

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FARMASÖTİK NANOTEKNOLOJİ  
ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Dr. Öğr. Üy. Ahmet Doğan ERGİN

**KOENZİM Q10' UN BİYOYARARLANIMINI  
ARTTIRMAK İÇİN PRONİOZOMAL  
FORMÜLASYONLARIN GELİŞTİRİLMESİ: İN VİTRO  
VE İN VİVO DEĞERLENDİRMELERİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**ŞENCAN BALCI**

**Referans no: 10499832**

**EDİRNE-2023**

**T.C.**  
**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**FARMASÖTİK NANOTEKNOLOJİ**  
**ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**  
Tez Yöneticisi  
Dr. Öğr. Üy. Ahmet Doğan ERGİN

**KOENZİM Q10' UN BİYOYARARLANIMINI**  
**ARTTIRMAK İÇİN PRONİOZOMAL**  
**FORMÜLASYONLARIN GELİŞTİRİLMESİ: İN VİTRO**  
**VE İN VİVO DEĞERLENDİRMELERİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**ŞENCAN BALCI**

**EDİRNE-2023**

# İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI .....	i
ETİK BEYAN.....	ii
İTHAF .....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGE VE KISALTMALAR.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1.GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Veziküler Sistemler .....	2
2.1.1.Transferozomlar .....	3
2.1.2.Farmakazomlar .....	4
2.1.3.Fitozomlar .....	4
2.1.4.Etozomlar .....	4
2.1.5.Lipozomlar .....	4
2.1.6.Niozomlar .....	6
2.1.7.Özel Niozom Türleri.....	10
2.2. Proveziküler Sistemler .....	13
2.2.1. Prolipozomlar.....	14
2.2.2. Proniozomlar .....	15
2.2.3. Proniozom Oluşturma Yöntemleri.....	17
2.2.4. Proniozom Bileşenleri ve Etkileri.....	19
2.2.5. Proniozomlarda Yapılan Karakterizasyon İşlemleri.....	21
2.2.6. Kuru Toz Proniozomlarda Yapılması Gereken Kontroller.....	21
2.2.7. Proniozomlardan Elde Edilen Niozomlarda Yapılan Kontroller .....	22
2.3. Koenzim Q10.....	22
2.3.1 Koenzim Q10'un Klinik ve Terapötik Faydaları.....	23
2.3.2. Koenzim Q10'un Farmakokinetiği .....	24
2.3.3.Koenzim Q10'un Yan Etkileri .....	25
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	26
3.1. Kullanılan Materyaller ve Kimyasallar .....	26
3.1.1 Kullanılan Materyaller.....	26
3.1.2 Kullanılan Kimyasallar Maddeler .....	27
3.2.Çalışmalarda Kullanılan Çözünme Ortamının Bileşimi ve Hazırlanması.....	27
3.3. Koenzim Q10'un Miktar Tayin Yöntemlerinin Geliştirilmesi.....	27
3.3.1.Koenzim Q10'un Etil Asetat Ortamındaki Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini.....	27
3.3.2.Koenzim Q10'un HPLC ile Hayvan Plazmasındaki Tayini.....	29
3.4.Analitik Metot Validasyonu.....	30

3.5. Formülasyon Çalışmaları.....	31
3.5.1.Proniozomların Hazırlanması ve Optimizasyonu .....	31
3.5.2. Proniozomal Formülasyonların Karakterizasyonu.....	32
3.6. İn-Vitro İlaç Salım Çalışmaları.....	34
3.7.Proniozomun Morfolojik Değerlendirmesi .....	34
3.8.Termal Analiz .....	35
3.9.Farmakokinetik Analiz .....	35
4. BULGULAR .....	36
4.1. Koenzim Q10'un Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi .....	36
4.1.1. Koenzim Q10'un Etil asetat Ortamındaki HPLC-DAD Spektrumu.....	36
4.1.2. Koenzim Q10'un Hareketli Fazdaki Standart Doğrusuna İlişkin Bulgular ...	36
4.1.3. Koenzim Q10'un Plazma Ortamındaki HPLC-DAD Spektrumu .....	38
4.1.4. Koenzim Q10'un Plazmadaki Standart Doğrusuna İlişkin Bulgular.....	38
4.1.5. Koenzim Q10'un HPLC-DAD Miktar Tayini Yöntemlerinin Validasyon Çalışmaları .....	41
4.2. Proniozom Formülasyon Sonuçları .....	45
4.3. Formülasyonun Görüntülenmesi.....	50
4.4. In Vitro Salım Çalışması .....	50
4.5. Termal Analiz (DSC) Bulguları .....	51
4.6. Farmakokinetik Analiz Bulguları .....	52
5.TARTIŞMA .....	53
5.1. Koenzim Q10'un Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi.....	53
5.2. Proniozomların Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	54
5.3. In Vitro Salım Çalışmalarının Değerlendirilmesi.....	56
5.4. Termal Analiz (DSC) Bulgularının Değerlendirilmesi .....	58
5.5. Proniozomun Morfolojik Değerlendirilmesi .....	58
5.6. Farmakokinetik Analiz .....	58
KAYNAKLAR .....	61
EKLER.....	69
ÖZGEÇMİŞ .....	70
BENZERLİK RAPORU .....	71

## ONAY SAYFASI



## ETİK BEYAN

“Koenzim Q10’un biyoyararlanımını arttırmak için proniozomal formülasyonların geliştirilmesi: in vivo ve in vitro değerlendirmeleri” adlı bana ait olan tez çalışmamın bütün aşamalarında etik dışı davranışımın olmadığını, bütün verileri ve bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, verilerde ve sonuçlarda herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezimin yazımında yapay zeka yazılımları kullanmadığımı, diğer kaynaklardan elde ettiğim bilgi ve yorumlara tezimde uygun şekilde kaynak gösterdiğimi ve kaynaklar bölümünde yer verdiğimi, patent ve telif haklarını ihlal edici herhangi bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Şencan BALCI

## İTHAF

Bu tez çalışmasını üzerimde emeği geçen biricik aileme, eşime ve kıymetli hocam Sayın Dr. Öğr. Üy. Ahmet Doğan ERĐİN'e' ithaf ediyorum.



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde ve çalışmalarım süresince bilgisiyle ve tecrübesiyle bana yol gösteren, yardımlarını ve gece gündüz çalışıp bana desteğini esirgemeyen tez danışmanım Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Doğan ERĐİN hocama, yüksek lisans eğitimim boyunca emeği geçen, ders ve tez çalışmalarım süresince ilgi ve desteklerini gördüğüm Anabilim Dalımızdaki tüm öğretim üyelerine teşekkürü bir borç bilirim.



## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>ATP</b>	: Adenozin Trifosfat
<b>CPP</b>	: Critical Packaging Parameter (Kritik Paketleme Parametresi)
<b>DL</b>	: Drug Loading (İlaç Yüklemesi)
<b>DLS</b>	: Dynamic Light Scattering (Dinamik Işık Saçılımı)
<b>DSC</b>	: Differential Scaler Calorimetry (Diferansiyel Taramalı Kalorimetri)
<b>DSP</b>	: Disetil Fosfat
<b>EMİ</b>	: Etkin Madde İçeriği
<b>HLB</b>	: Hidrofilik-Lipofilik Balans
<b>LD</b>	: Lazer Difraksiyonu
<b>HMGC<sub>o</sub>A</b>	: Hidroksimetilglutaril-CoA
<b>HPLC</b>	: High Performance Liquid Chromatography
<b>ICH</b>	: International Council on Harmonization
<b>LOD</b>	: Limit of Dedection (Tespit limiti)
<b>LOQ</b>	: Limit of Quantification (Tayin Limiti)
<b>LUV</b>	: Large Unilamellar Vesicles (Büyük Tek Tabakalı Veziküller)
<b>MLV</b>	: Multilamellar Vesicles (Çok Tabakalı Veziküller)
<b>PBPK</b>	: Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling and Simulation
<b>PF127</b>	: Pluronik F127
<b>PN</b>	: Proniozom
<b>PV</b>	: Proses Verimi
<b>RSD</b>	: Relative Standart Deviation (Bağlı standart sapma)
<b>SEM</b>	: Scanning Electron Microscopy (Taramalı Elektron Mikroskopisi)
<b>STR</b>	: Stearilamin

- SUV** : Small Unilamellar Vesicles (Küçük Tek Tabakalı Veziküller)
- T<sub>c</sub>** : Kritik Jel Geçiş Sıcaklığı
- TEM** : Transmission Electron Microscope (Geçirimli Elektron Mikroskobu)
- UV** : Ultra viole
- Y.E.** : Yükleme Etkinliği



## ÖZET

'Koenzim Q10'un biyoyararlanımını arttırmak için proniozomal formülasyonların geliştirilmesi: İn vitro ve in vivo değerlendirmeleri' Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Nanoteknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Edirne, 2023.

Koenzim Q10 vücudun ürettiği en önemli antioksidanlardan biridir. Ayrıca elektron taşıyıcı olarak da görev alır, genel olarak oral olmakla birlikte vücuda transdermal, oküler yollarla da uygulanmaktadır. Koenzim Q10, oksijen kaynaklı serbest radikaller ile etkileşerek biyomoleküllerin zarara uğramasını önlemektedir. Bundan dolayı vücutta güçlü bir antioksidan olarak görev alarak diğer antioksidanların yenilenmesinde, hücre sinyalinde, hücre büyümesinde ve gen ekspresyonunda görev alır, membran stabilitesinde, enerji dönüşümünde ve ATP üretiminde de önemli rol oynar. Koenzim Q10 düşük çözünürlük ve düşük biyoyararlanımı gösterdiğinden kullanımı sınırlanmaktadır.

Yaptığımız tez çalışması kapsamında proniozomlardan elde edilen niozomal formülasyonları üzerinde karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve belirlenen formüller in vivo farmakokinetik çalışmalara tabi tutulmuştur. Saf koenzim Q10 ve koenzimQ10 yüklü proniozomlar uygulandıktan sonra sıçanlardan 24 saat boyunca belli saatlerde kan örnekleri alınıp gerekli ölçümler yapılmıştır. Farmakokinetik parametreler incelendiğinde görüleceği üzere proniozom formülasyonu saf etkin maddeye göre etkili bir biyoyararlanım göstermiştir. Miktar tayinleri yapılırken ICH referans alınarak HPLC'de analitik metot yöntemi geliştirilmiş ve bu yöntemin validasyonu yapılmıştır. Yapılan bu çalışmada koenzim Q10 proniozomlara yüklenmiş, in vitro ve in vivo deneyler sonucunda etkin maddenin biyoyararlanımının arttığı gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak proniozom formülasyonlarının biyoyararlanımı arttırmada etkili bir taşıyıcı olduğu çalışmamızda gösterilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Bulamaç yöntemi, koenzim Q10, proniozom, biyoyararlanım, farmakokinetik.

## ABSTRACT

‘Development of proniosomal formulations to improve the bioavailability of coenzyme Q10: In vitro and in vivo assessments’ Trakya University, Institute of Health Science, Pharmaceutical Nanotechnology Department, Master Thesis, Edirne, 2023.

Coenzyme Q10 is one of the most important antioxidants produced by the body. It also functions as an electron carrier and is generally administered orally, but can also be applied to the body transdermally, orally, and ocularly. Coenzyme Q10 interacts with oxygen-derived free radicals to prevent damage to biomolecules. Therefore, it serves as a potent antioxidant in the body, contributing to the renewal of other antioxidants, cell signaling, cell growth, and gene expression. Additionally, it plays a significant role in membrane stability, energy conversion, and ATP production. Due to its low solubility and low bioavailability, the use of coenzyme Q10 is limited.

As part of our thesis work, characterization studies were conducted on niosomal formulations obtained from proniosomes, and the identified formulas were subjected to in vivo pharmacokinetic studies. After the application of pure coenzyme Q10 and coenzyme Q10 - loaded proniosomes, blood samples were collected from rats at specified intervals over 24 hours, and the necessary measurements were performed. When pharmacokinetic parameters were examined, it was observed that the proniosome formulation exhibited effective bioavailability compared to the pure active substance. Quantitative determinations were carried out by developing an analytical method using the ICH reference in HPLC, and the validation of this method was performed. In this study, coenzyme Q10 was loaded into proniosomes, and because of in vitro and in vivo experiments, it was observed that the bioavailability of the active substance increased.

In conclusion, our study has demonstrated that proniosome formulations are effective carriers in increasing bioavailability.

**Keywords:** Slurry method, coenzyme Q10, proniosome, bioavailability, pharmacokinetics.

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Koenzim Q10, Alzheimer hastalığı, hipertansiyon, migren, romatoid artrit, parkinson, fibromiyalji, kalp hastalıkları gibi birçok hastalığın tedavisinde terapötik etkileri olan ve vücudumuzda elektron taşıyıcısı olarak da kullanılan endojen bir maddedir. Vücutta enerji üretim süreçlerinde yer almaktadır, oksijen kaynaklı serbest radikaller ile etkileşerek biyomoleküllerin zarara uğramasını önlemektedir. Bundan dolayı vücutta güçlü bir antioksidan olarak görev alarak diğer antioksidanların yenilenmesinde, hücre sinyalinde, hücre büyümesinde ve gen ekspresyonunda görev almaktadır. Koenzim Q10 hücre zarı stabilitesinde, enerji üretiminde ve canlı hücrede ATP sentezine destek olur. Bunların yanısıra koenzim Q10 düşük çözünürlük ve çözünme hızı ve bu sebeple düşük biyoyararlanım göstermektedir.

Proniozomlar, non-iyonik yüzey aktif maddeler içeren kuru serbest akan granüler yapıdaki poröz tozlardır. Kuru ve serbest akan bu tozlar kullanılmadan önce su ile hidrate edilir, niozomal yapılara dönüşerek kolloidal bir dispersiyon haline dönüşürler ve böylece etkin maddenin niozomal yapılara hapsedilerek etkin maddenin absorpsiyonunu kolaylaştırırlar. Proniozomal formülasyonlar, diğer geleneksel ilaç formülasyonlarına göre hedef hücre veya organa hedeflendirmede oldukça etkilidir. Bu formülasyonlar oral, parenteral, topikal, transdermal, oküler ya da enjeksiyonluk preparatlar şeklinde kullanılabilirler.

Koenzim Q10, düşük çözünürlüğünü ve biyoyararlılığını arttırmak amacıyla proniozomal formülasyonlara yüklenmiş, in vitro karakterizasyonları yapılmış ve in-vivo çalışmalar yürütülmüştür. Çalışmamızda koenzim Q10 yüklü proniozom formülasyonları bulamaç yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Proniozom formülasyonunda L-arginin, suda çözünür taşıyıcı materyal olarak kullanılmıştır. L-arginin (yarı esansiyel amino asit), nitrik oksit miktarını, endotel disfonksiyonunu ve hücresel alımı artırarak daha yüksek etkinlik elde etmek için formülasyonda kullanılmıştır. Koenzim Q10'un oral verilişteki bu problemlerini çözmek amacıyla dozaj formlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Veziküler Sistemler

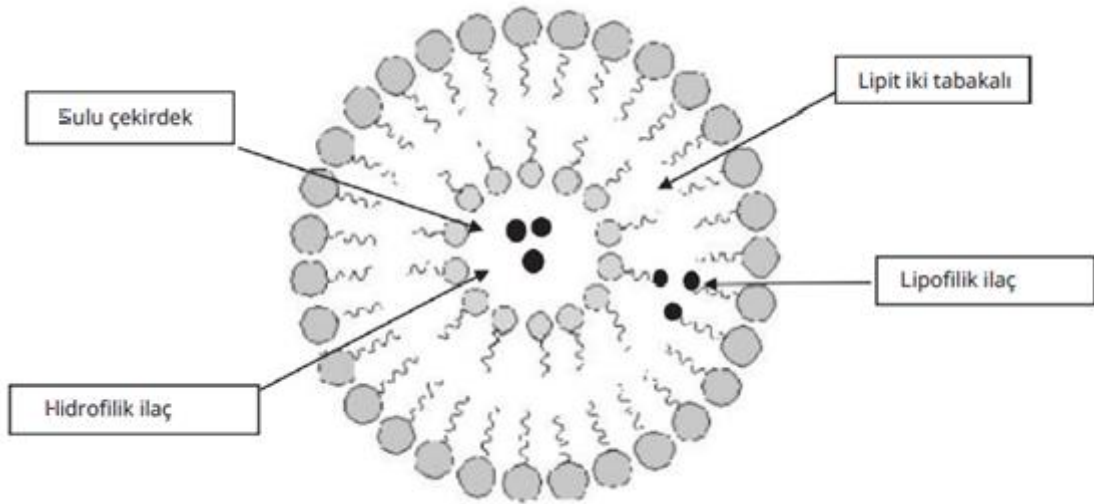
Terapötik etkili bileşikler günümüz teknolojisiyle hastalıklı organ veya hücelere çeşitli ilaç taşıma sistemleri ile hedeflenebilmektedir. İlaç taşıma sistemleri olarak lipozomlar, miseller nanoküreler, niozomlar, polimerik nanopartiküller gibi çeşitli sistemler geliştirilmiştir (1).

Veziküler sistemler, amfifilik yapı blokları su ile karşı karşıya kaldığında oluşan bir veya birkaç eş merkezli lipit çift tabakasının düzenlenmiş formlarıdır. Hem hidrofilik hem de hidrofobik fonksiyonel grupları vardır (Şekil 2.1.). Veziküller, çok çeşitli amfifilik yapı bloklarından oluşturulabilmektedir. Bu veziküllerin biyolojik kökeni ilk olarak 1965 yılında Bangham ve ark (1965) tarafından rapor edilmiş ve Bangham cisimcikleri adı verilmiştir. Bangham, hücre içi enfeksiyonların tedavisi için etkin maddenin hücelere sınırlı olarak nüfuz etmesi nedeniyle geleneksel dozaj formlarının etkili olmadığını, bunun ancak veziküler ilaç taşıma sistemlerinin kullanılmasıyla aşılabileceğini saptamıştır (2).

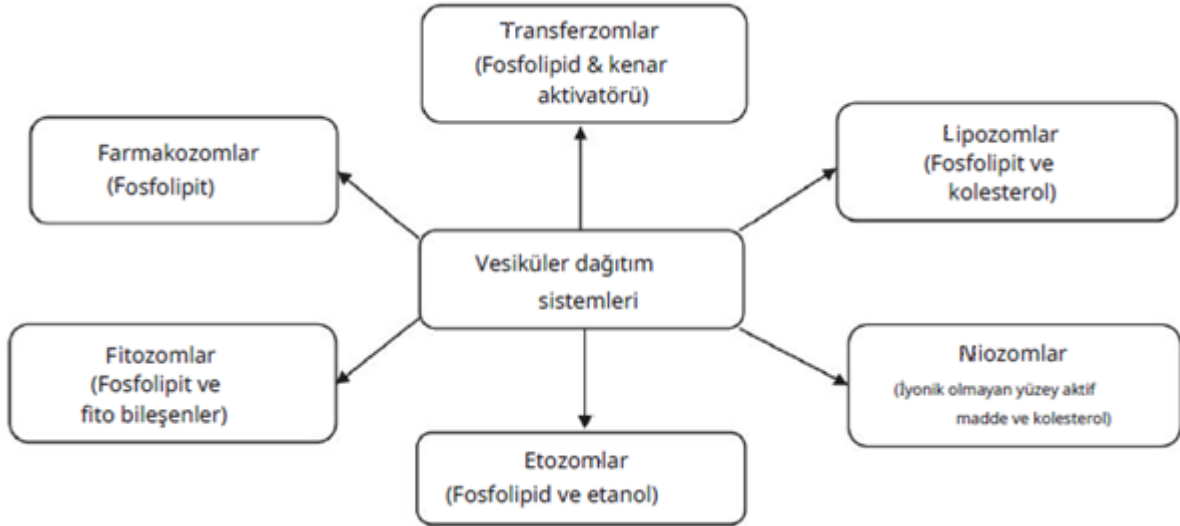
Lipozomlar, niozomlar, transferezomlar, farmakozomlar, proniozomlar ve prolipozomlar gibi nano boyuttaki veziküler sistemlerle etkin madde taşınabilmektedir (Şekil 2.2.). Lipozomların ve niozomların diğer geleneksel dozaj formlarına göre avantajları, etkin maddeyi hedef organa veya hücreye etkili iletilmesi ve dolayısıyla diğer dokulardaki toksik etkiyi azaltmasıdır. Veziküler formülasyonlardan niozomlar ve proniozomlar 1980'lerin başından itibaren geniş ilgi görmektedir. Proniozomlar, suda çözünür ve akışkan haldeki taşıyıcı toz partiküllerinin niozomal içerikle kaplanarak oluşturulan bir ön niozom formülasyonudur. Bunlar, sıcak sulu ortamda kısa süreli çalkalama üzerine bir niozomal dispersiyon oluştururlar. Ortaya çıkan niozomal yapı, yüksek ölçekte boyut tekdüzeliğine sahiptir. Proniozomal yaklaşım, stabiliteyi arttırarak depolama ve sterilizasyon sırasında meydana gelebilecek sorunları azaltmaktadır (3,4).

### Veziküler Sistemlerin Geleneksel Sistemlere Göre Avantajları (4)

- Daha tekdüze sonuçlar verir,
- Hedef bölgeye etkin madde iletimini kolaylaştırır,
- Toksisiteyi azaltır,
- Kolay depolama transfer, sterilizasyon ve ekonomik kolaylıkları vardır.
- Yüksek enkapsülasyon verimi,
- Kolay kullanım imkânı sağlamaktadır.



**Şekil 2.1. Lipofilik ve hidrofilik etkin maddelerin veziküler dağıtım sistemlerinde tutulması (4)**



**Şekil 2.2. Farklı veziküler sistemler ve bunların temel bileşenleri (4)**

### 2.1.1. Transferozomlar

Lipozomal ve niozomal sistemler transdermal kullanımda zayıf geçirgenlik, veziküllerin etkin madde sızıntısı ve füzyonu gibi problemler barındırmaktadır. Bu durumu önlemek amacıyla transferozom adı verilen nano yapıları taşıyıcılar üretilmiştir. Transferozomlar, 1992 yılında Cevc ve Blume tarafından üretilen oldukça elastik veziküllerdir. Veziküllerde bulunan fosfolipitler ve kenar aktivatörleri veziküllerin çift katmanlarını zayıflatarak yüzey gerilimlerini düşürür ve elastiklik sağlar (4,5).

### **2.1.2.Farmakazomlar**

Veziküler taşıma sistemlerin çoğu, optimal hazırlama yöntemlerinin olmaması, düşük yükleme verimliliği, stabilite sorunları ve kontrolsüz ilaç salımı gibi bazı faktörler sebebiyle sınırlandırılabilir. Bu problemleri aşabilmek amacıyla hidrofilik etkin madde molekülleri lipidik yapıları grupları ile kovalent bağlanarak kendiliğinden vezikül oluşturabilen formlara dönüştürülmektedir (4).

### **2.1.3.Fitozomlar**

Fitozomlar, fosfolipitlerin ve bitkisel etkin maddelerle kompleksleşmesiyle oluşturulurlar. Bitkisel etkin maddelerin hedef bölgeye kontrollü olarak ulaştırılması için geliştirilmiş nano yapılarıdır ve bu sayede daha iyi farmakokinetik ve farmakodinamik profiller göstermektedirler. Yapısal olarak etkin madde, lipozomların sulu çekirdeğinde veya lipit çift tabakasında tutulurken, fitozomlara bitkisel bileşenler fosfolipitlere kimyasal olarak bağlıdır. Bu nedenle çift tabakaya sıkıca bağlıdır (4,5).

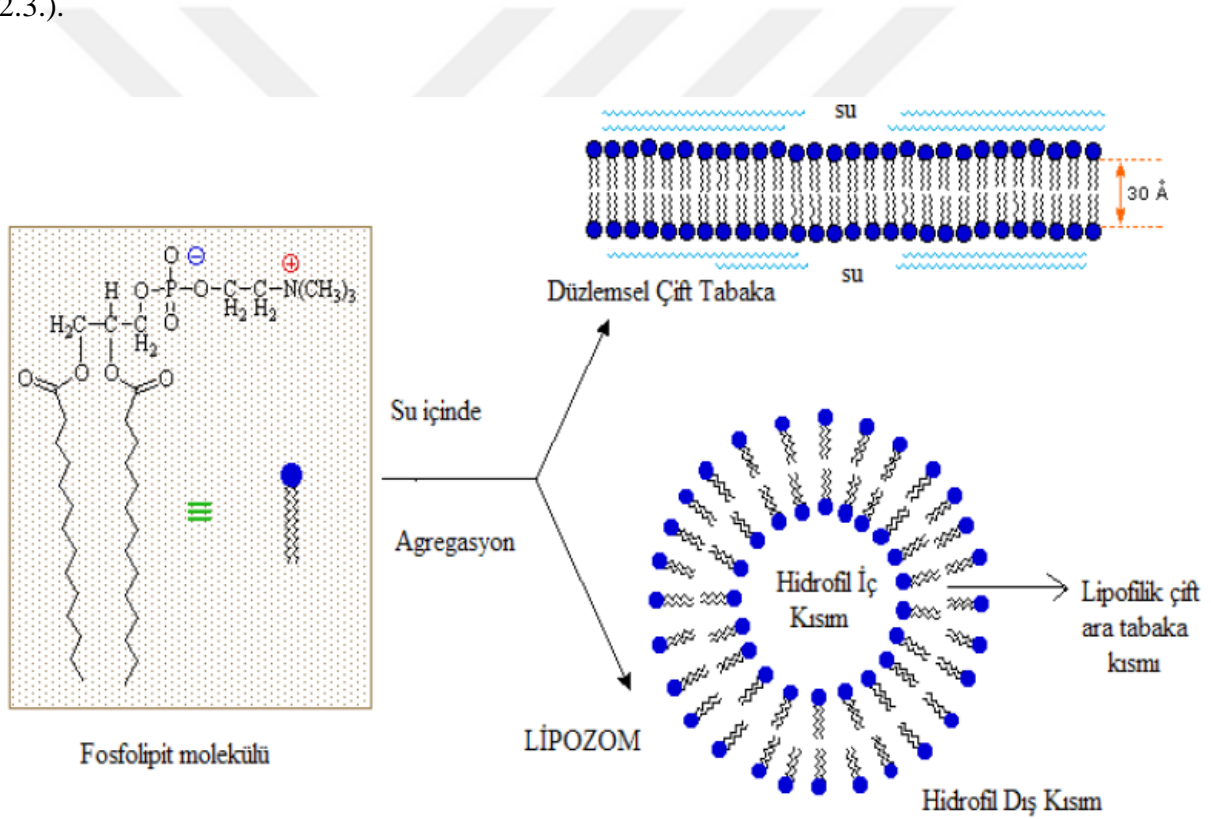
### **2.1.4.Etozomlar**

Etozomlar, fosfolipit, su ve yüksek konsantrasyonda (%45'e kadar) etanolden oluşan veziküllerdir. Touitou tarafından 2000 yılında üretilmiştir. Etanol, lipit zarındaki boşluklara nüfuz ederek zar esnekliğini arttıran bir geçirgenlik artırıcı görevi görür. Hem hidrofilik hem de lipofilik etkin maddelerin hücre içine taşınmasını sağlar. Alopesi, dermatit ve sedef hastalığı gibi çeşitli dermal hastalıkların tedavisi için çok sayıda ilacın dermal ve transdermal iletimi için etozomların kullanımı bildirilmektedir. Ayrıca etozomların perkütan yoluyla deriye nüfuz ettiği bildirilmektedir. Piyasada Noicellex, Lipoduction, Supravir, Celluight EF, Decorin, Skin Genuity ve Nanominox gibi bir dizi etozomal formülasyonlar bulunmaktadır. Etozomların modifikasyonu ile ikili etozomlar elde edilebilmektedir Bunlar tek bir etanol fazı yerine ikili alkol fazından (etanol ve propil alkol) oluşmaktadır. İkili etozomların, etozomlara kıyasla derinin daha derin katmanlarına nüfuz ettikleri için tekli etozomlardan daha kararlı olduğu rapor edilmiştir (4,6).

### **2.1.5.Lipozomlar**

Lipozomlar, Alec Bangham tarafından 1965 yılında 'lipit' ve 'soma' kelimeleri Yunanca'dan türetilmiştir. Lipozomlar, sulu bir hacmin tamamen fosfolipit ve kolesterol çift tabakasından oluştuğu küresel, veziküler mikro keseciklerdir (4). Bu zamana kadar birçok lipozomal

formülasyon geliştirilmiş olup bu formülasyonlar klinik olarak kullanılmaktadır. Bu yapılar, lipozomlar içinde hem hidrofilik hem de hidrofobik etkin maddelerin enkapsülasyonuna olanak tanır. Genel olarak doğal fosfolipitlerle hazırlanan bu lipozomal yapılar, enkapsüle ilaç etkin maddesinin terapötik etkinliğini artırarak toksisiteyi azaltan, yüksek düzeyde biyoyoumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen nano yapılardır. Topikal olarak kullanıldığında rezervuar olarak görev alır, aktif bileşenlerin sürekli olarak iletilmesini sağlar ve kapsüllenmiş etkin maddeyi oksidasyon, ışık ve hidroliz gibi dış faktörlerden korur (7). Vezikül büyüklükleri 10 ile 100 nm arasında değişebilenler tek tabakalı veziküller (SUV), vezikül büyüklüğü 100 ile 3000 nm arasında değişenler büyük tek tabakalı veziküller (LUV), şayet veziküller bir çift tabakadan daha fazla yapıdan oluşuyor ise çok tabakalı veziküller (MLV) olarak adlandırılırlar (Şekil 2.3.).



**Şekil 2.3. Lipozom molekülünün su içerisindeki yapısı (8)**

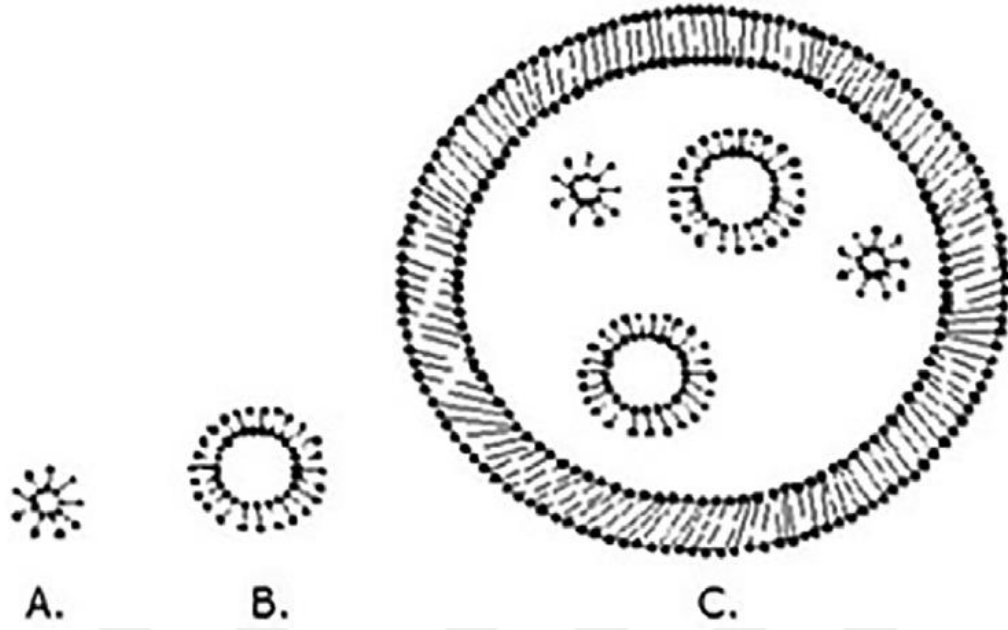
Doğada, fosfolipitler, hücre zarlarında bulunur. Bir hücrede, bu katmanların iki kutuplu kısmından polar olanları dışa ve içe bakarken polar olmayan kısımlar bu polar bölgeler arasında konumlanırken iç sulu ortam, sudan saklanarak hücre zarını oluşturur. Fosfolipitlerin zarı bozulduğunda kendiliğinden yeniden birleşirler (9). Lipozom yapısında fosfolipitlerin dışında fizikokimyasal özelliklerini geliştirmek, stabilitesini arttırmak, mikro viskozitesini arttırmak

için kolesterol, bunun yanında pozitif ve negatif yük veren maddeler, ayrıca lipozomlar oksidasyona çok yatkın moleküller oldukları için antioksidanlar da bulunmaktadır (10).

### **2.1.6.Niozomlar**

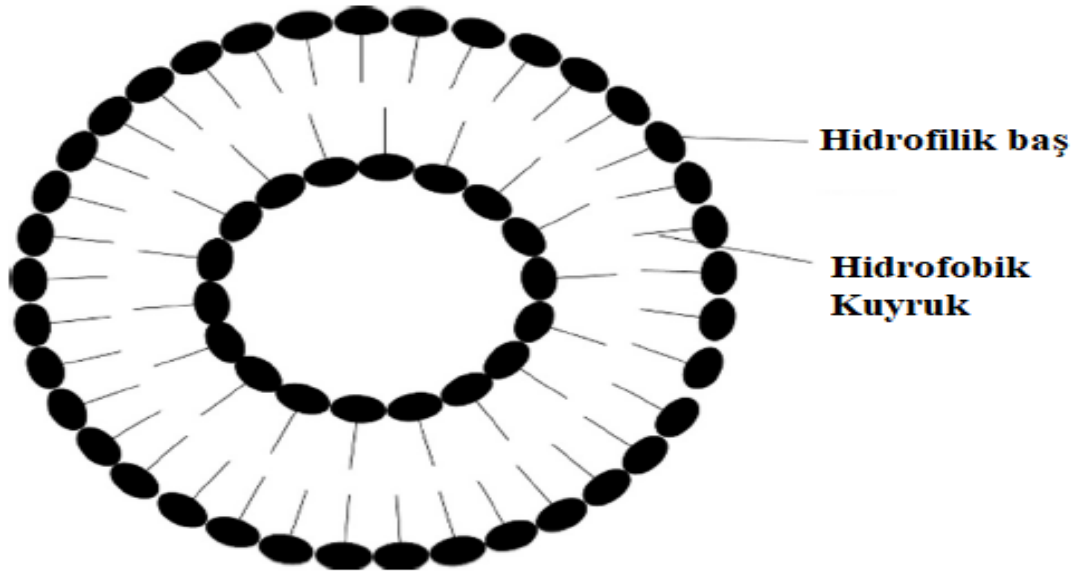
Niozomlar, biyolojik olarak parçalanabilen ve nispeten toksik olmayan iyonik olmayan yüzey aktif maddelerden oluşurlar. Lipozomlara stabil ve ucuz alternatifler olarak geliştirilmişlerdir. Farmasötik ve kozmetik endüstrisinde oldukça yeri büyüktür. Niozomal formülasyonlar, oral, parenteral, oküler, transdermal, vajinal ve inhalasyon yollarıyla uygulanmaya uygundur. Handjani-Vila 1979 yılında, niozomal yapıları kolesterol ve tek alkil zincirli noniyonik sürfaktan karışımının hidrasyonu üzerine çalışmalar yapıp, veziküler sistem oluşumunu bildiren ilk kişilerdendir. Niozomlar iyonik olmayan yüzey aktif madde kesecikleridir (11). İyonik yüzey aktif maddeler de vezikül oluşturmaktadır ancak çoğu iyonik ve toksik olduğu için genellikle farmasötik alanda kullanıma uygun değildirler. Niozomlar küresel nanoyapılardır ve mikroskobik lamelli (tek lamelli veya çok lamelli) yapılardan oluşur (Şekil 2.5.).

Çift katman, kolesterol ve bir yük indükleyici içeren veya içermeyen iyonik olmayan yüzey aktif maddelerden oluşur. Karbon zincirindeki alkil gruplarının, karbon zinciri uzunluğu 12 ile 18 arasında değişmektedir ( $C_{12}$ - $C_{18}$ ). Moleküller birden fazla alkil grubu içerebilirler (12,13). Değişken kombinasyonlarda ve farklı türde sürfaktanlar kullanılır. Hidrofilik uç dışa (sulu faza doğru) bakacak, hidrofobik uç ise içe bakacak şekilde yönelir (Şekil 2.4). Kolesterolün eklenmesi, çift tabakanın sertliğini koruyarak daha mukavemetli formülasyonlar oluşturmaktadır. Bu arada, yük vericiler veziküllere elektriksel yük sağlar ve stabiliteyi artırır. Anyonik yük vermek amacıyla disetil fosfat, diheksadesil fosfat ve lipoamino asit; katyonik yük vermek amacıyla stearilamin ve setil piridinyum klorür gibi maddeler formüle ilave edilerek formülün stabilitesi artırılır (13).



Şekil 2.4. Küçük tek tabakalı veziküller (0,025-0,05 mm) (A), Çok tabakalı veziküller (>0,05 mm) (B) ve Büyük tek tabakalı veziküller (0,10 mm) (C) (14)

Niozomlar, vezikül konfigürasyonu ve boyutlarına göre küçük unilamellar veziküller (0,025-0,05 mm), multilamellar veziküller (>0,05 mm) ve büyük unilamellar veziküller (0,10 mm) olmak üzere 3 sınıfa ayrılabilir (12,13).



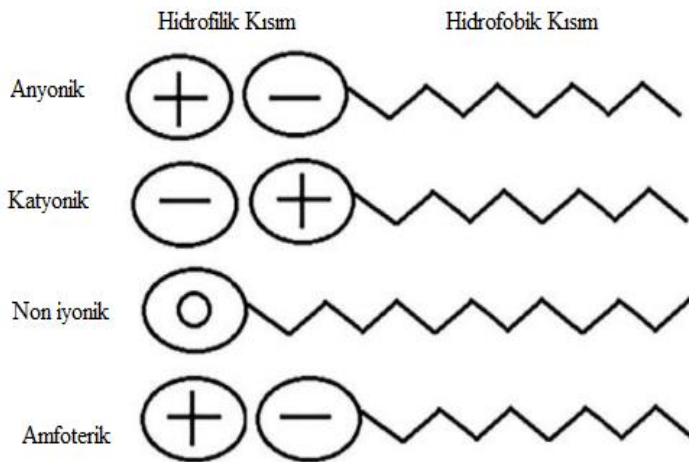
Şekil 2.5. Niozomun yapısı (12)

### Niozomların diğer ilaç taşıyıcı sistemlere göre bazı üstünlükleri:

- Niozomların oluşumunda kullanılan sürfaktanlar, lipozom formülasyonlarında kullanılan fosfolipit moleküllerine kıyasla daha kararlıdır.
- Niozomların büyük ölçekli üretimlerinde basit yöntemler kullanılır.
- Niozomların üretiminde kullanılan yardımcı maddeler ve ekipmanlar pahalı olmadığından niozom üretim süreci uygun maliyetlidir.
- Lipozomlar ve diğer ilaç taşıyıcı sistemlere göre daha fazla raf ömrüne sahiptir.
- Niozomlar; ısı, ışık gibi dış etmenlere maruz bırakıldığında lipozomlara göre daha stabil olduğu bulunmaktadır.
- Niozomların bileşenleri arasında yüzey aktif maddeler (genellikle noniyonik y.a.m.), kolesterol ve yük verici maddeler bulunur. Formülasyon bileşenleri formülün fizikokimyasal ve kimyasal özelliklerini belirler (13,14).

### Yüzey Aktif Madde Etkisi:

Yüzey aktif maddeler (sürfaktanlar), lipofilik bir kuyruk ve hidrofilik bir baş içeren amfifilik moleküllerdir. Hidrofilik baş gruplarına göre katyonik, anyonik, amfoterik ve noniyonik olmak üzere sınıflandırılırlar (Şekil 2.6.). Non-iyonik yüzey aktif maddeler, diğer yüzey aktif maddelerle kıyaslandığında yüksüz hidrofilik grupları nedeniyle düşük toksisiteleri ve biyouyumlulukları nedeniyle niozomların hazırlanmasında yaygın olarak kullanılır (14).



Şekil 2.6. Farklı yüzey aktif maddelerin molekül yapıları (14)

### **Niozom Oluşumunda Eklenen Yardımcı Maddeler:**

Niozom oluştururken ana bileşen yüzey aktif maddelerin yanında çeşitli yardımcı maddeler kullanılmakta olup bunların en yaygın kullanılanı kolesteroldür. Kolesterol, noniyonik yüzey aktif madde ile etkileşerek, yüzey aktif madde moleküllerinin hidroksil grupları ile alkil zinciri arasında bir hidrojen bağı oluşturur. Bu, niozomların geçiş sıcaklığını artırır ve böylece iki tabakalı zincirlerin akışkanlığını değiştirerek stabiliteyi iyileştirebilir. Kolesterol ayrıca membran stabilize edici etkisinden dolayı enkapsülasyonu arttırmakta ve sızıntıları önlemektedir (15).

Disetil fosfat (DCP) gibi negatif yüklü ve stearyl amin veya stearyl piridinyum klorür gibi pozitif yüklü maddeler, niozomlara eklenerek yük verirler ve elektrostatik itme ile niozomların stabilitesine destek olurlar. Genel olarak, bu yardımcı maddeler formülasyona düşük miktarda ilave edilir (16).

### **Kritik paketleme parametresi (CPP):**

Noniyonik yüzey aktif maddelerden oluşan niozomun vezikül oluşturması yüzey etkin maddenin HLB'sine, kimyasal yapısına ve kritik paketleme parametresi (CPP)'ne bağlıdır. CPP aşağıdaki şekilde ifade edilir:

$CPP = V a_0 / l_c$  burada V hidrofobik kuyruk grubun hacmidir,  $a_0$  hidrofilik baş grubunun alanıdır ve  $l_c$  kritik hidrofobik grubun uzunluğudur. Oluşturulan niozomun yapısının tipi CPP değeri ile belirlenir. 0,5'in altındaki bir CPP, küresel misellerin oluşumunu gösterirken, 0,5-1 arasındaki bir CPP, iki tabakalı misellerin oluşumunu gösterir. 1'den büyük bir CPP, ters misel oluşumunu gösterir (17,18).

$$CPP = \frac{V}{l_{cao}}$$

### **Hidrofilik lipofilik denge (HLB):**

HLB, sürfaktanların hidrofilikliği veya hidrofobikliği hakkında bilgi veren bir değerdir. HLB değeri büyüdükçe yüzey aktif maddelerin hidrofilitesi/suda çözünürlüğü artmaktadır. HLB değeri, niozomların büyüklüğünü ve maddelerin enkapsülasyonunu etkiler. HLB değeri 4-8 olan bir yüzey aktif maddenin niozom oluşturabileceği, HLB değeri 6 veya daha yüksek olan bir yüzey aktif maddenin niozom oluşturmak için kolesterol eklenmesini gerektirdiği bildirilmiştir. Bu aralığın dışında HLB içeren sürfaktanlar niozom oluşturamazlar (19,20).

### **Jel sıvı geçiş sıcaklığı ( $T_c$ ):**

Sümfaktan maddelerin jel-sıvı geçiş sıcaklığı ( $T_c$ ), niozomların oluşumu için önemli bir parametredir ve , membranın akışkanlığı, enkapsülasyon ve stabilizeyi etkiler.  $T_c$ , alkil zincir uzunluğu ile ilişkilidir. Daha kısa alkil zincirleri, "sızdıran" niozomların oluşumuna neden olurken bu maddeler daha düşük bir  $T_c$ 'ye sahiptir. Daha yüksek  $T_c$ 'ye sahip yüzey aktif maddelerin, daha düşük faz geçiş sıcaklıklarına sahip yüzey aktif maddelere kıyasla lipid çift tabakadan sızıntıyı azaltan düzenli jel formunda olma olasılığı daha yüksektir.  $T_c$ , alkil zincirinin doymamışlık derecesine bağlıdır (21).

Alkil zincir doymamış olması,  $T_c$ 'yi düşürür; zincir akışkanlığını ve membran geçirgenliğini artırmaktadır. Çalışmalar, düşük  $T_c$ 'li yüzey aktif maddelerden oluşan niozomların, yüksek  $T_c$ 'li yüzey aktif maddeden oluşan niozomlara göre daha esnek olduğunu göstermiştir. Hidrasyon ortamının sıcaklığı yüzey aktif maddenin  $T_c$ 'sinden daha yüksek olmalıdır (22,23).

### **2.1.7.Özel Niozom Türleri**

#### **Proniozomlar**

Proniozomlar, suda çözünür bir taşıyıcı üzerine ince bir noniyonik yüzey aktif madde filminin kaplanmasıyla elde edilen bir ön niozom formudur. Su ile temasta hidrate olarak niozomları oluşturur. Proniozomları hazırlamada kullanılan taşıyıcıların, hidrasyona izin vermek için toksik olmayan, güvenli, serbest akışlı ve suda yüksek oranda çözünür olmaları gerekir. Proniozom hazırlanmasında maltodekstrin, glikoz monohidrat, laktoz monohidrat, mannitol, sukroz stearat ve sorbitol gibi maddeler kullanılmaktadır. Proniozomlar kuru toz halinde olduğundan geleneksel niozomlara göre daha iyi stabilize, daha az agregat oluşumu olasılığı ve daha az etkin madde sızıntısı gibi çeşitli avantajlara sahiptir (24,25).

#### **Elastik Niozomlar**

Elastik niozomlar, etozoma benzeyen, boyutlarından daha küçük gözeneklerden yapılarını bozmadan geçebilen esnek niozomlardır. Bu veziküllerin bileşenleri sümfaktanlar, kolesterol, su ve etanoldür. Küçük gözeneklerden geçebilmeleri ve bu nedenle cilt bariyerinden penetrasyonu iyileştirmeleri nedeniyle topikal veya transdermal ilaç taşınmasında yaygın olarak kullanılırlar. Manosroi ve arkadaşları, diklofenak dietilamonyumun transdermal iletimi için elastik

niozomlar hazırlayarak elastiklik indeksinin geleneksel niozomlardan yaklaşık 14 kat daha yüksek olduğunu bulmuştur. Yine başka bir çalışmada sodyum kolat ilavesiyle hazırlanan papain yüklü elastik niozomlar, yara tedavisi için umut verici bulmuştur (26,27).

#### **Diskomlar:**

Diskomlar, büyük disk benzeri niozomlardır. Uchegbu ve arkadaşları tarafından yapılan önceki bir çalışmada, mekanik çalkalama, karıştırma ve sonike etme yoluyla disetil fosfat heksadesil, kolesterol ve digliserol eter kullanılarak diskomlar hazırlanmıştır. Çalışmada, diskomların boyutunun büyük 11-60 µm civarında büyük bulunmuş ve sonikasyondan sonra da boyutu artmıştır (28,29).

#### **Bola niozomları:**

Birbirine bağlı bir veya iki lipofilik grubun iki hidrofilik başlarının olduğu yapılar bola yüzey aktif maddeleri olarak isimlendirilir. Bola niozomları, bola yüzey aktif maddelerden oluşturulur. Paolino (2008), bola yüzey aktif maddelerinin, klasik yüzey aktif maddelere göre çok daha yüksek yüzey gerilimleri ve daha düşük kritik misel konsantrasyonlarının olduğunu ve daha stabil olduklarını göstermiştir (30).

#### **Transferozomlar:**

Transferozomlar, tıpkı lipozomlar gibi, lipit tabakalarından oluşan nano veziküllerdir. Bu veziküller, hücre içi veya hücreler arası ilaç taşıma için uygun araçlar olarak kullanılabilirler. Lipit çift tabaka esnekliğini ve geçirgenliğini artırmak için kenar aktivatörleri (edge activator) eklenir. Kenar aktivatörleri genellikle, lipit çift tabakasının akışkanlığını ve elastikiyetini artıran, noniyonik tek zincirli yüzey aktif maddelerden oluşur. Hem düşük hem de yüksek molekül ağırlıklı etkin maddeler için taşıyıcı görevi görebilirler (31).

#### **Aspazomlar:**

Çift tabakalı lipit olarak askorbil palmitat, kolesterol, ve yük vericilerle oluşturulan niozomlardır. Aspazomlar, ince film hidrasyonu ile üretilir. Aspazomların etkin maddelerin transdermal uygulamalarında cilt bariyerini geçebildiği ve transdermal penetrasyonu artırabildiği bulunmuştur (32).

### Niozomların Karakterizasyonu:

Niozomal yapılar üretildikten sonra oluşturulan yapının uygunluğunu tayin edebilmek için bazı test yöntemlerinin uygulanması gerekir. Bu yöntemler (Tablo 2.1.' de) yer almaktadır.

**Tablo 2.1. Niozomların karakterizasyonunda kullanılan teknikler (32)**

Parametreler	Uygulanan Teknikler
Partikül boyutu ve dağılımı	Dinamik ışık saçılımı (DLS), Taramalı elektron mikroskobu (SEM), Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)
Morfoloji	Atomik kuvvet mikroskobu (AFM), Taramalı elektron mikroskobu (SEM), Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)
Zeta potansiyeli	Dinamik ışık saçılımı, Lazer doppler anemometrisi
Vezikül kararlılığı	Dinamik ışık saçılımı, Mikroskobik teknikler
Enkapsülasyon etkinliği	UV-spektrometre, Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
In vitro salımı	Diyaliz, Franz difüzyon hücreleri

Niozomların stabilitelelerini tespit edebilmek için ilk olarak niozomların yapılarında bulunan ilaç etkin maddelerinin yapısal olarak özellikleri incelenmelidir. İlaç etkin maddesinin polimorfizm yapısına sahip olması, nem tutucu potansiyelinin var olması ya da olmaması durumu, ortamın pH'ından etkilenme durumu, polaritesi, sıcaktan ve ışıktan etkilenip etkilenmediği, vb. özelliklerinin bilinmesi gerekmektedir. Ayrıca bir diğer önem teşkil eden husus ilaç etkin maddesinin niozomların yapılarında bulunan kolesterol, sürfaktan madde ve yük verici maddeler ile etkileşip etkileşmediğidir. Niozomların stabiliteleleri incelenirken veziküllerin büyüklüğü, zeta potansiyeli, etkin madde yükleme etkinliği ve polidispersite indeksi incelenmelidir. Bunun yanında niozomların fiziksel ve kimyasal stabilitelelerinin yanında biyolojik olarak kararlılıkları da önemlidir (33,34). Veziküller, van der Waals kuvvetleri, elektrostatik etkileşimler, entropik itme kuvvetleri, kısa etkili itici kuvvetler ile stabilize edilir.

Niozomların stabilitesini etkileyen faktörler şunlardır (14,33):

- Sürfaktan türü;
- Etkin maddenin yapısı;
- Depolama sıcaklığı;

- Yüklü bir molekülün bulunması.

Niozomların toksisitesi birçok araştırmacı tarafından incelenmektedir. Ester tipi sürfaktanların eter tipi diğer sürfaktanlara kıyasla toksisitesinin daha az olduğu belirlenmiştir. Bu durumun nedeni ester bağlarının enzimatik bozulması olarak açıklanabilir. Bazı durumlarda, etkin maddenin niozomlar tarafından enkapsülasyonu toksisiteyi azaltmaktadır. S-180 sarkoma ve Ehrlich asit fare modellerinde vinkristin niozomları ile intravenöz uygulamasını takiben nörolojik toksisite, diyare ve alopesi azaltılmış ve anti-tümör aktivite artırılmıştır (35,36).

## 2.2. Proveziküler Sistemler

Veziküler sistemlerin (niozom ve lipozom) agregasyon, hidroliz, sedimentasyon, oksidasyon kaynaklı veya depolama sırasında füzyona dayalı fiziksel ve kimyasal stabilite problemleri vardır. Proveziküler sistemler, veziküler sistemlerin bu olumsuz özelliklerine karşı geliştirilmiş taşıyıcı sistemlerdir. Genel olarak kimyasal özellikleri birbirlerine benzemektedir. Proveziküler sistemlerin fiziksel stabilitesi ve molekül kararlılığı, depolama kolaylığı, uzun raf ömrü, kolay sterilite edilebilme gibi özellikleri veziküler sistemlere göre proveziküler sistemleri üstün kılmaktadır.

Proveziküler taşıyıcılar, veziküler sistemlerin dehidrate şeklidir ve su ile kolaylıkla hidrate edilerek veziküler sistemi oluşturular. Prolipozomlar ve proniozomlar en çok kullanılan proveziküler sistemlerdendir. Proniozomlar ve prolipozomlar yapılarında kolesterol, fosfolipit ve çeşitli yüzey etkin maddeler içerirler. Su ile hidrasyonunda kolay bir şekilde niozomlara veya lipozomlara dönüşürler. Formülasyon olarak; akışkan kuru toz ya da jel formda bulunurlar. Kimyasal yapıları birbirlerine çok benzeyen bu sistemler arasındaki fark fosfolipidler yerine iyonik olmayan yüzey etkin maddeleri yapılarında bulundurmalarıdır. Kuru toz şeklindeki bu formülasyonlarda taşıyıcının hidrofilik yapıda olan yüzey etkin madde ile kaplanması gerekir. Kaplanan toz formülasyonlar camsı geçiş sıcaklığından fazla bir sıcaklıktaki su eklenip çalkalanıp hidrate edildikten sonra niozomal yapıdaki veziküllere dönüşür (37-39). Proniozom formülasyonunun niozomlara dönüştürülmesi iki yolla gerçekleştirilebilir.

**Cilt tarafından hidrasyon:** Cilt tarafından hidrasyon yönteminde cildin kendisi tarafından sağlanır, yani derideki su proniozom formülasyonunu oluşturmak ve niozomlara dönüştürmek için kullanılır.

**Çözücülerle Hidratasyon:** Çözücülerle hidratasyon yönteminde hidrasyon sulu sistemler ile sağlanmakta olup ajitasyon ve sonikasyon ile proniozomları niozomlara dönüştürmek için kullanılır (38,39).

**Proveziküler sistemin, veziküler sistemlere göre avantajları şunlardır (37,39);**

1. Raf ömrünü sınırlayan, fiziksel ve kimyasal stabilite problemlerden kaçınmak,
2. Sterilizasyon, depolama ve taşıma kolaylığı,
3. Doz tekdüzeliği,
4. Biyoyararlanımı ve minimum yan etkileri iyileştirir,
5. Kontrollü, hedefli ve sürekli salım gösterir
6. Hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaç etkin maddeleri tutabilir,
7. Biyolojik olarak uyumlu olup vücutta parçalanabilir.
8. İlacının boyutu, şekli, boyutu ve bileşimi gerektiğinde kontrol edilebilir.
9. Depolama esnasında meydana gelen füzyon, agregasyon, sedimantasyon ve sızıntı gibi fiziksel stabilite problemlerini önler.

### **2.2.1. Prolipozomlar**

Lipozomlar, Bangham ve arkadaşları tarafından 1965 yılında keşfedilmiştir. İlaç etkin maddelerinin terapötik etkilerini artırmak, olumsuz yan etkilerini azaltmak ve kimyasal olarak yapılarının bozunmadan korumasını sağlamak, fiziksel ve kimyasal stabilitelelerini artırmayı amaçlamışlardır. Lipozomal formülasyonlarda, fizikokimyasal stabilite problemleri, füzyon ve agregasyon sonucu oluşan partikül büyüklüğündeki değişim, ilaç etkin maddesinin veziküllerin dışına sızma gibi stabilite problemleri görülmektedir. Bu problemler lipozomların parçalanmasını hızlandırır, in-vivo davranışı, saklama koşullarını ve ilaç salım özelliklerini değiştirirler. Bu sebepten dolayı lipozomal formülasyonlar için özel saklama koşulları gerekmektedir (40).

Prolipozomal formülasyonlar, lipozomların stabilite kaynaklı sorunlarını gidermek için geliştirilen yeni nesil ilaç taşıyıcı sistemlerdendir. Prolipozomlar Nicholas Payne ve arkadaşları tarafından 1986 yılında geliştirilmiştir. Bu yapı, etkin madde, çeşitli fosfolipitler ve suda çözünebilir taşıyıcıdan oluşan, su veya nem ile teması halinde lipozomlara kolaylıkla dönüşebilen, kuru ve toz yapıda iyi akış özelliklerine sahip çok tabakalı granüler ürünlerdir (41). Prolipozomların kuru ve toz yapıda olmaları saklama, transfer, stabilitesini korumada kolaylık sağlamaktadır. Prolipozomların stabiliteleleri, lipozomların stabilitelelerine göre üstünlük

gösterirler ve sterilizasyonunun büyük ölçekli üretimde sağlanması kolaydır. Prolipozomların üretimi, lipozomların üretimine göre daha basit ve tekrarlanabilir üretim imkânı sağlar.

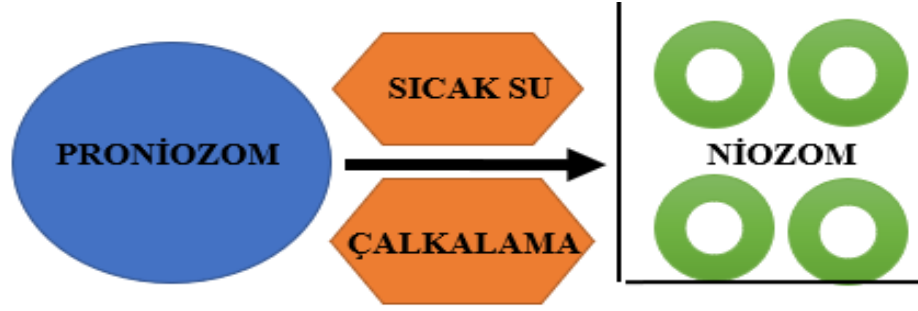
Prolipozomlar başlıca avantajları aşağıda belirtildiği gibidir (40,42-44);

- Çözünürlüğü az olan etkin maddelerin çözünürlüğünü ve biyoyararlanımlarını arttırmaları,
- Hidrofilik ve lipofilik maddeler enkapsüle edilebilir,
- Kontrollü etkin madde salımı ve etkin maddelerin hedef dokulara taşımak için kullanılabilirler,
- Lipozomlara kıyasla stabilizasyonu yüksektir,
- Oral yoldan etkin maddenin emilimini artırır,
- Sindirim sisteminde etkin maddenin parçalanmasına karşı korurlar,
- Prolipozomal formülasyonlar, etkin maddenin farmakodinamik ve farmakokinetik özelliklerini iyileştirip değiştirebilirler,
- Etkin maddenin toksik etkisini azaltır,
- Biyolojik olarak parçalanabilirler,
- Üretimleri ucuz ve kolay olarak yapılabilir.

### **2.2.2. Proniozomlar**

Niozomal ilaç taşıyıcı formülasyonların taşınma, stabilizasyon, etkin madde sızması, degradasyon, oksidasyon, hidroliz agregasyon, çökme gibi olumsuz yönlerinin giderilmesi açısından kimyasal etkilerine müdahalede bulunulmaksızın proniozomal formülasyonlar geliştirilmiştir. Proniozomlar, niozomal formülasyonların dehidrate şeklidir.

Kuru akışkan bir toz şeklinde bulunan farmasötik proniozomal formülasyonlar taşıma, dağıtım, saklama, depolama durumlarında büyük bir avantaj sağlamaktadır. Proniozomal formülasyonlar; gerektiği kadar alınıp ılık suda birkaç dakikalık çalkalanma ile hızlı ve kolay bir şekilde niozom dispersiyonuna dönüşebilen yüzey etkin madde ile kaplı ve dehidrate edilebilen yeni nesil kuru toz formülasyonlardır (Şekil 2.2.). Proniozomların üretim teknikleri basit ve büyük ölçekte üretilebilirler. Proniozomlar, transdermal, oküler, oral ve enjeksiyonluk preparatlar şeklinde uygulanabilir (45,46).



**Şekil 2.2. Proniozomdan niozom oluşum şeması**

Proniozomların üretiminde kullanılan noniyonik sürfaktan maddeler, kolesterol, yük verici maddeler proniozom formülasyonların yapılarını oluştururlar( Tablo 2.3.). Kuru toz ve granül yapıdaki proniozomal formülasyonların niozomal formülasyonlardan tek farkı yapılarında taşıyıcı madde içermesidir (45).

**Tablo 2.3. Proniozomların yapılarında bulunan maddeler (45-47)**

Proniozomların Yapılarında Bulunan Maddeler	
Taşıyıcı maddeler	Arjinin, Glukoz, Maltodekstrin, Sorbitol, Sükroz stearat, Laktoz monohidrat
Yüzey yükü sağlayan maddeler	Disetil fosfat, Stearilamin
Membran stabilize ediciler	Kolesterol, Lesitin
İyonik olmayan yüzey aktif maddeler	Span (20, 40, 60, 80, 85), Tween (20, 60, 80)
Çözücüler	Etanol, Metanol, Propanol, İzopropanol

İyi bir taşıyıcı madde; güvenli, toksik olmamalıdır, suda iyi çözünmelidir, organik çözücüde çözünmemeli veya çok az çözünmelidir, akışkan olmalıdır, Hausner indeksi küçük olmalıdır, şekli küresel olmalıdır (45). Proniozomlar fiziksel olarak kuru granüler ve sıvı kristal jel formunda olmak üzere iki formda bulunurlar.

**Kuru granüler tipteki proniozomlar:**

Suda çözünebilir bir taşıyıcının üzerine film tabakası şeklinde kaplanmasıyla elde edilir. Kaplamada önceden organik solvan içerisinde çözündürülmüş ipit ve yüzey etkin maddenin eklenmesiyle üretilen serbest akan, kuru granüler şeklindedir. Bu form özellikle kapsül boncuk ve tablet haline dönüştürülebildikleri için hiçbir şekilde sıvı ile temas olmadan saklanabilirler (48).

### **Sıvı kristal jel proniozomlar:**

Proniozom oluşturmak için eklenen sürfaktan madde moleküllerinin su ile teması halinde sürfaktan maddenin lipofilik zincirlerinin “liyotrofik sıvı kristal durumu” denen düzensiz ve sıvı duruma gelmesi sıvı kristal jel durumunu ortaya çıkarır. Bu faz su varlığında birbirlerinin üzerine gelen tabakalar şeklindedirler. Bu formu elde etmek üç yolla mümkündür (49):

- Kritik sıcaklığı (T<sub>c</sub>) sıcaklığı artırmak,
- Yağları çözebilen çözücünün varlığı,
- Sıcaklık ve çözücü parametrelerini aynı anda uygulamak.

Sıvı kristal jel proniozomlar; penetrasyon artırıcı özellikleri, membran özelliklerinin stabilitesi, yüksek etkin madde yükleme etkinliği, stabilite, ölçek büyütmedeki kolaylık ve matris içinde disperse edilmelerine gerek duyulmaması, farmasötik olarak toksik olmayan maddelerin kullanılması, doğrudan transdermal olarak kullanılabilir olması sıvı kristal jel proniozomların avantajlı özellikleri arasındadır (49).

### **2.2.3. Proniozom Oluşturma Yöntemleri**

Kuru toz proniozom formülasyonlarının hazırlanması iki ayrı yöntemle hazırlanabilir. Bunların birincisi bulamaç yöntemi diğeri ise sprey kaplama yöntemidir. Jel olarak hazırlanan formülasyonlar için koaservasyon yöntemi kullanılır.

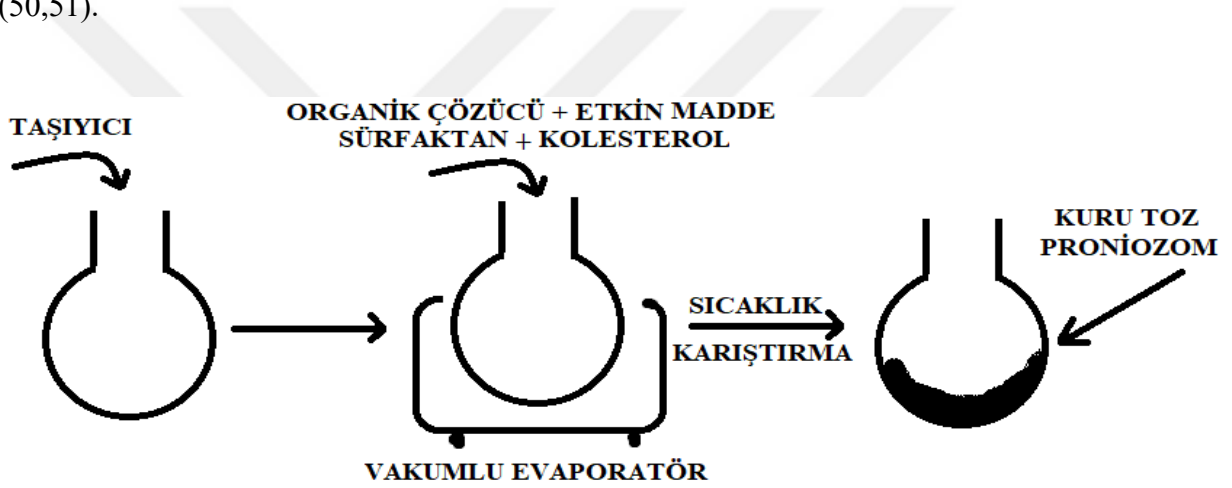
#### **Bulamaç Yöntemi:**

Bulamaç yöntemi, taşıyıcı olarak kullanılan maltodekstrin bazlı proniozomların üretimi için kullanılan geliştirilen yöntemdir. Bu yöntemde, taşıyıcı olarak kullanılmak istenilen madde yuvarlak bir balona konularak başka bir kapta çözüldürülüp karıştırılmış etkin madde, organik solvent, yüzey yükü verici madde ve yüzey etkin madde çözeltisi hazırlanır.

Organik çözelti karışımı balon içerisindeki taşıyıcı maddeye dökülerek karışması ve bulamaç oluşması sağlanır. Bu karışma işlemi vakum altında balon içerisindeki organik solvent buharlaşana kadar ve kuru akışkan bir toz elde edene kadar devam edilir. Sonuç olarak elde edilen akışkan kuru toz proniozom formülasyonunu temsil etmektedir (Şekil 2.4.). Bazı solventler kolay olarak uçmayıp uzun süre vakum altında karıştırılması gerekebilmektedir. Elde edilen proniozom formülasyonları hava ve nem almayan uygun saklama kaplarına konularak muhafaza edilir (50,51).

**Bulamaç yöntemin avantajları:** Suda çözünebilir taşıyıcı maddeler kolaylıkla kaplanabilmektedir, taşıyıcıların yüzeyi iyi bir şekilde kaplanabildiği için okside ve hidroliz gibi durumlardan etkilenmez, taşıyıcı materyal tekdüze kaplanabildiği için yüzey alanı büyük olan moleküller daha ince kaplanabilmektedir, büyük ölçekli üretim imkânı sağlamaktadır (50,51).

**Bulamaç yöntemin dezavantajları:** Bulamaç yönteminde üretim metoduna göre zaman gerektirebilir ve özel ekipmanlara (vakum, azot gazı gibi) ihtiyaç duyulabilir, üretilen proniozomal formülasyonda az da olsa solvent kalabilir. Bunun için ekstra vakum veya özel yöntemler kullanılabilir, bu yöntem küçük dozlu ölçeklerde üretilmesi uzun zaman alabilir (50,51).



Şekil 2.4. Bulamaç yöntemiyle proniozom oluşum şeması

#### **Sprey Kaplama Yöntemi:**

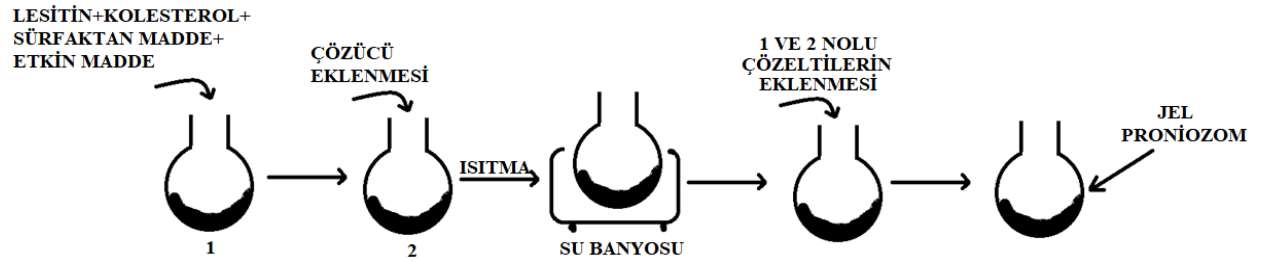
Sprey kaplama yönteminde organik çözücünün içerisine eklenen yüzey aktif madde, kolesterol, etkin madde ve yük verici madde çözülerek çözelti oluşturulur. Daha sonra belli sıcaklıkta bulunan sisteme çözelti spreyci şeklinde taşıyıcıya püskürtülür ve kaplanması sağlanır. Bu işlem yavaş ve porsiyonlar şeklinde yapılmalı, taşıyıcı tamamen ıslanmamalıdır. Bu işlem yüzey aktif maddenin taşıyıcıyı kaplayana kadar devam edilir. Taşıyıcı üzerine uygulanan kaplama işlemi çok ince yapıdadır. Evaporatörde vakum altında devam edilen bu işlem devam edilerek içerisindeki solvent buharlaşıp kuru akışkan toz proniozom elde edilene kadar devam edilmelidir. Bu yöntem genellikle hidrofobik yapıdaki etkin maddelerin ya da hidroliz sorunu olan etkin maddelerin formülasyonu için önerilmektedir. Ayrıca bu yöntem, sorbitolün, sürfaktan madde kaynağı olarak kullanılan organik solventler içinde çözünmesi sebebiyle sorun oluşturduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (50,51).

**Yöntemin avantajları:** Hidrofobik yapıdaki hidroliz ve stabilite sorunu olan etkin maddelerin formülasyonu için kullanışlı bir yöntemdir (51,52).

**Yöntemin dezavantajları:** Yüzey aktif madde, etkin madde, kolesterol ve yüzey yükü verici maddelerin bir arada oldukları çözelti sorbitol üzerine çok hızlı püskürtülürse sorbitol moleküllerinin yapıları bozulup bulamaç haline gelir, taşıyıcı olarak kullanılan sorbitolün etkin maddeye girişim yaptığı rapor edilmiştir (51,52).

### **Faz Ayrışması (Koaservasyon) Yöntemi:**

Bu yöntem, Vora ve ark. tarafından 1998 yılında jel form oluşturmak için geliştirilmiştir. Cam bir balona alınan yüzey aktif madde, etkin madde ve lipit, üzerine eklenen alkol ile karıştırılır. Tüm bileşenler çözününceye kadar cam baget ile karıştırılarak rotavapor da belli sıcaklıkta homojenizasyonu sağlanır. Bu sisteme sıcak su veya gliserol çözeltisi eklenerek berrak ya da yarı saydam bir form oluşuncaya kadar ısıtılır. Bu çözelti soğutularak proniozomal jel şekline dönüşür (Şekil 2.5.). Bu yöntemin üretimi basittir ve çok fazla zaman gerektirmez, özel bir ekipmana ihtiyaç duyulmayıp küçük miktarlar için ya da düşük dozlu formülasyonları için üretimi uygundur (53,54).



**Şekil 2.5. Koaservasyon yöntemiyle proniozom oluşum şeması**

### **2.2.4. Proniozom Bileşenleri ve Etkileri**

Proniozom formülasyonu üretebilmek için kullanılan taşıyıcı toksik olmayan, organik çözücüde çözünmeyen, suda kolay hidrate olabilen, toz olarak iyi akışkanlık sağlayabilir olmalıdır.

**Yüzey Aktif Madde:**

İyonik olmayan yüzey aktif maddeler, fonksiyonel grup olarak (anyonik, katyonik, amfoterik) kıyaslandığı zaman, toksisite açısından en zararsız yüzey aktif madde grubu noniyonik yüzey aktif maddelerdir.

Noniyonik sürfaktanlar, hidrasyonları sonucunda çift tabakalı nano boyutta yapılar oluştururlar. Noniyonik yüzey aktif maddelerden genel olarak Span gruplarında etkin madde tutulma oranı yüksektir çünkü en yüksek faz değişim sıcaklığına sahiptirler. Tween gruplarının etkin madde tutma oranı Span gruplarıyla kıyaslandığında daha düşüktür. Çünkü Tween grupları daha az lipofiliktirler. Ayrıca sistemin sıcaklığı, yüzey aktif madde moleküllerinin şeklini etkilemektedir. Yüzey etkin maddeler molekül yapılarında polar ve apolar kısımlar bulundurulur. Çift tabakalı yapıların oluşumu ise yüzey etkin maddelerin HLB değerlerine bağlıdır. HLB değeri 4 ve 8 arası olanlar için vezikül oluşum potansiyeli oluşturur. HLB sayısı 14-16 arasında olanlar proniozom oluşturamazlar, 8-6 arasında olan yüzey etkin maddeler için ise etkin maddenin tutum etkinliği azdır, 6'dan küçük olan HLB değerleri için ise çift katmanlı yapı oluşturabilmek için kolesterol eklenmelidir (53,54).

**Membran Stabilize Ediciler:**

Membran stabilitesini korumada genel olarak eklenen lipit yapıdaki stabilize ediciler kolesterol ve lesitindir. Bunların haricinde (Tablo 2.3'te) belirtilen lipit yapıdaki maddeler proniozom yapısına eklenebilir. Lesitin suda düşük çözünürlüğe sahip olması sebebiyle proniozomların yapısına eklenmesiyle permeasyon artırıcı olarak görev almaktadır, etkin madde sızıntısını önleyerek enkapsülasyon etkinliğini arttırmaktadır (17,55).

**Yüzey Yükü Veren Maddeler:** Proniozomların membran yapılarını ve stabil kalmasını sağlamak için yüzey yükü veren maddeler eklenmelidir. Bunlardan bazıları negatif yük verici olarak kullanılan disetil fosfat (DSP) ve fosfatidik asit, stearilamin (STR) ve setilpridinyum klorür pozitif yük verici madde kullanılır. Ayrıca yüzey yükü veren maddeler sadece membran stabilizasyonunda değil topaklanma önleyici olarak da görev alırlar. Bu maddeler formülasyona çok küçük oranlarda katılır. Şayet oran artarsa enkapsülasyon oranı düşer (17).

**Kullanılan Çözücüler:**

Proniozom oluşturmada çözücü seçimi önemli derecede etkilidir. Toksisitesi düşük olmalıdır, kolay bir şekilde üretim esnasından uzaklaştırılabilir olmalıdır. Formülasyonun uygulanış

yoluna göre partikül büyüklüğü önemli ölçüde değişmektedir. Çözücümüz alkol ise transdermal uygulamada epitel dokudan geçişi değişik büyüklüğe sahip olan alkollerin geçişleri etanol>propanol>bütanol>izopropanol şeklindedir. Etanol kullanılarak oluşturulan formülasyonların veziküler büyüklükleri, etanolün polaritesi nedeniyle izopropanole göre daha büyüktür (50).

#### **Etkin Madde:**

Formülasyonda kullanılan etkin maddenin amfifilik, hidrofilik ve hidrofobik olup olmaması önem arz etmektedir. Etkin madde hidrofobik ise vezikülden sızıntı azalır, stabilitesi artar. Bu yapı transdermal taşıma için kullanılır. Etkin madde hidrofilik ise vezikülden sızıntı artar, stabilitesi azalır. Etkin madde amfifilik ise vezikülden sızıntı azalır, stabilitesi değişmez (57).

#### **2.2.5. Proniozomlarda Yapılan Karakterizasyon İşlemleri**

Üretilen proniozomal formülasyonların boyutları, akış özellikleri poröz yapıları, morfolojisi, enkapsülasyon etkinliği, zeta potansiyeli gibi karakteristik özellikleri önem teşkil etmektedir. Proniozomların karakterizasyonu, kuru toz formülasyonda yapılması gereken kontroller ve proniozomdan elde edilen niozomal dispersiyonda yapılması gereken kontroller olmak üzere iki kısma ayrılır.

#### **2.2.6. Kuru Toz Proniozomlarda Yapılması Gereken Kontroller**

##### **Morfolojik Yapısının Tayini:**

Oluşturulan kuru toz proniozomların küreselliği ve porozitesi morfolojik yapısının analiz edilmesiyle tayin edilir. Bu kontrolde taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmaktadır (56).

##### **Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC):**

Proniozomal formülasyonda enkapsüle edilen etkin maddenin formülasyon içeriğinde yer alan diğer maddeler ile etkileşimini incelemek için diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) kullanılır (45).

### **Proniozomal Tozların Akış Özellikleri:**

Proniozom tozların akış özelliği yığın açısının ölçülmesiyle yapılır. Yığın açısı; serbestçe döküldüğünde tozun oluşturduğu maksimum eğimin açısını ifade eder ve yüzeyi kaplayan tozun tanecikleri arasındaki sürtünmesinin bir ölçüsüdür (57,60).

### **2.2.7. Proniozomlardan Elde Edilen Niozomlarda Yapılan Kontroller**

Proniozomların hidrasyonu ile elde edilen niozomal dispersiyonlarda aşağıda belirtilen testler uygulanmalıdır (57,58).

### **Zeta Potansiyeli Ölçümü:**

Partikülün yükü zeta potansiyeli ile ölçülür. Zeta potansiyelinin mutlak değeri ne kadar yüksek olursa, yüzey yükü miktarı ve stabilitesi o kadar büyük olur. Mantıksal olarak zeta potansiyeli, partikül stabilitesinin bir göstergesidir. Artan zeta potansiyeline sahip yüklü partiküller birbirlerini iter ve bu da daha düzgün bir boyut dağılımı ile daha kararlı partikül oluşumuna yol açar. Bir formülasyonun kabul edilir bir stabilite değerine sahip olması için en az  $\pm 30$  mV'lik bir zeta potansiyeline sahip olması beklenmektedir (58).

### **Partikül Büyüklüğü Tayini:**

Proniozomal formülasyon üretildikten sonra partikül boyutu önem taşımaktadır. Kolloidal yapıda olan sistemlerde partikül büyüklüğü kullanım amacına uygunluğunun belirlenmesinde, stabilite tayini açısından da önemlidir. Genel olarak en çok kullanılan yöntemlerin başında lazer difraksiyonu (LD), optik mikroskop ve dinamik ışık saçınım (DLS) yöntemi gelmektedir (46,62).

### **Veziküllerin Yüzey Yapılarının İncelenmesi:**

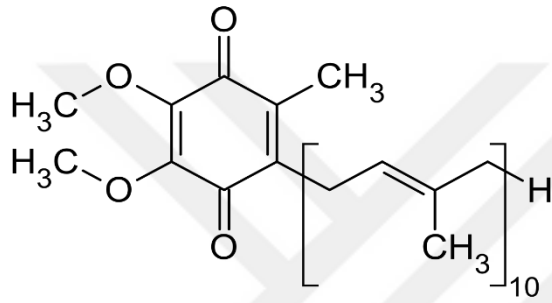
Proniozomların hidrasyonu ile oluşturulan niozomal formülasyonların vezikül yapısının incelenmesi geçirimli elektron mikroskopisi (TEM) ile incelenebilir (58).

## **2.3. Koenzim Q10**

Koenzim Q10, adenosin trifosfat formunda hücresel enerji üretimi gibi çeşitli temel hücresel işlemlerde yer alan lipofilik bir antioksidan maddedir. Dr. Frederick Crane tarafından (1957) sığırcı kalbi hücrelerinden elde edilmiştir. Yapılmış olan araştırmalarda mitokondride elektron transferinde rol oynadığı anlaşılmıştır. Koenzim Q10 yağda çözünebilir bir benzokinon

bileşigidir. Hücre zarı membran stabilitesinde, enerji ve ATP üretiminde direkt görev almaktadır. Hücre içerisinde mitokondride bulunur. Vücuttaki önemli endojen antioksidanlardan biridir (59).

Eksojen uygulanan koenzim Q10'un biyoyararlanımı, zayıf suda çözünürlüğü ve büyük moleküler kütlesi nedeniyle son derece düşüktür. Son zamanlarda en yaygın kullanılan besin takviyelerinden biridir. Kalp ve damar rahatsızlıkları, kas erimesi olan kişilerde ve alzheimer hastalığı olan kişilerde koenzim Q10 düzeyinin düşük olduğu belirlenmiştir. Doğada ise balıklarda (uskumru ve sardalye), et (kalp, akciğer, böbrek, sığır eti ve tavuk), yer fıstığı ve soya fıstığında bulunur (60,61).



Şekil 2.6. Koenzim Q10'un kimyasal yapısı (65)

Kimyasal olarak bir benzokinon halkası ve yan zincirde 10 izoprenoid biriminden oluşur. Nispeten büyük moleküler ağırlığı (863,34 g/mol) ve hidrofobik doğası nedeniyle, koenzim Q10 mide bağırsak yolundan zayıf ve yavaş emilir (62).

Tablo 2.4. Koenzim Q10'un fiziksel özellikleri (65)

<b>Erime Noktası (C°)</b>	48 -52
<b>Molekül Ağırlığı (g/mol)</b>	863,344
<b>Kapalı Formülü</b>	C <sub>59</sub> H <sub>90</sub> O <sub>4</sub>
<b>Renk/ Görünüş</b>	Sarı-Turuncu/ Akışkan toz

### 2.3.1 Koenzim Q10'un Klinik ve Terapötik Faydaları

Koenzim Q10 endojen olarak üretilir ve çoğunlukla hücre içi olarak oluşur. Normal kan seviyeleri 0,7-1,0 µg/mL arasındadır. Koenzim Q10'un üretimi, kalp ve bağışıklık sistemi gibi

yüksek metabolizmaya sahip dokularda en fazladır (63). Koenzim Q10 üretiminin kontrolünde hayati bir işlev gören hidrosimetilglutaril-CoA (HMGCoA) redüktaz adlı enzim, statinler gibi kolesterol düşürücü ilaçlar tarafından inhibe edildiğinde, Q10 seviyelerinde azalma meydana gelebilir (64). Koenzim Q10'un in vivo antioksidan savunmaya olan katkısı belirsizdir. Bu sebeple her hastalık için farklı dozlarda kullanımı görülmektedir. Fakat 3600 mg doza kadar uygulandığı ve tolere edilebildiği çalışmalar mevcuttur (63,65).

### **2.3.2. Koenzim Q10'un Farmakokinetiği**

Koenzim Q10, 2400 mg/gün konsantrasyonun üzerinde doğrusal olmayan farmakokinetik sergiler (66). Bu davranış, taşıyıcı-aracılı absorpsiyonun, bu taşıyıcı proteinin doygunluğunun ve/veya absorpsiyon penceresinin varlığının bir sonucu olabilir. Farklı hastalıklarda farklı dozlar uygulanmakta olup oral günlük dozun 3600 mg'a kadar hem sağlıklı hem de sağlıklı kişiler tarafından tolere edildiği bulunmuştur (65,66). Koenzim Q10 düşük biyoyararlanım göstermektedir (67). Düşük biyoyararlanımının altında yatan nedenler, büyük moleküler ağırlıklı olması (863 Da), yüksek lipofiliklik (log P=21) ve zayıf sulu çözünürlüktür (37 ° C'de 0,7 ng / ml) (Persson ve diğerleri, 2005) (62). Oral yoldan alınan koenzim Q10'un sadece %2-3'ünün emildiğini bildirmektedir. Alınan doz ne kadar yüksekse, emilen yüzde o kadar düşüktür (68). Koenzim Q10 lipofilik yapıda bir madde olduğundan, gastrointestinal sistemdeki emilimi yağlar ve E vitamini gibi diğer lipofilik besin maddelerine benzer bir süreci takip eder.

Koenzim Q10 'un emilimi, yağ içeren bir öğünle alındığında artar, çünkü sindirim, koenzim Q10'un yiyecek matrisinden serbest bırakılmasına yardımcı olur. Saf koenzim Q10 içeren takviyeler için mide sindirimi önemli bir faktör değildir. İnce bağırsakta, pankreas salgıları ve safra yağları, koenzim Q10'un emülsifikasyonunu ve yağ emilimi için gerekli olan misellerin oluşumunu kolaylaştırır. Koenzim Q10 'un emilimi için ince bağırsak boyunca belirli bir yer tespit edilmemiştir. Emilimden sonra, koenzim Q10, şilomikronlara dahil edilir ve lenfatik sistem üzerinden kan dolaşımına taşınır. Emiliminde doza bağlı, basit kolaylaştırılmış bir pasif difüzyon etkilidir (69). Çalışmalar, koenzim Q10 'un emilim sırasında veya hemen sonrasında bağırsağa indirgenmiş formu olan ubiquinol'e dönüştüğünü göstermektedir. Ubiquinol daha sonra mezenterik triasilgliserol zengin lipoproteinlerde belirir, bunlar kan dolaşımında şilomikron artıklarına dönüşür ve hızla karaciğer tarafından alınır.

Karaciğerde, koenzim Q10 çoğunlukla VLDL/LDL partiküllerine yeniden bağlanır ve E vitamini (alfa-tokoferol) gibi dolaşıma yeniden salınır. HDL de küçük bir miktar koenzim Q10 içerir. Plazma koenzim Q10 konsantrasyonları büyük ölçüde plazma lipoproteinlerine

bağlıdır ve dolaşımdaki koenzim Q10 'un yaklaşık %95'i indirgenmiş formu olan ubiquinol olarak bulunur. Bununla birlikte, koenzim Q10 gastrointestinal sistemden zayıf bir şekilde emilir (Tmax ~ 6 saat) ve oral olarak desteklenen koenzim Q10 'un %90-95'i, zayıf sulu çözünürlüğü nedeniyle dışkı yoluyla elimine edilir (70).

### **2.3.3.Koenzim Q10'un Yan Etkileri**

Koenzim Q10'un insanlarda meydana gelen ciddi bir yan etkisi yoktur. Toksikitesi kullanımıyla ilişkilidir ve şu ana kadar epigastrik rahatsızlık %0,39, iştah bastırma %0,23, mide bulantısı %0,16 ve ishal %0,12 oranında rapor edilmiştir. Bu doza bağlı şikayetler dozla en aza indirilir (64).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Kullanılan Materyaller ve Kimyasallar

##### 3.1.1 Kullanılan Materyaller

<b>Materyal Adı</b>	<b>Menşei</b>
Cam Malzemeler	Pyrex (ABD)
DSC cihazı	Q100-MET (A.B.D.)
Filtreler	Sartorius, Whatman (Alm. A.B.D.)
Hassas Terazı	Sartorius (Almanya)
HPLC sistemi	Agilent Technologies 1290 Infinity II Serisi C18 ters faz HPLC kolonu Zorbax Eclipse Plus (C18 ters faz; 100 mm x 4,6 mm x 3.5 µm) (ABD)
HPLC Kolonu	
Manyetik Karıştırıcı	Weightlab WN-10H-120 (Türkiye)
Mikropipetler (100-1000 µl)	İsolab (Türkiye)
Su Arıtma Sistemi	İsolab (Türkiye)
Ultrasantrifüj Cihazı	Daihan (Japonya)
	SPSS 13 (ABD) STATISTICA 8.0; Stat Soft. Inc. (ABD)
Paket Programlar	DDSolver ve PKSolver- Excel/Microsoft Office (ABD)
Parafilm	Parafilm, Chicago (A.B.D.)
Plastik enjektör	Tibset inject (Türkiye)
Rotavapor	BUCHI R200 (Almanya)
Taramalı elektron mikroskobu	ZEIS Evo-40(USA)
Ultrasantrifüj cihazı	Hettich-Mikro 12-24 (ABD)
Vorteks cihazı	Heidolph D91126 (Almanya)
Zeta potansiyel ve partikül ölçüm cihazı	Nano ZS, Malvern (İngiltere)

### 3.1.2 Kullanılan Kimyasallar Maddeler

Kimyasal Adı	Menşei
Arjinin	Merck (Almanya)
Asetonitril (HPLC grade)	Supelco (Almanya)
Etanol	Aklar Kimya (Türkiye)
Etil Asetat	Sigma (Fransa)
Koenzim Q10	Dibcr (Almanya)
Kolesterol	Merck (Almanya)
Metanol	Sigma (Fransa)
İzopropanol	Sigma (Fransa)
Pluronik F127	Merck (Almanya)
Sitrik asit	Kimetsan (Türkiye)

### 3.2.Çalışmalarda Kullanılan Çözünme Ortamının Bileşimi ve Hazırlanması

Sodyum Klorür.....	0,8 g
Potasyum Klorür.....	0,2 g
Disodyum Fosfat.....	0,144 g
Monopotasyum Fosfat.....	0,024 g
Tween 80.....	2,0 mL
Asetonitril.....	25 mL
Distile su.....	100 mL

**Hazırlanışı:** Yukarıda belirtildiği şekilde hesaplı miktarda tozlar tartılarak suda çözülür, daha sonra Tween 80 ve asetonitril eklendikten sonra distile su ile 100 mL'ye tamamlanır. Daha sonra pH 7,4'e sodyum hidroksit çözeltisi ile ayarlanır.

### 3.3. Koenzim Q10'un Miktar Tayin Yöntemlerinin Geliştirilmesi

#### 3.3.1.Koenzim Q10'un Etil Asetat Ortamındaki Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini

### **Koenzim Q10'un HPLC-DAD ile Miktar Tayininde Kullanılan Hareketli Faz Çözeltisi:**

Mezür yardımı ile 250 mL metanol ve 750 mL etanol alınarak rezervuar şişesine konulmuş ve manyetik karıştırıcı ile yaklaşık 30 dak karıştırılmıştır. Daha sonra ultrasonik banyoda 10 dak bekletilerek degaze işlemi gerçekleştirilmiştir.

### **Koenzim Q10 Stok Çözeltisi**

Koenzim Q10'un çözünürlüğü apolar çözücülerde daha yüksek olduğu için stok çözelti hazırlanmasında çözücü olarak etil asetat kullanılmıştır. Koenzim Q10 stok çözeltisinin hazırlanmasında, 10,0 mg koenzim Q10 analitik terazide tartılarak 10 mL hacimli ve amber renkli balon jode etil asetat ile çözündürülerek yine etil asetat ile hacme tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti çalışma ve kontrol çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılmıştır. Çalışma ve kontrol çözeltileri hareketli faz çözeltisi (metanol:etanol; 25:75; h:h) ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

### **Koenzim Q10'un Hareketli Faz Ortamında HPLC-DAD Analizi:**

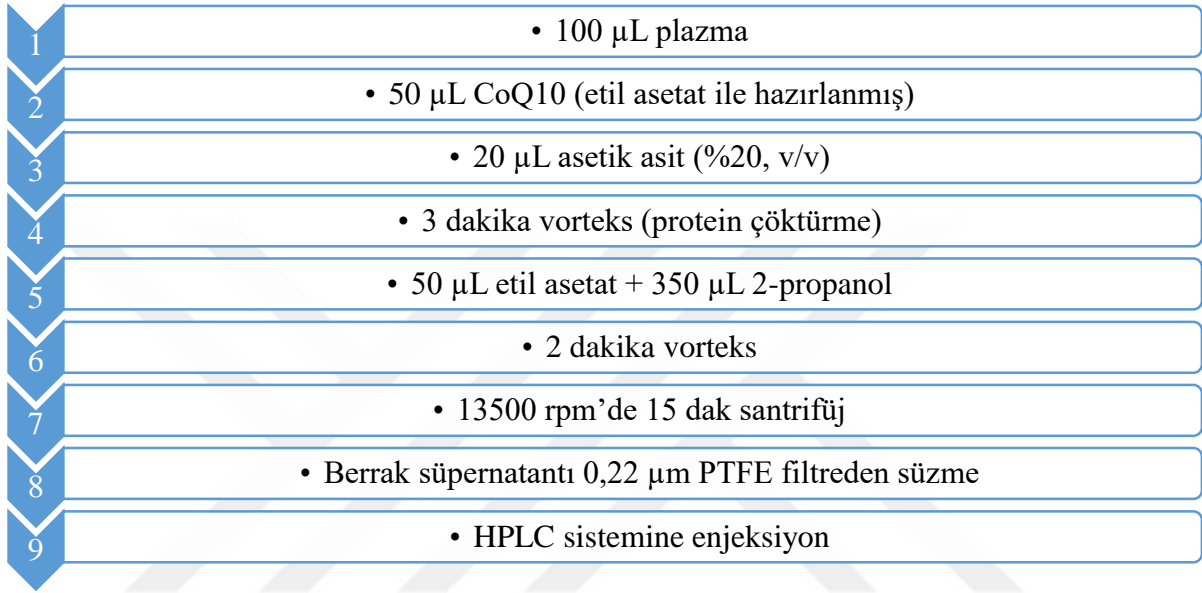
Koenzim Q10 stok çözeltisinden istenilen konsantrasyonlarda çalışma ve kontrol çözeltileri hazırlanmıştır. Hareketli faz ile seyreltilerek hazırlanan koenzim Q10 çözeltisi diyot sıralı dedektör bağlı HPLC sistemine enjekte edilmiş ve 190-400 nm dalga boyu aralığında DAD spektrumu alınarak maksimum absorban gösterdiği dalga boyu ( $\lambda_{max}$ ) tespit edilmiştir. 10  $\mu\text{g/mL}$  derişimde hazırlanan koenzim Q10 çözeltisi kullanılarak akış hızı, enjeksiyon hacmi ve  $\lambda_{max}$  gibi gerekli çalışma parametreleri belirlenmiştir.

### **Koenzim Q10'nin HPLC-DAD ile hareketli faz ortamındaki standart doğrusunun hazırlanması:**

Koenzim Q10 stok çözeltisinden hareketli faz ile yapılan seyreltmeler ile farklı konsantrasyonlarda (0-50  $\mu\text{g/mL}$ ) bir seri çözelti hazırlanmıştır. Her bir çözeltinin maksimum absorban verdiği dalga boyunda kromatogramları alınarak pik alanları hesaplanmıştır. Konsantrasyon değerleri x eksenine, pik alan değerleri y eksenine yerleştirilerek standart doğru elde edilmiş ve en küçük kareler yöntemi kullanılarak doğruya ait istatistiki veriye ulaşılmıştır. Çalışma üç farklı stok çözelti için tekrarlanmış ve her bir konsantrasyondaki çözelti n=3 olacak şekilde sisteme enjekte edilmiştir.

### 3.3.2.Koenzim Q10'un HPLC ile Hayvan Plazmasındaki Tayini

Koenzim Q10'un plazmadan ekstraksiyonu Şekil 3.1.'de gösterilen protokol uygulanarak hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltileri HPLC sistemine enjekte edilmiş ve 190-400 nm dalga boyu aralığında DAD spektrumu alınarak maksimum absorptans gösterdiği dalga boyu ( $\lambda_{max}$ ) tespit edilmiştir. Koenzim Q10 konsantrasyonu 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  derişimde olacak şekilde plazmaya katım yapılarak akış hızı, enjeksiyon hacmi gibi kromatografik ayırım koşulları belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Koenzim Q10'un plazmadan ekstraksiyonunda kullanılan yöntemle ait akış şeması

#### Koenzim Q10'un HPLC-DAD ile plazma ortamındaki standart doğrusunun hazırlanması:

Koenzim Q10'un stok çözeltilerinden gerekli miktarda plazmaya katım yapılmıştır. Katım yapılan plazmalara (Şekil 3.1.'de) gösterildiği şekilde ekstraksiyon yapılarak farklı konsantrasyonlarda (0,1-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) bir seri çözeltiler hazırlanmıştır. Konsantrasyon değerleri x eksenine, pik alan değerleri y eksenine yerleştirilerek standart doğru elde edilmiş ve en küçük kareler yöntemi kullanılarak doğruya ait istatistiksel veriye ulaşılmıştır. Koenzim Q10 endojen bir madde olduğu için,  $t=0$  anında elde edilen alan değeri standart doğru çözeltilerinden hesaplanan alan değerlerinden çıkarılmıştır. Çalışma üç paralel için tekrarlanmış ve her bir konsantrasyondaki çözeltiler n=3 olacak şekilde sisteme enjekte edilmiştir.

### **3.4. Analitik Metot Validasyonu**

Analitik yöntem validasyon parametreleri olarak doğrusallık , doğruluk, kesinlik, teşhis ve tayin sınırı ve sistem uygunluğu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Parametrelerin değerlendirilmesinde ICH kılavuzları temel alınmıştır.

#### **Doğrusallık:**

Yöntem doğrusallığı belirli bir konsantrasyon aralığında, analit konsantrasyonu ile analitik sinyal arasındaki cevabın orantılı olmasıdır. Doğrusallığı tespit edebilmek için koenzim Q10 konsantrasyonu 1,0-50 µg/mL olacak, plazma ortamında 0,1-10 µg/mL şekilde altı farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmış ve n=3 olacak şekilde HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Kromatogramlardan tespit edilen pik alanına karşı koenzim Q10 derişimleri grafiğe geçirilerek regresyon formülü ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. LOD ve LOQ değerleri doğrusallık grafiğindeki doğrunun eğimi ve regresyon doğrusundaki y kesişim noktasının standart sapması kullanılarak hesaplanmıştır.

#### **Doğruluk:**

Analitik yöntemin doğruluğu, yöntem ile elde edilen deneme sonuçlarının gerçek değere yakınlığıdır. Koenzim Q10'un miktar tayininde kullanılacak olan standart doğrulardan elde edilecek doğruluk ve yüzde geri eldeyi tespit etmek amacıyla koenzim Q10'un yüksek, orta, düşük olmak üzere üç farklı konsantrasyonda etil asetat (5, 15, 40 µg/mL) ve plazma (0.5, 3.5, 8.5 µg/mL) için hazırlanmış ve tekrarlı ölçümler yapılmıştır. Buradan %geri elde, standart sapma (SS), ve % bağıl standart sapma hesaplanmıştır.

#### **Kesinlik:**

Kesinlik çalışmaları gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılarak belirlenmiştir. Çalışmalar etil asetatta 20 µg/mL; plazmada 8,5 µg/mL koenzim Q10 içeren kontrol örneği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasında kontrol örneği aynı gün içinde n=6, günler arası n=9 defa olacak şekilde sisteme enjekte edilmiştir. Günler arası tekrarlanabilirlik çalışmalarında kontrol örneği birinci, üçüncü ve yedinci günlerde n=3 olacak şekilde sisteme enjekte edilmiştir. Sonuçlar %RSD (bağıl standart sapma) şeklinde ifade edilmiştir.

### **Teşhis ve Tayin Sınırı Tayini:**

Teşhis ve tayin sınırı, analizin sonuçlarının kabul edilebilir bir düzeyde doğruluk ve güvenilirlikle belirli bir durumu teşhis etme veya varlığını tespit etme yeteneğini ifade eder. Teşhis Sınırı (LOD): Teşhis sınırı, bir analizin sonuçlarının kesinlikle teşhis edebileceği düşünülen minimum düzeydir. Bir testin teşhis sınırı, testin hassasiyeti ve özgülüğü ile ilişkilidir. Tayin Sınırı (LOQ): Tayin sınırı, bir testin sonuçlarının analiz edilen bileşiği en düşük kabul edilebilir düzeyde tespit edebileceği minimum düzeydir. Bu, analiz edilen bileşiğin varlığının tespit edilebilir en düşük konsantrasyonudur. Tayin sınırı, analiz yönteminin hassasiyeti ve doğruluğu ile ilişkilidir. Regresyon analizinden sonra kalibrasyon denklemi oluşturularak LOD ve LOQ değerleri  $\mu\text{g/mL}$  olarak tespit edildi. LOD ve LOQ çalışmaları sistemin standart sapma/ eğim oranına bakılarak tespit edildi ve  $\text{LOD} = 3,3 \times \text{SD}/\text{eğim}$   $\text{LOD} = 10 \times \text{SD}/\text{eğim}$  olarak ifade edilir.

### **3.5. Formülasyon Çalışmaları**

#### **3.5.1. Proniozomların Hazırlanması ve Optimizasyonu**

Proniozomlar bulamaç yöntemiyle hazırlanmış olup bileşimleri (Tablo 3.1'de) verilmiştir. İşleme başlamadan önce formülasyon bileşenleri, işlem parametreleri değiştirilerek uygun metot bulunmuş ve bulunan bu yöntem ve formülasyonun optimizasyonu yapılmıştır. Hesaplı miktardaki etkin madde, yüzey aktif maddeler (100 mg) ve kolesterol (55 mg), tabanı yuvarlak cam balona aktarılarak ve 10 mL kloroform içinde çözülmüştür. Berrak çözelti elde edildikten sonra, bulamaç yapmak için tartılan miktarda L-arjinin taşıyıcı olarak ilave edilmiştir. Kloroform, 40 °C, 60 rpm, 5 dakika evaporatör kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Elde edilen kuru proniozomlar, gece boyu kurumaları ve kloroformun buharlaşmasını sağlamak için silika jel içeren bir desikatörde saklanmıştır. Bu kuru proniozomlar daha sonra sıkıca kapatılan kaplarda derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Sonrasında, PN1-PN8 olarak adlandırılan bu formülasyonlar karakterize edilmiş ve doğrusal regresyon analiziyle formülasyon parametrelerinin etkileri detaylıca incelenmiştir.

**Tablo 3.1. Formülasyon bileşenleri**

<b>Formülasyon Kodu</b>	<b>PN-1</b>	<b>PN-2</b>	<b>PN-3</b>	<b>PN-4</b>	<b>PN-5</b>	<b>PN-6</b>	<b>PN-7</b>	<b>PN-8</b>
<b>Parametreler</b>								
<b>Koenzim Q10 (mg)</b>	10	10	5	5	10	10	5	5
<b>Span 80: PF127 (100 mg)</b>	50:50	50:50	50:50	50:50	75:25	75:25	75:25	75:25
<b>L-Arjinin (g)</b>	2	1	2	1	2	1	2	1
<b>Kolesterol (mg)</b>	55	55	55	55	55	55	55	55
<b>Kloroform (mL)</b>	10	10	10	10	10	10	10	10

Formülasyon üç faktör iki düzey  $2^3$  faktöriyel tasarıma göre oluşturulmuştur. Parametreler ve değişkenlerin değerleri (Tablo 3.2.'de) verilmiştir.

**Tablo 3.2. Proniozomlar için değişken düzeyde  $2^3$  faktörlü tasarım**

<b>Değişkenlik Parametresi</b>	<b>Düşük</b>	<b>Yüksek</b>
Taşıyıcı Miktarı (g) ( $X_1$ )	1	2
Etkin Madde Miktarı (mg) ( $X_2$ )	5	10
Span 80: Pluronic F127 miktarı (mg) ( $X_3$ )	50:50	75:25

### 3.5.2. Proniozomal Formülasyonların Karakterizasyonu

#### Partikül Boyut Dağılımı:

Proniozomlardan niozomları üretmek için, proniozomlar saf suda ultrasonik banyoda 5 dakika inkübe edildi ve 5 dk vortekslenmiştir. Dinamik ışık saçılımı (DLS) ile, partikül büyüklüğü ve dağılımı belirlenmiş (NanoSeries, Nano-ZS, Malvern Instruments, UK). Bu analizler, 25°C sıcaklıkta, 633 nm dalga boyundaki He-Ne lazeri kullanarak ve 173° saçılma açısıyla yapılmıştır. Niozom ölçümleri için tek kullanımlık zetasizer küvetleri tercih edilmiştir (n=3).

### **Zeta Potansiyeli:**

Zeta-potansiyel ölçümü için proniozomlar tarafından oluşturulan niozomların yüzey yükleri, zetasizer (NanoSeries, Nano-ZS, Malvern Instruments, UK) kullanılarak elektroforetik hareketlilik yoluyla hesaplanmıştır (n=3).

### **Enkapsülasyon Etkinliği ve İlaç Etkin Madde Yükleme Etkinliği:**

Enkapsülasyon etkinliği niozomlara enkapsüle edilen etkin madde miktarını ölçmek amacıyla hesaplanmıştır. Proniozomdan oluşturulan niozomlarda süpernatandaki miktar bulunarak indirekt yöntem ile ölçülmüştür. Proniozomlar (100 mg), 10 mL damıtılmış su içerisinde 30 dakika boyunca inkübe edilerek niozomlar oluşturulmuştur. Niozomların hazırlanmasının ardından, oluşan niozomal karışım 30 dakika boyunca 12500 rpm hızında santrifüj edilmiştir. Yükleme Etkinliği (%YE), süpernatanın miktarının (Denklem 1) kullanılmasıyla hesaplanmıştır.

Proniozomların etkin madde içeriği için ise direkt yöntem kullanılmıştır. 10 mg proniozom, niozomu oluşturan sürfaktanı parçalamak için 300 µL kloroformda 30 dakika inkübe edilmiş ve ardından 5 ml asetonitril'e tamamlanmıştır ve 30 dakika ultrasonik banyoda tutulmuş; böylece koenzim Q10'un asetonitrile geçmesi sağlanmıştır. % Etkin madde içeriği (% EMI) Denklem 2 ile hesaplanmıştır. Tüm ölçümler üç tekrarlı yapılmıştır. 500 uL numune, 500 µL HPLC dereceli etil asetat ile karıştırılmıştır. 60 saniye kuvvetlice vortekslelendikten sonra karışım 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Koenzim Q10'un tam ekstraksiyonuna izin vermek için dakika dakika ve ardından 13500 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatantlar, doğrudan 276 nm dalga boyunda HPLC sistemine enjekte edilmiş ve Koenzim Q10 miktarları, bir kalibrasyon eğrisi kullanılarak tespit edilmiştir

$$Y. E. (\%) = \frac{\text{Toplam KoQ10 ağırlığı} - \text{Yüklenmemiş KoQ10 ağırlığı}}{\text{Toplam KoQ10 ağırlığı}} \times 100 \quad (1)$$

$$E. M. İ. (\%) = \frac{\text{Yüklenmiş KoQ10 ağırlığı}}{\text{Toplam formülasyon ağırlığı}} \times 100 \quad (2)$$

### **Proses Verimi:**

Proniozomların proses verimi gravimetrik olarak hesaplanmıştır. Proniozomlar elde edildikten sonra gece boyunca kurutulmuştur. Bu prosedürün ardından, işlem verimini hesaplamak için nanopartiküllerin gerçek ağırlıklarını teorik ağırlıklarıyla karşılaştırılarak proses verimi Denklem 3 aracılığıyla hesaplanmıştır.

$$P.V. (\%) = \frac{\text{Proniozomun Ağırlığı}}{\text{Toplam Toz (KoQ10 + Sürfaktan Madde + Kolesterol + Arjinin)Ağırlığı}} \times 100 \quad (3)$$

### 3.6. İn-Vitro İlaç Salım Çalışmaları

İn vitro ilaç salım çalışması için 50 µg saf koenzim Q10 ve aynı miktar koenzim Q10 içeren proniozomlar 1 mL çözünme ortamı içinde dağıtılmıştır (7). Ependorflar 75 rpm'de, 37°C'de 24 saat çalkalayıcı su banyosunda karıştırılmıştır. 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6 ve 24 saatlik zaman aralıklarında ependorflar alınarak santrifüjlenmiştir (13500 rpm, 30 dakika). Santrifüjlemeden sonra, süpernatant koenzim Q10 salımı için analiz edilmiştir. Saf koenzim Q10 ile proniozomların salım profilleri arasındaki benzerliği değerlendirmek için  $f^2$  benzerlik faktörü hesaplanmıştır (71).

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left( 1 + \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (R_t - T_t)^2 \right)^{-0.5} \times 100 \right\}$$

- $R_t$ : t zamanında çözünmüş koenzim Q10 yüzdesi.
- $T_t$ : t zamanında proniozomlardan çözünmüş koenzim Q10 yüzdesi.
- n: Salım ortamında numune sayısı.

Proniozomlardan etkin madde salım kinetiğini tam olarak anlamak için, salım verileri toplanmış ve sıfır derece, birinci derece, Higuchi, Hixson-Crowell, Hopfenberg ve Korsmeyer-Peppas matematiksel modellerine uyumluluk açısından incelenmiştir. Microsoft Excel eklentisi DDSolver kullanılarak proniozomal formülasyonların salım profilleri ( $R^2$ ),  $R^2$ -ayarlı MSC ve AIC hesaplanarak değerlendirilmiştir (72,73).

### 3.7. Proniozomun Morfolojik Değerlendirmesi

Proniozom formülasyonunun yapısal özellikleri taramalı transmisyon elektron mikroskobu (STEM) (JEOL JEM-2100F) 160 keV altında incelenmiştir. Numuneler niozomlar oluşturulduktan sonra liyofilize edilmiş ve daha sonra elektrik iletkenliğini artırmak için kaplama cihazında 5 dakika (Leica EM ACE600) Au'ya maruz bırakılmıştır. Örnekler hazırlandıktan sonra 20-25 kV voltaj aralığında taranmıştır.

### 3.8. Termal Analiz

Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) cihazında 2-10 mg aralığında tartılan maddeler için 20°C/dak hızda, 20-300°C aralığında termogramlar alınmıştır. Cihaz içindeki referans madde (indium) ile örnek madde karşılaştırılarak maddenin kalorimetrik davranışları incelenmiştir. Etkin maddenin, yardımcı maddelerin ve PN6 formülasyonunun DSC termogramları çekilerek maddeler arasındaki etkileşimler incelenmiştir.

### 3.9. Farmakokinetik Analiz

In vitro karakterizasyonlar yapıldıktan sonra optimum formül olarak belirlenen PN6 formülasyonunun etkisini incelemek için bir in-vivo farmakokinetik çalışma yapılmıştır. Bu çalışma için Trakya Üniversitesi Etik Kurulundan onay alınmıştır (Tarih: 28-05-2021; Protokol No: TÜHADYEK 2021/20) (Ek-1). Çalışmada kullanılan Wistar sıçanları ağırlıkları 250,0 ile 288,0 g arasında değişmekte olup Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi'nde hayvanları standartlaştırılmış koşullar altında (25°C oda sıcaklığında 12 saat/12 saat aydınlık/karanlık döngüsü) standart kafeslerde barındırılmıştır. Sıçanların deney günü öncesi yemleri alınarak gece boyunca (10-12 saat) ve deney süresince aç kalmaları sağlanmış ve bu süre içinde sadece su tüketmelerine izin verilmiştir.

#### **Denek Hayvanlarına Oral Yolla İlaç Uygulaması ve Kan Örnekleme:**

Formülasyon (PN6) ve saf koenzim Q10 fizyolojik suda disperse edilerek, bir sonda iğnesi kullanılarak Wistar sıçanlara (n=6) oral yolla uygulanmıştır (10 mg/kg). Verilen süspansiyonun hacmi 0,3 ila 0,5 mL arasında olup sıçanların kuyruklarından belirli aralıklarla (0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6 ve 12 saat) kan örnekleri (100-200 µl) antikoagülan olarak sodyum sitrat (%3,8 w/v) içeren test tüplerine alınmıştır. Tüplere ilave edilen antikoagülan ajanlar (100 µl) kullanılmadan önce kurutulmuştur.

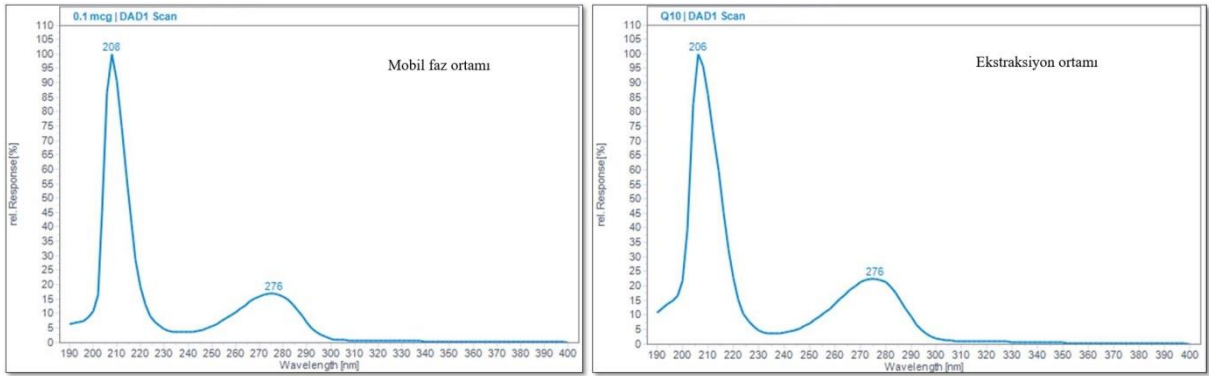
Toplanan kan örnekleri, 6000 rpm hızında 10 dakika santrifüj edilerek plazması ayrıştırılmış ve her bir örnekten ayrılan plazma, analiz yapılana kadar -80°C'de saklanmıştır. Koenzim Q10'un plazma içindeki konsantrasyonu, HPLC yöntemi ile ölçülmüştür. Koenzim Q10, vücutta doğal olarak bulunan bir bileşik olduğundan, başlangıçtaki (t = 0) plazma koenzim Q10 seviyesi, bazal düzey olarak kabul edilmiş ve sonraki ölçümlerdeki plazma koenzim Q10 düzeyleri bu bazal seviyeden çıkarılarak farmakokinetik parametreler hesaplanmıştır. Bu farmakokinetik veriler, Excel'deki bir eklenti olan PKSolver kullanılarak Non-kompartmanal Analiz metoduyla değerlendirilmiştir (74).

## 4. BULGULAR

### 4.1. Koenzim Q10'un Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi

#### 4.1.1. Koenzim Q10'un Etil asetat Ortamındaki HPLC-DAD Spektrumu

Koenzim Q10'un hareketli fazdaki çözeltisinin (Metanol: Etanol (25:75, h/h)) 190-400 nm aralığında diyot sıralı dedektörde alınan spektrumunda maksimum absorbands gösterdiği dalga boyu ( $\lambda_{\max}$ ) 276 nm olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.1.). Koenzim Q10'un plazmadan ekstraksiyonu sonrası elde edilen çözeltisinin  $\lambda_{\max}$  spektrumu alınmış ve değerinin değişmediği görülmüştür.



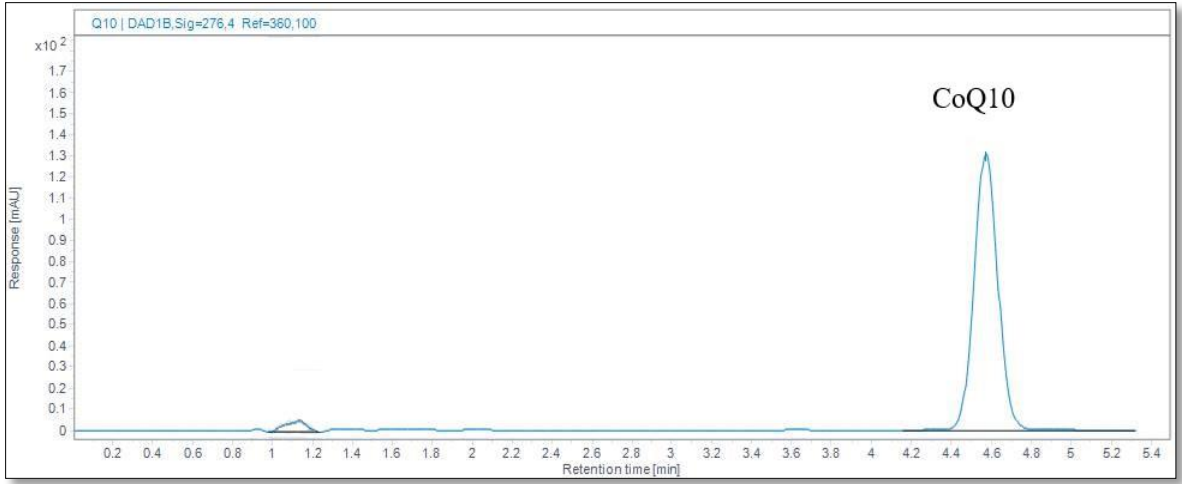
Şekil 4.1. Koenzim Q10'un farklı ortamlarda alınan DAD spektrumu

#### 4.1.2. Koenzim Q10'un Hareketli Fazdaki Standart Doğrusuna İlişkin Bulgular

Koenzim Q10'un (Tablo 4.1.'de) verilen koşullar altında kromatografik ayrımı sağlanmıştır. Elde edilen HPLC kromatogramı ve standart doğru grafiği sırası ile (Şekil 4.2., Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.'de) gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Koenzim Q10'un HPLC'de ayırım koşulları

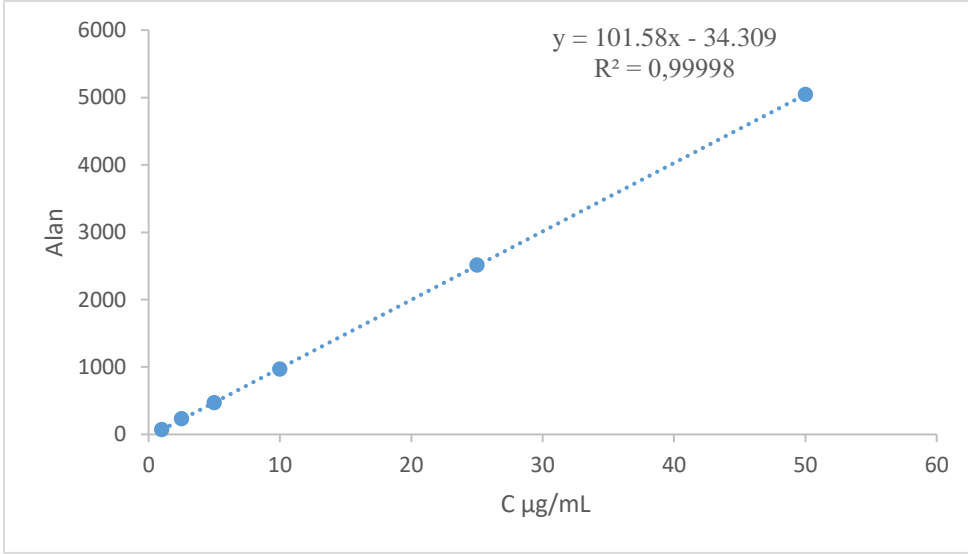
Cihaz	Agilent 1290 İnfinite
Detektör	Diyot sıralı dedektör (Agilent 1290 İnfinite)
Kolon	Zorbax Eclipse Plus C18 (100mm x 4,6 mm, 3,5 $\mu$ m)
Hareketli Faz	Metanol: Etanol (25:75, h/h)
Dedeksiyon dalga boyu	276 nm
Akış hızı	1,0 mL/dak
Enjeksiyon hacmi	10 $\mu$ L
Analiz sıcaklığı	25 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C
Alıkonma zamanı	4,543 $\pm$ 0,011 dak



**Şekil 4.2. Hareketli faz ortamında çözülmüş olan koenzim Q10'un HPLC-DAD kromatogramı**



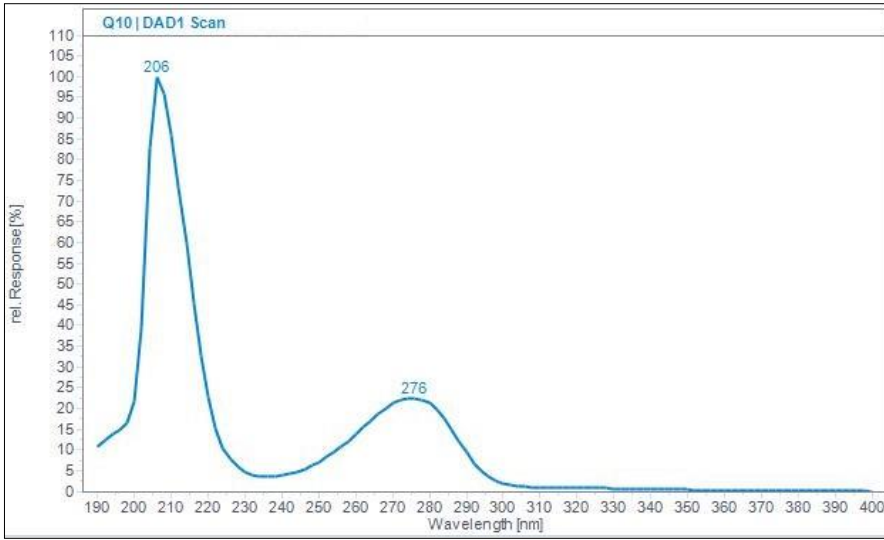
**Şekil 4.3. Hareketli faz ortamında bulunan koenzim Q10'un standart doğrusunda bulunan seviyelerin üst üste çakıştırılmış HPLC kromatogramları**



**Şekil 4.4. Hareketli faz ortamında çözülmüş koenzim Q10'un standart doğru grafiği**

#### 4.1.3. Koenzim Q10'un Plazma Ortamındaki HPLC-DAD Spektrumu

Koenzim Q10'un plazmadan ekstraksiyonu sonrası elde edilen çözeltisinin 190-400 nm aralığında diyot sıralı dedektörde alınan spektrumunda maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu ( $\lambda_{max}$ ) 276 nm olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.5.).



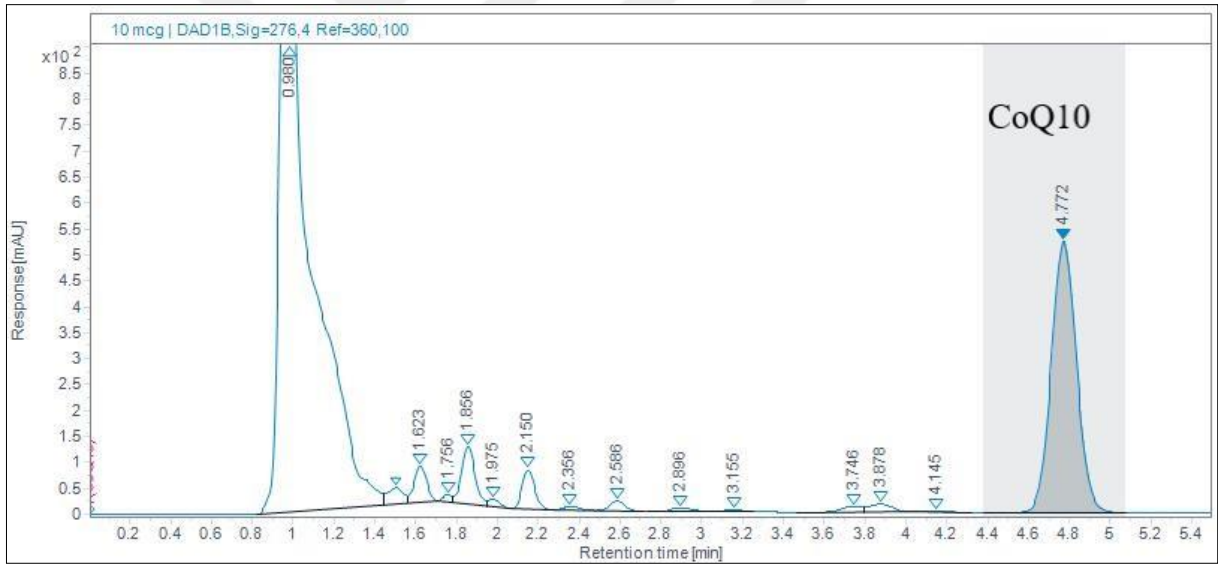
**Şekil 4.5. Koenzim Q10'un plazma ortamındaki DAD spektrumu**

#### 4.1.4. Koenzim Q10'un Plazmadaki Standart Doğrusuna İlişkin Bulgular

Koenzim Q10'un (Tablo 4.1.'de) verilen koşullar altında kromatografik ayrımı sağlanmıştır. Elde edilen HPLC kromatogramı ve standart doğru grafiği sırası ile (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da) gösterilmiştir.

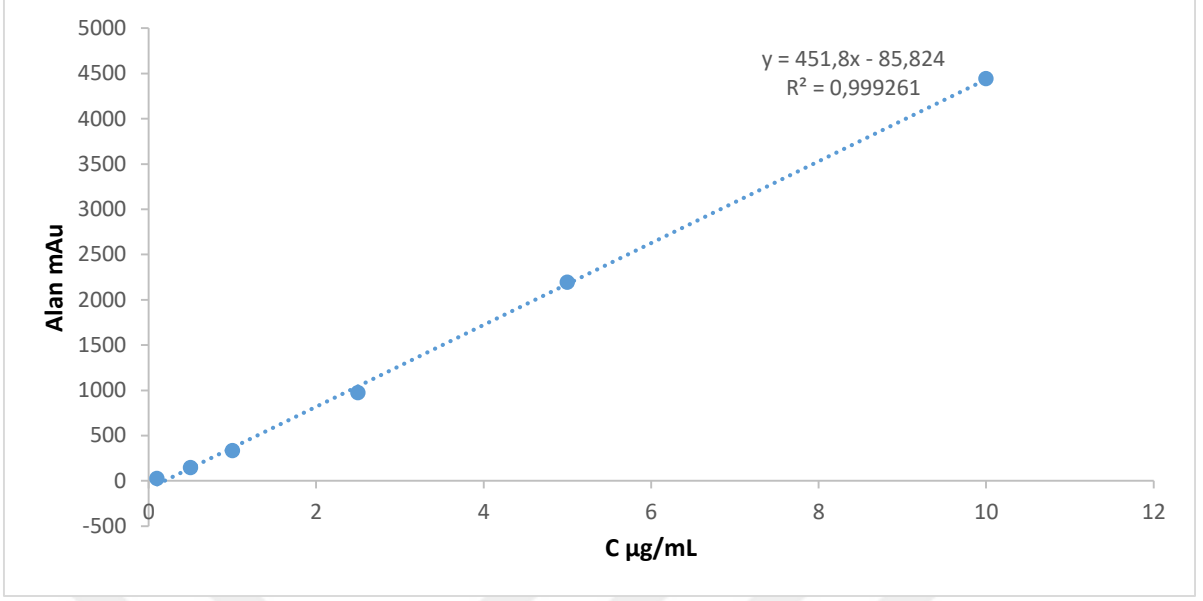
**Tablo 4.2. Koenzim Q10'un plazma ortamında HPLC'de ayırım koşulları**

Parametre	Bulgular
Cihaz	Agilent 1290 İnfinite
Detektör	Diyot sıralı dedektör (Agilent 1290 İnfinite)
Kolon	Zorbax Eclipse Plus C18 (100mm x 4,6 mm, 3,5 µm)
Hareketli Faz	Metanol: Etanol (25:75, h/h)
Dedeksiyon dalga boyu	276 nm
Akış hızı	1,0 mL/dak
Enjeksiyon hacmi	10 µL
Analiz sıcaklığı	25±2 °C
Alıkonma zamanı	4,761 ± 0,013 dak



**Şekil 4.6. Boş plazmaya katım yapılmış koenzim Q10'un HPLC kromatogramı**





**Şekil 4.9. Plazma ortamında koenzim Q10'un standart doğru grafiği**

#### **4.1.5. Koenzim Q10'un HPLC-DAD Miktar Tayini Yöntemlerinin Validasyon**

##### **Çalışmaları**

Koenzim Q10'un Bölüm 3.1.7'de verilen şekilde yapılmış olan analitik validasyon bulguları aşağıda verilmektedir.

##### **Doğrusallık ve Doğrusal Konsantrasyon Aralığı:**

Koenzim Q10'un hareketli faz ortamındaki miktar tayini için HPLC-DAD'de geliştirilen analitik yöntemin doğrusallık, doğrusal konsantrasyon aralığı ve standart doğruya ilişkin istatistik bilgileri (Tablo 4.3'te) verilmiştir.

**Tablo 4.3. Koenzim Q10'un hareketli faz ortamındaki miktar tayini için geliştirilen HPLC-DAD yönteminin standart doğrusuna ait istatistiksel bilgiler**

<b>Koenzim Q10</b>	<b>Değer</b>
Doğrusal Konsantrasyon Aralığı	1,0-50 µg/mL
Eğim	101,582
Eğimin %95 Güven Aralığı	Alt sınır: 100,935 Üst sınır: 102,935
Eğimin Önemlilik Değeri	<0,001
Kesişim	-34,309
Kesişimin %95 Güven Aralığı	Alt sınır:-35,379 Üst sınır:-32,240
Korelasyon Katsayısı	0,999989482

Koenzim Q10'un plazma ortamındaki miktar tayini için HPLC-DAD'de geliştirilen analitik yöntemin doğrusallık, doğrusal konsantrasyon aralığı ve standart doğruya ilişkin istatistiksel bilgileri (Tablo 4.4'te) verilmiştir.

**Tablo 1.4. Koenzim Q10'un plazma ortamındaki miktar tayini için geliştirilen HPLC-DAD yönteminin standart doğrusuna ait istatistiksel bilgiler**

<b>Koenzim Q10</b>	<b>Değer</b>
Doğrusal Konsantrasyon Aralığı	0,1-10 µg/mL
Eğim	451,403
Eğimin %95 Güven Aralığı	Alt sınır: 434,750 Üst sınır: 468,855
Eğimin Önemlilik Değeri	<0,001
Kesişim	-85,824
Kesişimin %95 Güven Aralığı	Alt sınır:-87,365 Üst sınır:-82,948
Korelasyon Katsayısı	0,999261

**Doğruluk:**

Koenzim Q10'nin hareketli faz ve plazma ortamlarında miktar tayini için geliştirilmiş HPLC-DAD yöntemine ait doğruluk çalışmaları bulguları (Tablo 4.5.'te) verilmiştir.

**Tablo 4.5. Doğruluk çalışması sonuçları**

Doğruluk (n= 6)				
Ortam	C µg/mL	Ortalama % Geri Kazanım	Standart Sapma (SS)	% Bağıl Standart Sapma (RSS)
Hareketli faz ortamı	5	100,23	0,28	1,76
	15	99,63	0,24	1,64
	40	100,03	0,59	1,47
Plazma ortamı	0,5	101,60	7,56	7,454
	3,5	101,04	3,42	4,367
	8,5	98,96	1,94	2,149

**Kesinlik:**

Geliştirilen HPLC-DAD yönteminin kesinliği gün içi ve günler arası çalışmaları şeklinde yapılmış olup bulgular (Tablo 4.6.'da) verilmiştir.

**Tablo 4.6. Kesinlik çalışması sonuçları**

Kesinlik							
Hareketli faz ortamında	Gün içi (n=6)				Günler arası (n=9)		
	C µg/mL	% ORT	SS	%BSS	% ORT	SS	%BSS
	20	100,03	0,22	0,209	101,87	0,68	1,024
Plazma ortamında	8,5	99,08	0,17	2,04	99,99	0,51	6,030

**Teşhis Sınırı ve Tayin Sınırı:** Geliştirilen HPLC-DAD yöntemi için teşhis sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) (Tablo 4.7.'de) verilmektedir.

**Tablo 4.7. Hareketli faz ve plazma ortamları için hesaplanan teşhis ve tayin sınırı değerleri**

Çözelti Ortamı	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Hareketli faz ortamında	0,168	0,326
Plazma ortamında	0,321	0,973

LOD: Limit of dedection, LOQ: Limit of Quantification.

**Sistem Uygunluk Testleri:**

Koenzim Q10'nin hareketli faz ve plazma ortamındaki miktar tayinleri için sistem uygunluk test bulguları (Tablo 4.8. ve Tablo 4.9.'da) verilmiştir.

**Tablo 4.8. Hareketli faz ortamındaki koenzim Q10'un uygunluk çalışması sonuçları**

Enjeksiyon numarası	Alıkonma süresi (dak)	Pik alanı	Teorik plaka sayısı (USP)	Kuyruklanma faktörü (USP)
1	4,551	925,875	7020,054	1,002
2	4,552	926,268	7029,059	1,031
3	4,548	924,859	7024,967	1,017
4	4,516	925,396	7019,926	1,014
5	4,532	926,075	7025,021	1,004
6	4,549	924,845	7014,255	1,038
7	4,547	925,401	7029,259	1,000
8	4,542	925,631	7031,265	1,09
9	4,543	924,894	7035,023	0,989
10	4,545	924,869	7016,804	0,996
<b>Ortalama</b>	4,543	925,411	7024,563	1,018
<b>SS</b>	0,011	0,540	6,710	0,030
<b>%BSS</b>	0,240	0,058	0,096	2,905

**Tablo 4.9. Plazma ortamındaki koenzim Q10'un uygunluk çalışması sonuçları**

Enjeksiyon numarası	Alıkonma süresi (dak)	Pik alanı	Teorik plaka sayısı (USP)	Kuyruklanma faktörü (USP)
1	4,741	468,865	6194,642	1,062
2	4,761	467,923	6204,754	1,105
3	4,758	468,323	6205,981	1,038
4	4,754	468,216	6197,871	1,024
5	4,770	465,824	6211,217	1,067
6	4,766	469,795	6189,947	1,138
7	4,781	469,444	6178,896	0,994
8	4,741	468,959	6214,284	1,090
9	4,769	470,542	6200,745	1,118
10	4,773	468,258	6198,766	1,087
<b>Ortalama</b>	4,761	468,615	6199,710	1,072
<b>SS</b>	0,013	1,274	10,377	0,044
<b>%BSS</b>	0,277	0,272	0,167	4,145

## 4.2. Proniozom Formülasyon Sonuçları

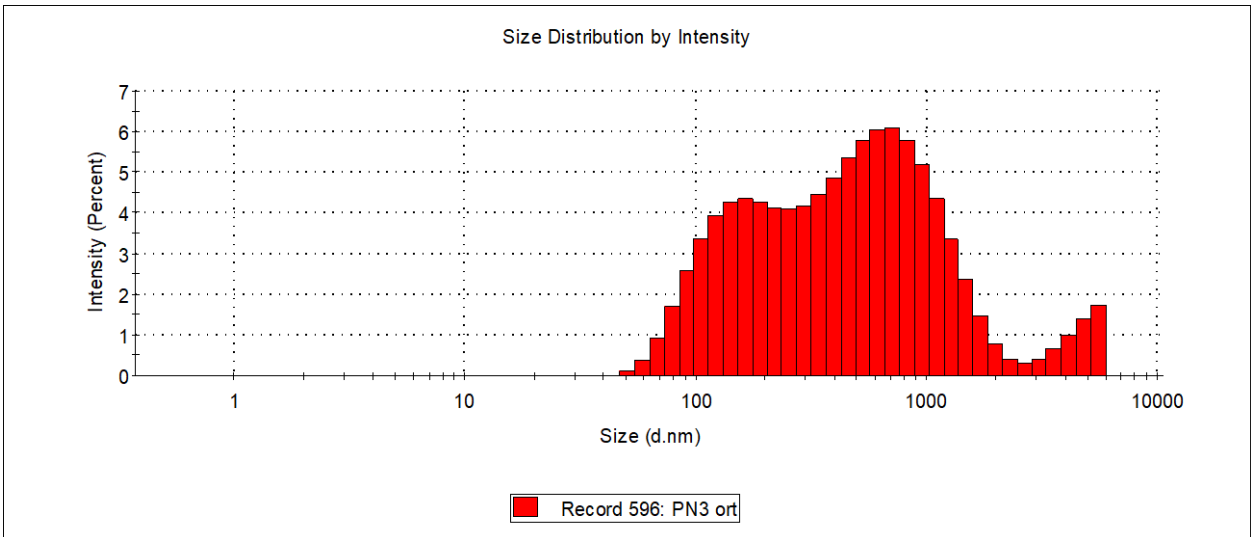
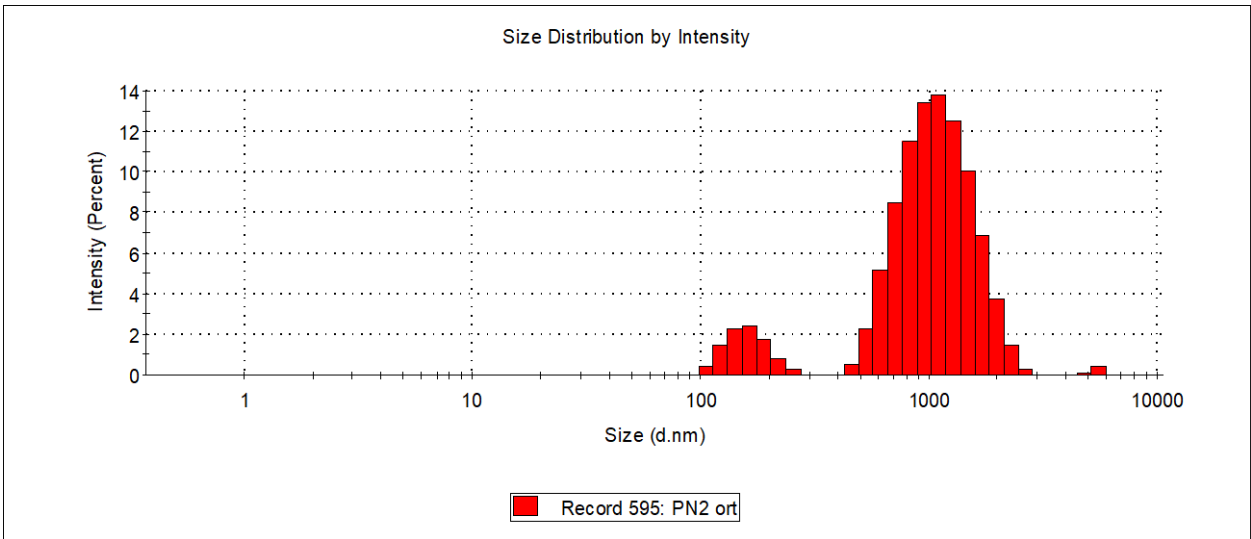
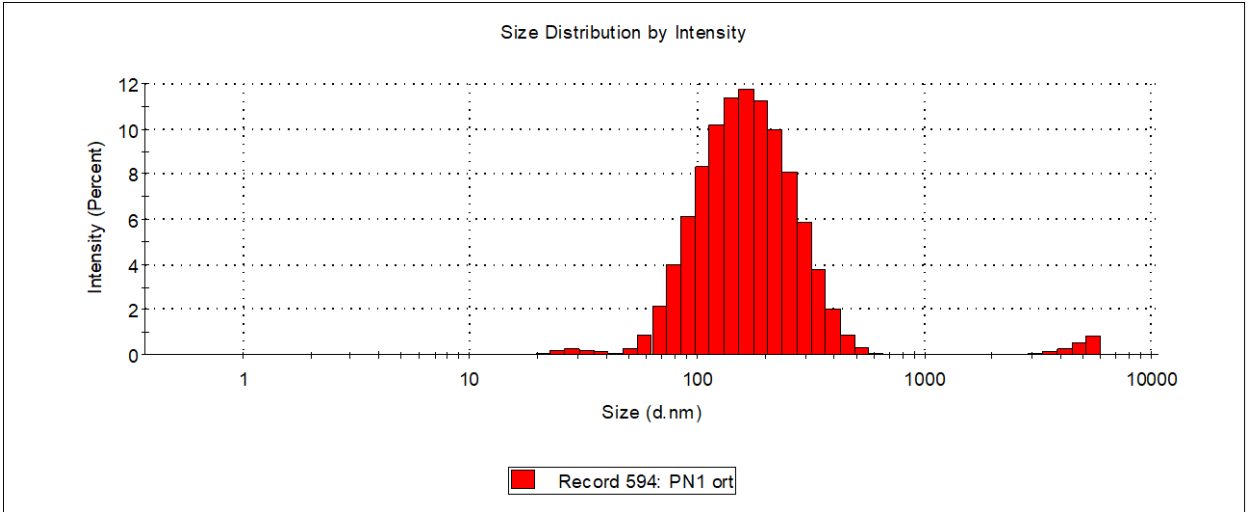
Proniozom formülasyonları bulamaç yöntemine göre hazırlanmıştır. Üretilen tüm formülasyonların karakterizasyon sonuçları (Tablo 4.10.'da) belirtilmiştir.

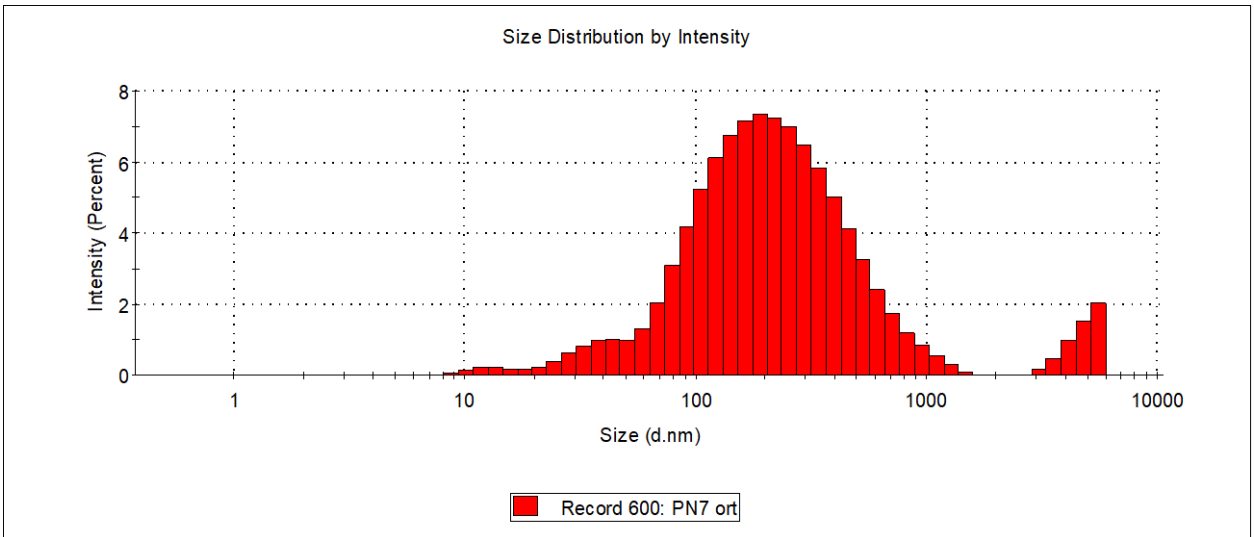
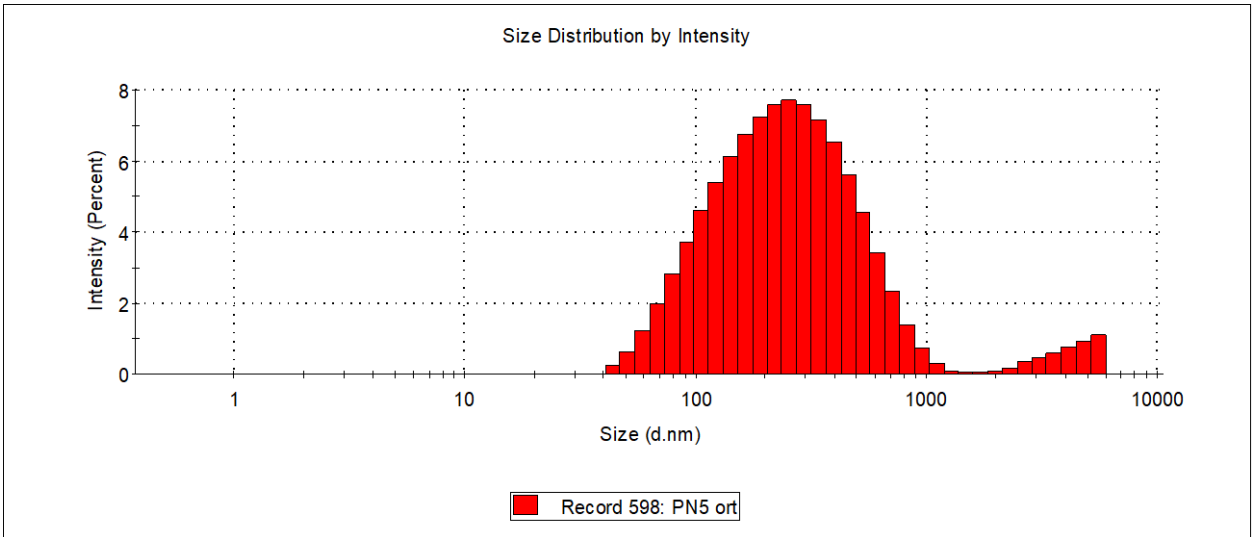
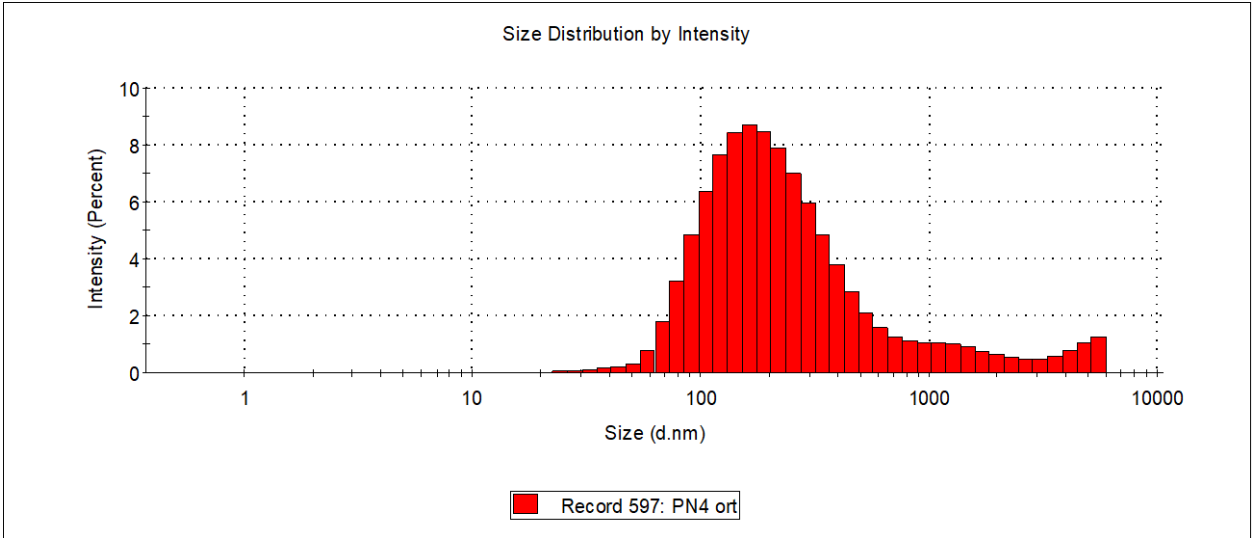
**Tablo 4.10. Formülasyon karakterizasyon sonuçları**

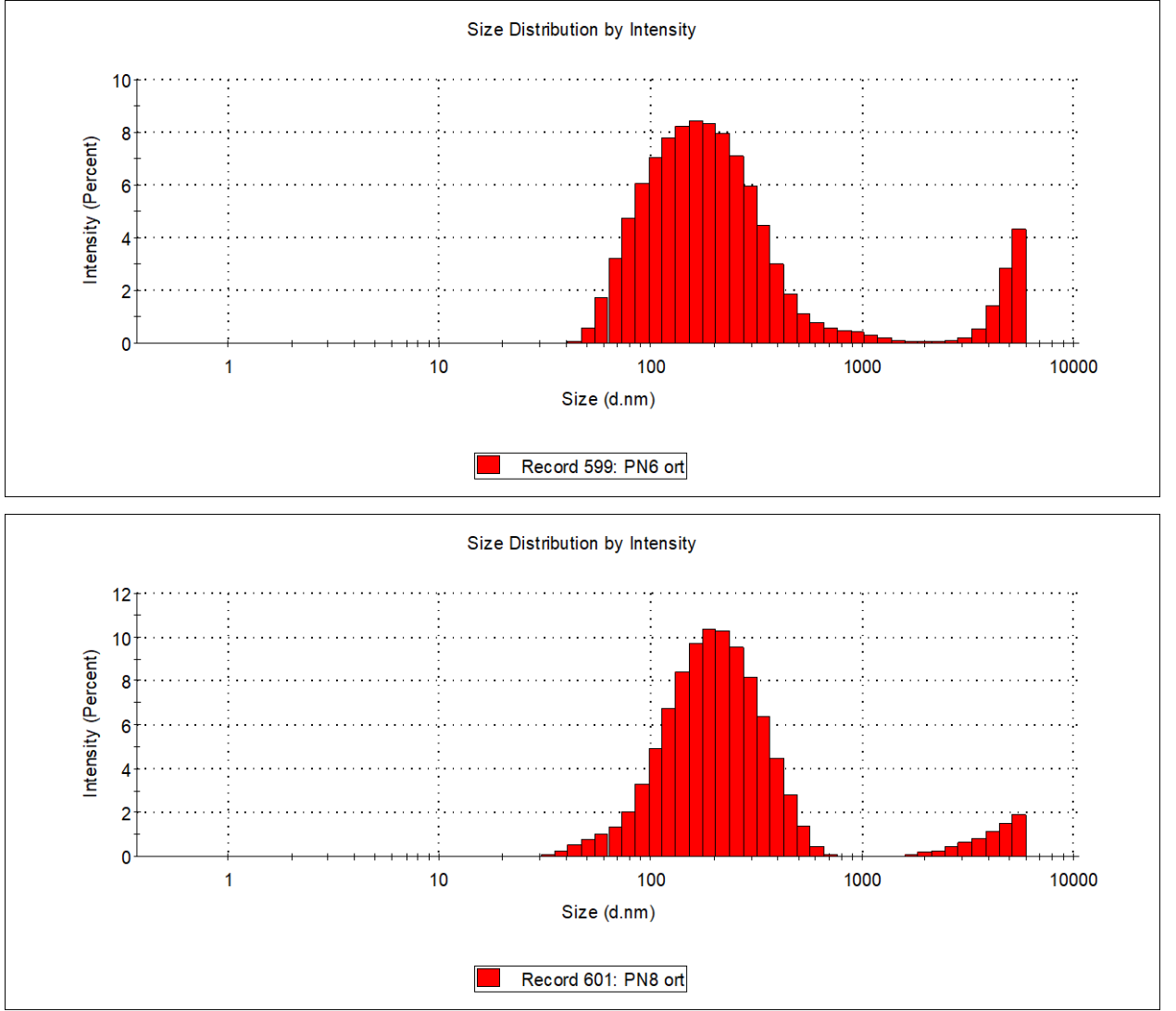
Formülasyon Kodu		PN 1	PN 2	PN 3	PN 4	PN 5	PN 6	PN 7	PN 8
Parametreler									
Bağımsız Faktörler	Taşıyıcı Miktarı (g) (X <sub>1</sub> )	2	1	2	1	2	1	2	1
	Etkin Madde Miktarı (mg) (X <sub>2</sub> )	10	10	5	5	10	10	5	5
	Span 80: Pluronic F127 miktarı (mg) (X <sub>3</sub> )	75:25	75:25	75:25	75:25	50:50	50:50	50:50	50:50
Yamlar	Boyut±SH (nm)	147,2 ±4,416	824,0 ±55,24	305,8 ±7,536	182,6 ±3,812	202,2 ±19,42	187,5 ±16,35	160,9 ±3,425	185,2 ±6,764
	PDI±SH	0,262 ±0,034	0,432 ±0,030	0,595 ±0,136	0,388 ±0,027	0,384 ±0,035	0,517 ±0,166	0,539 ±0,134	0,372 ±0,029
	Zeta Potansiyeli±SH (mV)	-18,7 ±1,46	-18,5 ±2,17	-28,4 ±3,96	-43,1 ±3,82	-42,0 ±1,93	-44,7 ±12,8	-47,9 ±4,35	-48,5 ±3,24
	%YE±SH	92,62 ±0,29	100,00 ±0,00	96,03 ±2,09	98,31 ±0,54	98,25 ±0,84	99,05 ±0,30	96,79 ±1,47	96,22 ±0,15
	%EMİ±SH	0,75 ±0,02	1,46 ±0,02	0,35 ±0,02	0,74 ±0,14	0,82 ±0,04	1,18 ±0,17	0,42 ±0,09	0,81 ±0,10
	%PV	98,16	87,78	96,41	91,13	98,33	90,55	96,94	95,24

PN: Proniozom, YE: Yükleme etkinliği, EMİ: Etkin madde içeriği, PV: Proses verimi

Elde edilen sonuçlara göre PN 6 formülasyonu partikül boyutu, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli, %YE, %EMİ ve proses verimi olarak değerlendirildiğinde en yüksek olarak bulunmuştur.







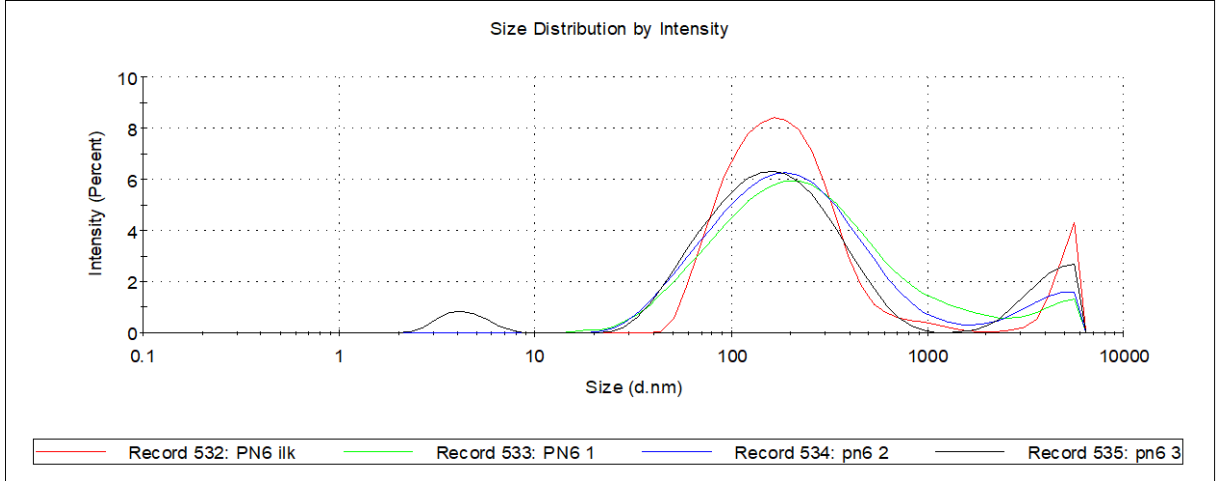
**Şekil 4.10. Proniozom ormülasyonlarının partikül büyüklük dağılımları**

Tekrar edilebilirliği saptamak amacıyla PN6 formülasyonu 3 kez daha üretilmiş olup bunlara ait karakterizasyon sonuçları (Tablo 4.11.'deki) gibidir.

**Tablo 4.11. PN6 Formülasyonunun tekrarlanabilirlik çalışması**

Formül	Boyut±SH (nm)	PDI±SH	Zeta Potansiyeli±SH (mV)	%YE±SH	%EMİ±SH	%PV
PN6-ilk	187,5±16,35	0,517±0,166	-44,7±12,8	99,29052	1,18±0,17	90,55
PN6-1	171,8±35,30	0,391±0,145	-35,5±14,2	98,67±1,14	0,96±0,10	93,00
PN6-2	151,8±8,709	0,421±0,164	-31,2±7,45	98,66±0,54	0,78±0,08	91,97
PN6-3	145,6±13,18	0,410±0,134	-31,8±0,862	98,84±1,07	0,66±0,03	90,39

PN: Proniozom, PDI: Polidispersite indeksi, YE: Yükleme etkinliği, EMİ: Etkin madde içeriği, PV: Proses verimi



Şekil 4.11. PN-6 formülasyonlarının partikül dağılım diyagramları

Formülasyonlar üç faktör iki düzey olarak tasarlanmıştır. Uygulanan MLR analiz sonuçları (Tablo 4.12.'de) verilmiştir. Anlamlı bulunan değerler \* işaretiyle belirtilmiştir.

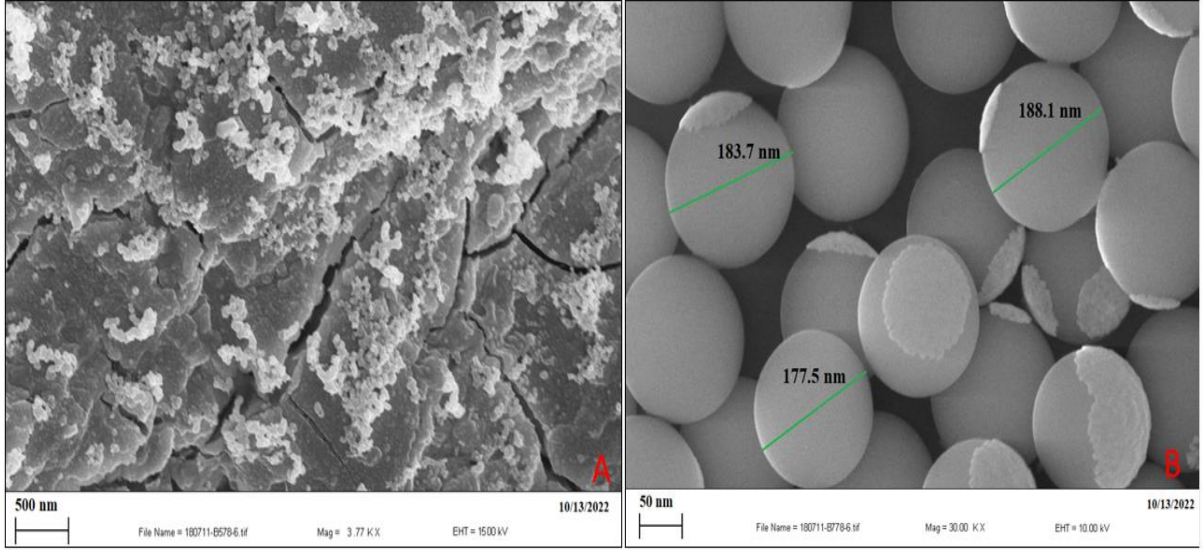
Tablo 4.12. MLR analizinin sonuçları ve varyans analizinden (anova) elde edilen P değeri

Yanıtlar		Arjinin Miktarı (X <sub>1</sub> )	Koenzim Q10 Miktarı (X <sub>2</sub> )	Span80:P F127 (X <sub>3</sub> )	Kesişim	R
Partikül Boyutu	Katsayı	-140,800	26,320	-90,475	469,175	0,6220
	P	0,4451	0,4732	0,3380	0,3048	-
PDI	Katsayı	0,0177	-0,0150	0,0169	0,4879	0,4148
	P	0,8564	0,4622	0,7324	0,0916	
Zeta Potansiyeli	Katsayı	4,4500	2,200	-9,300	-41,050	0,9317
	P	0,3592	0,0623	<b>0,0124*</b>	<b>0,0164*</b>	-
%Proses Verimi	Katsayı	6,285	-0,245	0,9475	84,832	0,9001
	P	<b>0,018*</b>	0,4905	0,3059	0,0000*	-
%Yükleme Etkinliği	Katsayı	-0,4625	0,0945	-0,0087	0,8187	0,9692
	P	<b>0,0053*</b>	<b>0,0049*</b>	0,8451	<b>0,0153*</b>	-
%EMİ	Katsayı	-2,4725	0,1285	0,4187	99,066	0,6246
	P	0,2153	0,7217	0,6444	<b>0,0000*</b>	-

\*p<0,05, PDI: Polidispersite indeksi, EMİ: Etkin madde içeriği

### 4.3. Formülasyonun Görüntülenmesi

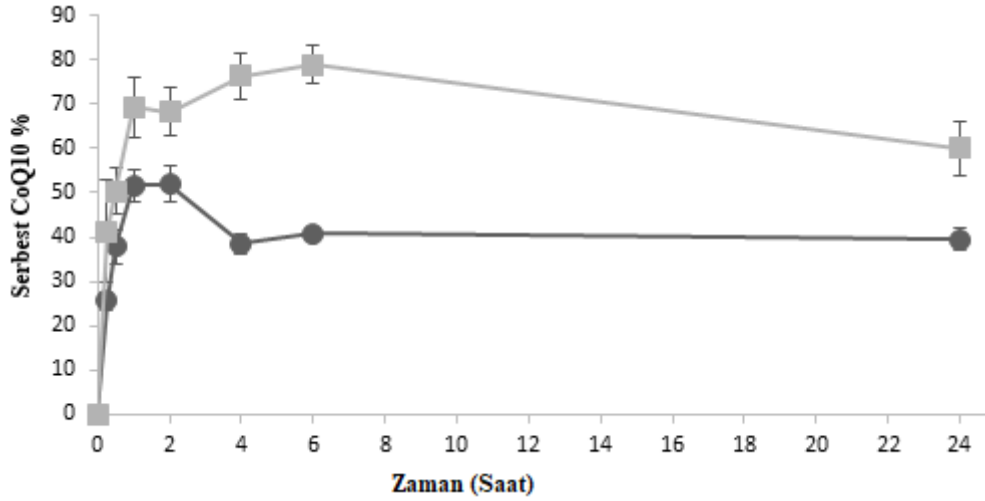
Seçilen proniozom formüllerine ait SEM görüntüleri (Şekil 4.12.'de) verilmiştir.



Şekil 4.12. PN6 proniozom formülasyonları morfolojik değerlendirmeleri (A: 3,77 kV büyütme; B: 30 kV büyütme)

### 4.4. In Vitro Salım Çalışması

Seçilen PN6 formülasyonu ile etkin madde salım çalışması baz alınarak in vitro salım çalışması yapılmıştır ve bu salım sonuçları (Şekil 4.13.'te) verilmiştir.



Şekil 4.13. Koenzim Q10 ve proniozom formülasyonunun etkin madde profil grafiği

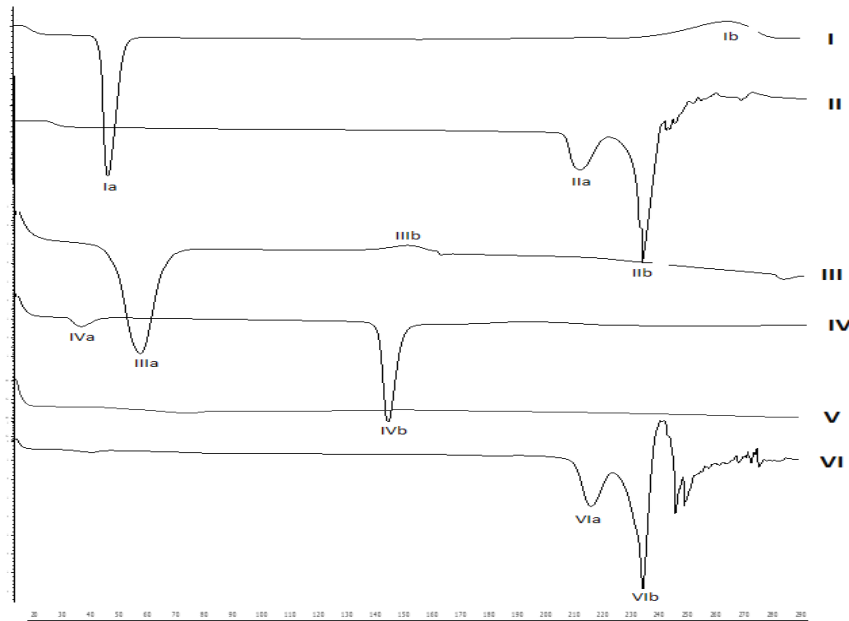
**Tablo 4.13. PN6 formülasyonu için DD-Solver istatistiksel aracını kullanarak elde edilen kinetik sonuçları**

Model	Equation	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Düzeltilmiş	AIC	MSC	n
<b>0.derece kinetik</b>	$F = k_0 * t$	0,4834	0,3801	58,47	-0,9594	-
<b>1.derece kinetik</b>	$F=100*(1-e^{-k1*t})$	0,3618	0,3618	57,95	-0,8850	-
<b>Hixson-Crowell</b>	$F=100*[1-(1-k_{HC}*t)^3]$	0,1684	0,1684	59,81	-1,150	-
<b>Higuchi</b>	$F=kH*t^{0.5}$	0,5069	0,5069	56,15	-0,627	-
<b>Hopfenberg</b>	$F=100*[1-(1-k_{HB}*t)^n]$	0,1857	0,0229	61,66	-1,414	-
<b>Korsmeyer-Peppas</b>	$F=k_{KP}*t^n$	0,9974	0,9961	11,58	3,959	0,375

\*Tüm modellerde F, t zamanında salınan ilacın fraksiyonudur (%), **k0**: sıfır dereceli salım sabiti, **k1**: birinci derece salım sabiti, **kHC**: Hixson-Crowell salım sabiti **kH**: Higuchi salım sabiti, **kHB**: Hopfenberg salım sabiti, **kKP**: ilaç dozaj formunun yapısal ve geometrik özelliklerini içeren salım sabiti, **n**: ilaç salım mekanizmasını gösteren difüzyonel üsteldir.

#### 4.5. Termal Analiz (DSC) Bulguları

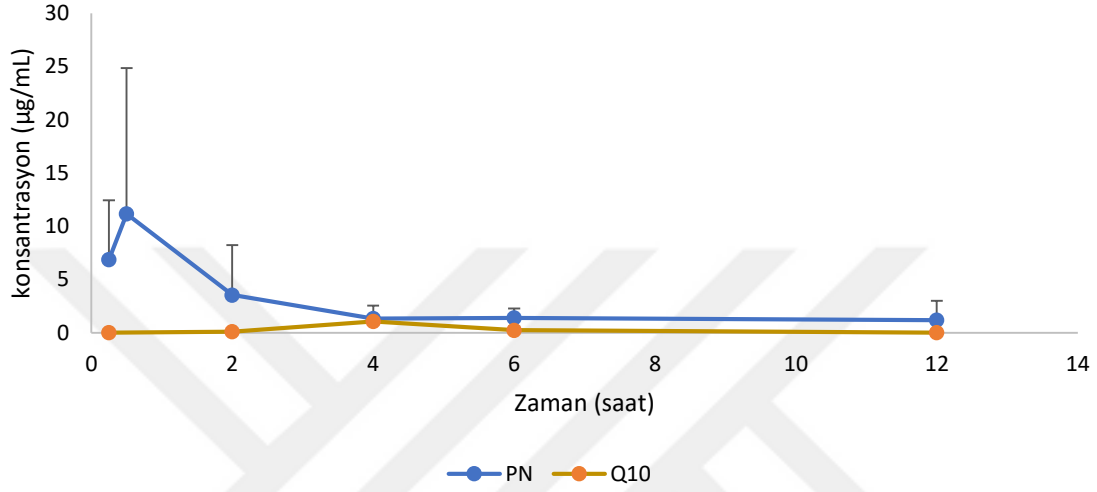
DSC termogramları (Şekil 4.14.'te) belirtilmiştir.



**Şekil 4.14. Koenzim Q10 (I), L-arginin (II), pluronik F127 (III), kolesterol (IV), span 80 (V) ve PN6 formülasyonunun (VI) diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC) termogramları**

#### 4.6. Farmakokinetik Analiz Bulguları

Bölüm 3.9’da belirtildiği şekilde yürütülen farmakokinetik çalışmaların sonuçları (Şekil 4.15 ve Tablo 4.14’te) verilmiştir.



Şekil 4.15. Sıçanlarda proniozom formülasyonu ve koenzim Q10'un plazma profilleri

Tablo 4.14. Saf Q10 ve Q10 yüklü proniozomların oral uygulaması için PK parametreleri

PK Parametreler	Birimi	PN 6-Deneysel	Koenzim Q10-Deneysel
$\lambda z$	1/h	0,0179	0,562
$t_{1/2}$	h	38,8	1,23
$T_{max}$	h	0,5	4
$C_{max}$	µg/ml	11,2	1,07
$AUC_{0-t}$	µg/ml*h	29,5	3,35

## 5.TARTIŞMA

### 5.1. Koenzim Q10'un Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

Koenzim Q10'un etil asetat ve plazma ortamında maksimum absorpsiyon gösterdiği dalga boyu 276 nm olarak belirlenmiştir. Bu değer literatür verileriyle uyumludur. Bu değer belirlendikten sonra belirli konsantrasyonlar hazırlanarak standart doğrular çizilmiştir. Geliştirdiğimiz analitik metodun validasyonu için doğrusallık ve aralığı, doğruluk ve geri elde, kesinlik (tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik), teşhis sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) parametreleri yapılmıştır. Bu parametrelerin değerlendirilmesinde resmi kılavuzlar kullanılmıştır(75-78).

Doğrusallık çalışmalarında ICH kılavuzuna göre minimum 5 noktada ölçüm yapılması gerektiği belirtilmiştir. Ölçümler en az 3 tekrar okutularak standart sapma ve bağıl standart sapmaları hesaplanmıştır (Tablo 4.3. ve Tablo 4.4.). Elde edilen standart doğru denklemlerinin determinasyon katsayıları,  $R^2$  değerleri 0,9990 üzerindedir (79). Bu değerler etil asetat için  $R^2=0,99998$ , plazma için  $R^2=0,999261$  bulunmuştur (Şekil 4.4 ve Şekil 4.9.). Absorbanslardan elde edilen bu veriler ve konsantrasyon değerlerinin güvenilir olduğu anlaşılmıştır.

Doğruluk ve geri elde çalışmaları Bölüm 3.1.7'de açıklandığı gibi yapılmıştır. Bu konsantrasyonların bağıl standart sapmaları hesaplanmıştır. Bu kapsamda etil asetat ortamındaki %BSS'lar sırasıyla 1.76, 1.64, 1.47 bulunurken; plazma ortamında 7.454, 4.367, 2.149 bulunmuştur. %BSS değerleri  $<2\%$  olmalıdır. Biyolojik numuneler için bir limit bulunmamaktadır (75). Sonuçlara bakıldığında yöntemimizin limitler içerisinde olduğu söylenebilmektedir (Tablo 4.5).

Kesinlik kapsamında gün içi ve günler arası ara kesinlik çalışmaları yürütülmüştür. Kılavuzlara göre elde edilen %BSS değerleri  $2\%$ 'nin altında olmalıdır (75). Etil asetat içindeki yöntem bu değerlere uymaktadır. Plazma ortamında ise bu değer  $10-15\%$  değerine kadar çıkması kabul edilmektedir. Plazma ortamında gün içi ve günler arası yapılan kesinlik çalışması sonucunda %BSS sırasıyla  $2,04\%$  ve  $6,03\%$  olarak bulunmuştur. Bu değer de kabul edilir sınırlar içerisinde yer aldığından yöntemlerin kesinliğinden bahsedilebilir (Tablo 4.6.).

Yöntemin teşhis ve tayin sınırları Bölüm 3.1.7.'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre LOD ve LOQ, etil asetat ortamında 0,168 ve 0,326  $\mu\text{g/mL}$ , plazma ortamında 0,321 ve 0,973  $\mu\text{g/mL}$  bulunmuştur (Tablo 4.7.).

FDA ve USP tarafından HPLC analizlerinde sistem uygunluk testleri önerilmektedir. Çalışmamızda etil asetat ve plazma ortamındaki HPLC analizlerinin Teorik plaka sayısı (USP) ve kuyruklanma faktörü (USP) sistem uygunluğu açısından değerlendirilmiştir. Bu testlerin uygun olması için tekrarlı ölçümün %BSS'i<1, teorik plaka sayısı>5000 ve kuyruklanma faktörü<2 olmalıdır (75,78). Elde ettiğimiz tüm sonuçlar limitler içerisinde bulunmuştur (Tablo 4.8., Tablo 4.9.).

Sonuç olarak in vitro ve in vivo ortam için kalibrasyonu ve validasyonu yapılmış yöntem geliştirilmiş, bu yöntem formülasyonun geliştirilmesinde ve in vivo çalışmaların yapılmasında kullanılmıştır.

## **5.2. Proniozomların Hazırlanması ve Karakterizasyonu**

Niozomlar, lipozomlara kıyasla daha yüksek kimyasal ve fiziksel stabiliteye, hidrofilik ve hidrofobik ilaçlar için daha yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahiptir. Niozomlar iyonik olmayan yapısından dolayı daha az toksisite gösterir (39). Proniozomal metot, niozomlarda karşılaşılan sızıntı, füzyon ve agregasyon gibi sorunları çözerek, dozaj, taşıma, depolama ve sterilizasyonu daha verimli bir şekilde gerçekleştirmeyi sağlar. Proniozom tozları genellikle bulamaç ve sprey kaplama yöntemleri olmak üzere iki ana yöntemle üretilir. Bu çalışmada, en yaygın kullanılan bulamaç yöntemi tercih edilmiştir. Bulamaç yöntemi, basit, hızlı, ucuz ve ölçeklendirme açısından uygundur (52,80).

Pluronikler veya poloksamerler, kozmetik ve farmasötik uygulamalarda emülgatör, çözücü ve ıslatıcı olarak kullanılan noniyonik, polioksietilen-polioksipropilen-polioksietilen triblok kopolimerlerdir (81). Çalışmamızda kolesterol yanında stabilite artırılması amacıyla Pluronik F127 (PEO100-PO65-PEO100) (HLB:22) kullanılmıştır (82). Pluronikler Span'lar ile kombine edilerek onların stabilitesini ve permeabilitesini arttırdığı çeşitli çalışmalar mevcuttur. Sakai ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada Pluronic P123 ve Span 65 kombinasyonu ile 4-30 µm büyüklüğünde kendiliğinden oluşan veziküler yapılar elde etmişlerdir (83). Çalışmamıza benzer şekilde de Sousa Garcia ve arkadaşları ilk defa Pluronic F127 (Poloxamer 407) ile Span 80'i kombine ederek veziküller oluşturmuşlardır (84). Çalışmamızda bu yüzey aktif karışımı kullanılarak ilaç yüklü veziküllerin oluşturulması amaçlanmıştır. Ön formülasyonda yapılan deneyler sonucu elde edilen sonuçlar sonucunda Pluronic yüzdesi değiştirilerek etkisi incelenmiştir (Tablo 3.1.).

Proniozomlar, oda sıcaklığında suda kolayca çözünür. Koenzim Q10 yüklü niozomal dispersiyonların hidrodinamik çapı 147,2 ile 824,0 nm arasında değişmektedir. Niozomların

boyutu, lipid membran bileşimi ile ilgilidir. Kolesterol, Pluronik F127 ve Span 80 oranı membran stabilitesini ve boyutunu etkiler (85). Ek olarak, Span 80'in yüksek hidrofobikliği (HLB = 4,3) yüzey serbest enerjisini ve boyutunu azaltır (23). Ancak ne miktarı ne taşıyıcı miktar ne de sürfaktan oranı partikül boyutu üzerinde önemli bir etkiye sahip bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Bu araştırmada, proniozomların Polidispersite İndeksi (PDI)  $<0,7$  olarak bulunmuş, bu da partiküllerin eşit bir dağılıma sahip olduğunu göstermiştir (Tablo 4.10.). Niozom formülasyonlarının temel bileşenleri noniyonik yüzey aktif maddelerdir. Kolesterol, bu yapıların stabilitesini artırır. Özellikle, doymamış oleik asit içeren Span 80 gibi sürfaktanlar kullanıldığında, membranlar son derece akışkan ve esnek olur. Bu nedenle, jel-sıvı faz geçişini engellemek amacıyla kolesterol eklenir (86). Daha önceki literatürlerde sürfaktan/kolesterol ideal oranının olarak 1:1 olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda, sürfaktan çeşitliliği nedeniyle bu oran 1,25 ile 0,85 arasında değişmiştir (87,88), bu da yüksek fiziksel stabiliteye sahip partiküllerin oluşumuna katkıda bulunmuştur. Ancak, bu oran partikül boyutu ve PDI üzerinde önemli bir etki göstermemiştir (Tablo 4.12.) ( $p>0,05$ ).

Niozomların oluşumu, yüzey aktif maddelerin jel-sıvı faz geçiş sıcaklığından ( $T_c$ ) büyük ölçüde etkilenmektedir. Niozom oluşumu bu sıcaklık ve üstünde çalışılmasıyla gerçekleştirilmektedir. Bu sıcaklık, membran stabilitesi, geçirgenliği, akışkanlığı ve enkapsülasyon etkinliğini etkilemektedir. Niozomların oluşumu için belirli bir sıcaklık gerekmektedir. Bu yüzden, proniozomlardan niozom oluşturulurken hidrasyon solüsyonunun sıcaklığı kritik bir öneme sahiptir. Belirli bir sıcaklığın altında, lipid çift katmanlarının geçirgenliği ve ilaç sızıntısı düşük olmaktadır. Bu nedenle, yüksek stabilite ve enkapsülasyon verimliliği elde etmek amacıyla, yüksek  $T_c$  değerine ( $50^\circ\text{C}$ ) sahip Span 60 kullanılmaktadır. Bu,  $50^\circ\text{C}$  üzerindeki sıcaklıklarda çalışılması gerektiğini gösterir (58,89). Çalışmamızda ise, düşük  $T_c$  değerine ( $-12^\circ\text{C}$ ) sahip Span 80 kullanılmıştır, bu sayede niozomlar oda sıcaklığında kolayca oluşabilmektedir. Span 80'in kararsızlığı ve sızıntı sorunları, Pluronik F127 ve kolesterol eklenerek giderilmiş, bu sayede yüksek yükleme verimlilikleri ve zeta potansiyelleri elde edilmiştir. Daha önceki çalışmalarda yardımcı sürfaktan olarak Tween 80 ve kolesterol oranları değiştirilerek stabilite ve enkapsülasyon etkinliği artırılmıştır (90).

Niozom içerik bileşimi zeta potansiyeli üzerinde önemli bir etkiye sahiptir ( $p<0,05$ ). Proniozomların zeta potansiyeli  $-18.5$  ile  $-48.5$  mV arasında değişmektedir. Elde edilen zeta potansiyel değerleri,  $-10$  ila  $+10$  mV arasındaysa nötr olarak sınıflandırılırken,  $-30$  ila  $+30$  mV arasındaysa güçlü anyonik veya katyonik olarak sınıflandırılır; bu da füzyona karşı iyi bir stabilite ve zamanla birleşmeme anlamına gelir. Formülasyon grubunda, Span 80:PF127 oranı

ve arttıkça zeta potansiyelin de arttığı görülmüştür ( $p<0,05$ ). Bu artış, niozomal formülasyonların HLB (hidrofil-lipofil dengesi) değerlerinin değişmesiyle ilişkilendirilebilir. Yüksek Span80: Pluronik F127 oranı (HLB: 7,94), düşük orana (HLB: 13,5) kıyasla formülasyonlara iyi bir stabilite sağlar. Niozomlar çift tabakalı bir yapı oluşturmaktadır. Kolesterol, yapısal olarak katı bir lipit olduğu için niozomun çift katmanlı yapısındaki boşlukları doldurur ve amfifilik yapıyı destekler. Bu formülasyon serisinde, kolesterol miktarı sabit tutulmuştur. Bu, kolesterolün çift tabakalı membran arasındaki boşlukları doldurarak stabiliteyi artırmasıyla açıklanabilir. Taşıyıcı olarak kullanılan katyonik bir amino asit olan L- arjinin, suda çözünür fakat partiküllerin yüzey yükünü etkilememiştir ya etkisi ihmal edilmektedir. Yükleme etkinliği incelendiğinde, taşıyıcı miktarı arttıkça %yükleme etkinliğinin azaldığı görülmektedir. Bu durum, kütledeki artışa göre ilaç oranının azalmasından kaynaklanır (Tablo 4.10.).

Abu-Taleb ve arkadaşları, farklı Span çeşitleri (Span 20, Span 60, Span 80, Span 85) kullanarak niozomlar üretmiş ve Span 80'in yapısındaki doymamış alkil zincirlerin yol açtığı artmış geçirgenliğe bağlı olarak düşük yükleme etkinliği elde edilmiştir (91). Bu sebeple, araştırmamızda kolesterol oranını değiştirerek ve Pluronik F127 stabilizatörünü ekleyerek ilaç yükleme etkinliğini arttırdık. Taşıyıcı miktarı arttıkça, proses verimliliği de anlamlı ölçüde yükselmektedir ( $p<0,05$ ). Elde edilen in-vitro karakterizasyon çalışmalarına göre enkapsülasyon etkinliği, yükleme etkinliği, partikül boyutu ve polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli sonuçlarına göre en iyi bulunduğu için PN6 formülasyonu seçilmiş ve in vivo çalışmalarına bu formülle devam edilmiştir. Formülasyonun tekrarlanabilirlik çalışmaları kapsamında belirtildiği gibi üç kere üretimi yapılarak karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu kapsamda partikül büyüklük ve dağılımı, enkapsülasyon etkinliği, proses verimi benzer bulunmuştur. Buna karşılık zeta potansiyelinde benzer sonuçlar elde edilememiştir. Bu durum kolesterol ve PF127'in niozom çeper üzerindeki stabil olmayan dağılımıyla ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

### **5.3. In Vitro Salım Çalışmalarının Değerlendirilmesi**

Optimum formülasyondan (PN6) koenzim Q10 salınımı, sink koşulunu sağlamak için PBS (pH 7.4): Asetonitril: Tween 80 (73:25:2, h/h/h) ortamında yapılmıştır (7). Koenzim Q10'un proniozomlara kıyasla daha yavaş salınım göstermesi, bu bileşenin yüksek lipofilikliğinden ( $\text{LogP}=21$ ) kaynaklanmaktadır. Ancak, koenzim Q10'un proniozomal sistemlere dahil edilmesiyle salım hızı önemli ölçüde artmıştır (Şekil 4.13.) ( $f_2=31,82$ ). Bu durum, niozomal

enkapsülasyonun ilacın salım hızını artırma konusunda etkili olduğunu göstermektedir. Liu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, Span 80'in koenzim Q10'un çözünürlüğünü ve çözünme hızını artırdığı gösterilmiştir (92). Span 80 ile kullanılan Pluronik F127'nin de çözünme hızını artırdığı düşünülmektedir. Pluronik F127'deki PEO zincirleri, yüzey gerilimini düşürerek ilaç salım hızını artırır. Bunun nedeni ise PEO zincirleri arttıkça, su yük kapasitesi ve böylece salınım hızının artmasıdır (93).

Ek olarak, arjinin, çözünürlüğü düşük ilaçlarla hidrotropik kompleks oluşturduğu için çözünürlük artırıcı olarak etki gösterdiği düşünülmektedir. Bazı bildirilen çalışmalarda, arginin indometazin (94), curcumin (95), simvastatin (96,97) gibi çeşitli maddeler ile kompleks yaparak çözünürlük ve çözünme hızını önemli ölçüde arttırmıştır. Taşıyıcı olarak kullanılan L-arjininin çalışmamızda çözünürlük hızındaki artışta etkisi olduğu düşünülmektedir.

İlaç salım çalışmasında, bazı zaman noktalarında uygun olmayan dalgalanmalar mevcuttur. Çalışmamızda, bu dalgalanmanın, toz içinde ilacın homojen olmayan dağılımı ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Salım çalışmasında mikro santrifüj yöntemi kullanılmıştır: her zaman noktası için aynı miktarda ilaç içeren tozlar, bir dizi eppendorf tüpüne eklenir, belirli bir süre sonra bir eppendorf tüpü çıkarılır, tüp santrifüj edilir ve çözünmemiş partiküller ayrılır ve çözünen miktar ölçülür. Bu çalışmada artan salım hızı; niozomlara enkapsülasyon, yüzey aktif maddelerle artmış çözünürlük, arjininin çözünürlüğü artırma etkisi, ilacın amorf hale dönüşümü, ıslanabilirliğinin ve dağılılırlığının artması gibi çeşitli faktörlerden etkilenmiş olabileceği düşünülmektedir.

PN6 formülasyonunun zaman içindeki ilaç salım yüzdesi, DDSolver yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir. Çözünme hızının değerlendirilmesinde determinasyon katsayısı ( $R_{sq}$ ,  $R^2$ , düzeltilmiş determinasyon katsayısı ( $R_{sq\_adj}$ / $R^2_{adjusted}$ ), Akaike Bilgi Kriteri (AIC) ve Model Seçim Kriteri (MSC) parametreleri kullanılmıştır. Akaike Bilgi Kriteri, modelin uygunluğunu değerlendirmede kullanılır ve düşük AIC değeri, modelin daha iyi olduğunu gösterir. MSC, 2 veya 3'ten yüksek bir değer alırsa, modelin uygun olduğuna dair kanıtlar sunar (72,73). Bu değerlendirme, en yüksek  $R^2$ , düzeltilmiş  $R^2$  ve MSC değerleri ile en düşük AIC değerlerine dayanarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, proniozomlar Korsmeyer-Peppas salım kinetiğine uygun davranmaktadır. Bu kinetiğe uygunluk gösterildikten sonra incelenen n değerleri, koenzim Q10'un difüzyon kontrolü altında salındığını göstermektedir, çünkü  $n < 0,43$  ( $n=0,375$ ) olarak bulunmuştur. Ritger ve Peppas, n değeri  $0,3 \pm 0,1$  civarında olan küresel partiküllerin Fickian difüzyon gösterdiğini belirtmişlerdir (Tablo 4.13.) (98).

#### **5.4. Termal Analiz (DSC) Bulgularının Değerlendirilmesi**

Proniozomların termogramları (Şekil 4.14'te) gösterilmiştir. DSC grafiklerinin incelenmesi sonucunda, koenzim Q10'un termogramlarındaki 53°C'de yer alan keskin endotermik pikin (Ia) erime noktası olduğu görülmektedir. Ayrıca, 273°C'de tespit edilen geniş ekzotermik pik (Ib), bazı kimyasal bağların kopması, yapısal değişiklikler veya polisakkarit zincirlerinin bozulması gibi nedenlerle ortaya çıkabilir. DSC termogramları, L-arjinin'in 216.0°C (IIa) ve 240.0°C (IIb) olmak üzere iki ayrı endotermik pik gösterdiğini belirtmektedir. L-arjinin bu sıcaklıktan sonra bozulmaya başlar ve bu bulgular literatürdeki verilerle uyumlu durumdadır (81,99). Pluronik F127 ve kolesterolün termogramı, erimeye bağlı keskin bir endotermik pik (IIIa) göstermektedir ve bu değerler de literatürle uyumludur (99,100).

Span 80, 20-300°C aralığında düzensiz bir sıvı kristal yapıda bulunur ve düşük geçiş sıcaklığı ( $T_c = -12^\circ\text{C}$ ) gösterir, bu sebeple anlamlı bir pik gözlemlenmemiştir (54). PN6 formülasyonunda, koenzim Q10, Pluronik F127 ve kolesterolün karakteristik keskin pikleri kaybolmuş, sadece taşıyıcı ve miktarca yüksek olan L-arjinin'in pikleri görülmüştür. Bu durum, Koenzim Q10'un niozom formülasyonuna etkin bir şekilde yüklenip amorf bir yapı kazandığını gösterir. Bu durum aynı zamanda kristal koenzim Q10'un amorf hale geldiğini ve bu sebeple çözünme hızının artmasının da nedeni olabileceğini bizlere göstermektedir.

#### **5.5. Proniozomun Morfolojik Değerlendirilmesi**

SEM, katı dispersiyonların yüzey morfolojisi hakkında bilgi sağlar ve özellikle formülasyon hazırlığı sırasında maddenin ve polimerin yüzey özelliklerindeki değişiklikler incelenebilir. Elde edilen görüntülere göre, arginin kullanımı ile küresel niozomlar elde edildiği söylenebilir (101). Görüntüler 30000 ve 3000 büyütme oranında incelenmiştir. Aynı zamanda, moleküler afiniteleri nedeniyle argininin niozom yüzeyinde toplanabileceği de gözlemlenmiştir (102, 103). Ayrıca, elde edilen partikül boyutu, DLS sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur. Yüzey aktif madde ile kaplanmış arjinin proniozomlarında da küresel şekil gözlemlenmiştir (Şekil 4.12.).

#### **5.6. Farmakokinetik Analiz**

Koenzim Q10, bir antioksidan olarak, memelilerde her hücrede doğal olarak bulunan ve endojen olarak mevalonat yolu aracılığıyla tek lipid şeklinde üretilen bir maddedir. Ancak, insanlar yaşlandıkça, vücutlarının koenzim Q10 üretimi doğal olarak azalır. Eksojen takviyeler, bu düşük koenzim Q10 düzeylerini artırmanın etkili bir yoludur (104). Fakat düşük biyoyararlanım eksojen uygulamasını kısıtlayan en büyük dezavantajdır. Endojen maddelerle

yapılan biyoyararlanım çalışmaları sırasında en önemli konu, yaş, cinsiyet, diyet, gece ve gündüz saatlere bağlı maddenin bazal değerlerinin belirlenmesidir. Araştırmadan önce, bazal konsantrasyon ve potansiyel değişkenler belirlenmelidir (105). Bu çalışmada her bir sıçan için başlangıç konsantrasyon değeri belirlenmiş ve tavsiye edildiği gibi daha sonra ölçülen değerlerden çıkarılmıştır (79).

Plazma koenzim Q10 konsantrasyon-zaman eğrisi ve farmakokinetik parametreler, bölümde açıklandığı şekilde yapılmış ve sonuçlar (Şekil 4.15 ve Tablo 4.14'te) gösterilmektedir; her grup için sadece 3 sıçan (PM=formülasyon; C=Kontrol), koenzim Q10 hesaplamaları yapıldıktan sonra veri analizi için uygun bir profil göstermiştir. Bu tek profiller karşılaştırma için birleştirilmiş ve ortalaması alınmıştır. Çıkarılan değerler ortalama istatistik olarak sapan değerlerdir. Proniozomlar, referans koenzim Q10'a kıyasla daha yüksek maksimum plazma konsantrasyonu (11,2'ye karşı 1,07 µg/ml) ve daha yüksek EAA (29,5'e karşı 3,35 µg/ml\*sa) göstermiştir. Koenzim Q10'un yarı ömrü, bifazik plazma profili nedeniyle yanıtıcı olabilir; eğim aşağı profilinin sadece başlangıç kısmı göz önünde bulundurulduğunda, proniozomların yarı ömrü koenzim Q10 ile benzerdir. Koenzim Q10 formülasyonunun farmakokinetik parametreleri (Tablo 4.14.) belirtilmiştir.

Proniozomlar aracılığıyla koenzim Q10 biyoyararlanım artışında bir veya birden fazla mekanizmanın etkili olabileceği düşünülmektedir. Bunlar arasında, yüzey aktif madde özelliklerinin, hücre zarının hidrofobik alanına daha iyi partiyon olasılığı sağlayarak arayüzey engelini azaltması ve epitelyal hücre zarı ile temas izni vermesi sonucunda koenzim Q10'un hücre zarının hidrofobik alanına daha iyi dağılımı yer alabilir; GI zarı üzerinden emilimi düzenleyen Peyer plaklarındaki endositoz ve/veya M hücreleri ile alımın artışı; niozomların doğrudan füzyon yoluyla ve/veya L-arjinin tarafından kolaylaştırılmış absorpsiyon ile alımının artışı söz konusu olabilmektedir. Bunun yanısıra L-arjininin hücresel alımı arttığı da düşünülmektedir. Arjininin daha önce yapılan çalışmalarda hücresel alımı (106-108) ve biyoyararlanımı (109,110) arttırdığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak; Çalışmamızda elde edilen verilere göre; bulamaç yöntemi ile optimum partikül boyutu, enkapsülasyon etkinliği ve ilaç salım özelliklerine sahip koenzim Q10 yüklü proniozomlar üretilmiştir. Arjinin, formülasyonu geliştirme sırasında başarıyla bir taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Hazırlanan formülasyonlar, saf ilaca kıyasla üstün farmakokinetik etki göstermiştir. Biyoyararlanımın bu artışında, sadece sürfaktan tarafından çözündürme etkili olmayıp, aynı zamanda arjinin tarafından hücresel alımı kolaylaştırması da etkili olmuştur.

Buna göre, geliştirilen arjinin taşıyıcı bazlı proniozom formülasyonu, koenzim Q10'un biyoyararlanımını ve terapötik aktivitesini iyileştirmek için kullanılabilir.



## KAYNAKLAR

- 1.Ashara K, Paun JS, Soniwala MM, Chavda JR, Nathawanı SV, Morı NM, et al. Vesicular drug delivery systems. *Mintage J Pharm Med Sci* 2014;1-14.
- 2.Jadhav SM, Morey P, Karpe M, Kadam V. Novel vesicular system. *J Appl Pharm Sci* 2011;02 (01):193-202.
- 3.Radha GV, Rani TS, Sarvani B. Proniosomal drug delivery system for targeted drug action. *J Basic Clin Pharm* 2013;4(2):42-8.
- 4.Kapoor B, Gupta R, Gulati M, Singh SK, Khursheed R, Gupta M. The Why, where, who, how, and what of the vesicular delivery systems. *Adv Colloid Interface Sci* 2019;271:101985.
- 5.Cevc G, Blume G, Schätzlein A. Transfersomes mediated transepidermal delivery improves the regio specificity and biological activity of corticosteroids in vivo. *J Controll Release* 1997;45(3) 211–26.
- 6.Özbay HS. Koenzim Q10 nefropatisinde koenzim Q10 içerikli nanoterapötiklerin tedavi etkinliğinin araştırılması ve in vitro modelde mitokondiriyal fonksiyonların Karşılaştırılması (Tez). Ankara: Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü;2022.
- 7.Çelik BB, Asram A, Sağıroğlu AA, Özdemir S. Design, optimization and characterization of coenzyme Q10- and D-panthenyl triacetate-loaded liposomes. *Int J Nanomed* 2017;12:4869–78.
- 8.Oral M. Oral Yolla verilif için kandesartan sileksetil içeren proniozomların hazırlanması: formülasyon parametreleri ve etkin madde salımının değerlendirilmesi (Tez). Ankara: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü;2010.
- 9.Karagöz D. Liposomes encapsulating cosmetic raw materials (tez). İstanbul: Bođaziçi Üniversitesi;2017.
- 10.Güler C. Study of new age liposomes: transethosomes (tez). İstanbul: Bođaziçi Üniversitesi;2019.
- 11.Handhani-Vila RM, Ribier A, Rondot B, Vanlerberghie G. Dispersions of lamellar phases of non-ionic lipits in cosmetic products. *Int J Cosmet Sci* 1979;1:303-14.
- 12.Yeo PL, Lim CL, Chye SM, Ling APK, Koh RY. Niosomes of their structure, properties, methods of preparation, and medical applications. *Asian Biomedicine* 2017;11:301-14.
- 13.Shah MR, Imran M, Ullah S. Niosomal drug delivery Lipit-based nanocarriers for drug delivery and diagnosis in In Micro and Nano Technologies. William Andrew Publishing; 2017.P317-342.
- 14.Şahin, NÖ. Niosomes as Nanocarrier Systems. In: *Nanomaterials and Nanosystems for Biomedical Applications*. Springer, Dordrecht;2007.P67-81.

15. Li Z, Li W, Zeng S, Ge H, Lu C, Wu L, et al. Proniosome derived niosomes for tacrolimus topical ocular delivery: in vitro cornea permeation, ocular irritation, and in vivo anti-allograft rejection. *Eur J Pharm Sci* 2014;62:115–123.
16. Basiri L, Rajabzadeh G, Bostan A. A-Tocopherol-loaded niosome prepared by heating method and its release behaviour. *Food Chem* 2017;221:620–628.
17. Devaraj GN, Parakh SR, Devraj R, Apte SS, Rao, Rambhau D. Release studies on niosomes containing fatty alcohols as bilayer stabilizers instead of cholesterol. *J Colloid Interface Sci.* 2002;251:360–5.
18. Mahale NB, Thakkar PD, Mali RG, Walunj DR, Chaudhari SR. Niosomes: novel sustained release nonionic stable vesicular systems. *Colloid Interface Sci* 2012;183-184:46-54.
19. Balakrishnan P, Shanmugam S, Lee WS, Lee WM, Kim JO, Oh DH, et al. Formulation and in vitro assessment of minoxidil niosomes for enhanced skin delivery. *Int J Pharm* 2009;377:1-8. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.04.020.
20. Girigoswami A, Das S, De S. Fluorescence and dynamic light scattering studies of niosomes-membrane mimetic systems, *Spectrochim Acta* 2006;64:859-66.
21. Mullaicharam AR, Murthy RSR. Lung accumulation of niosome entrapped gentamicin sulfate follows intravenous and intratracheal administration in rats. *J Drug Deliv Sci Technol* 2006;16:109–113.
22. Shaker DS, Shaker MA, Hanafy MS. Cellular uptake, cytotoxicity and in-vivo evaluation of Tamoxifen citrate loaded niosomes. *Int J Pharm* 2015;493:285–294.
23. Ruckmani K, Jayakar B, Ghosal SK. Nonionic surfactant vesicles (niosomes) of cytarabine hydrochloride for effective treatment of leukemias: encapsulation, storage, and in vitro release. *Drug Dev Ind Pharm.* 2000;26:217-22.
24. Elhissi A, Hidayat K, Phoenix DA, Mwesigwa E, Crean S, Ahmed W, et al. Air-jet and vibrating-mesh nebulization of niosomes generated using a particulate-based proniosome technology. *Int J Pharm* 2013;444:193–9.
25. Moghassemi S, Hadjizadeh A. Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems. *J Controll Release* 2014;185:22–36.
26. Manosroia A, Jantrawuta P, Manosroia J. Anti-inflammatory activity of gel containing novel elastic niosomes entrapped with diclofenac diethylammonium. *Int J Pharm* 2008;360:156–63.
27. Manosroi A, Chankhampan C, Manosroi W, Manosroi J. Transdermal absorption enhancement of papain loaded in elastic niosomes incorporated in gel for scar treatment. *Eur J Pharm Sci* 2013;48:474–83.
28. Abdelkader H, Ismail S, Kamal A, Alany RG. Design and evaluation of controlled- release niosomes and discomes for naltrexone hydrochloride ocular delivery. *J Pharm Sci* 2011;100:1833–46.

29. Abdelkader H, Wu Z, Al-Kassas R, Alany RG. Niosomes and discomes for ocular delivery of naltrexone hydrochloride: morphological, rheological, spreading properties and photo-protective effects. *Int J Pharm* 2012;433:142–8.
30. Paolino D, Cosco D, Muzzalupo R, Trapasso E, Picci E, Fresta M. Innovative bola-surfactant niosomes as topical delivery systems of 5-fluorouracil for the treatment of skin cancer. *Int J Pharm* 2008;353:233–42.
31. Saini N, Sodhi RK, Bajaj L, Pandey RS, Jain UK, Katare OP, et. al. Intravaginal administration of metformin hydrochloride loaded cationic niosomes amalgamated with thermosensitive gel for the treatment of polycystic ovary syndrome: In vitro and in vivo studies. *Colloid Surf B* 2016;144:161–9.
32. Gopinath D, Ravi D, Rao BR, Apte SS, Renuka DD, Rambhau D. Ascorbyl palmitate vesicles (Aspasomes): formation, characterization and applications. *Int J Pharm* 2004;271:95–113.
33. Jadhav KR, Pawar AY, Bachhav AA, Ahire SA. Proniosome: a novel non-ionic provesicules as potential drug carrier. *Asian Journal of Pharmaceutics* 2016;10:1-10.
34. Mokhtar M, Shehata T. The enhancement of transdermal permeability of water soluble drug by niosome-emulgel combination. *J Drug Deliv Sci Technology*.2012;22:353-9. doi:10.1016/S1773-2247(12)50059-6.
35. Patel A, Ketkar S, Patil S, Fearnley J, Mahadik KR, Paradkar AR. Potentiating antimicrobial effect of propolis through niosomal-based system for administration. *Integr Med Res* 2015;4:94–101.
36. Hofland HEJ, Bouwstra JA, Ponec M, Bodde HE, Spies F, Verhoef JC, et al. Interactions of non-ionic surfactant vesicles with cultured keratinocytes and human skin in vitro: a survey of toxicological aspects and ultrastructural changes in stratum corneum. *J Control Rel* 1991;16:155–168.
37. Solanki A, Parikh J, Parikh R. Preparation, characterization, optimization, and stability studies of aceclofenac proniosomes. *Iran J Pharm Res*. 2008;7:237-246.
38. Thomas L, Viswanad V. Formulation and optimization of clotrimazole-loaded proniosomal gel using 3 factorial design. *Sci Pharm* 2012;80:731-748.
39. Yasam VR, Jakki SL, Natarajan J, Kuppusamy G. Novel vesicular drug delivery: proniosomes. *Drug Deliv* 2014;21:243-9.
40. Nadir Dereli N, Bayındır ZS. Prolipozom teknolojisindeki güncel gelişmeler ve uygulamalar. *Ankara Ecz Fak Derg* 2020;44:308-333.
41. Tunsirikongkon A, Pyo YC, Kim DH, Lee SE, Park JS. Optimization of polyarginine-conjugated PEG lipid grafted proliposome formulation for enhanced cellular association of a protein. *Drug Pharm* 2019;11:272

42. Contin M, Bonelli P, Lucangioli S, Cukierman A, Tripodi V. Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymernanoparticles for coenzyme Q10 dispersive micro solid phase extraction. *J Chromatogr A*. 2016;1456:1–9.
43. Shaji J, Bhatia, V. Proliposomes delivery system. *Int J Pharm Biosci* 2013;4:150-160.
44. Nekkanti V, Venkatesan N, Betageri G. Proliposomes for oral delivery: progress and challenges. *Curr Pharm Biotechnol* 2015;16:303-312.
45. Elbary A, El-Lağthy HM, Tadros M. Sucrose stearate-based proniosome-derived niosomes for the nebulisable delivery of cromolyn sodium. *Int J Pharm* 2008;357:189-198.
46. Fang JY, Yu SY, Wu PC, Huang YB, Tsai YH. In vitro skin permeation of estradiol from various proniosome formulations. *Int J Pharm* 2001;215:91-99.
47. Gupta A, Prajapati S, Singh M, Balamurugan M. Proniosomal powder of captopril: formulation and evaluation. *Mol Pharm* 2007;4:596-599.
48. Almira I, Welsh B, Rhodes DG. SEM Imaging predicts quality of niosomes from maltodextrin based proniosomes. *Pharm Res* 2001;18:5.
49. Sudhamani T, Priyadarisini N, Radhakrishnan M. Proniosomes: A promising drug carriers. *Int J Pharm Tech Res* 2010;ISSN:0974-4304.
50. Solanki AB, Parikh JR, Parikh RH. Formulation and optimization of piroxicam proniosomes by 3 factor 3 level box behnken design. *AAPS Pharm Sci Tech* 2007;8:E86.
51. Hu C, Rhodes DG. Proniosomes: a novel drug carrier preparation. *Int J Pharm* 1999;185:23–35.
52. Toshimitsu Y, Florence AT. Vesicle (niosome) in water in oil (v/w/o) emulsions an in vitro study. *Int J Pharm* 1994;108:117-23.
53. Sankar V, Ruckmani K, Durga S, Jailani S. Proniosomes as drug carriers. *Pak J Pharm Sci* 2010;23:103-107.
54. Mokhtar M, Sammour O, Hammad M, Megrab N. Effect of some formulation parameters on flurbiprofen encapsulation and release rates of niosomes prepared from proniosomes. *Int J Pharm* 2008;361:104-11.
55. Leekumjorn S. Synthesis and characterization of potential drug delivery systems using nonionic surfactant “niosome” (dissertation). Tampa: University of South Florida; 2004.
56. Chandra A, Sharma PK. Proniosome based drug delivery system of piroxicam. *Afr J Pharm* 2008;2:184-190.
57. Chintankumar JT, Chetan HB, Ashok HB, Rakesh PP, Tamizharaasi S, Sureja KD, et al. Formulation and evaluation of aceclofenac loaded maltodextrin mased proniosome. *Int J Chem Tech Res* 2009;1:567-73.

58. Shruthi PA, Pushpadass HA, Franklin MEE, Battula SN, Laxmana Naik N. Resveratrol-loaded proniosomes: formulation, characterization and fortification. *Lwt.* 2020;134:110-127.
59. Andreani C, Bartolacci C, Guescini M, Battistelli M, Stocchi V, Orlando F, et al. Combination of coenzyme Q10 intake and moderate physical activity counteracts mitochondrial dysfunctions in a SAMP8 mouse model. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:8936251.
60. Littarru GP, Tiano L. Clinical aspects of coenzyme Q10: an update. *Nutrition.* 2010;26:250-4.
61. Kalen A, Appelkvist EL, Dallner G. Age-related changes in the lipid compositions of rat and human tissues. *Lipids* 1989;24:579-84.
62. Zaki NM. Strategies for oral delivery and mitochondrial targeting of CoQ10. *Drug delivery.* 2016;23:1868-81. doi:10.3109/10717544.2014.993747.
63. Gurkan-Alp AS, Bozdağ-Dündar O. Coenzyme q10: koenzim q10. *Ankara Universitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi.* 2005;34:001-27. doi:10.1501/Eczfak\_0000000022.
64. Langsjoen PH, Langsjoen AM. Clinical use of HMG CoA reductase inhibitors and associated coenzyme Q10 depletion, animal and human publications. *Biofactors* 2003;18:101-11.
65. Hyson HC, Kieburtz K, Shoulson I, McDermott M, Ravina B, de Bleeck EA, et al. Safety and tolerability of high-dosage coenzyme Q10 in Huntington's disease and healthy subjects. *Mov Disord.* 2010;25:1924-8.
66. Shults CW, Flint Beal M, Song D, Fontaine D. Pilot trial of high dosages of coenzyme Q10 in patients with Parkinson's disease. *Experimental neurology.* 2004;188:491-4.
67. Bhagavan HN, Chopra RK. Coenzyme Q10: absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics. *Free radical research.* 2006;40:445-53.
68. Zhang Y, Aberg F, Appelkvist EL, Dallner G, Ernster L. Uptake of dietary coenzyme Q supplement is limited in rats. *The Journal of nutrition.* 1995;125:446-53. doi:10.1093/jn/125.3.446.
69. Martelli A, Testai L, Colletti A, Cicero AFG. Coenzyme Q10: Clinical Applications in Cardiovascular Diseases. 2020;9:341.
70. Lamichhane S, Seo JE, Keum T, Noh G, Bashyal S, Cho SW, et al. Enhancing solubility and bioavailability of coenzyme Q10 formulation of solid dispersions using Soluplus as a carrier. *Archives of pharmacal research.* 2022;45:29-37..
71. Yüksel N, Baykara T, Kanık AE. Comparison of in vitro dissolution profiles by ANOVA-based, model-dependent and independent methods. *Int J Pharm* 2000;209:57-67.

72. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Zou A, Li W, Yao C, et al. DDSolver: An add in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *The AAPS J* 2010;12:263-71.
73. Ergin AD, Sezgin Bayindir Z, Yüksel N. Characterization and optimization of colon targeted S-adenosyl-L-methionine loaded chitosan nanoparticles. *J Res Pharm* 2019;23:914-26.
74. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Computer methods and programs in biomedicine* 2010;99:306-314.
75. Özkan Y., Tas C., Özkan C.K., Bayrak Z., Esim O. İlaçların analiz ve kalite kontrollerinde kullanılan analitik yöntemlerin geçerliliği. Ankara: Gülhane Askeri Tıp Akademisi; 2011.
76. CFDEAR. Reviewer Guidance' Validation of Chromatographic Methods [Cited Date: Available from: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm134409.pdf>].
77. Harmonization ICO. International center of harmonization Topic Q2(R1) validation of analytical procedures: Text and Methodology, note for guidance on validation of analytical procedures: Text and methodology (CPMP/ICH/381/95).
78. Shabir G. A practical approach to validation of HPLC methods under current good manufacturing practices. *J Validation Tech* 2004;10:210-8.
79. FDA (US). Guidance for industry: bioavailability studies submitted in NDAs or INDs general considerations; 2019.
80. Varshosaz J, Pardakhty A, Hajhashemi VI, Najafabadi AR. Development and physical characterization of sorbitan monoester niosomes for insulin oral delivery. *Drug Deliv* 2003;10:251-62.
81. Agafonov M, Ivanov S, Terekhova I. Improvement of pharmacologically relevant properties of methotrexate by solid dispersion with Pluronic F127. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2021;124:112059.
82. Sezgin Z, Yuksel N, Baykara T. Preparation and characterization of polymeric micelles for solubilization of poorly soluble anticancer drugs. *Eur J Pharm Biopharm* 2006;64:261-68.
83. Sakai T, Kurosawa H, Okada T, Mishima S. Vesicle formation in mixture of a PEO-PPO-PEO block copolymer (Pluronic P123) and a nonionic surfactant (Span 65) in water. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2011;389:82-9. doi:10.1016/j.colsurfa.2011.08.046.
84. Garcia SAS, da Rocha PBR, Souza BDS, Paz ATS, Negriz ALC, Marreto RN, et al. Enhanced Skin Permeation of Punicalagin after Topical Application of Pluronic Micelles or Vesicles Loaded with Lafoensia pacari Extract. *Planta medica*. 2022;88:479-88. doi:10.1055/a-1464-1525.
85. Kazi KM, Mandal AS, Biswas N, Guha A, Chatterjee S, Behera M, Kuotsu K. Niosome a future of targeted drug delivery systems. *J Adv Pharm Tech Res* 2010;1:374-80.

86. Hayashi K, Shimanouchi T, Kato K, Miyazaki T, Nakamura A, Umakoshi H. Span 80 vesicles have a more fluid, flexible and "wet" surface than phospholipid liposomes. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011;87:28-35.
87. Uchegbu IF, Vyas SP. Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery. *Int J Pharm* 1998;172:33-70.
88. Yuksel N, Bayindir ZS, Aksakal E, Ozcelikay AT. In situ niosome forming maltodextrin proniosomes of candesartan cilexetil: In vitro and in vivo evaluations. *Int J Biol Macromol* 2016;82:453-63.
89. Ismail S, Khattab A. Optimization of proniosomal itraconazole formulation using box behken design to enhance oral bioavailability. *J Drug Deliv Sci Tech* 2018;45:142-150.
90. Mohd Nadzir M, Tan WF, Mohamed AR, Hisham SF. Size and stability of curcumin niosomes from combinations of tween 80 and span 80. *Sains Malaysiana* 2017;46:2455-460.
91. Abou-Taleb HA, Khallaf RA, Abdel-Aleem JA. Intranasal niosomes of nefopam with improved bioavailability: preparation, optimization, and in vivo evaluation. *Drug Des Devel Ther* 2018;12:3501-3516.
92. Liu L, Mao K, Wang W, Pan H, Wang F, Yang M, Liu H. Kolliphor(R) HS 15 micelles for the delivery of coenzyme Q10 preparation, characterization, and stability. *AAPS Pharm. Sci Tech* 2016;17:757-66.
93. Sezgin-Bayindir Z, Antep MN, Yuksel N. Development and characterization of mixed niosomes for oral delivery using candesartan cilexetil as a model poorly water-soluble drug. *AAPS Pharm Sci Tech* 2015;16:108-17.
94. ElShaer A, Khan S, Perumal D, Hanson P, Mohammed AR. Use of amino acids as counterions improves the solubility of the BCS II model drug, indomethacin. *Curr Drug Deliv* 2011;8:363-72.
95. Zhao Y, Wu T, Li H, Duan Y, Li H, Yang W. Influence of hydrotrope on solubility and bioavailability of curcumin: its complex formation and solid-state characterization. *Drug Dev Ind Pharm* 2021;47:1392-1400.
96. Meor Mohd Affandi MM, Tripathy M, Shah SA, Majeed AB. Solubility enhancement of simvastatin by arginine: thermodynamics, solute-solvent interactions, and spectral analysis. *Drug design, development and therapy*. 2016;10:959-69. doi:10.2147/dddt.S94701.
97. Affandi M, Tripathy M, Majeed ABA. Arginine complexes with simvastatin: Apparent solubility, in vitro dissolution and solid state characterization. *Current drug delivery*. 2018;15:77-86. doi:10.2174/1567201814666170320144259.
98. Ritger PL, Peppas NA. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *J Control Rel* 1987;5:37-42.

99. Weiss IM, Muth C, Drumm R, Kirchner HOK. Thermal decomposition of the amino acids glycine, cysteine, aspartic acid, asparagine, glutamic acid, glutamine, arginine and histidine. *BMC biophysics* 2018;11:2.
100. Zhang L, Wu C, Gu T, Zhang Y, Liu Y. Preparation, characterization and cytotoxicity activity of rhein arginate. *Anal Methods* 2014;6:3838-84.
101. Kim MS, Lee D-W, Park K, Park S-J, Choi E-J, Park ES, et al. Temperature triggered tumor specific delivery of anticancer agents by cRGD-conjugated thermosensitive liposomes. *Colloids Surf B* 2014;116:17-25.
102. Kalmes A, Merdes G, Neumann B, Strand D, Mechler BM. A serine-kinase associated with the p127-1 gl tumour suppressor of drosophila may regulate the binding of p127 to nonmuscle myosin II heavy chain and the attachment of p127 to the plasma membrane. *J Cell Sci* 1996;109:1359-68.
103. Sitterlin D, Bergametti F, Tiollais P, Tennant BC, Transy C. Correct binding of viral X protein to UVDDDB-p127 cellular protein is critical for efficient infection by hepatitis B viruses. *Oncogene* 2000;19:4427-31.
104. Jankowski J, Korzeniowska K, Cieslewicz A, Jablecka A. Coenzyme Q10- a new player in the treatment of heart failure. *Pharmacol Rep.* 2016;68:1015-19.
105. Marzo A, Rescigno A. Pharmacokinetics of endogenous substances: Some problems and some solutions. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1993;18:77-88.
106. Arunagiri V, Tsai HC, Darge HF, Hanurry EY, Lee CY, Lai JY, et al. Enhanced cellular uptake in an electrostatically interacting fucoidan-L-arginine fiber complex. *Polymers* 2021;13.
107. Oh D, Nasrolahi Shirazi A, Northup K, Sullivan B, Tiwari RK, Bisoffi M, et al. Enhanced cellular uptake of short polyarginine peptides through fatty acylation and cyclization. *Mol Pharm* 2014;11:2845-54.
108. Kamei N, Khafagy ES, Hirose J, Takeda-Morishita M. Potential of single cationic amino acid molecule "Arginine" for stimulating oral absorption of insulin. *Int J Pharm* 2017;521:176-183.
109. Yamaki T, Uchida M, Kuwahara Y, Shimazaki Y, Ohtake K, Kimura M, et al. Effect of poly-L-arginine on intestinal absorption of hydrophilic macromolecules in rats. *Biol Pharm Bull* 2013;36:496-500.
110. Motlekar NA, Srivenugopal KS, Wachtel MS, Youan BB. Evaluation of the oral bioavailability of low molecular weight heparin formulated with glycyrrhetic acid as permeation enhancer. *Drug Dev Res* 2006;67:166-74.

# EKLER

## EK-1 Etik Kurul Kararı



**T.C.**  
**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**  
**Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu**  
(Trakya University, Local Ethics Committee of Animal Experiments)

**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI**

**Oturum Sayısı:** 2021/05 **Karar Tarihi:** 28.05.2021  
**Karar No:** 2021.05.07  
**Hayvan Sayısı ve Cinsi:** Sıçan 18 adet

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Doğan ERGİN'in yaptığı, TÜHADYEK-2021/20 protokol no'lu yüksek lisans öğrencisi Şencan BALCI'nın yüksek lisans tezi olarak planlanan "Koenzim Q10'un Biyoyararlanımını Artırmak İçin Proniozomal Formülasyonların Geliştirilmesi: İn Vitro ve İn Vivo Değerlendirmeleri" başlıklı çalışma isteği görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri etik kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmelik ve Trakya Üniversitesi hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

**Prof. Dr. Hakan ERBAŞ**  
Başkan  
Araştırma ile İlişki:  var  yok  
Toplantı Katılım:  evet  hayır

**Prof. Dr. Enis ULUÇAM**  
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi  
Araştırma ile İlişki:  var  yok  
Toplantı Katılım:  evet  hayır

**Prof. Dr. Suat ERDOĞAN**  
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi  
Araştırma ile İlişki:  var  yok  
Toplantı Katılım:  evet  hayır

**Prof. Dr. Y. Atakan SEZER**  
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi  
Araştırma ile İlişki:  var  yok  
Toplantı Katılım:  evet  hayır

**Prof. Dr. Tevfik AKTOZ**  
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi  
Araştırma ile İlişki:  var  yok  
Toplantı Katılım:  evet  hayır

**Prof. Dr. Necdet SÜT**  
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi  
Araştırma ile İlişki:  var  yok  
Toplantı Katılım:  evet  hayır

**Doç. Dr. Elvan BAKAR**  
Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi  
Araştırma ile İlişki:  var  yok  
Toplantı Katılım:  evet  hayır

**Doç. Dr. Filiz SANAL**  
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi  
Araştırma ile İlişki:  var  yok  
Toplantı Katılım:  evet  hayır

**Dr. Öğr. Üyesi F. Gülfeşan ÇANAKÇI**  
Diş Hekimliği Fakültesi Öğretim Üyesi  
Araştırma ile İlişki:  var  yok  
Toplantı Katılım:  evet  hayır

**Vet. Hek. Kerem SELVİ**  
Vet.Hek. Üye  
Araştırma ile İlişki:  var  yok  
Toplantı Katılım:  evet  hayır

**Ecz. Dr. Ümit GÜNER**  
Sivil Toplum Kuruluşu Sivil Üye  
Araştırma ile İlişki:  var  yok  
Toplantı Katılım:  evet  hayır

**Tarik AYKIZ**  
Sivil Üye  
Araştırma ile İlişki:  var  yok  
Toplantı Katılım:  evet  hayır

## ÖZGEÇMİŞ



# BENZERLİK RAPORU



## Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Şencan Balcı  
Ödev başlığı: proniosome  
Gönderi Başlığı: Tez benzerlik  
Dosya adı: ENCAN\_BALCI-TEZ-benzerlik.doc  
Dosya boyutu: 2.55M  
Sayfa sayısı: 56  
Kelime sayısı: 9,915  
Karakter sayısı: 70,730  
Gönderim Tarihi: 13-Kas-2023 03:06ÖS (UTC+0300)  
Gönderim Numarası: 2226622062



## Tez benzerlik

ORJİNALLIK RAPORU

% **8** EN  
BENZERLİK ENDEKSİ

% **2**  
İNTERNET KAYNAKLARI

% **7**  
YAYINLAR

%  
ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

- 1** Ahmet Doğan ERGİN, Burcu ÜNER, Şencan BALCI, Çağlar DEMİRBAĞ, Camillo Benetti, Çağatay OLTULU. "Improving the bioavailability and efficacy of coenzyme q10 on Alzheimer's disease through the arginine based proniosomes", Journal of Pharmaceutical Sciences, 2023  
Yayın % **3**
- 2** core.ac.uk  
İnternet Kaynağı % **1**
- 3** Venkata Ramesh Yasam, Satya Lavanya Jakki, Jawahar Natarajan, Gowthamarajan Kuppusamy. "A review on novel vesicular drug delivery: proniosomes", Drug Delivery, 2013  
Yayın % **1**
- 4** Haruki Higashino, Keiko Minami, Makoto Kataoka, Namino Tomimori, Tomohiro Rogi, Hiroshi Shibata, Shinji Yamashita. "Control of oral absorption of nutritional supplement using lipid-based formulations (LBFs): Application to the poorly water-soluble <% **1**