ve kohleatlar içinde dimetil- β -CD içeren kohleatlar (215 Ω) en düşük TEER değerlerine sahiptir. Tüm bu grupların neden olduğu TEER azalması istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.001$).

Tamoksifen geçişi yapılan formülasyonlarla aynı anda ölçülen başlangıç TEER değeri 285 Ω olarak ölçüldü. Tamoksifen içeren tüm formülasyon gruplarına bakıldığında, en düşük TEER değerlerinin dimetil- β -CD içeren formülasyonlarda olduğu görülmektedir. Lipozomlar içinde dimetil- β -CD içeren lipozom (226 Ω), nanopartiküller içinde dimetil- β -CD içeren nanopartikül (252 Ω) ve kohleatlar içinde dimetil- β -CD içeren kohleatlar (223 Ω) en düşük TEER değerlerine sahiptir. Tüm bu grupların neden olduğu TEER azalması istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.001$).

İki grup için de sodyum taurokolat da sadece etkin madde içeren formülasyonlarla kıyaslandığında daha düşük TEER değerleri bulunmasına sebep olmuştur. elektriksel direnç değerleri incelendiğinde

sodyum taurokolat ve dimetil- β -CD içeren formülasyonların geçişlerinin yapıldığı hücre membranlarından yapılan ölçümler varlığında elektriksel dirençte düşüş olduğunu göstermiştir. Sodyum taurokolat varlığında ise biraz daha az olmakla birlikte yine düşüş görülmüştür. Bu düşüş, absorpsiyon artırıcı maddelerin sıkı bağlantı bölgelerini açmış olduğunu düşündürmüştür.

Elde edilen TEER değerleri permeabilite katsayıları ile birlikte değerlendirildiğinde, birbirleriyle uyumlu oldukları gözlenmiştir.

5.1.5.3. Diyaliz Membran Geçişlerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Formülasyonların diyaliz membrandan geçiş çalışmalarının ardından yapılan kinetik hesaplamalarla, Bölüm 4.2.1.5.3 ve 4.2.2.5.3’de verilen tablolar elde edilmiştir. Kinetik türü seçerken r kare ve SKT uyum ölçütleri göz önüne alınmıştır. Formülasyonların genellikle Higuchi salım kinetiğine uygun olduğu görülmüştür. Higuchi kinetiği bir matris sistemden ilaç salımını ifade eder. Farklı şekil ve por yapısına sahip moleküllere uygun olabilir. Çalışmamızda elde ettiğimiz partiküller tek tür ve küresel olduğundan bu kinetiğe uyum göstermesi beklenir. Hazırladığımız kohleatlar da lipozomlardan hareketle elde edildiği için onların da kinetiği Higuchi salım kinetiğine uygunluk göstermiştir. Çözelti formülasyonları da etkin maddelerimiz suda çözünürlükleri yüksek olmayan maddeler olduğu için matris gibi davranmış ve Higuchi kinetine uymuştur.

Lipozom ve kohleat formülasyonlarının Caco-2 hücrelerinden geçen kümülatif raloksifen ve tamoksifen miktarları, diyaliz membranlardan geçen miktarlarından fazladır. Bunun nedeninin, hücre zarı membran lipidlerine benzerlik gösteren lipidlerle formüle edilmelerinin olabileceği düşünülmüştür. Yapıları sayesinde hücre membranlarındaki sıkı bağlantı

bölgelerini açabilir ve pasif difüzyonla hücrelere geçişi daha kolay olabileceğine karar verilmiştir. Ayrıca diyaliz membrandan geçiş sonuçları incelendiğinde, tamoksifen, raloksifen kadar hidrofobik olmadığından diyaliz membrandan geçişinin daha kolay olduğu görülmektedir.

Ayrıca absorpsiyon artırıcı olarak kullanılan dimetil- β -CD'nin raloksifen ve tamoksifen salımındaki artışa neden olma sebebi düşünülmüştür.

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

J: (Flux) akı, D: difüzyon katsayısı, A:alan, K:geçen madde için membran ile (maddenin molekül büyüklüğüne göre) çözelti arasındaki partiyon katsayısı, C_d : donör kısımdaki madde konsantrasyonu, h: membran kalınlığını ifade etmektedir. Buradan permeabilite katsayısı değeri:

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

Formülden, permeabilitenin difüzyon katsayısı ve membran çözelti partiyon katsayısı ile doğru orantılı olduğunu görüyoruz. Bu denkleme göre raloksifen ve tamoksifen diyaliz membrandan sodyum taurokolat ve dimetil- β -CD varlığında daha fazla geçiyor olabilir; çünkü bu maddeler raloksifen ve tamoksifenin membrana olan partiyon katsayısını artırmaktadır. Bu olay Fick'in ikinci kanunu ile ifade edilmektedir²⁴⁰. Bundan başka ayrıca:

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

Burada A: alan, α : termodinamik aktivite katsayısı, D: difüzyon katsayısı, γ : maddenin membrandaki efektif aktivite katsayısı, h: membran kalınlığıdır. Bu denkleme göre de sodyum taurokolat ve dimetil- β -CD, α ve γ 'yı değiştiriyor olabileceği düşünüldü. α , donör fazdaki madde miktarıyla doğru orantılıdır. Katı ve doymunluk durumunda bu termodinamik aktivite katsayısının en yüksek olduğu literatürlerde bildirilmektedir. O yüzden deneylerde hep doymun çözelti kullanılmaya çalışılır. Partiyon katsayısı

ile geçişin arttığı pek çok yayında bildirilmektedir²⁴¹. Bizim çalışmamızda diyaliz membranından ve boş membrandan dimetil- β -CD'li formülasyonlardan raloksifen ve tamoksifen geçişinin artması, yukarıdaki literatür bilgileri ışığında sodyum taurokolat ve dimetil- β -CD gibi maddelerin etkin maddeler ile birlikte kullanıldıklarında, etkin maddenin membrana olan partisyon katsayısını ve termodinamik aktivite katsayısını (α) arttırdığı düşünülmüştür.

5.1.6. MCF-7 ve MDA MB-231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan Antitümöral Aktivite Tayinine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

MCF-7 ve MDA- MB 231 hücreleri meme kanseri hücre serileri oldukları için meme tümörü çalışmalarında sıklıkla karşımıza çıkmaktadır^{242,243}. Bu çalışmada da, östrojen reseptör pozitif bir hücre serisi olan MCF-7 ve östrojen reseptör negatif hücre serisi olan MDA- MB 231 raloksifen ve tamoksifen içeren formülasyonların antitümöral aktivite tayininde kullanılmak üzere seçilmiştir. Bölüm 3.2.2.1.6.'da açıklandığı gibi yapılan çalışmalara ait bulgular Bölüm 4.1.1.6 ve 4.2.1.6'da verilmiştir. Sonuçlar, her formülasyon tipini etkin madde içermeyen kendi formülasyon tipiyle karşılaştırılarak hesaplanmıştır.

5.1.6.1. MCF-7 Hücreleri Kullanılarak Yapılan Antitümöral Aktivite Tayinine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Raloksifen içeren tüm formülasyonlar içinde, en yüksek antitümöral aktivite %41.6 ile dimetil- β -CD içeren kohleat için hesaplanmıştır. ($p<0.001$). Ondan sonraki en yüksek değer %28.1 ile dimetil- β -CD içeren lipozoma aittir ($p<0.001$). Bulduğumuz bu antitümöral aktivite sonuçları, Caco-2 hücrelerinden geçiş çalışmaları, hesaplanan permeabilite katsayıları ile benzerlik göstermektedir. Yani lipidik karakterli

formülasyonlar, hücre membran yapılarına gösterdikleri benzerlik sayesinde hücreler üzerinde daha etkili olmaktadır.

Tamoksifen içeren formülasyonlar için dimetil- β -CD içeren tüm formülasyonlara ait antitümöral aktivite değerleri birbirine yakın bulunmuştur. En yüksek antitümöral aktivite değeri dimetil- β -CD içeren lipozoma aittir (%28.05) ($p<0.001$). Ardından gelen en yüksek değer ise dimetil- β -CD içeren nanopartiküllere ait olmuştur (%27.9) ($p<0.001$). Tamoksifen, raloksifen kadar hidrofobik olmadığı için lipidik yapıli formülasyonlarda elde edilen etki raloksifen lipozom ve kohleat formülasyonlarında olduğu kadar belirgin değildir.

5.1.6.2. MDA-MB 231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan Antitümöral Aktivite Tayinine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

MDA-MB 231 hücre hattıyla yapılan antitümöral aktivite tayinine ait sonuçlar MCF-7 hücre hattıyla yapılan sonuçlara paralellik göstermektedir.

Raloksifen içeren tüm formülasyonlar içinde, en yüksek antitümöral aktivite %24.1 ile dimetil- β -CD içeren kohleat için hesaplanmıştır. ($p<0.001$). Ondan sonraki en yüksek değer %15.8 ile dimetil- β -CD içeren lipozoma aittir ($p<0.001$). Raloksifen dimetil- β -CD içeren kohleat ve lipozomlar için elde edilen %antitümöral aktivite değerlerinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Tamoksifen içeren formülasyonlarla ilgili bulgular incelendiğinde en yüksek antitümöral aktivite %24.5 ile dimetil- β -CD içeren kohleat için hesaplanmıştır. ($p<0.001$). Ondan sonraki en yüksek değer %20.3 ile dimetil- β -CD içeren lipozoma aittir ($p<0.001$).

Raloksifen ve tamoksifen formülasyonlarına ait iki hücre hattı için bulunan sonuçlar incelendiğinde, MCF-7 hücre hattı için daha yüksek antitümöral aktivite değerleri elde edilmiştir. Bu şekilde veriler elde edilmesinin sebebi, MCF-7 hücre hattının östrojen reseptör pozitif bir hücre hattıyken MDA-MB-231'in öyle olmamasıdır ^{160,165}. Raloksifen ve tamoksifen maddelerinin benzer etki mekanizmasına sahip moleküller olup ikisi de östrojen reseptörlerine bağlanarak etki göstermektedirler ^{66,96}.

5.1.7. MCF-7 ve MDA MB-231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan MMP-2 Enzim İnhibisyonu Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

5.1.7.1. MCF-7 Hücreleri Kullanılarak Yapılan MMP-2 Enzim İnhibisyonu Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Yapılan çalışmalarda, dimetil- β -CD'nin MCF-7 hücreleriyle MMP-2 enzim inhibisyonu üzerine olan anlamlı etkisi dikkat çekmektedir. Raloksifen ve dimetil- β -CD içeren kohleatlar %51.9 luk inhibisyon yüzdesiyle en fazla MMP-2 enzim inhibisyonu yapan formülasyon olmuştur ($p<0.001$). Dimetil- β -CD içeren kohleatlardan sonra dimetil- β -CD içeren lipozomlar %32.2'lik inhibisyon yüzdesiyle en fazla inhibisyona neden olan ikinci grup olmuştur ($p<0.001$). Lipid yapılı formülasyonların raloksifen etkinliği üzerine olan olumlu etkisi MCF-7 hücreleri üzerinde yapılan MMP-2 enzim inhibisyonu çalışmalarında da oldukça belirgindir.

Tamoksifen içeren tüm formülasyonlar için dimetil- β -CD içeren tiplerin değerleri birbirlerine yakın ve anlamlı olarak yüksektir ($p<0.001$). En fazla MMP-2 enzim inhibisyonu yapan formülasyon, %39.4 ile tamoksifen dimetil- β -CD lipozom olurken, dimetil- β -CD içeren formülasyonların MMP-2 enzim inhibisyonu yüzdeleri

birbirlerinden anlamlı olarak farklı olmayıp ($p>0.01$) hepsinin inhibisyon yüzdeleri anlamlıdır ($p<0.001$).

Raloksifen ve tamoksifen formülasyonları ortak değerlendirildiğinde, MCF-7 hücrelerinde en fazla MMP-2 inhibisyon yüzdesi raloksifen dimetil- β -CD kohleatlarda görülmüştür.

5.1.7.2. MDA-MB 231 Hücreleri Kullanılarak Yapılan MMP-2 Enzim İnhibisyonu Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Bu hücre hattıyla yapılan çalışmalar MCF-7 hücre hattıyla bulunan sonuçlara benzerlik göstermektedir. Dimetil- β -CD'nin MDA-MB 231 hücre hattı üzerinde de MMP-2 enzim inhibisyonunu artırdığı, etkin maddelerin daha etkili olmasını sağladığı görülmektedir.

Raloksifen ve dimetil- β -CD içeren kohleatlar %39.7 inhibisyon yüzdesiyle en fazla MMP-2 enzim inhibisyonu yapan formülasyon olmuştur ($p<0.001$). Dimetil- β -CD içeren kohleatlardan sonra dimetil- β -CD içeren lipozomlar %28.1'lik inhibisyon yüzdesiyle en fazla inhibisyona neden olan ikinci grup olmuştur ($p<0.001$). Lipid yapılı formülasyonlar hücre membranlarına benzer yapıları ve etkileşme kolaylıkları sayesinde, raloksifenin MMP-2 enzim inhibisyonu etkinliği üzerine olan olumlu etkisi MDA-MB 231 hücre serisinde de belirgin olarak görülmektedir.

Tamoksifen formülasyonları için de sonuçlar MCF-7 hücre serisiyle bulunan sonuçlara benzerlik göstermektedir. Tüm tamoksifen formülasyon tipleri arasında en fazla MMP-2 inhibisyon yüzdesi tamoksifen dimetil- β -CD lipozomlarda (%28.4) ($p<0.001$), ardından ise dimetil- β -CD içeren nanopartiküllerde (%24.03) ($p<0.001$) görülmüştür.

Raloksifen ve tamoksifen formülasyonları ortak değerlendirildiğinde, MDA-MB 231 hücrelerinde en fazla MMP-2 inhibisyon yüzdesi raloksifen dimetil- β -CD kohleatlarda görülmüştür.

5.2. İn Vivo Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi

5.2.1. Balb-C tipi Sağlıklı Dişi Farelerle Yapılan İn Vivo Çalışmalara Ait Bulgular

Raloksifen ve tamoksifen formülasyonlarına ait kan konsantrasyon zaman profilleri incelendiğinde benzer profiller karşımıza çıkmaktadır. Genellikle absorpsiyon artırıcılarla hazırlanan formülasyonlar hem oral hem intraperitoneal olarak uygulandığında daha yüksek kan konsantrasyonlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bunun yanı sıra oral olarak uygulanan formülasyonların maksimum kan konsantrasyonları daha düşük olabilmekle birlikte kanda etkin maddelerin kalış süreleri daha uzun olmaktadır. 24.saatte bile kanda etkin maddelerin var oluşu gözlenmektedir.

Oral yolla verilen lipozomlar ve nanopartiküller kıyaslandığında lipozomlar nanopartiküllere göre daha kısa sürede maksimum kan konsantrasyonuna ulaşmış ama nanopartiküller daha uzun süreli etkinlik göstermişlerdir.

Dimetil- β -siklodekstrin ile hazırlanan lipozomlar ile dimetil- β -siklodekstrin ile hazırlanan nanopartiküller kıyaslandığında, ilk saatlere bakılırsa lipozomların daha kısa sürede maksimum kan konsantrasyonuna ulaştığı görülmektedir. Buna rağmen lipozom, içerisine hem raloksifeni hem de dimetil- β -siklodekstrini alarak yapısında bulunan lipitlerin membran yapılarına benzerliğinin böylece hücre içlerine girişlerinin kolaylığı sayesinde 24.saatte bile hala kandaki raloksifen konsantrasyonunu koruduğu dikkati çekmektedir. Aynı durum daha az

olmakla birlikte sodyum taurokolatlı lipozom ve nanopartikül formülasyonlarında da görülmektedir. Bu durumda nanopartikül formülasyonunun daha uzun süreli etki edeceği düşünülse de, lipozom formülasyonu hem absorpsiyon artırıcıların hem de yapısında bulundurduğu hücre membranı lipidlerine benzer lipidler sayesinde daha uzun süre kanda etkin madde konsantrasyonunu koruduğu düşünülmüştür.

Lipozomların bir diğer önemli özelliği de oral alındıklarında Peyer Patchler vasıtasıyla lenf yoluyla vücuda dağılmalarıdır. Peyer plakları barsakta bulunan ikincil lenfoid organlardan biridir. İsveçli anatomist Johan Conrad Peyer tarafından 17. Yüzyılda bulunmuştur ve ismi buradan gelmektedir. İleumun alt kısmında genel olarak bulunurlar, daha aşağı gittikçe sayıları da artar. Büyüklükleri birkaç santim olan uzunca yuvarlağımsı kümeciklerdir. Lenf düğümü gibidirler. İçlerinde makrofaj ve benzeri yapılar başta olmak üzere tüm bağışıklık sistemi hücreleri vardır. B ve T lenfositlerden bolca vardır. Sonuç olarak, eğer Peyer plaklarına herhangi bir antijenik madde veya çok küçük partikül gelirse bu immün sistem hücreleri tarafından yabancı madde olarak kabul edilir ve fagosite edilirler. Bu zaten yıllardır oral aşılama şeklinde kullanılmaktadır²⁴⁴. Lipozomlar antijenik madde olan lipidlerden oluştukları için ve boyutları küçük olduğu için eğer bağışıklık sistemi hücreleri ile karşılaşılırsa hemen fagosite edilirler²⁴⁵. Mikro ve nano boyuttaki lipozomlar Peyer plaklarına ulaşırlarsa hemen fagosite edilirler ve lenf sistemine karışırlar. Bu da lipozomların mide - barsak kanalındaki yüksek asit ve alkali pH veya enzimler tarafından bozunmasını engeller²⁴⁶. Sonuç olarak lipozomlar oral yoldan uygulanırlarsa Peyer plaklarına ulaştıklarında antijenik/yabancı madde olarak kabul edilip fagosite edilirler ve bu şekilde asit, alkali ve enzimatik bozunmadan korunurlar, ayrıca membranlardan lipid karakteri nedeniyle daha fazla ve hızlı geçebilirler.

Daha açık olarak, oral alındıklarında Peyer Patchler vasıtasıyla lenf yoluyla dağılan lipozomlar fagositte edilirler ve karaciğerde filtre olarak tutulurlar. Karaciğerde karaciğer enzimleri tarafından yıkılarak kanda etkin madde konsantrasyonunun tekrar yükselmesine neden olabilirler. Diğer taraftan lipozomlar lipit karakterli maddelerden oluştuğu için safra enzimleri ile etkileşerek buradan emilmek suretiyle karaciğerde lokalize olup tekrar kana salınabilirler (enterohepatik siklus). Ancak bu ikinci doz yükselmesinin 12. Saatten sonra olması birinci ihtimalin daha yüksek olduğunu düşündürmüştür.

Kohleat formülasyonlarına ait kan konsantrasyon zaman profilleri incelendiğinde, oral veya intraperitoneal uygulanan tüm formülasyonların 24. saatte hala kanda var olduğu gözlenmektedir. Santangelo ve arkadaşlarının¹⁴² amfoterisin B kohleatları kullanarak gerçekleştirdikleri in vivo çalışmada, intraperitoneal ve oral yolla uyguladıkları amfoterisin B içeren kohleatların, vücuttaki birikimlerinden bahsedilmiştir. Aynı şekilde Segarra ve arkadaşları¹⁷⁴ amfoterisin B kohleatlarını intravenöz yolla uygulamışlar, başta karaciğer olmak üzere dalak, kalp, böbrekler ve akciğerlerde biriktiğini göstermişlerdir. Yani yukarıda lipozomlar için açıklanan Peyer Patchlerde tutulma ve enterohepatik siklusa katılma olayının kohleatlar için de geçerli olduğu düşünülmektedir.

5.2.2. Sprague Dawley Cinsi Meme Tümörü Oluşturulmuş Dişi Sıçanlarla Yapılan İn Vivo Çalışmalara Ait Bulgular

Çalışmamızın bu kısmında, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Sprague Dawley cinsi dişi sıçanlarda Bölüm 3.2.1.3.2.'de anlatıldığı gibi tümör oluşumu sağlandıktan, tümörler palpasyonla hissedilmeye başlandıktan sonra seçilen formülasyonlar

raloksifen dimetil- β -CD lipozom ve raloksifen dimetil- β -CD kohleatları ile kıyaslama yapabilmek amacıyla raloksifen dimetil- β -CD çözelti formülasyonları meme tümörlü sıçanlara 8 hafta boyunca oral yolla uygulandı. Aynı şekilde tamoksifen dimetil- β -CD lipozom ve tamoksifen dimetil- β -CD kohleatları ile kıyaslama yapabilmek amacıyla tamoksifen dimetil- β -CD çözelti formülasyonları meme tümörlü sıçanlara 8 hafta boyunca haftada bir kez oral yolla uygulandı. Tümör çapının ölçülmesi ile formülasyonların etkinliği izlendi.

Çalışmanın bitiminde ise hayvanlardan çıkarılan meme tümörü dokuları sağlıklı sıçan meme dokusu ve hiçbir uygulama yapılmayan sıçanın meme tümörü dokusu ile birlikte patolojik incelemeye tabi tutulmuştur.

Bölüm 4.1.2.2 ve 4.2.2.2'de grafiklerle ve fotoğraflarla varılan sonuçlara göre 8 haftalık oral formülasyon uygulamasının ardından formülasyonlar arasında tümör küçülmesinde en etkin olan formülasyonlar, raloksifen dimetil- β -CD kohleatları (%94.8 küçülme) ve tamoksifen dimetil- β -CD lipozom (%92.5 küçülme) olduğu görülmüştür. Bu iki formülasyonun uygulandığı hayvanların ağırlıklarındaki azalma ve dalgalanmanın az olması da tedavi etkinliğinin iyi olduğunu yani hayvanların genel sağlık durumlarının iyiye gittiğini düşündürmüştür, çünkü kontrol grubunun ağırlıkları anlamlı oranda azalmıştır.

Deney süresi tamamlandıktan sonra sıçanlar açılarak tümör dokularından kesitler alınarak patolojik olarak incelenmiştir. Yapılan incelemede malignite olup olmadığı, varsa malignitenin cinsi ve tedaviye yanıtı değerlendirilmiştir. Tedaviye yanıt tümörün içerdiği fibrozis ve nekroz oranları ile değerlendirilmiştir.

Bölüm 4.1.2.3'de sağlıklı meme dokusu ve hiçbir uygulama yapılmayan sıçanlardan alınan meme tümör dokusu görülmektedir. Sağlıklı meme dokusu resminde görülen uzun oklar meme lobüllerini, arada görülen kısa ok bir adet geniş duktusu işaret etmektedir. Hiçbir uygulama yapılmayan meme tümörlü gruba ait fotoğrafta tüm alanlar meme kanseri dokusundan oluşmaktadır. Tüm alanlar belirgin hiperplastik görünümündedir. Arada gland formasyonu dikkati çekmektedir (oklar). Neoplastik hücreler iri-hiperkromatik nükleuslu olup tümör yoğun mitoz içermektedir. Nekroz veya sklerotik alan izlenmemiştir.

Bölüm 4.1.2.3'de raloksifen dimetil- β -CD lipozom görüntüsünde stromada malign değişiklikler ve arada malign epitel adaları (okların arası), ayrıca mitotik alanlar görülmektedir (Resim 28-29). Fibrotik-nekrotik alan değerlendirmesinde ise örneğin yaklaşık %5'i fibrotik-nekrotik alanlardan oluşmakta olduğu ifade edildi. Bu yorum tedavi etkinliğinin çok düşük (%5) olduğu anlamına gelmektedir. Oysa yapılan ölçümlerde, bu grubun tümör küçülmesi %65 olarak hesaplanmıştı. Ayrıca permeabilite katsayısı en yüksek olan formülasyon raloksifen dimetil- β -CD lipozomlarıydı. Patolojik incelemenin de yapılması sonuçların yorumlanırken yapılacak hataları önlediği görülmüştür.

Bölüm 4.1.2.3'de raloksifen dimetil- β -CD kohleat uygulanan gruba ait görüntüde çoğunluğu fibrotik alanlardan oluşan (sol ok) ve arada nekrotik alanlar (sağ alt ok) görülmektedir (Resim 30). Fibrotik-nekrotik alan değerlendirmesinde ise örneğin yaklaşık %60'ı fibrotik-nekrotik alanlardan oluşmakta olduğu ifade edildi. Bu yorum tedavi etkinliğinin en yüksek (%60) grup olduğu yönündeydi.

Bölüm 4.2.2.3'de tamoksifen dimetil- β -CD çözelti uygulanan gruba ait görüntüde bazıları hiperplastik (sol ok) bazıları neoplastik glandlar (sağ ok) içeren arada fibrotik alanlar bulunduran doku görüntüsü

verilmiştir. Fibrotik-nekrotik alan değerlendirmesinde ise örneğin yaklaşık %30'u fibrotik-nekrotik alanlardan oluşmakta olduğu ifade edildi. Bu yorum tedavi etkinliğinin orta seviyede (%30) olduğu yönündeydi (Resim 45).

Bölüm 4.2.2.3'de tamoksifen dimetil- β -CD lipozom uygulanan gruba ait görüntüde bazıları hiperplastik (üst ok) bazıları neoplastik glandlar (alt ok) içeren arada fibrotik alanlar bulunduran doku görüntüsü verilmiştir. Fibrotik-nekrotik alan değerlendirmesinde ise örneğin yaklaşık %50'sinin fibrotik-nekrotik alanlardan oluşmakta olduğu ifade edildi. Bu yorum tedavi etkinliğinin iyi seviyede (%50) olduğu yönündeydi (Resim 46).

Bölüm 4.2.2.3'de tamoksifen dimetil- β -CD kohleat uygulanan gruba ait görüntüde beyaz oklar arasında geniş bir nekroz alanı görülmektedir. Fibrotik-nekrotik alan değerlendirmesinde ise örneğin yaklaşık %30'u fibrotik-nekrotik alanlardan olduğu ifade edildi. Bu yorum tedavi etkinliğinin orta seviyede (%30) olduğu yönündeydi (Resim 47).

5.3. İn Vitro-İn Vivo Korelasyon Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Aynı örnek alma zamanlarında, hücre kültürlerinde hesaplanan %kümülatif geçen raloksifen/tamoksifen miktarı ile kandaki raloksifen/tamoksifen grafiğe geçirilerek korelasyon çalışması oral yolla verilen tüm formülasyon tipleri için gerçekleştirildi^{202,203}. Oral yolla hayvanlara verilen formülasyonlar üzerinde korelasyon çalışması yapmamızdaki amaç, Caco-2 hücrelerinin oral ilaç absorpsiyonunun in vitro olarak değerlendirilmesinde kullanılan bir model olmasıdır. Bu yüzden intraperitoneal yolla verilen formülasyonlar için korelasyon çalışması yapılmamıştır.

Raloksifen dimetil- β -CD kohleatları için hesaplanan korelasyon katsayısı: 0.853 olarak hesaplanmıştır. Bulunan tüm korelasyon katsayıları değerlendirildiğinde, korelasyon katsayılarının, in vitro yöntemin, ve yapılan in vivo çalışmaların seçiminin ve doğruluğunun bir göstergesidir.

Çalışmamızda en iyi etki gösterdiği düşünülen dimetil- β siklodekstrinli tamoksifen formülasyonları için hesaplanan korelasyon katsayıları: Tamoksifen dimetil- β -CD lipozomları için korelasyon katsayısı 0.619 olarak hesaplanmıştır. Bu da bize, in vitro ve in vivo veriler arasında oldukça iyi bir uyum olduğunu göstermiştir.

Tüm grupların sonuçları değerlendirildiğinde, birkaç gruptaki korelasyon katsayısının düşük olmasına rağmen, Caco-2 hücrelerinin in vivo özellikleri tahmin etmekte başarılı bir model olduğu sonucuna varılmıştır.

5.4. Stabilite Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Raloksifen formülasyonları açısından en iyi permeabilite katsayısına ve in vivo etkinliğe sahip formülasyonlar olan raloksifen dimetil- β -CD lipozom ve raloksifen dimetil- β -CD kohleatları ile kıyaslama yapabilmek amacıyla raloksifen dimetil- β -CD çözelti formülasyonları ile 6 ay süreyle hızlandırılmış stabilite çalışması yapılmıştır. Aynı şekilde, tamoksifen formülasyonları açısından en iyi permeabilite katsayısına ve in vivo etkinliğe sahip formülasyonlar olan tamoksifen dimetil- β -CD lipozom ve tamoksifen dimetil- β -CD kohleatları ile kıyaslama yapabilmek amacıyla raloksifen dimetil- β -CD çözelti formülasyonları ile 6 ay süreyle hızlandırılmış stabilite çalışması yapılmıştır. Stabilite çalışmaları pH 7.4

fosfat tamponunda yapılmıştır. Böyle yapılmasındaki amaç, in vivo ortam pH ve iyonik ortamını taklit edebilmektir.

Raloksifen ve dimetil- β -CD içeren çözelti formülasyonları içindeki raloksifenin tüm sıcaklık dereceleri için birinci derece kinetikle bozulduğu saptanmıştır. Raf ömürleri hem 4°C hem de 25°C için 3-4 gün gibi çok düşük sürelerdir. Tamoksifen ve dimetil- β -CD çözeltileri için de aynı durum geçerlidir.

Tamoksifen ve raloksifen lipozomlarının 4°C için, 25°C ve 40°C'den farklı kinetik özellik gösterdiği görülmektedir. Bunun sebebinin, 4°C'de bozunmanın daha yavaş olmasından kaynaklı olarak kinetik değerlerin hesaplanmasını sağlayan doğrunun eğiminin azalması böylece pseudo sıfır derece gibi davranmasından dolayı olduğu düşünülmüştür. Kohleat formülasyonları için böyle bir durum gözlenmemiştir çünkü tüm kinetik değerlerinde eğimler birbirine daha yakındır.

Lipozom formülasyonlarında özellikle 25 ve 40°C sıcaklıklarda partikül boyutlarının zamanla arttığı gözlenmiştir. Bu sonuç lipozomların birleşmeye meyilli formülasyonlar olmalarından kaynaklanmaktadır. Zamanla birleşen veziküllerin yüzey alanları artmış, böylelikle zeta potansiyellerinde artış gözlenmiştir.

Raloksifen ile dimetil- β -CD içeren kohleatlar için raloksifenin bozunması birinci derece kinetikle olmuştur. Raloksifen 4°C için uyum ölçütleri r^2 0.985, SKT ise 19.4 olarak hesaplanmıştır. Raf ömrü 25.2 gün olarak bulunmuştur. 25°C için uyum ölçütleri r^2 0.988, SKT ise 100.3 olarak hesaplanmıştır. Raf ömrü 13 gün olarak bulunmuştur. 25°C'de saklanan raloksifen ile dimetil- β -CD kohleatların raf ömrü bile, 4°C'de saklanan raloksifen ile dimetil- β -CD lipozomlardan yüksektir.

Tamoksifen ve dimetil- β -CD içeren kohleat formülasyonları içindeki tamoksifenin tüm sıcaklık dereceleri için birinci derece kinetikle

bozunduğu saptanmıştır. 4°C için uyum ltleri r^2 0.988, SKT ise 29.3 olarak hesaplanmıştır. Raf mr 21.6 gün olarak bulunmuştur. 25°C için uyum ltleri r^2 0.988, SKT ise 48.3 olarak hesaplanmıştır. Raf mr 12 gün olarak bulunmuştur. 25°C’de saklanan tamoksifen ile dimetil-β-CD kohleatların raf ömrü bile, 4°C’de saklanan tamoksifen ile dimetil-β-CD lipozomlardan yüksektir.

Kohleat formülasyonlarında, özellikle 25 ve 40°C sıcaklıklarda partikül boyutlarının zamanla azaldığı gözlenmiştir. Bu değişimin, stabilite sonunda çekilen fotoğraflarda da izlendiği gibi sarmal yapılı kohleatların, zamanla uçlardan kopma ve etkin maddeyi sızdırmasına bağlı olduğu düşünülmüştür. Kohleat tipi formülasyonlarda özellikle 3. aydan sonra izlenen zaman ve sıcaklık etkisiyle belirginleşen, zeta potansiyel düşüşü, kohleatı oluşturan negatif yüklü lipozomların kopması ile gerçekleştiği düşünülmüştür.

Raloksifen ve tamoksifen formülasyonlarının tüm sıcaklık değerleri için raf ömürleri incelendiğinde çok düşük raf ömrü olan çözelti formülasyonlarının raf ömürleri, lipozom ve kohleat formülasyonları ile artırılmıştır. Lipozom formülasyonları ile çözelti formülasyonlarının stabilitesi anlamlı olarak artırılmıştır ($p<0.001$). Kohleat formülasyonları lipozom formülasyonlarının stabilitelerini yaklaşık rakamsal olarak yaklaşık 2 kat olarak artırmıştır ($p<0.001$).

Bulgular bölümünde stabilite öncesinde ve sonrasında çekilen TEM fotoğrafları lipozomlar için incelendiğinde +4°C ‘de saklanan lipozomların yuvarlak şekillerini +25°C ‘de saklanan lipozomlara göre daha iyi koruduğu gözlenmiştir. Nanopartiküller için morfolojik değişiklikler lipozomlara göre daha belirgindir. Kohleat formülasyonlarının stabilite sonunda çekilen TEM görüntüleri ise kohleatların şekil özelliklerini korumada lipozom ve nanopartiküllere göre daha başarılı olduğunu göstermektedir. Raloksifen ve dimetil-β-CD içeren kohleatların stabilite

sonuçları ve TEM görüntülerinde izlenen yapıları incelendiğinde, tamoksifen ve dimetil- β -CD içeren kohleatlara göre daha iyi olduğu görülmektedir. Tamoksifen ve dimetil- β -CD kohleatlarına ait stabilite sonunda çekilen TEM görüntülerine bakıldığında, etkin maddenin dışarıya çıkmaya başladığı belirgin olarak görülmektedir. Raloksifen ve dimetil- β -CD kohleatlarına ait stabilite sonunda çekilen TEM görüntülerine bakıldığında ise, etkin maddenin dışarıya çıkmaya başladığına dair belirgin bir görüntü görülmemektedir. Ayrıca tamoksifen ve dimetil- β -CD içeren kohleatlara ait stabilite sonunda çekilmiş son TEM görüntüsünde kohleatlara özgü sarmal yapının açılmaya başladığı dikkati çekmektedir.

Raloksifen ve tamoksifen ile dimetil- β -CD içeren kohleat formülasyonları stabilitelerinin düşük olduğu bilinen lipozom formülasyonları için iyi bir alternatif olarak düşünülebilir.

6. SONUÇ

Tez çalışmamızda, SERM grubuna dahil iki etkin madde olan raloksifen hidroklorür ve tamoksifen sitrat ile in vitro ve in vivo çalışmalar yapılmıştır. Çalışmamızda, raloksifen ve tamoksifenin oral yolla kullanılması düşünülen lipozom, nanopartikül ve kohleat formülasyonları absorpsiyon artırıcılar kullanılarak geliştirilmiştir. Formülasyon tipleri ve hazırlama yöntemleri, formülasyonlardaki etkin madde ve absorpsiyon artırıcı (dimetil- β -CD ve sodyum taurokolat) madde miktarları aynı tutularak sadece etkin madde olarak tamoksifen veya raloksifen kullanılmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

- ✓ Formülasyon hazırlamada kullanılması planlanan yardımcı maddelerin etkin maddelerle etkileşip etkileşmediğini görmek için DSC çalışmaları yapıldı. Herhangi bir etkileşime rastlanmamıştır.
- ✓ Hücre kültüründen geçiş çalışmalarına başlamadan önce, etkin maddeler, etkin madde içermeyen formülasyonlar ve absorpsiyon artırıcıların hücreler üzerinde toksik etki göstermeden kullanılacak maksimum miktarlarının belirlenmesi amacıyla, MTT testleri gerçekleştirildi. Test çalışmaları sonucunda raloksifen ve tamoksifenin 120 $\mu\text{g/mL}$, dimetil- β -CD'nin % 0.15, sodyum taurokolatın 0.005 mM konsantrasyonda kullanımına kadar verildi. Etkin madde içermeyen formülasyonların ve geçiş deneylerinde kullanılması planlanan PG/DMEM (% 60/% 40)'ın ise hücreler üzerinde toksik olmadığı görüldü.
- ✓ Hazırlanan formülasyonların karakterizasyonu yapıldı ve uygun olduğuna karar verildi.

- ✓ Caco-2 hücrelerinden geçiş çalışmaları % kümülatif geçen etkin madde miktarları ve permeabilite katsayıları (log k) hesaplanarak değerlendirildi. Raloksifen içeren formülasyonlar için dimetil- β -CD'nin her formülasyon grubu için log k değerlerini anlamlı olarak artırdığı görüldü. Sodyum taurokolatın ise dimetil- β -CD'den az olmakla birlikte log k değerlerini artırdığı görüldü. Permeabilite katsayıları üzerinde genel olarak düşünüldüğünde, hem sodyum taurokolatın hem de dimetil- β -CD'nin etkin maddelerin özellikle lipit yapılı formülasyonlar olan lipozom ve kohleatlarda çözünürlüğünü artırdığı ve de sıkı bağlantı noktalarını açtığı görüldü.
- ✓ Caco-2 hücrelerinden geçiş çalışmaları sonunda yapılan TEER ölçümleri, permeabilite katsayıları ile birlikte değerlendirildiğinde, birbirleriyle uyumlu oldukları gözlemlendi.
- ✓ Diyaliz membranlardan geçiş çalışmalarında absorpsiyon artırıcı olarak kullanılan dimetil- β -CD'nin raloksifen ve tamoksifen salımındaki artışa neden olduğu görülmüştür. Diyaliz membran geçiş sonuçlarının kinetik olarak değerlendirilmesiyle formülasyonların genellikle Higuchi salım kinetiğine uygun olduğu görüldü.
- ✓ Formülasyonların tümörler üzerine etkisini görmek için östrojen reseptör pozitif bir hücre serisi olan MCF-7 ve negatif olan MDA-MB 231 serisi ile antitümöral aktivite testleri yapıldı. Antitümöral aktivite çalışmalarına başlamadan önce de MTT çalışması yapıldı ve Caco-2 hücrelerinde bulunan miktarların MCF-7 ve MDA-MB 231 hücreleri için de uygun olduğuna karar verildi. ($p < 0.001$)
- ✓ MCF-7 hücreleri üzerindeki antitümöral aktivite çalışmaları sonunda en fazla antimöral etkiye sahip tamoksifen formülasyonu %28.1 ile tamoksifen dimetil- β -CD lipozom olurken, bu hücreleri üzerinde en

fazla MMP-2 enzim inhibisyonu yapan tamoksifen formülasyonu,% 28.05 ile yine tamoksifen dimetil- β -CD lipozom olmuştur. ($p<0.001$)

- ✓ MCF-7 hücreleri üzerindeki antitümöral aktivite çalışmaları sonunda en fazla antitümöral etkiye sahip raloksifen formülasyonu %41.6 ile raloksifen dimetil- β -CD lipozom olurken, bu hücrelerin üzerinde en fazla MMP-2 enzim inhibisyonu yapan tamoksifen formülasyonu,% 51.9 ile yine raloksifen dimetil- β -CD lipozom olmuştur. ($p<0.001$)
- ✓ MDA-MB 231 hücreleri üzerindeki antitümöral aktivite çalışmaları sonunda en fazla antitümöral etkiye sahip tamoksifen formülasyonu %39.7 ile tamoksifen dimetil- β -CD lipozom ile olurken, bu hücrelerde en fazla MMP-2 enzim inhibisyonu yapan tamoksifen formülasyonu ise ,% 28.4 ile tamoksifen dimetil- β -CD lipozomları olmuştur ($p<0.001$).
- ✓ MDA-MB 231 hücreleri üzerindeki antitümöral aktivite çalışmaları sonunda en fazla antitümöral etkiye sahip raloksifen formülasyonu % 24.1 ile raloksifen dimetil- β -CD lipozom olurken, bu hücrelerde en fazla MMP-2 enzim inhibisyonu yapan tamoksifen formülasyonu,% 24.5 ile tamoksifen dimetil- β -CD nanopartikülleri olmuştur. ($p<0.001$)
- ✓ Özellikle lipid yapılı formülasyonlar hücre membranlarına benzer yapıları ve etkileşme kolaylıkları sayesinde raloksifenin ve tamoksifenin MMP-2 enzim inhibisyonu etkinliği üzerine olan olumlu etkisi MDA-MB 231 hücre serisinde de belirgin olarak görülmektedir. ($p<0.001$)
- ✓ Tamoksifen sitrat ve raloksifen hidroklorür formülasyonları kullanarak yapılan, sağlıklı dişi Balb/C tipi farelere oral ve

intraperitoneal yollarla uygulanmış ve genellikle absorpsiyon artırıcılarla hazırlanan formülasyonlar hem oral hem intraperitoneal olarak uygulandığında daha yüksek kan konsantrasyonlarının ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bunun yanı sıra oral olarak uygulanan formülasyonların maksimum kan konsantrasyonları daha düşük olabilmekle birlikte kanda etkin maddelerin kalış süreleri daha uzun olmaktadır. 24.saatte bile kanda etkin maddelerin var oluşu gözlenmektedir.

- ✓ Meme tümörü oluşturulmuş Sprague Dawley cinsi dişi sıçanlara seçilen formülasyonlarının oral yolla uygulanmasının ardından en fazla tümör küçülmesi, raloksifen dimetil- β -CD kohleatları (% 94.8 küçülme) ve tamoksifen dimetil- β -CD lipozom (% 92.5 küçülme) ile sağlanmıştır.
- ✓ Deney süresi sonunda formülasyon uygulaması yapılan meme tümürlü sıçanlardan alınan örneklerin patolojik inceleme sonuçlarından hareketle, tedaviye yanıt tümörün içerdiği fibrozis ve nekroz oranları ile değerlendirildi. Tedavi etkinliğinin en yüksek (% 60) grup raloksifen dimetil- β -CD kohleat olurken, ikinci sırada ise % 50 ile tamoksifen dimetil- β -CD lipozom olmuştur.
- ✓ İn vitro/in vivo korelasyon çalışmalarının sonucunda lipit bazlı ve dimetil- β -CD formülasyonların daha yüksek korelasyon katsayıları olduğu görüldü.
- ✓ Tüm grupların sonuçları değerlendirildiğinde, birkaç gruptaki korelasyon katsayısının düşük olmasına rağmen, Caco-2 hücrelerinin in vivo özellikleri tahmin etmekte başarılı bir model olduğu sonucuna varılmıştır.

- ✓ Stabilit  çalışmaları sonucunda, raloksifen ve tamoksifen formülasyonlarının tüm sıcaklık değerleri için raf ömürleri incelendiğinde çok düşük raf ömrü olan çözelti formülasyonlarının raf ömürleri, lipozom ve kohleat formülasyonları ile arttığı görülmüştür. Kohleat formülasyonları ise çözelti formülasyonlarının stabilitelerinden anlamlı olarak fazla olan ($p<0.001$) lipozom formülasyonlarının stabilitelerini yaklaşık rakamsal olarak yaklaşık 2 kat artırmıştır ($p<0.001$).
- ✓ Dimetil- -CD, in vitro ve in vivo çalışmalarda, raloksifen ve tamoksifenin etkinliğini artırmıştır.
- ✓ Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde en başarılı formülasyonun raloksifen dimetil- -CD kohleatları olduğu sonucuna varılmıştır.

7. ÖZET

Bu çalışmada, SERM grubuna dahil iki etkin madde olan raloksifen hidroklorür ve tamoksifen sitrat ile meme tümörleri üzerinde etkili, oral yolla kullanılması amaçlanan yeni ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilerek tedavi etkinliklerinin artırılması yönünde in vitro ve in vivo çalışmalar yapılmıştır. Raloksifen ve tamoksifenin lipozom, nanopartikül ve kohleat formülasyonları absorpsiyon artırıcılar (dimetil- β -CD ve sodyum taurokolat) kullanılarak geliştirilmiştir. Geliştirilen formülasyonların karakterizasyonu yapılmış, Caco-2 hücrelerinden geçiş özellikleri çözelti formlarıyla kıyaslanarak araştırılmış, permeabilite katsayıları hesaplanmıştır. Raloksifen dimetil- β -CD lipozomları için:4.14 kohleatları için log k: 1.59 cm/saat, taloksifen dimetil- β -CD lipozomları için:1.22 kohleatları için log k:1.22 cm/saat'dir. tamoksifen dimetil- β -CD lipozomları için, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri kullanarak, antitümöral aktivite tayinleri ve MMP-2 enzim inhibisyonu çalışmaları yapılmıştır. Hazırlanan formülasyonlar Balb-C tipi sağlıklı dişi farelere uygulanarak konsantrasyon zaman grafikleri elde edilmiş ve Caco-2 hücrelerinden geçiş çalışmaları ile birlikte değerlendirilerek in vitro/in vivo korelasyon çalışmaları yapılmıştır. Genel olarak fomülasyonlarda, dimetil- β -CD varlığında ve lipit bazlı formülasyonlarda permeabilite katsayıları artmıştır. İn vitro ve in vivo çalışmalarda en iyi özellik gösteren formülasyonlar seçilerek meme tümörü oluşturulmuş Sprague Dawley cinsi dişi sıçanlara oral yolla uygulanmış ve tedavi etkinlikleri tümör ölçüm ve patoloji sonuçlarıyla değerlendirilmiştir. Meme tümörü oluşturulmuş Sprague Dawley cinsi dişi sıçanlara seçilen formülasyonlarının oral yolla uygulanmasının ardından en fazla tümör küçülmesi, raloksifen dimetil- β -CD kohleatları (%94.8 küçülme, $p<0.001$) ve tamoksifen dimetil- β -CD lipozom (%92.5 küçülme, $p<0.001$) ile sağlanmıştır. Tedavi etkinliğinin en yüksek %60 grup raloksifen dimetil- β -CD kohleat olurken, ikinci sırada ise %50 ile tamoksifen dimetil- β -CD

lipozom olmuştur. Seçilen formülasyonlarla 6 ay süreli stabilite çalışmaları yapılmış ve kohleat formülasyonlarıyla raf ömürlerinin arttığı bulunmuştur.

8. SUMMARY

In this study, two active substances (raloxifene hydrochloride and tamoxifene citrate) from the group of SERM were used to prepare and develop orally applicable new dosage forms for the treatment of breast tumors and in vitro and in vivo experiments were performed to enhance their therapeutic effectiveness. Liposome, nanoparticulate and cochleate formulations of raloxifene and tamoxifene were developed containing penetration enhancer (dimethyl- β -cyclodextrin or sodium taurocholate). Developed formulations were characterized and permeability properties through Caco-2 cell lines were investigated by compared with their solutions and finally permeability coefficients were calculated. Permeability coefficients (as logk) were found to be 4.14, 1.59, 1.22 and 1.22 cm/hour for raloxifen dimethyl- β -CD liposomes, raloxifen dimethyl- β -CD cochleates, tamoxifene dimethyl- β -CD liposomes and tamoxifene dimethyl- β -CD cochleates respectively. Antitumor activity determinations and MMP-2 enzyme inhibition tests were performed using MCF-7 and MDA-MB 231 cell lines. All formulations were administered to Balb-C healthy female mice and blood concentration profiles were obtained. These profiles were compared with permeability experiment results and in vivo in vitro correlation studies were performed. In general, permeability coefficients were found to be enhanced when dimethyl- β -CD was present in the formulation (especially for lipid containing formulations). The best formulation selected after in vitro and in vivo studies and then applied orally to the Sprague Dawley female rats whose have breast tumor. Therapeutic effectiveness's of formulations were evaluated by the tumor mass measurements and pathological observations. Maximum tumor mass reduction was observed after raloxifene dimethyl- β -CD cochleates (94.8%) reduction $p < 0.001$) administration and tamoxifene dimethyl- β -CD liposomes (92.5% reduction $p < 0.001$) administration. Therapeutic

effectiveness of raloxifene dimethyl- β -CD cochleates was found to be the best (60%) where thearepeutical effectiveness of tamoxifene dimethyl- β -CD liposomes was found to be 50%. Stability studies were also performed for selected formulations and cochleate formulations were found to increase their shelf life.

9. KAYNAKLAR

1. <http://www.who.int/topics/cancer/en/>
2. Canadian Cancer Society Statistics, 2012.
3. Sağlık Bakanlığı İstatistikleri, 2010.
4. Pecorino L. Molecular Biology of Cancer, Mechanisms, Targets and Therapeutics. 3 rd ed. Oxford (UK): Oxford University Press; 2012.
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell 2011; 144: 646-674.
6. Fontanges E, Fontana A, Delmas P. Osteoporosis and breast cancer. Joint Bone Spine 2004;71: 102–110.
7. Hortobagyi GN, The curability of breast cancer: present and future, EJC Supplements 2003; 1(1): 24-34.
8. Kristensen VN, Børresen-Dale AL. Molecular epidemiology of breast cancer: genetic variation in steroid hormone metabolism. Mutation Research 2000; 462: 323–333.
9. Michels KB, Risk of breast cancer with hormone replacement therapy. International Congress Series 2002; 1129: 135– 141.
10. Li CI, Anderson BO, Daling JR, Moe R. Trends in incidence rates of invasive lobular and ductal breast carcinoma. JAMA 2003;11(89): 1421-1424.
11. Marshall LM, Hunter DJ, Conolly JL, Schnitt SJ, Byrne S, London SJ, et. al. Risk of breast cancer associated with atypical hyperplasia of

lobular and ductal types. *Cancer Epidemiology, Biomarkers&Prevention* 1997; 6: 297-301.

12. <http://www.cancer.gov/PublishedContent/MediaLinks/388072.html>

13. Tavassoli FA, Devilee P. World Health Organization Classification of Tumours Pathology & Genetics Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press Lyon 2003; 32-34.

14. Galvão ERCGN, Martins LMS, Ibiapina JO, Andrade HM, Monte SJH. Breast cancer proteomics: a review for clinicians. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137:915–925.

15. Mitrinen K, Hirvonen A. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. *Mutation Research* 2003; 544: 9–41

16. Weiss JM, Goode EL, Ladiges WC, Cornelia M. Ulrich CM. Polymorphic variation in hOGG1 and risk of cancer: A review of the functional and epidemiologic literature. *Molecular Carcinogenesis* 2005; 42: 127–141.

17. Zhang Y, Newcomb PA, Egan KM, Titus-Ernstoff, L, Chanock S, Welch R, et.al. Genetic polymorphisms in base-excision repair pathway genes and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2006; 15(2): 353-358.

18. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan, D, Conway K, et.al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the carolina breast cancer study. *JAMA* 2006; 295(21): 2492-2502.

- 19.** Perou CM, Sùrlie T, Eisen MB, Rijn M, S Jeffreyk SS, Rees CA, et. al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406(17) : 747-753.
- 20.** Finlin BS, Chia-Ling Gau CL, Murphy GA, Shao H, Kimel T, Robert S. Seitz RS et.al. RERG is a novel ras-related, estrogen-regulated and growth-inhibitory gene in breast cancer. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(45): 42259-42265.
- 21.** Vora T, Azambuja E, Awada A, Piccart M. Novel therapeutics in breast cancer-Looking to the future. *Update on Cancer Therapeutics* 2009; 3: 189–205.
- 22.** Shapiro S, Strax P, Venet L, Fink R. The search for risk factors in breast cancer. *AJPH* 1968; 58(5): 820-835.
- 23.** Parl FF, Dupont WD. A retrospective cohort study of histologic risk factors in breast cancer patients. *Cancer* 1982; 50(11): 2410-2416.
- 24.** Martin AM., Weber BL. Genetic and Hormonal Risk Factors in Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2000; 92(14): 1126-1135.
- 25.** Singletary SE. Rating the Risk Factors for Breast Cancer. *Annals of Surgery* 2003; 237(4): 472-482.
- 26.** McTiernan A. Behavioral risk factors in breast cancer: Can risk be modified?. *The Oncologist* 2003; 8(4): 326-334.
- 27.** Eti Aslan F, Gürkan A. Kadınlarda meme kanseri risk düzeyi. *Meme Sağlığı Dergisi* 2007;(32): 63-68.

- 28.** Konuklugil B, Bahadır Ö. *Linum usitatissimum* l.'nin kimyasal bileşikleri ve biyolojik aktiviteleri. *Ankara Ecz Fak Derg* 2004; 33(1): 63,84.
- 29.** Stacker SA, Baldwin ME, Achen MG. The role of tumorlymphangiogenesis in metastatic spread. *The FASEB Journal* 2002;16: 922-934.
- 30.** Weigelt B, Peterse JL, van't Veer VJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(8): 591-602.
- 31.** Barse PM. Issues in the treatment of metastatic breast cancer *Semin Oncol Nurs* 2000; 16(3): 197-205.
- 32.** Isaacs C, Peshkin BN, Schwartz M, DeMarco TA, Main D, Lerman C. Breast and ovarian cancer screening practices in healthy women with a strong family history of breast or ovarian cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2002; 71: 103-112.
- 33.** Somunoğlu S. Meme kanseri: Belirtileri ve erken tanıda kullanılan tarama yöntemleri. *Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi* 2009; 4(10): 103-122.
- 34.** Brenda E. Breast cancer screening. *Surgical Clinics of North America* 1999; 79(5) 961-990.
- 35.** Overmayer B. Breast cancer screening. *Medical Clinics of North America* 1999; 83(6): 1443-1466.
- 36.** Fletcher SW, Elmore JG. Mammographic screening for breast cancer. *The New England Journal of Medicine* 2003; 348(17): 1672-1680.
- 37.** Hilton SW, Leopold G, Olson LK, Wilson SA. Real time breast sonography. Application of 300 consecutive patients. *AJR* 1996; 147: 479-486.

- 38.** Basset LW. Imaging of breast masses. Radiologic Clinics of North America 2000; 38(4): 669-691.
- 39.** Murat A, Arslan A. Oğur E. Benign ve Malign Meme Kitlelerinin Ayırımında Renkli Dupleks Ultrasonografinin Yeri. Fırat Tıp Dergisi 2005; 10(2): 68-71.
- 40.** [http://web.udl.es/usuarios/e4650869/docencia/segoncicle/genclin98/recursos_classe_\(pdf\)/revisionsPDF/Cancer.pdf](http://web.udl.es/usuarios/e4650869/docencia/segoncicle/genclin98/recursos_classe_(pdf)/revisionsPDF/Cancer.pdf)
- 41.** Nicolini A, Carpi A. 2003. Advanced breast cancer: an update and controversies on diagnosis and therapy. Biomedicine & Pharmacotherapy 2003;57: 439–446.
- 42.** Maughan KL, Lutterbie MA, Ham PS. Treatment of Breast Cancer. Am. Fam. Physician 2010;1;81(11):1339-1346.
- 43.** <http://www.breastcancer.org/treatment/chemotherapy/medicines.jsp>
- 44.** Minckwitz G, Kaufmann M. New endocrine approaches in the treatment of breast cancer. Biomed & Pharmacother 1998; 52: 122-132.
- 45.** Miller WR, Mullen P, Sourdain P, Watson C, Dixon JM, Telford J. Regulation of breast activity within the breast. J Steroid Biochem Molec Biol 1997; 61(3-6): 193-202.
- 46.** Choueiri TK, Alemany CA, Abou-Jawde RM, Budd GT. Role of aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. Clinical Therapeutics 2004; 26(8): 1199-1214.
- 47.** Cano A, Hermenegildo C. Modulation of oestrogen reseptor: a process with distinct susceptible steps. Human Reproduction Update 2000; 6(3): 207-211.

- 48.** Heldermon C, Ellis M. Endocrine therapy for breast cancer 2006, Update on cancer therapeutics 2006;1: 285–297.
- 49.** Xu HB, Liu YJ, Li L. Aromatase inhibitor versus tamoxifen in postmenopausal woman with advanced breast cancer: A literature-based meta-analysis. *Clinical Breast Cancer* 2011; 11(4): 246-251.
- 50.** Goldstein SR, Siddhanti S, Ciaccia AV, Plouffe L. A pharmacological review of selective estrogen receptor modulators. *Human Reproduction Update* 2000; 6(3): 212-224.
- 51.** Sahin M, Demirag NG. Osteoporoz, tanı ve tedavide yenilikler. *TOTBİD (Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği) Dergisi* 2004; 3: 1-2.
- 52.** Jarkova NB, Martenyi F, Masanauskaite D, Walls EL, Smetnik VP, Pavo I. Mood effect of raloxifene in postmenopausal women, *Maturitas* 2001; 42: 71–75.
- 53.** Goldfrank D, Haytoglu T, Frishman WH, Mohammad Z. Raloxifene, a new selective estrogen receptor modulator. *J Clin Pharmacol* 1999; 39: 767-74.
- 54.** Siris E. Schussheim DH, Muchmore DB, Selective estrogen receptor modulators, *The Aging Skeleton* 1999, Academic Press. Chapter 42: 507-520.
- 55.** Bryant HU. Mechanism of action and preclinical profile of raloxifene, a selective estrogen receptor modulator, *Reviews in Endocrine&Metabolic Disorders* 2001; 2: 129-138.

- 56.** Jordan VC. Tamoxifen or Raloxifene for Breast Cancer Chemoprevention: A Tale of Two Choices—Point Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007;16(11): 2207-2209.
- 57.** McDonnell DP, The Molecular Pharmacology of Estrogen Receptor Modulators: Implications for the Treatment of Breast Cancer, Clinical Cancer Research 2005 (Suppl.);11: 871s–877s.
- 58.** Magnusson C, Baron JA, Correia N, Bergstro R, Adami HO, Persson I, Breast-cancer risk following long-term oestrogen and oestrogen-progestin-replacement therapy, Int. J. Cancer 1999; 81: 339–44.
- 59.** Konefka ES, Konefka T, Jassem J, The effects of tamoxifen on the female genital tract, Cancer Treatment Reviews 2004; 30: 291-301.
- 60.** Zheng H, Kangas L, Härkönen PL. Comparative study of the short-term effects of a novel selective estrogen receptor modulator, ospemifene, and raloxifene and tamoxifen on rat uterus. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 2004; 88: 143–156.
- 61.** Mocanu EV, Harrison RF. Tamoxifen in gynaecology. Reviews in Gynaecological Practice 2004; 4: 37-45.
- 62.** <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00675>
- 63.** Howell SJ, Johnston SRD, Howell A. The use of selective estrogen receptor modulators and selective estrogen receptor down-regulators in breast cancer. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 2004; 18(1): 47-66.

- 64.** O'Regan RM, Jordan VC, The evolution of tamoxifen therapy in breast cancer: selective oestrogen-receptor modulators and downregulators, *The Lancet Oncology* 2002; 3: 207-14.
- 65.** Clemons M, Danson S, Howell A. Tamoxifen ('Nolvadex'):a review, *Cancer Treatment Reviews* 2002; 28: 165-180.
- 66.** <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fu seaction=Search.DrugDetails>
- 67.** Tonetti DA, Jordan VC. Possible mechanisms in the emergence of tamoxifen-resistant breast cancer. *Anticancer Drugs* 1995;6: 498-507.
- 68.** Jaiyesimi IA, Buzdar AU, Decker DA, Hortobagyi GN. Use of tamoksifen for breast cancer: twenty-eight years later. *J Clin Oncol* 1995;13: 513-529.
- 69.** Jordan VC, Fritz NF, Langan-Fahey S, Thompson M, Tormey DC. Alteration of endocrine parameters in premenopausal women with breast cancer during long-term adjuvant therapy with tamoxifen as the single agent. *J Natl Cancer Inst* 1991;83: 1488-1491.
- 70.** Lonning PE, Johannessen DC, Lien EA, Ekse D, Fotsis T, Adlercreutz H. Influence of tamoxifen on sex hormones, gonadotrophins and sex hormone binding globulin in postmenopausal breast cancer patients. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 52: 491-496.
- 71.** Sedlacek SM, Horowitz KB. The role of progestins and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Steroids* 1984;44: 467-484.
- 72.** Nahari C, Tepper R, Beyth Y, Flex D, Figer A, Cohen I. Long-term trans I ultrasonographic endometrial follow-up in postmenopausal breast

cancer patients with tamoxifen treatment. *Gynecol Oncol* 1999;74: 222-226.

73. Love RR, Barden HS, Mazess RB, Epstein S, Chappell RJ. Effect of tamoxifen on lumbar spine bone mineral density in postmenopausal women after 5 years. *Arch Intern Med* 1994;154:2585-2588.

74. Polin SA, Ascher SM. The effect of tamoxifen on the genital tract. *Cancer Imaging*.2008 Jun 30; 8: 135-145.

75. Buchanan CM, Buchanan NL, Edgar KJ, Little JL, Malcolm MO, Ruble KM, Wachter VJ, Wempe MF. Pharmacokinetics of tamoxifen after intravenous and oral dosing of tamoxifen–hydroxybutenyl- β -cyclodextrin formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2007; 96(3): 644-660.

76. Buchanan CM, Buchanan NL, Edgar KJ, Lamber JL, Posey-Dowty JL, Ramsey MG, Wempe MF. Solubilization and dissolution of tamoxifen hydroxybutenyl cyclodextrin complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006; 95(10): 2246-2255.

77. Piao P, Shin SC, Choi JS. effects of oral kaempferol on the pharmacokinetics of tamoxifen and one of its metabolites, 4-hydroxytamoxifen, after oral administration of tamoxifen to rats. *Biopharm Drug Dispos* 2008; 29: 245–49.

78. <http://toxwiki.wikispaces.com/Tamoxifen>

79. Robinson SP, Langan-Fahey SM, Johnson DA , Jordan VC. Metabolites, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of tamoxifen in rats and mice compared to the breast cancer patient. *Drug Metabolism&Disposition* 1991; 19(1): 36-43.

- 80.** Adam HK, Patterson JS, Kemp JV. Studies on the metabolism and pharmacokinetics of tamoxifen in normal volunteers. *Cancer Treatment Researches*.1980; 64(6-7):761-764.
- 81.** Lien EA, Anker G, Ueland PM. Pharmacokinetics of tamoxifen in premenopausal and postmenopausal women with breast cancer, *Steroid Biochem. Molec. Biol. Vol.* 1995; 55(2): 229-231.
- 82.** Kafkaslı A, Ünlünen E, Demirhan B, Yoloğlu S. Distribution of Tamoxifen in Rat Tissues During Steady-State Treatment. *Tr. J. of Medical Sciences* 1998;28: 591-594.
- 83.** Coppi G, Iannuccelli V. Alginate/chitosan microparticles for tamoxifen delivery to the lymphatic system. *Int J Pharm* 2009;367: 127–132.
- 84.** Jagadeesh HG, Devi KV. Tamoxifen loaded poly (ϵ -caprolactone) based injectable microspheres for breast cancer. *Int J Pharm. Sci.*, 2010; 2: 189–195.
- 85.** Fenández A, Teijón C, Benito M, Iglesias I, Lozano R, Teijón JM, Blanco MD. Tamoxifen-loaded microspheres based on mixtures of poly(d,l-lactide-co-glycolide) and poly(d,l-lactide) polymers: effect of polymeric composition on drug release and in vitro antitumoral activity. *Journal of Applied Polymer Science* 2012; 124(4): 2987-2998.
- 86.** Layek B, Mukherjee B. Tamoxifen citrate encapsulated sustained release liposomes: preparation and evaluation of physicochemical properties, *Sci Pharm* 2010; 78: 507–515.
- 87.** Zeisig R, Rückerl D, Fichtner I. Reduction of tamoxifen resistance in human breast carcinomas by tamoxifen-containing liposomes in vivo. *Anti-Cancer Drugs* 2004; 15(7): 707-714.

- 88.** Bhatia A, Singh B, Amarji B, Katare OP. Tamoxifen-loaded liposomal topical formulation arrests hair growth in mice. *British Journal of Dermatology* 2010; 163: 412–415
- 89.** Guo J, Zhou J, Ying X, Men Y, Li RJ, Zhang Y et. al. Effects of stealth liposomal daunorubicin plus tamoxifen on the breast cancer and cancer stem cells. *British Journal of Dermatology* 2010; 163: 412–415.
- 90.** Abbasalipourkabir R, Salehzadeh A, Abdullah R. Antitumor activity of tamoxifen loaded solid lipid nanoparticles on induced mammary tumor gland in Sprague-Dawley rats. *African Journal of Biotechnology* 2010; 9(43): 7337-7345.
- 91.** Sahana B, Santra K, Basu S, Mukherjee B. Development of biodegradable polymer based tamoxifen citrate loaded nanoparticles and effect of some manufacturing process parameters on them: a physicochemical and in-vitro evaluation. *International Journal of Nanomedicine* 2010; 5: 621–630.
- 92.** Cavalli R, Bisazza A, Bussano R, Trotta A, Civra A, Lembo D, et.al. Poly(amidoamine)-cholesterol conjugate nanoparticles obtained by electrospraying as novel tamoxifen delivery system. *Journal of Drug Delivery* 2011; 2011: 1-9.
- 93.** <http://www.ilactr.com/atc/L02BA01.html>
- 94.** <http://www.breastcancer.org/questions/tamoxifen.jsp>
- 95.** <http://breast-cancer.emedtv.com/tamoxifen/tamoxifen-and-pregnancy.html>
- 96.** Khovidhunkit W, Shoback DM. Clinical effects of raloxifene hydrochloride in women, *Annals of Internal Medicine* 1999; 130(5): 431-439.

- 97.** <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cig?cid=5035>
- 98.** Eli Lilly and Company Material Data Sheet, Raloxifene hydrochloride tablets, 2004.
- 99.** Miclea RD, Varma PR, Peng A, Balu-Iyer SV, Development and characterization of lipidic cochleate containing recombinant factor VIII, *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; 1768: 2890–2898.
- 100.** <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00481>
- 101.** Hibner M, Magrina JF, Lefler SR, Cornella JL, Pizarro AR, Loftus C, Effects of raloxifene hydrochloride on endometrial cancer cells in vitro, *Gynecologic Oncology* 2004; 93: 642-46.
- 102.** Martino S, Cauley JA, Barrett-Connor E, Powles TJ, Mershon J, Disch D, Secrest RJ, Cummings SR, Continuing outcomes relevant to evista: breast cancer incidence in postmenopausal osteoporotic women in a randomized trial of raloxifene, *Journal of the National Cancer Institute* 2004; 96(23):1751-61.
- 103.** Raloxifene Hydrochloride, *Am J Health-Syst Pharm* 2000; 57(18):1669-1678.
- 104.** Cauley JA, Norton L, Lippman ME, Eckert S, Krueger KA, Purdie DW, et.al. Continued breast cancer risk reduction in postmenopausal women treated with raloxifene: 4-year results from the MORE trial, *Breast Cancer Research and Treatment* 2001; 65, 125–34.
- 105.** Balfour JA, Goa KL, Raloxifene, *Drugs & Aging* 1998; 12(4): 335-341.

- 106.** Wempe MF, Wacher WJ, Ruble KM, Michael G. Ramsey MG, Kevin J. Edgar KJ. Pharmacokinetics of raloxifene in male Wistar–Hannover rats: Influence of complexation with hydroxybutenyl-beta-cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* 2008; 346: 25–37.
- 107.** Jha RK, Tiwari S, Mishra B. Bioadhesive microspheres for bioavailability enhancement of raloxifene hydrochloride: formulation and pharmacokinetic evaluation. *AAPS PharmSciTech* 2011; 12(2): 650-657.
- 108.** Suthar AK, Solanki SS, Dhanwani RK.. Enhancement of dissolution of poorly water soluble raloxifene hydrochloride by preparing nanoparticles. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research* 2011; 2: 189-194.
- 109.** http://www.researchgate.net/publication/229472771_Lipid_nanoparticles_for_oral_delivery_of_raloxifene_hydrochloride_Preparation_characterization_biodistribution_and_pharmacokinetic_studies
- 110.** www.google.com/patents/US6w080762
- 111.** http://www.vademecumonline.com.tr/index_auth.php?page=active-substance&page2=1805
- 112.** <http://www.evista.com/Pages/side-effects.aspx#effects>
- 113.** <http://www.drugs.com/pregnancy/raloxifene.html>
- 114.** Loo WTY, Mary NB. Cheung, CLWC. Production of matrix metalloproteinases in specific subpopulations of human-patient breast cancer invading in three dimensional culture system. *Life Sciences* 2004; 76: 743–752.

- 115.** La Rocca G, Pucci-Minafra I, Marrazzo A, Taormina P, Minafra S. Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera. *British Journal of Cancer* 2004; 90: 1414 – 1421.
- 116.** Pellikainen JM, Kirsi M. Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ, Kosma VM. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, her2, and prognosis. *Clinical Cancer Research* 2004; 1: 7621–7628.
- 117.** Wang XY, Wang Y, Liu HC. Tamoxifen lowers the MMP-9/TIMP-1 ratio and inhibits the invasion capacity of ER-positive non-small cell lung cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2011; 65: 525–528.
- 118.** Bellosta S, Baetta R, Canavesi M, Comparato C, Granata A, Monetti M et al. Raloxifene inhibits matrix metalloproteinases expression and activity in macrophages and smooth muscle cells. *Pharmacological Research* 2007; 56: 160–167.
- 119.** Lewandowski KC, Komorowski J, Mikhalidis DP, Bienkiewicz M, Tan BK, C. J. O’Callaghan, et al. Effects of Hormone Replacement Therapy Type and Route of Administration on Plasma Matrix Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitors in Postmenopausal Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2006; 91(8):3123–3130.
- 120.** Subramani K, Ahmed W. Nanoparticulate Drug Delivery Systems for Oral Cancer Treatment. *Emerging Nanotechnologies in Dentistry*, 1 st ed.;USA: Elsevier Inc 2012.
- 121.** Sahoo SK, Labhasetwar V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discovery Today* 2003; 8(24): 1112-1120.

- 122.** Orive G, Gasco AR, Hernandez RM, Dominguez-Gil A, Pedraz JL. Techniques: New approaches to the delivery of biopharmaceuticals. Trends in Pharmacological Sciences 2004; 25(7), 387-382.
- 123.** Gaumet M, Vargas A, Gurny R, Delie F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2008; 69 :1–9.
- 124.** Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews 2010;62: 83–99.
- 125.** Sabnis S, Block LH. Chitosan as an enabling excipient for drug delivery systems I. Molecular modifications, International Journal of Biological Macromolecules 2000;27: 181–186.
- 126.** Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. Progress in Polymer Science 2011; 36 981–1014.
- 127.** Sinha VR, Singla AK, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K, et. al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs, Int. J. Pharm. 2004;274: 1–33.
- 128.** Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2004; 57: 19-34.
- 129.** Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Gurny R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2004; 57: 35–52.

- 130.** Pillai CKS, Paul W, Sharma CP. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science* 2009; 34: 641–678.
- 131.** Majeti NV, Kumar R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers* 2000;46: 1–27.
- 132.** Bernkop-Schnürch A. Chitosan and its derivatives: potential excipients for peroral peptide delivery systems. *Int. J. Pharm.* 2000; 194: 1–13.
- 133.** Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release* 2004; 100: 5 –28.
- 134.** Uhumwangho MU, Okor RS. Current trends in the production and biomedical applications of liposomes: a review. *J Med Biomed Res* 2005; 4: 9-21.
- 135.** Lasic DD. Novel applications of liposomes. *Tibtech* 1998; 16: 307-321.
- 136.** New RRC. *Liposomes: a practical approach*. 1. New York: Oxford University Pres; 1990.
- 137.** Allen TM. Liposomes: Opportunities in drug delivery. *Drugs* 1997; 4: 8-14.
- 138.** Gürsoy AZ. *Kontrollü salım sistemleri*.1. İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği; 2002.

- 139.** Barenholz Y. Design of liposome-based drug carriers: From basic research to application as approved drugs, Lasic and Papahadjopoulos (eds.). *Medical Applications of Liposomes*, 1998: 543-565.
- 140.** Miclea RD, Varma PR, Peng A, Balu-Iyer SV. Development and characterization of lipidic cochleate containin recombinant factor VIII. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; 1768: 2890–2898.
- 141.** Zarif L. Elongated supramolecular assemblies in drug delivery. *Journal of Controlled Release* 2002; 81: 7–23.
- 142.** Santangelo R, Paderu P, Delmas G, Chen ZW, Mannino R, Zarif L, Perlin DS. Efficacy of oral cochleate-amphotericin B in a mouse model of systemic candidiasis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000; 44(9): 2356–2360.
- 143.** Freshney RI. *Culture of animal cells*. 4. Canada: Wiley-Liss,inc.; 1994.
- 144.** Artursson P, Borchardt RT. Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond. *Pharm Res* 1997; 14: 1655-1658.
- 145.** Lundquist S, Renftel M, Brillault J, Fenart L, Cecchelli R, Dehouck MP, et al. Prediction of drug transport through the blood-brain barrier in vivo: A comparison between two in vitro cell models. *Pharm Res* 2002; 19: 976-981.
- 146.** Audus KL, Bartel RL, Hidalgo IJ, Borchardt RT. The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism studies. *Pharm Res* 1990; 7: 435-449.

- 147.** Martin BM. Tissue cell culture techniques. 1. Boston: Birkhauser; 1994.
- 148.** Clynes M. Animal cell culture techniques. 1. New York: Springer; 1998.
- 149.** Artursson P. Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa. Crit Rev Ther Drug Car Syst 1991; 8: 305-330.
- 150.** Boulenc X, Marti E, Joyeux H, Roques C, Berger Y, Fabre G, et al. Importance of the paracellular pathway for the transport of a new bisphosphonate using the human Caco-2 monolayers model. Biochem Pharmacol 1993; 46: 1591-1600.
- 151.** Walter E, Kissel T. Heterogeneity in the human intestinal cell line Caco-2 leads to differences in transepithelial transport. Eur J Pharm Sci 1995; 3: 215-230.
- 152.** Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. Biochem and Biophys Res Com 1991; 175: 880-885.
- 153.** Anderberg EK, Nyström C, Artursson P. Epithelial transport of drugs in cell culture. VII: Effects of pharmaceutical surfactant excipients and bile acid on transepithelial permeability in monolayers of human intestinal epithelial (Caco-2) cells. J Pharm Sci 1992; 81: 879-887.
- 154.** Hilgers AR, Conradi RA, Burton PS. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. Pharm Res 1990; 7: 902-910.
- 155.** Gan LS, Eads C, Niederer T, Bridgers A, Yanni S, Hsyu PH, Pritchard FJ, Thakker D, et al. Use of Caco-2 cells as an in vitro intestinal

absorption and metabolism model. Drug Dev Ind Pharm 1994; 20: 615-631.

156. Artursson P. Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. J Pharm Sci 1990; 79: 476-482.

157. Garberg P, Eriksson P, Schipper N, Sjöström B. Automated absorption assessment using Caco-2 cells cultured on both sides of polycarbonate membranes. Pharm Res 1999; 16: 441-445.

158. Wilson G. Cell culture techniques for the study of drug transport. Eur J D Met Pharm 1990; 15: 159-163.

159. Raiman J, Törmälehto S, Yritys K, Junginger HE, Mönkkönen J. Effects of various absorption enhancers on transport of clodronate through Caco-2 cells. Int J Pharm 2003; 261: 129-136.

160. Product Information Sheet for ATCC® HTB-22™

161. Saunders DE , Lawrence WD, Christensen C,. Wappler NL, Ruan H, Deppe G, Paclitaxel-induced apoptosis in MCF-7 breast-cancer cells. Int J Cancer 1997; 70: 214–220.

162. Horwitz KB, Costlow ME, McGuire WL. MCF-7: A human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors, Steroids 1975;26(6): 785-795.

163. Zheng A, Kallio A, Haürkoönen P. Tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells is mediated via extracellularly signal-regulated kinase signaling and can be abrogated by estrogen. Endocrinology 2007; 148(6):2764–2777.

- 164.** Nuttall ME, Fisher PW, Suva LJ, Gowen M. The selective oestrogen receptor modulators idoxifene and raloxifene have fundamentally different cell-specific oestrogen-response element (ERE)-dependent/independent mechanisms in vitro. *European Journal of Cancer* 2000; 36: 59-67.
- 165.** Product Information Sheet for ATCC® HTB-22™
- 166.** Woodward JKL, Holen I, Coleman RE, Buttle DJ. The roles of proteolytic enzymes in the development of tumour-induced bone disease in breast and prostate cancer. *Bone* 2007; 41: 912–927.
- 167.** Waleh NS, Murphy BJ, Nurulain Zaveri NT. Increase in tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) levels and inhibition of MMP-2 activity in a metastatic breast cancer cell line by an anti-invasive small molecule SR13179. *Cancer Letters* 2010; 289(1): 111-118.
- 168.** Trontelj J, Vovk T, Bogataj M, Mrhar A. HPLC analysis of raloxifene hydrochloride and its application to drug quality control studies, *Pharmacological Research* 2005; 52: 334–339.
- 169.** Yang ZY, Zhang ZF, He X, Zhao GY, Zhang YQ. Validation of a novel HPLC method for the determination of raloxifene and its pharmacokinetics in rat plasma. *Chromatographia* 2007; 65 (3/4): 197-201.
- 170.** <http://www.baltic-analytics.de/index.php?id=39>
- 171.** Mertins O, Lionzo MIZ, Micheletto YMS, Pohlmann AR, Silveira NP. Chitosan effect on the mesophase behavior of phosphatidylcholine supramolecular systems. *Materials Science and Engineering C* 2009; 29: 463–469.

- 172.** Qi L, Xu Z, Jiang X, Hu C, Xiangfei Zou. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research* 2004;339: 2693–2700.
- 173.** Syed UM, Woo AF, Plakogiannis F, Tuo Jin T, Zhu H. Cochleates bridged by drug molecules. *Int. J. Pharm.* 2008; 363: 118–125.
- 174.** Segarra I, Diane A, Movshin DA, Zarif L. Pharmacokinetics and tissue distribution after intravenous administration of a single dose of amphotericin B cochleates, a new lipid-based delivery system. *J. PHARM. SCI* 2002; 91(8): 1827-1837.
- 175.** Othman AA, Syed SA, Newman AH, Eddington ND. Transport, metabolism and in vivo population pharmacokinetics of the chloro benztropine analogs, a class of compounds extensively evaluated in animal models of drug abuse. *J Pharm Exp Ther* 2007;320:344-353.
- 176.** Stevenson CL, Augustijns PF, Hendren RW. Use of Caco-2 cells and LC/MS/MS to screen a peptide combinatorial library for permeable structures. *Int J Pharm* 1999;177:103-115.
- 177.** http://www.drugdevelopmenttechnology.com/contractors/contract_research/advancell/advancell1.html
- 178.** Miret S, Abrahamse L, and Groene EM. Comparison of in vitro models for the prediction of compound absorption across the human intestinal mucosa. *Journal of Biomolecular Screening* 2004; 9(7): 598-506.
- 179.** Kamiyama E, Sugiyama D, Nakai D, Miura S, Okazaki O. Culture Period-Dependent Change of Function and Expression of ATP-Binding Cassette Transporters in Caco-2 Cells. *Drug Metabolism And Disposition* 2009; 37(9): 1956-1962.

- 180.** Vaidyanathan JB, Walle T. Transport and metabolism of the tea flavonoid (–)-epicatechin by the human intestinal cell line Caco-2. *Pharm. Res.* 2011; 18(10): 1420-1425.
- 181.** Saitoh R, Sugano K, Takata N, Tachibana T, Higashida A, Nabuchi Y et.al. Correction of permeability with pore radius of tight junctions in Caco-2 monolayers improves the prediction of the dose fraction of hydrophilic drugs absorbed by humans. *Pharmaceutical Research* 2004; 25(5): 749-755.
- 182.** Markowska M, Oberle R, Juzwin S, Hsu PC, Gryszkiewicz M, Streeter AJ. Optimizing Caco-2 cell monolayers to increase throughput in drug intestinal absorption analysis. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2001; 246: 51– 55.
- 183.** Ingels F, Deferme S, Destexhe E, Oth M, Mooter GV, Augustijns P. Simulated intestinal fluid as transport medium in the Caco-2 cell culture model. *Int. J. Pharm.* 2002; 232: 183–192.
- 184.** Motz SA, Schaefer UF, Balbach S, Eichinger T, Lehr CM. Permeability assessment for solid oral drug formulations based on Caco-2 monolayer in combination with a flow through dissolution cell. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2007;66: 286–295.
- 185.** Desai MP, Labhasetvar V, Walter E, Lewy RJ, Amidon GL. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm. Res.* 1997; 14 (11): 1568-1573.
- 186.** Ebert B, Albrecht S, Lampen A. Identification of BCRP as transporter of benzo[a]pyrene conjugates metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists. *Carcinogenesis* 2005; 26(10): 1754-1763.

- 187.** Physicians Desk Reference, 58th ed., 2252-2260, 2004.
- 188.** Rapoport N, Gao Z, Kennedy A. Multifunctional nanoparticles for combining ultrasonic tumor imaging and targeted chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 1095 – 1096.
- 189.** Weydert CY, Zhang Y, Sun W, Waugh TA, Teoh MLT, Andringa KK, et.al. Increased oxidative stress created by adenoviral MnSOD or CuZnSOD plus BCNU (1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea) inhibits breast cancer cell growth. *Free Radical Biology & Medicine* 2008; 44: 856–867.
- 190.** Min KH, Park K, Kim YS, Bae SM, Lee S, Jo HG, et.al. Hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles-encapsulated camptothecin enhance the drug stability and tumor targeting in cancer therapy. *Journal of Controlled Release* 2008; 127: 208–218.
- 191.** Rizzo P, Miao H, D’Souza G, Osipo C, Yun J, et al., Cross-talk between notch and the estrogen receptor in breast cancer suggests novel therapeutic approaches. *Cancer Research* 2008; 68(13): 5226-5235.
- 192.** Hakimuddin F, Tiwari K, Paliyath G, Meckling K. Grape and wine polyphenols down-regulate the expression of signal transduction genes and inhibit the growth of estrogen receptor–negative MDA-MB231 tumors in nu/nu mouse xenografts. *Nutrition Research* 2008; 28: 702–13.
- 193.** Visigalli D, Palmieri D, Strangio A, Astigiano S, Barbieri Ottavia, et al. The carboxyl terminal trimer of procollagen I induces pro-metastatic changes and vascularization in breast cancer cells Xenografts, *BMC Cancer* 2009; 9(59): 1-10.

- 194.** Aslan G, Ulukanlıgil M, Özardalı İ. İmmunsuprese Balb/C farelerde deneysel tüberkuloz peritonit modeli. Genel Tıp Dergisi 1999; 9(4): 131-134.
- 195.** Ölmez Ü. İmmun sistemin baskılanması. TKlin Tıp Bilimleri 1991; 11: 177-182.
- 196.** Chan PC, Head JF, Cohen LA, Wynder EL. Influence of dietary fat on the induction of mammary tumors by N-nitrosomethylurea: associated hormone changes and differences between Sprague-Dawley and F344 rats. J. Natl.Cancer.Inst. 1977; 59(4): 1279-83.
- 197.** Rivera ES, Andrade N, Martin G, Melito G, Cricco G, Mohamad N, et.al. Induction of mammary tumors in rat by intraperitoneal injection of NMU: histopathology and estral cycle influence. Cancer Letters 1994; 86(2): 223-228.
- 198.** Kijkuokool P, Parhar IS, Malaivijitnond S. Genistein enhances N-nitrosomethylurea-induced rat mammary tumorigenesis. Cancer Letters, 2006; 242(1): 53-59.
- 199.** Lippert HT, Adlercreutz H, Berger MR, Seeger H, Elger W, Mueck AO. Effect of 2-methoxyestradiol on the growth of methyl-nitroso-urea (MNU)-induced rat mammary carcinoma. J Steroid Biochem Mol Biol 2003; 84(1), 51-56, 2003.
- 200.** Anzano MA, Smith JM, Uskokovic MR, Peer CW, Mullen LT, John J. Letterio JJ, et. al. 1a, 25-Dihydroxy-16-ene-23-yne-26,27-hexafluorocholecalciferol (Ro24-5531), a New Deltanoid (Vitamin D Analogue) for Prevention of Breast Cancer in the Rat, Cancer Research 1994; 54: 1653-1656.

- 201.** Verma AK, Johnson JA, Gould MN, Tanner MA. Inhibition of 7,12-dimethylbenz(α)anthracene- and nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin, *Cancer Research* 1988; 48(15): 5754-5758.
- 202.** Takka S, Sakr A, Goldberg A. Development and validation of an in vitro in vivo correlation for buspirone hydrochloride extended release tablets. *J Contr Rel* 2003; 88: 147-157.
- 203.** Değim Z, Ünal N, Eşsiz D, Abbasoğlu U. Caco-2 cell culture as a model for famotidine absorption. *Drug Del* 2005;12: 27-33.
- 204.** Fontana G, Maniscalco L, Schillaci D, Cavallaro G, Giammona G. Solid lipid nanoparticles containing tamoxifen characterization and in vitro antitumoral activity. *Drug Delivery* 2005; 12:385–392.
- 205.** USP 30, Buffer Solutions.
- 206.** Wörle-Knirsch JM, Pulskamp K, Krug HF. Oops they did it again! carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Letters* 2006; 6(6): 1261-1268.
- 207.** Slater K. Cytotoxicity tests for high-throughput drug discovery. *Current Opinion in Biotechnology* 2001; 12: 70–74.
- 208.** Crouch SPM, Slater KJ. High-throughput cytotoxicity screening: hit and miss. *DDT* 2001; 6(12): 548-553.
- 209.** Pieters R, Huismans DR, Levya A, Veerman AJP. Adaptation of the rapid automated tetrazolium dye based (MTT) assay for chemosensitivity testing in childhood leukemia. *Cancer letters* 1988; 41(3): 23-232.

- 210.** Değim Z, Mutlu NB, Yılmaz Ş, Eşsiz D, Nacar A. Investigation of liposome formulation effects on rivastigmine transport through human colonic adenocarcinoma cell line (CACO-2). *Pharmazie* 2010; 65: 32–40.
- 211.** Karamustafa F, Çelebi N, Değim Z, Ünal N. Transport evaluation of alendronate across Caco-2 cell monolayers. *Pharmazie* 2009; 64(2): 98-103.
- 212.** Yener G, Gönüllü Ü, Üner M, Değim T, Araman A. Effect of vehicles and penetration enhancers on the in vitro percutaneous absorption of celecoxib through human skin. *Pharmazie* 2003; 58: 330-333.
- 213.** Henriksen I, Vhgen SR, Sande SA, Smistad G, Karlsen J. Interactions between liposomes and chitosan II: effect of selected parameters on aggregation and leakage. *International Journal of Pharmaceutics* 1997; 146: 193-204.
- 214.** Deepak M, Basavaraj N, Manvi FV. Formulation and characterization of tamoxifen loaded stealth liposomes for breast cancer. *International Journal of Drug Development & Research* 2013; 5(1): 1-10.
- 215.** Manconi M, Mura S, Manca ML, Fadda AM, Dolz M, Hernandez MJ, et. al. Chitosomes as drug delivery systems for C-phycocyanin: Preparation and characterization. *International Journal of Pharmaceutics* 2010; 392: 92–100.
- 216.** Dodane V, Vilivalam VD. Pharmaceutical applications of chitosan. *PSTT* 1999; 1(6) : 246-253.
- 217.** Bernkop-Schnürch A, Dünnhaupt S. Chitosan-based drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2012; 81(3): 463-469.

- 218.** Thanou M, Verhoef JC, Junginger HE. Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001; 50: 91–101.
- 219.** Thanou M, Verhoef JC, Junginger HE. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001; 52: 117–126.
- 220.** Muhammed RPE, Junise V, Saraswathi R, Krishnan PN, Dilip C. Development and characterization of chitosan nanoparticles loaded with isoniazid for the treatment of tuberculosis. *RJPBCS* 2010; 1(4): 383-390.
- 221.** Alishahi A, Mirvaghefi A, Tehrani MR, Farahmand H, Koshio S, F.A. Dorkoosh FA, Elsabee MZ. Chitosan nanoparticle to carry vitamin C through the gastrointestinal tract and induce the non-specific immunity system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Carbohydrate Polymers* 2011; 86: 142– 146.
- 222.** Guan M, Zhou Y, Zu QL, Liu Y, Bei YY, Zhang XN, Zhan Q. N-trimethyl chitosan nanoparticle-encapsulated lactosyl-norcantharidin for liver cancer therapy with high targeting efficacy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2012; 8: 1172–1181.
- 223.** Parveen S, Sahoo SK. Long circulating chitosan/PEG blended PLGA nanoparticle for tumor drug delivery. *European Journal of Pharmacology* 2011; 670: 372–383.
- 224.** Ravikumara NR, Madhusudhan M. Chitosan nanoparticles for tamoxifen delivery and cytotoxicity to MCF-7 and Vero cells. *Pure Appl Chem* 2011; 83(11): 2027-2040.

- 225.** D'évay A, Nagy S, Mayer K, P'al Sz. Investigation of drug dissolution from cochleates applying transdermal diffusion cell. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2007; 32 S: S6–S21.
- 226.** Ramani K, Balasubramanian SV. Fluorescence properties of Laurdan in cochleate phases. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003; 1618: 67– 78.
- 227.** Evans CC, Zasadzinski J. Encapsulating vesicles and colloids from cochleate cylinders. *Langmuir* 2003; 19: 3109-3113.
- 228.** Shapiro L, Cohen S. Novel alginate sponges for cell culture and transplantation. *Biomaterials* 1997; 18: 583-590.
- 229.** Potter SM, DeMarse TB. A new approach to neural cell culture for long-term studies. *Journal of Neuroscience Methods* 2001; 110: 17–24.
- 230.** Pietschmann T, Lohmann V, Kaul A, Krieger N, Rinck G, Rutter G, et. al. persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *Journal of Virology* 2002; 76(8): 4008–4021.
- 231.** Halliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2008; 476: 107–112.
- 232.** Hilgers AR, Conradi RA, Burton PS. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across intestinal mucosa. *Pharm Res* 1990; 7(9): 902-910.
- 233.** Liu Y, Hu Ming. Absorption and metabolism of flavonoids in the Caco-2 cell culture model and a perused rat intestinal model. *Drug Metabolism and Disposition* 2002; 30(4): 370-377.

- 234.** Lindmark T, Kimura Y, Artursson P. Absorption enhancement through intracellular regulation of tight junction permeability by medium chain fatty acids in Caco-2 cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1998; 284(1): 362-369.
- 235.** Hovgaard L, Brondsted H. Drug delivery studies in Caco-2 monolayers: Effects of cyclodextrins. *Pharm Res* 1995; 12(9): 1328-1338.
- 236.** Mutlu NB, Değim Z, Yılmaz Ş, Eşsiz D, Nacar A. New perspective for the treatment of alzheimer diseases: Liposomal rivastigmine formulations. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2011; 37(7):775–789.
- 237.** Değim Z, Değim T, Acartürk F, Erdoğan D, Özoğul C, Köksal M. Rectal and vaginal administration of insulin–chitosan formulations: An experimental study in rabbits. *Journal of Drug Targeting* 2005; 13(10): 563–572.
- 238.** Başaran B, Bozkır A. Thermosensitive and pH induced in situ ophthalmic gelling system for ciprofloxacin hydrochloride: hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complex. *Acta Pol Pharm* 2012; 69(6): 1137-1147.
- 239.** Yavuz B, Sarisözen C, Vural İ. An alternative cyclodextrin based formulation for oral anticancer drug exemestane: In vitro and cell culture studies. *Abstracts / Journal of Controlled Release* 2010; 148: e74–e84.
- 240.** Higuchi T. Physical chemical analysis of percutaneous absorption from creams and ointments. *J Soc Cosmet Chem* 1960;11: 85-97.
- 241.** Potts RO, Guy RH. Predicting skin permeability. *Pharm Res* 1992;9: 663-669.

- 242.** Rouf MA, Vural İ, Hincal AA. Development and characterization of liposomal formulations for rapamycin delivery and investigation of their antiproliferative effect on MCF7 cells. *J Lip Res* 2009; 19(4): 322-331.
- 243.** Liko F, Erdoğan S, Özer YA, Vural I. In vitro studies on 5-florouracil-loaded DTPA-PE containing nanosized pegylated liposomes for diagnosis and treatment of tumor. *J Lip Res* 2013; 23(1): 61-69.
- 244.** Borges O, Cordeiro-da-Silva A, Romeijn SG, Amidi M, Sousa A, Borchard G, Junginger HE. Uptake studies in rat Peyer's patches, cytotoxicity and release studies of alginate coated chitosan nanoparticles for mucosal vaccination. *J Cont Rel* 2006; 114: 348-58.
- 245.** Degim IT, Gumusel B, Degim Z, Özçelikay T, Tay A, Güner Ş, Oral administration of liposomal insulin. *J Nanosci Nanotech* 2006; 6(9-10): 2945-2949.
- 246.** Değim Z, Değim T, Baş L, Elmas M. The use of liposomal enrofloxacin for intracellular infections in kangal dogs and visualisation of phagocytosis of liposomes. *J Biomed Mater Res* 2002; 61(2): 246-51.

EK 1



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

12.02/2010

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/ 34-2372
KONU:

Sayın

Doç.Dr.Zelihagül DEĞİM
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Eczacılık Teknolojisi Bölümü
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

G.Ü.ET-10.010 kod numaralı ve *“Tamoksifen ve raloksifenin yeni formülasyonlarının geliştirilmesi ve bu yeni formülasyonların in vivo-in vitro etkinliklerinin kıyaslanması”* başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-10.010 and entitled *“Development of new formulations of tamoxifen and raloxifene and comparison of in vivo-in vitro efficacy of these new formulations”* is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.


Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

EK 2



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/199-20288
KONU :

31.10.2011

Sayın

Prof.Dr.Zelihagül DEĞİM
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Daha önce onay alan, G.Ü.ET-10.010 kod numaralı *"Tamoksifen ve raloksifenin yeni formülasyonlarının geliştirilmesi ve bu yeni formülasyonların in vivo-in vitro etkinliklerinin kıyaslanması"* adlı çalışmanız hakkında vermiş olduğunuz 18.10.2011 tarihli dilekçeniz incelenmiş olup, talebiniz Başkanlığımızca uygun görülmüştür.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.


Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

10.1. TEŞEKKÜR

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

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

Bilgi birikimlerinden faydalandığım, bana karşı her zaman içten ve anlayışlı davranan, en zor günlerimde desteklerini esirgemeyen **Sayın Prof. Dr. Nevin Çelebi'ye, Sayın Prof. Dr. Füsün Acartürk'e**

Bana karşı her zaman samimi davranan ve destek olan **Sayın Prof. Dr. Sevgi Takka'ya**

Her zaman içtenliği ve güleryüzüyle bana destek olan, laboratuvarında geçirdiğim uzun akşam saatlerinde bana verdiği çikolatalar ve meyvelerle ile bana moral veren **Sayın Prof. Dr. Figen Tırnaksız'a**

Beni her zaman destekleyen, ihtiyacım olduğu zamanlarda bana tecrübeleriyle fikir ve moral veren **Sayın Doç. Dr. Zeynep Şafak Teksin'e**

Her ihtiyacım olduğunda benden destek ve sevgilerini esirgemeyen, bana sürekli yol gösteren arkadaşlarım **Arş. Gör. Dr. Fatmanur Tuğcu Demiröz ve Arş. Gör. Dr. Sibel Tamer'e**

En çok ihtiyacım olan zamanlarda yardımına koşan, beni sürekli dinleyip motive eden, ayrıca DSC çalışmalarımda kendi işini yaparcasına özenle çalışan oda arkadaşım **Arş. Gör. Uzm. Ecz. Serdar Tort'a,**

Bölüm arkadaşlarım, **Arş. Gör. Dr. Tuba İnceçayır ve Arş. Gör. Uzm. Ecz. Şeyda Akkuş Arslan'a,**

Bölüm sekreterimiz **Fatma Çelik'e,**

Yoğun çalışma programı içerisinde bana her zaman vakit ayıran, hücre kültürü çalışmalarımda, deneyimlerimden faydalandığım **Uzm. Bio. Şükran Yılmaz'a**

İn vivo çalışmalarımdaki yardımları ve sabrı için **Doç.Dr. Levent Altıntaş'a,**

GATA' da yaptığım in vivo çalışmalardaki özverisi ve yardımlarından dolayı **Doç. Dr. Turgut Topal'a**,

En çok ihtiyaç duyduğum anda yardımlarını ve ilgilerini benden esirgemeyen **Uzm.Ecz. Süha Kaya** ve **Didem Güner'e**,

En zor zamanlarımda yardıma koşan, bana destek olan ve bana moral vermeye çalışan, hep yanımda olan sevgili dostum **Arş. Gör. Sezen Yarımkaya Baş'a**,

Her zaman yanımda olan arkadaşlarım, **Dr. Feriba Turhan** ve **Erdem Baş'a**,

Bana hayatım boyu destek olan, bana her zaman inanan Sevgili Babam **İbrahim Mutlu'ya**,

Hayatımdaki en büyük eksikliği bana hissettirmemeye çalışan ve bana her zaman moral veren Sevgili ablalarım, **İlknur Yeşim Özen** ve **Sevda Nur Poyraz'a**,

Yaşadığım zorluklara rağmen, desteğini ve sabrını benden hiç esirgemeyen, vazgeçtiğim zamanlarda hayata tutunmamı sağlayan, uzun çalışma saatlerinde her zaman yanımda olan ve elinden gelen hiçbir yardımı esirgemeyen Biricik Eşim, **SONER AĞARDAN'a**,

Hayatta olduğu zamanlarda sabırla uzun çalışma saatleri sonunda camın önündeki koltukta eve dönüşümü bekleyen, bana her konuda destek olan, şu an hayatta olmasa da her zaman benimle birlikte olduğunu inandığım Canım **ANNEM Gülsevim Mutlu'ya**,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Necibe Başaran

Soyadı: MUTLU AĞARDAN

Doğum yeri ve tarihi: Ankara-07.08.1983

Eğitimi:

Doktora: Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, (Şubat 2008-)

Yüksek Lisans: Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Aralık 2007.

Yüksek Lisans Tezi

Rivastigminin Lipozom Formülasyonunun Geliştirilmesi ve Hücre Kültürlerinden Geçişinin İncelenmesi

Lisans: Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 2005.

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olunan Dernek ve Kuruluşlar

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

YAYINLAR

Mutlu NB, Değim Z. Bioavailability File: Rivastigmine Tartrate, FABAD J.Pharm.Sci., 30, 150-157, 2005.

Degim Z, Mutlu NB, Yilmaz S, Essiz D, Nacar A. Investigation of liposome formulation effects on rivastigmine transport through human colonic adenocarcinoma cell line (Caco-2), Pharmazie 65(1):32-40, 2010.

Mutlu NB, Degim Z, Yilmaz S, Essiz D, Nacar A. New perspective for the treatment of Alzheimer diseases: Liposomal rivastigmine formulations, Drug Dev Ind Pharm 2011; 37(7): 775-789.

BİLDİRİLER

Mutlu NB, Degim Z, Yılmaz Ş, Essiz D, Altıntaş L, Günkaya G, Investigation of Rivastigmine Transport Through Human Colon Carcinoma Cells, Caco-2, 35th Annual Meeting of Controlled Release Society, July 12-16 2008, New York City-USA.

Mutlu NB, Degim Z, Yılmaz Ş, Essiz D, Investigation of rivastigmine transport through MDCK cell line, 14th International Pharmaceutical Technology Symposium-Overcoming Biological Barriers Innovative Delivery Systems, September 8-11, 2008, Antalya-Turkey.

Degim Z, Mutlu NB, Yılmaz Ş, Essiz D, Development of liposome formulation of rivastigmine and investigation of transport properties through MDCK and Caco-2 cell lines, 3rd BBBB-Bosphorus International Conference on Pharmaceutical Sciences, October 26-28, 2009, Antalya-Turkey.

Mutlu NB, Değim Z, Yılmaz Ş, Eşsiz D. Development of liposome formulations of rivastigmine with absorption enhancers and investigation of transport properties of liposomes through Caco-2, PBP World Meeting, March 8-11, 2010, Malta-Valetta.

Mutlu NB, Değim Z, Yılmaz Ş, Eşsiz D. Development of liposome formulation of rivastigmine with enhancers and investigation of transport properties through MDCK cell line, 15th International Pharmaceutical Technology Symposium, September 13-15, Antalya-Turkey.

Mutlu NB, Değim Z, Yılmaz Ş, Eşsiz D. Development of liposome formulation of rivastigmine with enhancers and investigation of transport

properties through MDCK cell line, 15th International Pharmaceutical Technology Symposium, September 13-15, Antalya-Turkey (sözlü tebliğ).

Mutlu Ağardan NB, Değim Z, Yılmaz Ş, Altıntaş L. Development of tamoxifene nanoparticles with absorption enhancers and investigation of transport properties through caco-2 cell lines, 16th International Pharmaceutical Technology Symposium, September 10-12, Antalya-Turkey.

PROJELER

Rivastigminin Caco-2 Hücrelerinden Penetrasyonunun Araştırılması, G.Ü Araştırma Fonu, 02/2006-17. Araştırmacı-Proje tamamlandı.

Raloksifenin Hücre Kültürlerinden Absorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi ve Yeni Formülasyonları Geliştirilerek Etkinliğinin Artırılması, TÜBİTAK Proje No: 109S221, Bursiyer-Proje tamamlandı.

SERM(Selektif Östrojen Reseptör Modülatörleri) Grubundan Raloksifen ve Tamoksifenin Lipozomal ve Nanopartiküler İlaç Şekillerinin Geliştirilerek İn Vivo-İn Vitro Etkinliklerinin İncelenmesi, NOVARTİS Araştırma-Proje Destekleri, Araştırmacı-Proje tamamlandı.

Östrojen Reseptörleri Üzerinde Seçici Etki Gösteren İlaç Grubundan Bazı Etkin Maddelerin Yeni İlaç Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve İn vitro/İn vivo İncelenmesi, G.Ü Araştırma Fonu, Araştırmacı-Proje devam etmektedir.

ÖDÜLLER

SERM(Selektif Östrojen Reseptör Modülatörleri) Grubundan Raloksifen ve Tamoksifenin Lipozomal ve Nanopartiküler İlaç Şekillerinin Geliştirilerek İn Vivo-İn Vitro Etkinliklerinin İncelenmesi, NOVARTİS Farmasötik Teknoloji Proje Destek Ödülleri, 2010.