TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BEYİNE HEDEFLENDİRİLMİŞ ETKİN MADDE YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN HİDROJEL FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ

Özgün SAYINER

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Tansel ÇOMOĞLU

ANKARA
2019

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BEYİNE HEDEFLENDİRİLMİŞ ETKİN MADDE YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN HİDROJEL FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ

Özgün SAYINER

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Tansel ÇOMOĞLU

ANKARA
2019

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Beyine Hedeflendirilmiş Etkin Madde Yüklü Nanopartiküllerin Hidrojel Formülasyonlarının Geliştirilmesi" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikri tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışmalar/araştırmalar tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Özgün SAYINER

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında
Özgün SAYINER tarafından hazırlanan
"Beyine Hedeflendirilmiş Etkin Madde Yüklü Nanopartiküllerin Hidrojel Formülasyonlarının Geliştirilmesi" adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 05/08/2019

Prof. Dr. Nurten ÖZDEMİR
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Tansel ÇOMOĞLU
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI
Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı

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

Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan		ii
Kabul Ve Onay		iii
İçindekiler		iv
Önsöz		vii
Simgeler Ve Kısaltmalar		viii
Şekiller		x
Çizelgeler		xii
1.	**GİRİŞ**	**1**
1.1.	Kanser	1
1.2.	Beyin Tümörleri (Gliomalar)	1
1.3.	Glioblastoma multiforme	3
1.3.1.	Tanımı ve karakterize özellikleri	3
1.3.2.	Tarihçesi	3
1.3.3.	Epidemiyolojisi ve etiyolojisi	5
1.3.4.	Belirtileri	5
1.3.5.	Sınıflandırılması	6
1.3.6.	Teşhis ve tedavi yöntemleri	7
1.4.	Temozolomid	13
1.4.1.	Piyasa preparatları	14
1.4.2.	Farmakodinamik özellikleri	15
1.4.3.	Farmakokinetik özellikleri	15
1.4.4.	Etki Mekanizması	16
1.5.	Kan-beyin bariyeri	16
1.6.	PLGA	18
1.6.1.	NP sistemler ve farmasötik alanda kullanımları	19
1.6.2.	Lokal tedavi	21
1.7.	Pluronic® F-127	22
1.7.1.	Pluronic® F-127'nin farmasötik alanda kullanımı	23
2.	**GEREÇ ve YÖNTEM**	**27**
2.1.	Kullanılan kimyasal maddeler ve cihazlar	27
2.1.1.	Kimyasal maddeler	27
2.1.2.	Cihazlar	28
2.2.	Kullanılan çözeltilerin hazırlanması	29
2.3.	Etkin maddenin kromatografik analizi ve yöntem validasyonu	30
2.4.	TMZ yüklü PLGA nanopartiküllerin hazırlanması için formülasyon çalışmaları	32
2.4.1.	TMZ yüklü PLGA nanopartiküllerin enkapsülasyon ve yükleme etkinliğinin değerlendirilmesi	34
2.5.	TMZ yüklü PLGA nanopartiküllerin in vitro karakterizasyon çalışmaları	35
2.5.1.	Partikül büyüklüğü, poli-dispersite indeksi (pDI) ve zeta potansiyeli değerinin tayini	35
2.5.2.	FTIR (Fourier Transform Infrared) spektrumu analizi	35
2.5.3.	DSC (Differential Scanning Calorimetry) analizi	35

2.5.4. TEM (Transmission Electron Microscopy) Analizi 35
2.6. Pluronic® F-127 ile hidrojel üretimi 36
2.7. Pluronic® F-127 hidrojeller üzerinde yapılan in vitro karakterizasyon çalışmaları 36
2.7.1. Üretilen hidrojellerin pH seviyeleri 36
2.7.2. Sol-jel geçiş sıcaklığı 36
2.7.3. Viskozite 37
2.7.4. Mekanik özellikler 37
2.7.5. Şişme/erozyon çalışmaları 37
2.8. TMZ yüklü PLGA nanopartiküllerden ve TMZ-PLGA yüklü NP'leri içeren Pluronic® F-127 hidrojelinden in vitro etkin madde salım çalışmaları 38
2.8.1. Tamamlayıcı in vitro etkin madde salım çalışmaları 38
2.8.2. In vitro etkin madde salım çalışmalarının kinetik açıdan değerlendirilmesi 38
2.9. Hücre kültürü çalışmaları 40
2.9.1. Glioma hücrelerin kültüre edilmesi 40
2.9.2. MTT yöntemi ile canlılık analizleri 40
2.9.3. Akım sitometri ile hücre uptake analizi 41
2.10. Sterilizasyon çalışmaları 41
2.11. İstatistiksel hesaplamalar 42

3. BULGULAR 43
3.1. Kullanılan analitik yöntemler 43
3.1.1. pH 1.2 tamponu ile yapılan HPLC analizleri 43
3.1.2. pH 4.5 tamponu ile yapılan HPLC analizleri 44
3.1.3. pH 5 tamponu ile yapılan HPLC analizleri 45
3.1.4. pH 6.8 tamponu ile yapılan HPLC analizleri 46
3.1.5. pH 7.4 tamponu ile yapılan HPLC analizleri 47
3.1.6. PVA çözeltileri ile yapılan HPLC analizleri 48
3.1.7. DMF ile yapılan HPLC analizleri 49
3.2. Kullanılan yöntemin analitik validasyonu ile ilgili bulgular 50
3.2.1. Doğruluk ile ilgili bulgular 50
3.2.2. Kesinlik ile ilgili bulgular (Tekrarlanabilirlik çalışmaları) 51
3.2.3. Teşhis sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) ile ilgili bulgular 67
3.3. TMZ yüklü PLGA nanopartiküllerin formülasyon çalışması sonuçları 68
3.4. TMZ yüklü PLGA nanopartiküllerin in vitro karakterizasyon çalışmaları 73
3.4.1. Partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (pDI) ve zeta potansiyelinin tayini 73
3.4.2. FTIR (Fourier Transform Infrared) spektrumu analizi 75
3.4.3. DSC (Differential Scanning Calorimetry) analizi 79
3.4.4. TEM analizi 80
3.5. Optimum formülasyonların seçilmesi 88
3.6. Pluronic® F-127 ile hazırlanan hidrojel formülasyonlarının in vitro karakterizasyon çalışmaları 90
3.6.1. Üretilen hidrojellerin pH seviyeleri 90
3.6.2. Sol-jel geçiş sıcaklığı 90
3.6.3. Viskozite 91
3.6.4. Mekanik özellikler 92

3.6.5. Şişme/erozyon çalışmaları bulguları 93
3.7. In vitro etkin madde salım çalışmaları bulguları 94
3.7.1. In vitro etkin madde salım çalışmalarının kinetik hesaplamalarına ait bulgular 95
3.8. Hücre kültürü çalışmaları bulguları 96
3.8.1. MTT yöntemi ile canlılık analizleri bulguları 96
3.8.2. Akım sitometri çalışması bulguları 98

4. TARTIŞMA 99
4.1. Kullanılan analitik yöntemlere ait bulguların değerlendirilmesi 99
4.2. Formülasyonların üretimine ve in vitro karakterizasyon çalışmalarına ait bulguların değerlendirilmesi 101
4.2.1. Formülasyon parametrelerinin partikül özelliklerine etkisinin değerlendirilmesi 101
4.2.2. Nanopartikül formülasyonlarının transmisyon elektron mikroskopi (TEM) görüntülerine ait bulguların değerlendirilmesi 103
4.2.3. DSC analizi sonuçlarının değerlendirilmesi 104
4.2.4. FTIR analizi sonuçlarının değerlendirilmesi 104
4.2.5. Formülasyon parametrelerinin enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisinin değerlendirilmesi 105
4.3. Pluronic® F-127 içeren hidrojellerin in vitro karakterizasyon çalışmaları 107
4.4. In vitro etkin madde salım çalışmalarına ait bulguların değerlendirilmesi 108
4.4.1. In vitro etkin madde salım çalışmalarınnın kinetik hesaplamalarına ait bulguların değerlendirilmesi 109
4.5. Sterilizasyon yöntemlerinin değerlendirilmesi 111
4.6. Hücre kültürü çalışmalarına ait bulguların değerlendirilmesi 112
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 114
ÖZET 116
SUMMARY 117
KAYNAKLAR 118
ÖZGEÇMİŞ 126

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, antikanser bir etkin madde olan temozolomid yüklü nanopartikülleri içeren ve sıcaklık değişimi ile in situ hidrojel oluşturan formülasyonların üretimi, in vitro karakterizasyonu ve hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Glioblastoma multiforme tedavisinde günümüzde uygulanan standart tedavi protokollerinin sağkalım süresini uzatma ve tümör bölgesine etki etmede yetersizliği, ayrıca cerrahi müdahale esnasında tümör kitlesinin bazen tümünün çıkarılamayışı, bizi konvansiyonel dozaj formlarının dışındaki alternatiflere yöneltmektedir. Bu nedenle, tümör rezeksiyonu sonrasında kaviteye uygulanmak üzere, sıcaklık değişimiyle in situ sol-jel dönüşümü gerçekleşen hidrojel içinde, etkin maddenin bozunmadan korunmasını ve modifiye salımını sağlayacak temozolomid yüklü nanopartiküler formülasyonların geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Tez çalışmamı yöneten; bilgi, yönlendirme ve tecrübesi ile bana her noktada yardımcı olan tez danışmanım Prof. Dr. Tansel ÇOMOĞLU'na,

Tez çalışmamda bana bilgi ve imkan konusunda destek veren, anabilim dalımızın sayın öğretim üyeleri ve araştırma görevlilerine,

Çalışmalarım sırasında manevi desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen tüm arkadaşlarıma,

Bu yoğun tez temposunda yanıma gelip, tez stresini bizzat çeken ve maddi manevi hiçbir yardım ve desteğini esirgemeyen anne ve babama,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından "Beyine Hedeflendirilmiş Temozolomid Yüklü Nanopartiküllerin Hidrojel Formülasyonlarının Geliştirilmesi" proje adı ve 18L0237003 proje numarası ile desteklenmiştir.

SİMGELER VE KISALTMALAR

µL: mikrolitre

a/h: ağırlık/hacim

AÇMM: açığa çıkan madde miktarı

BSS: bağıl standart sapma

Cm: santimetre

cm^3: santimetreküp

cP: centipoise

CT: computerized tomography

Da: Dalton

DCM: diklorometan

dk: dakika

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMF: dimetil formamid

DSC: Differential Scanning Calorimetry

EE: enkapsülasyon etkinliği

FBS: fötal buzağı serumu

FTIR: Fourier Transform Infrared

g: gram

HPLC: high pressure liquid chromatography

kg: kilogram

kV: kilovolt

LOD: limit of detection (teşhis sınırı)

LOQ: limit of quantification (tayin sınırı)

M: molar

Ma: molekül ağırlığı

mg: miligram

mL: mililitre

mm: milimetre

mM: milimolar

MRI: magnetic resonance imaging

mV: milivolt

mW: miliwatt

nm: nanometre

OD: optik dansite

PBS: phosphate buffer saline

PCB: prokarbazin

pDI: polidispersite indeksi

PLGA: Poli(laktik-ko-glikolik) asit

ppm: parts per million

PVA: Polivinil alkol

R^2: determinasyon katsayısı

rpm: rotation per minute

sa: saat

sn: saniye

SS: standart sapma

TEM: Transmisyon Elektron Mikroskopi

TMZ: Temozolomid

UV: ultraviyole

W: watt

y.m. : yeter miktarda

YE: yükleme etkinliği

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Temozolomid'in formülü (PubChem Database) 13
Şekil 1.2. PLGA'nın moleküler yapısı (PubChem Database) 18
Şekil 2.1. Enkapsülasyon etkinliği (indirekt yöntem) 34
Şekil 2.2. Enkapsülasyon etkinliği (direkt yöntem) 34
Şekil 2.3. Yükleme etkinliği 34
Şekil 3.1. TMZ'in koruyucu içeren ve içermeyen pH 1.2 tamponlarında kalibrasyon doğruları ve denklemleri 43
Şekil 3.2. TMZ'in çeşitli oranlarda koruyucu içeren pH 4.5 tamponlarında kalibrasyon doğruları ve denklemleri 44
Şekil 3.3. TMZ'in % 0,1 askorbik asit içeren pH 5 tamponlarında kalibrasyon doğrusu ve denklemi 45
Şekil 3.4. TMZ'in çeşitli oranlarda koruyucu içeren pH 6.8 tamponlarında kalibrasyon doğruları ve denklemleri 46
Şekil 3.5. TMZ'in çeşitli oranlarda koruyucu içeren pH 7.4 tamponlarında kalibrasyon doğruları ve denklemleri 47
Şekil 3.6. TMZ'in % 2 oranında PVA içeren çözeltisinde kalibrasyon doğrusu ve denklemi 48
Şekil 3.7. TMZ'in askorbik asit içeren DMF içinde kalibrasyon doğrusu ve denklemi 49
Şekil 3.8. TMZ'in IR spektrumu 75
Şekil 3.9. PLGA'nın IR spektrumu 75
Şekil 3.10. A2-2'nin IR spektrumu 76
Şekil 3.11. A2-2'nin fiziksel karışımının IR spektrumu 76
Şekil 3.12. A2-5'in IR spektrumu 77
Şekil 3.13. A2-5'in fiziksel karışımının IR spektrumu 77
Şekil 3.14. A2-10'un IR spektrumu 78
Şekil 3.15. A2-10'un fiziksel karışımının IR spektrumu 78
Şekil 3.16. TMZ, PLGA, PVA, formüller ve fiziksel karışımların DSC analizi 80
Şekil 3.17. A1 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü 80
Şekil 3.18. A2 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü 81
Şekil 3.19. A3 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü 81
Şekil 3.20. A4 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü 82
Şekil 3.21. A5 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü 82
Şekil 3.22. A6 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü 83
Şekil 3.23. A7 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü 83
Şekil 3.24. A8 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü 84
Şekil 3.25. A9 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü 84
Şekil 3.26. A10 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü 85

Şekil 3.27. A11 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü 85
Şekil 3.28. A12 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü 86
Şekil 3.29. A13 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü 86
Şekil 3.30. A2-5 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü 87
Şekil 3.31. A2-10 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü 87
Şekil 3.32. Jel formülasyonların pH değerleri 90
Şekil 3.33. Hidrojel formülasyonlarının jelasyon sıcaklıkları ve ters tüp yöntemi 91
Şekil 3.34. Sol halinde kalabilen formülasyonların reogramları 91
Şekil 3.35. Jel haline geçebilen formülasyonların reogramları 92
Şekil 3.36. Hidrojel formülasyonların mekanik özelliklerinin karşılaştırılması 93
Şekil 3.37. Hidrojellerin zamana karşı erozyon grafiği 93
Şekil 3.38. A kodlu nanopartiküler formülasyonlardan optimum özelliklere sahip formülasyonların pH 5 tamponu içerisinde in vitro salım profilleri 94
Şekil 3.39. pH 5 tamponu içerisinde tüm formülasyonlardan etkin maddenin in vitro salım profilleri 95
Şekil 3.40. TMZ'nin MTT yöntemi ile canlılık analizleri 96
Şekil 3.41. Nanopartiküller için yapılan MTT çalışmaları sonucu canlılık değerleri 97
Şekil 3.42. Nanopartikül içeren hidrojeller için yapılan MTT çalışmaları sonucu canlılık değerleri 97
Şekil 3.43. Nil kırmızısı yüklü PLGA nanopartiküllerinin belirli zaman aralıklarındaki ortalama floresan yoğunluğu 98
Şekil 4.1. Hidrojel içinde nanopartikül formülasyonlarının dQ/dt – Q grafikleri 110

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Beyin tümörlerinin sınıflandırılması (Tsai ve ark., 2016) 2
Çizelge 1.2. Astrositik tümörlerin karakteristik özelliklerinin karşılaştırılması 2
Çizelge 1.3. Primer ve sekonder GBM'ın karşılaştırılması (Abdullah ve ark., 2016, Adamson ve ark., 2009, Agnihotri ve ark., 2013, Ostrom ve Barnholtz-Sloan, 2016) 6
Çizelge 1.4. Türkiye de temozolomid içeren piyasa preparatları (İlaç Rehberi) 14
Çizelge 2.1. Tampon çözeltileri, PVA çözeltisi ve su için kullanılan kromatografik koşullar 31
Çizelge 2.2. DMF için kullanılan kromatografik koşullar 31
Çizelge 2.3. TMZ içeren PLGA nanopartikül formülasyonları 33
Çizelge 3.1. pH 1.2 tamponunda yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları 50
Çizelge 3.2. 1.5 mg askorbik asit içeren pH 1.2 tamponunda yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları 50
Çizelge 3.3. 1.5 mg sodyum metabisülfit içeren pH 1.2 tamponunda yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları 51
Çizelge 3.4. 1.5 mg askorbik asit içeren pH 4.5 tamponunda yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları 51
Çizelge 3.5. 1.5 mg sodyum metabisülfit içeren pH 4.5 tamponunda yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları 52
Çizelge 3.6. 2.25 mg askorbik asit içeren pH 4.5 tamponunda yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları 52
Çizelge 3.7. % 0,1 askorbik asit içeren pH 5 tamponunda yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları 53
Çizelge 3.8. 1.5 mg askorbik asit içeren pH 6.8 tamponunda yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları 54
Çizelge 3.9. 2.25 mg askorbik asit içeren pH 6.8 tamponunda yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları 54
Çizelge 3.10. 1.5 mg sodyum metabisülfit içeren pH 6.8 tamponunda yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları 55
Çizelge 3.11. 2.25 mg sodyum metabisülfit içeren pH 6.8 tamponunda yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları 55
Çizelge 3.12. pH 7,4 fosfat tamponu ortamında yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları 56
Çizelge 3.13. 1,5 mg askorbik asit içeren pH 7,4 fosfat tamponu ortamında yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları 56
Çizelge 3.14. 1,5 mg sodyum metabisülfit içeren pH 7,4 fosfat tamponu ortamında yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları 57
Çizelge 3.15. % 2 PVA çözeltisi ortamında yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları 57

Çizelge 3.16. DMF'de yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları 58
Çizelge 3.17. pH 1.2 tamponunda yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları 59
Çizelge 3.18. 1.5 mg askorbik asit içeren pH 1.2 tamponunda yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları 59
Çizelge 3.19. 1.5 mg sodyum metabisülfit içeren pH 1.2 tamponunda yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları 59
Çizelge 3.20. 1.5 mg askorbik asit içeren pH 4.5 tamponunda yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları 60
Çizelge 3.21. 1.5 mg sodyum metabisülfit içeren pH 4.5 tamponunda yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları 60
Çizelge 3.22. 2.25 mg askorbik asit içeren pH 4.5 tamponunda yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları 61
Çizelge 3.23. % 0,1 askorbik asit içeren pH 5 tamponunda yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları 61
Çizelge 3.24. 1.5 mg askorbik asit içeren pH 6.8 tamponunda yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları 62
Çizelge 3.25. 2.25 mg askorbik asit içeren pH 6.8 tamponunda yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları 62
Çizelge 3.26. 1.5 mg sodyum metabisülfit içeren pH 6.8 tamponunda yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları 63
Çizelge 3.27. 2.25 mg sodyum metabisülfit içeren pH 6.8 tamponunda yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları 63
Çizelge 3.28. pH 7,4 fosfat tamponu ortamında yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları 64
Çizelge 3.29. 1,5 mg askorbik asit içeren pH 7,4 fosfat tamponu ortamında yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları 64
Çizelge 3.30. 1,5 mg sodyum metabisülfit içeren pH 7,4 fosfat tamponu ortamında yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları 64
Çizelge 3.31. % 2 PVA çözeltisi ortamında yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları 65
Çizelge 3.32. DMF'de yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları 66
Çizelge 3.33. LOD ve LOQ değerlerinin listesi 67
Çizelge 3.34. Belirlenen formülasyon yöntemleri ile üretilen F kodlu formülasyonlardan elde edilen enkapsülasyon etkinliği değerleri 69
Çizelge 3.35. Referans makaledeki formülasyon yöntemi ile üretilen formülasyonlardan elde edilen enkapsülasyon etkinliği değerleri 70
Çizelge 3.36. A kodlu formüllerin parametre değişiklikleri 71
Çizelge 3.37. A kodlu formülasyonların, değişen parametrelere göre üretimleri sonucu elde edilen enkapsülasyon etkinliği verileri 72
Çizelge 3.38. Formülasyonlara göre % yükleme ve enkapsülasyon etkinliği 73

Çizelge 3.39. Tüm formülasyonların partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri (n=3) 74
Çizelge 3.40. TMZ'in titreşim nitelik listesi 79
Çizelge 3.41. PLGA'nın titreşim nitelik listesi 79
Çizelge 3.42. A kodlu formülasyonların parametre değişiklikleri 88
Çizelge 3.43. Tekrarlanan formülasyonların değişen parametrelere göre enkapsülasyon etkinliği verileri 88
Çizelge 3.44. Karşılaştıma kriterleri ve formülasyon parametrelerine göre partikül özellikleri ve enkapsülasyon etkinliği verileri 89
Çizelge 3.45. In vitro etkin madde salımının kinetik modellere uyumunun incelenmesi 96

1. GİRİŞ

1.1. Kanser

Kanser, belirli organlardaki hücrelerin normal olmayan derecede ve düzensiz şekilde çoğalmasıdır (Schwab, 2008). Kanser hücreleri büyüyerek ve çoğalarak, tümör adı verilen normal olmayan bir hücre kitlesi haline dönüşmektedir (Pérez-Herrero ve Fernández-Medarde, 2015). Hücrelerin bölünmesi ve kontrolü genlerin kontrolü altında olduğundan kanser temel olarak genlerle ilişkili olan bir hastalıktır. Genlerin üzerindeki fiziksel veya kimyasal değişimler veya bölgesel silinme, -insersiyon- veya dönüşme gibi modifikasyonlar doğrudan hücrenin işlevini etkileyebilir (Baykara, 2016).

Çoğu kanser tipi kaynak organ ile sınırlı kalırken, ileri seviye kanserler kaynak doku veya organı geçip büyüyerek çevre dokuları da işgal ederler. Seviye ilerledikçe hematopoetik ve/veya lenfatik sistem ile başka doku veya organlarda yerleşerek metastaz olarak adlandırılan yapıları oluştururlar (Schwab, 2008).

1.2. Beyin Tümörleri (Gliomalar)

Beyin tümörleri, kötü prognozları, kognitif fonksiyonlara ve yaşam kalitesine olan direkt etkileri nedeniyle en çok korkulan kanser türlerinden biridir .

Beyin tümörleri geçmişte astrositomalar, oligodendrogliomalar veya karışık glioma/oligoastrositomalar gibi histopatolojilerine göre ayrılırken, son zamanlarda moleküler ve genetik belirteçlere göre ayrılmaktadırlar. Buna ek olarak gliomalar nekroz varlığına veya mitotik indekse göre I-IV. evre olarak sınıflandırılmaktadır (Mesfin ve Al-Dhahir, 2018).

Çizelge 1.1. Beyin tümörlerinin sınıflandırılması (Tsai ve ark., 2016)

Sınıflandırma	WHO Grade	Sınıflandırma	WHO Grade
Meningioma		**Oligodendroglial tümörler**	
Meningothelial meningioma	I	Oligodendroglioma	II
Fibrous (fibroblastic) meningioma	I	Anaplastic oligodenrdroglioma	III
Psammomatous meningioma	I	**Ependymal tümörler**	
Angiomatous meningioma	I	Ependymoma	II
Atypical meningioma	II	Anaplastic ependymoma	III
Astrocytic tümörler		**Diğer**	
Pilocytic astrocytoma	I	Santral nörositoma	II
Diffuse astrocytoma	II	Chordoma	II
Anaplastic astrocytoma	III	Medulloblastoma	IV
Glioblastoma mulitforme	IV		
Gliosarcoma	IV		

Glioblastoma multiforme, astrositik tümörler sınıfında yer almaktadır. Çizelge 1.2'de astrositik tümörler karakteristik özelliklerine göre kısaca karşılaştırılmıştır (Agnihotri ve ark., 2013);

Çizelge 1.2. Astrositik tümörlerin karakteristik özelliklerinin karşılaştırılması

Tümör tipi	Pilositik astrositoma	Erken evre difüze astrositoma	Anaplastik astrositoma	Glioblastoma multiforme
Özellikler	• Grade I • Çembersi görünüm	• Orta düzeyde hücrelenme • Anormal çekirdek • Proliferatif • İnvazif	• Grade III • Artmış hücrelenme • Atipik çekirdek • Mitotik aktivite • Yüksek düzeyde proliferatif • Yüksek düzeyde invazif	• Grade IV • Anaplastik astrositoma özelliklerine ek olarak; • Nekroz • Glomerüloid mikrovasküler proliferasyon

1.3. Glioblastoma multiforme

1.3.1. Tanımı ve karakterize özellikleri

Glioblastoma multiforme, insidansı nedeniyle nadir olarak nitelendirilen, fakat tüm gliomaların % 45-50'sini oluşturacak kadar sık görülen bir glioma türüdür (Hottinger ve ark., 2016, Wirsching ve ark., 2016). Tümör çevresindeki dokunun işgali, çok katmanlı glomerüler damarlı bir yapının yüksek proliferasyonu ve tümör histopatolojisinde heterojenite ve nekroz ile karakterizedir (Fourniols ve ark., 2015, Juillerat-Jeanneret, 2008, Omuro ve DeAngelis, 2013).

Teşhis koymak adına bilgisayarlı tomografi (CT) veya manyetik rezonans ile görüntüleme (MR imaging: MRI) taramaları yapılmaktadır. Teşhis anındaki yaklaşık tümör çapı 4 cm olarak belirtilmesine rağmen bir çalışmada hastaların % 38'inde 5 cm'den küçük, % 56'sında 5-10 cm arasında ve % 6'sında 10 cm'den büyük olduğu görülmüştür (Urbańska ve ark., 2014). Gadolinum kontrast MRI ile yapılan tüm taramalarda, GBM yapıları, çekirdeğinde nekroz olmak üzere düzgün olmayan bir yapıda belirgin bir şekilde görülmektedir (Davis, 2016, Omuro ve DeAngelis, 2013). Nekroz, GBM'nin karakterize özelliklerinden biri sayılmaktadır ve bir tümörün WHO sınıflandırmasında grade IV olmasında gereklilikler arasındadır (Davis, 2016).

1.3.2. Tarihçesi

Merkezi sinir sistemi tümörleri ilk olarak Berns tarafından 1800 yılında ve Aberny tarafından 1804 yılında, sağlıklı doku ile aralarında sınır olmayan, fakat yapıları oldukça farklı olan difüze tümör yapıları olarak betimlenmiştir (Stoyanov ve Dzhenkov, 2018).

Glial tümörler ile ilgili ilk ayrıntılı histomorfolojik açıklama 1865'te Alman patolog Rudolf Virchow tarafından yapılmıştır. Merkezi sinir sisteminin glial hücrelerinden tümör yapılarının oluştuğunu makroskopik ve mikroskopik yöntemlerle tespit etmiş; sağlıklı beyin dokusundan dokusal ve hücresel yapı farklılığını ve komşu yapıları işgal ettiğini açıklamalarında belirtmiştir. Virchow, bu lezyonlara

“glioma” adını veren ve modern sınıflandırmanın temellerinin atılmasını sağlayan ilk araştırmacıdır (Agnihotri ve ark., 2013, Stoyanov ve Dzhenkov, 2018).

Bazı tümörlerin histolojik ve hücresel açıdan sağlıklı doku ile yüksek derecede kontrastı nedeniyle Virchow gliomaları düşük ve yüksek evre olmak üzere 2 gruba ayırmıştır. Düşük evre gliomalar, 2016’da yapılan WHO sınıflandırmasındaki evre I ve II’e, yüksek evre gliomalar evre III ve IV’e karşılık gelmektedir.

1926’da Amerikalı nöropatolog Percival Bailey ve modern nörocerrahinin babası sayılan Harvey Cushing, 2016’da WHO’ın yaptığı sınıflandırmanın temelini oluşturan sınıflandırma sistemini önermişlerdir (Stoyanov ve Dzhenkov, 2018). Bailey ve Cushing, kısmi tümör rezeksiyonu yapılan hastaların yapılmayanlara kıyasla daha uzun yaşadıklarını fark etmişlerdir. Bununla birlikte bütün gliomaların aynı yapıda olmadıkları gözlemini birleştirmişler ve sınıflandırmada 13 glioma tipine ulaşmışlardır (Agnihotri ve ark., 2013).

1934-1941 yılları arasında gliomalar üzerine en detaylı araştırmaları yürüten kişi Hans-Joacim Scherer’dir. Scherer, histomorfolojik teşhisin tümörlerin yapılarının teker teker incelenmesi ile değil, tümör bölgesinin tümü ile konulması gerektiğini öne sürmüştür. Araştırmalarına göre GBM ile astrositomanın kökeninin aynı olduğunu ve bazı astrositoma vakalarının GBM’ye dönüşebilecekleri sonucuna varmıştır, bu nedenle de primer glioblastoma (de novo gelişen) ve sekonder glioblastoma (astrositoma kökeninden gelişen) terimlerini üretmiştir (Stoyanov ve Dzhenkov, 2018).

20. yüzyılın ikinci yarısında serebral glioma çalışmaları yeni muayene yöntemleri bulunmasına rağmen gerilemiştir. Bu dönemdeki araştırmaların en önemlisi olan mutasyonların varlığı ve biyolojik potansiyellerinin araştırılması, Scherer’in primer ve sekonder glioblastoma ayrımlarını doğrulamıştır. Bazı mutasyonların sık sık kombinasyonları halinde görülmesi, GBM teşhis ve tedavisinde yeni klinik yaklaşımlara ve yeni terapötik alternatiflere ön ayak olmuştur (Stoyanov, ve Dzhenkov 2018).

1.3.3. Epidemiyolojisi ve etiyolojisi

Glioblastoma multiforme, kötücül primer beyin tümörlerinin % 46,1'ini oluşturmaktadır ve 100.000'de 3-5 insidansı bulunmaktadır (Wirsching ve ark., 2016). Glioblastoma multiforme'nin ortalama hayatta kalma süresi, yapılan araştırmalar ve klinik çalışmalara rağmen 14-16 ayı geçememiş, 2 ve 5 yıl arası hayatta kalma sürelerinin yüzdesi ise % 10-27 arası ve % 10'dan az olarak belirlenmiştir (Fourniols ve ark., 2015, Hottinger ve ark., 2016). Bu nedenle tedavinin kişiye özel olması, yaşam kalitesini artırma ve tedavi verimliliği yönünden önem kazanmıştır (Hottinger ve ark., 2016).

GBM'in epidemiyolojisi her ne kadar sağlam temeller kazanmış olsa da, nüksün belirli bir seyrinin olmayışı ve tedavi alternatiflerinin fazlalığı ve değişkenliği, nükseden GBM'nin net bir profil kazanamayışına neden olmuştur (Hou ve ark., 2006).

1.3.4. Belirtileri

Günümüzde, glioblastomanın klinik bir profili yoktur. Tümör bölgesinin yeri, epilepsi belirtilerinin oluşu/olmayışı, ödem oluşumu ve doku hasarı hastalığın gidişatını belirleyen faktörlerdir (Wirsching ve ark., 2016). En sık görülen belirtiler intrakranial basıncın artmış olması, baş ağrısı ve fokal veya ilerleyen nörolojik bozukluklardır (Davis, 2016).

- Epileptik belirtiler
  - Anlık afazi (düşündüklerini söz haline getirememe)
  - Anlık sensörimotor bozukluklar
- Multifokal büyüme
- İşgal bölgesi
- Baş ağrısı
- Baş dönmesi
- Yorgunluk
- Mide bulantısı/kusma
- Nörokognitif değişiklikler

- Kişilikte değişiklik
- Yürüyüşte dengesizlik veya tutarsızlık
- İdrar kaçırma
- Hemiparezis
- Hemineglect
- Görüş alanı bozuklukları
- Kranial sinir palsisi
- Disfaji
- Hidrosefalus (Davis, 2016, Omuro ve DeAngelis, 2013, Urbańska ve ark., 2014)

1.3.5. Sınıflandırılması

Glioblastoma multiforme kendi içinde primer ve sekonder GBM olmak üzere ikiye ayrılabilmektedir. Glioblastoma olarak başlayan tümör profili primer GBM, daha erken evre gliomaların dönüşmesi sonucu meydana gelen ise sekonder GBM olarak adlandırılmaktadır (Omuro ve DeAngelis, 2013).

Çizelge 1.3. Primer ve sekonder GBM'ın karşılaştırılması (Abdullah ve ark., 2016, Adamson ve ark., 2009, Agnihotri ve ark., 2013, Ostrom ve Barnholtz-Sloan, 2016)

Primer GBM	Sekonder GBM
- Öncülü olmaksızın (de novo), yaşlı hastalarda görülmektedir (ortalama yaş: 62). - Tüm GBM vakalarının % 95'ini oluşturmaktadır. - Epidermal büyüme faktör reseptör (EGFR) yerinin amplifikasyonu ve mutasyonu, - Fosfotaz ve tersin homologunu içeren (PTEN) kromozom 10q'nun heterozigotluğunu kaybetmesi, - MDM2'nin overekspresyonu, - P16 delesyonu, - İzositrat dehidrojenaz 1 ve 2 mutasyonları görülmemektedir. (<% 5)	- Daha genç hastalarda erken evre gliomalardan meydana gelmektedir (ortalama yaş: 45). - Glioblastoma insidansının sadece % 5'ini oluşturmaktadır. - TP53 mutasyonu ve retinoblastoma (RB), - Platelet türevi büyüme faktörü A ve platelet türevi büyüme faktör reseptör α'nın overekspresyonu (PDGFA/PDGFRα), - 19q kromozomunun heterozigotluğunu kaybetmesi, - İzositrat dehidrojenaz 1/2 mutasyonları mevcuttur. (>% 80)

1.3.6. Teşhis ve tedavi yöntemleri

GBM hastaları için doğru tedavi seçimi, tümör bölgesine, histolojik evresine, genetik profiline, proliferatif indeksine, rezeksiyonun tam ya da kısmi olmasına ve hastanın yaşı ve Karnofsky performans durum skalasındaki (KPS scale) yerine bağlıdır. KPS onkoloji ve palyatif tıpta bir hastanın genel durumunun ve yaşam kalitesinin tanımlanmasına imkan sunmaktadır. Bu skala 0 hastanın ölümü ve 100 "hastalık bulgusu yok" olacak şekilde 11 aşama içermektedir (Urbańska ve ark., 2014).

Tedavi yöntemlerinin seyrinin belirlenmesi, genellikle hastalığın teşhis yöntemlerine bağlı olarak gerçekleştirilmiş ve teşhis yöntemlerinin karşılaştırılmasında çeşitli araştırmacı grupları tarafından farklı parametreler belirlenmiştir. Bu nedenle, ilk önce teşhis kriterlerinden ve sonra da uygulanan tedavi alternatiflerinden kronolojik olarak bahsedilecektir.

Levin ve ekibinin yaptığı çalışmaya göre, glioblastoma tedavisinde, tedavi yöntemlerinin karşılaştırılmasında en önemli parametreler hayatta kalma, tümör büyümesi veya ilerlemesi olmuştur. Bu nedenle bu çalışmada; belirlenen kriterler ile belirlenen sistemin, kemoterapiye olan cevabın belirlenmesindeki kesinlik ve doğruluğu araştırılmıştır.

Analizler esnasında hastalar 4 çeşit teste tabi tutulmuştur;

1- Elektroensefalografi
2- Nörolojik muayene
3- Radyonüklit tarama (RN scan)
4- Bilgisayarlı tomografi (CT scan)

Analizler ve testler esnasında, hastaların hangi tarama yöntemi/testte kemoterapiye cevap verdiğinin görüldüğü incelenmiştir. Aynı metot, hastaların gerilemesinin gözleminde de kullanılmıştır. Kemoterapi/kemoradyoterapi gören 100 hastaya, terapi başlangıcından 4-8 hafta sonra belirlenen bu 4 test uygulanarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Kemoterapötik uygulama sadece karmustin türevleri veya yanında prokarbazin, vinkristin, hidroksiüre veya 5-FU ile yapılmıştır. Çalışma sonucunda nörolojik muayene, RN tarama ve minimum dozda kortikosteroid

kullanımı ile gerileme ve iyileşmenin öngörülebileceği görülmüştür (Levin ve ark. 1977).

Fakat MacDonald ve ekibi, kriterlerin değiştirilmesi gerektiğini, görüntüleme ve steroid kullanımını göz önüne alarak klinik değerlendirmeleri öncelikli tutmamayı fakat göz ardı etmemeyi savunmuşlardır. Görüntüleme ve steroid kullanımına bağlı olarak 4 tip cevap belirlemişlerdir;

1- **Tümüyle cevap:** CT veya MR'da tümör görüntülenmemesi (1 ay ara ile)
2- **Kısmi cevap**: Tüm tümör büyüklüklerinde ≥ % 50 azalma, kullanılan steroid dozu sabit veya azaltılmış, nörolojik durumda stabilite veya iyiye gelişme gözlenmesi
3- **İlerleyen hastalık profili**: Tüm tümör büyüklüklerinde ≥ % 25 artma veya yeni tümör gözlenmesi (CT/MRI), nörolojik kötüleme, kullanılan steroid dozu sabit veya yükseltilmiş
4- **Stabil hastalık:** Diğer tüm durumlar (MacDonald ve ark., 1990)

Nöroonkolojide Cevap Değerlendirmesi (Response Assessment in Neuro-Oncology: RANO) ekibinin tespitlerine göre MacDonald kriterlerinin sınırlamaları, irregüler şekilli tümörlerin ölçülme yöntemi, gözlemci çeşitliliği, tümörün kontrast artırmayan kısmının incelenememesi, multifokal tümörlerin değerlendirilmesi için yöntem eksikliği vb. olarak belirtilmektedir. Ayrıca, radyoterapiden hemen sonra MRI'da görülen kontrast artışı ile karakterize olan, ve radyasyonun, tümör vaskülatürünü genişletmesinden dolayı görüldüğü düşünülen yalancı ilerleme (pseudoprogression) adı verilen durum ortaya çıkmaktadır. Yalancı ilerlemenin yapılan çalışmalarda istatistiksel ve tıbbi yanlışlara neden olmasından dolayı, önerilen yeni protokolde radyoterapinin bitiminden sonraki ilk 12 haftada (yalancı ilerlemenin en çok olduğu zaman aralığı) radyasyon bölgesinin dışındaki kötülemenin artışının incelenmesi uygun görülmüştür.

Kemoradyoterapi sonrasında;

- **< 12 haftada:** Radyasyon verilen bölgede yeni kontrast artışı var ise/histopatolojik örnekte tümör var ise, önceki biyopsi ile karşılaştırıldığında MIB-1 proliferasyonunda artış var ise, eğer yalancı ilerlemeden farkı

histopatolojik veya teşhis yöntemleri ile anlaşılamıyorsa hastalık ilerlemiş sayılmayacaktır.

- **≥ 12 haftada**

  1- Radyasyon bölgesinin dışında kontrast artıran lezyon varlığı (azalan, sabit veya artan dozda kortikosteroid kullanımına rağmen),

  2- Kitle büyüklüklerinde, operasyon sonrası ilk görüntülemeye nazaran toplam olarak ≥ % 25 artış (sabit veya artan dozda kortikosteroid kullanımına rağmen),

  3- Ek ilaçlardan veya başka hastalıklardan kaynaklanmayan klinik kötüleme,

  4- Antianjiyojenik terapi alan hastalarda T2/FLAIR kontrast artırmayan lezyonlar kötüleme sayılabilir (sabit veya artan dozda kortikosteroid kullanımına rağmen). Antianjiyojen ajanlar, özellikle vasküler endotelyal büyüme faktörü (vascular endothelial growth factor: VEGF) hedefleyen bevacizumab veya VEGF reseptörünü hedefleyen cediranib kontrast artışında azalmaya neden olabilir. Bu da antiglioma etkinin dışında bir iyileşme belirtisi vermektedir.

RANO teşhis kriterleri 2010'da belirlendiğinden beri altın standart olarak kullanılmaktadır (Wen ve ark., 2010).

Geçmişte GBM tedavisi protokolünde sadece lezyon veya tümörlerin rezeksiyonu yer almaktaydı. Fakat Walker ve ark. 1978'de yaptıkları bir çalışma ile, radyoterapi veya karmustin tedavisi alan hastalarda yaşam süresinin uzadığını ve yaşamını sürdüren hasta sayısının arttığını kanıtlamıştır. Destekleyici tedavi ile elde edilen 14 hafta ile karşılaştırıldığında yaşam süresi karmustin ile 18.5, radyoterapi ile 35 hafta ve karmustin+radyoterapi ile 34.5 haftaya çıkmıştır fakat yine de istenen sonuçlara ulaşılamamıştır. Bu gelişme ile tümör rezeksiyonu ile ek tedavi, standart tedavi protokolü haline gelmiştir.

TMZ 1980'lerde Aston Üniversitesi'nde geliştirilmiş, imidazotetrazin türevleri grubunda yer alan, alkilleyici özellikte, antikanser bir ajandır. Friedman ve ekibinin yaptığı preklinik çalışmalarda, TMZ'nin intrakraniyal ve ekstrakraniyal tümörlerde antitümör aktivitesinin olduğu görülmüştür (Phillips ve Chi, 2016).

Yung ve arkadaşları altı ay boyunca hastalıksız sağ kalımı sağlamaya ve geleneksel tedavinin işe yaramadığı hastalarda GBM'nin ilk nüksünde TMZ ile PCB'nin (prokarbazin) etkinliğini karşılaştırarak güvenlik profillerini saptamayı amaçlamışlardır. Hastaların yapılan çalışmaya dahil edilebilme şartları; 18 yaştan büyük olmaları, supratentarial GBM bulgusu, Gd- MRI veya CT görüntülemede tümör nüksü bulgusu, Karnofsky performans durumu (KPS)>70 ve sağkalım beklentisinin 12 haftadan uzun olması olarak belirlenmiştir.

TMZ 28 günlük bir periyotta art arda ilk beş gün 150 veya 200 mg/m^2 olarak, PCB 150 veya 125 mg/m^2/gün olarak 28 gün uygulanması uygun görülmüştür.

Uygulanacak protokol onaylandıktan sonra performans, klinik değerlendirme, nörolojik muayene ve yaşam kalitesi ölçümü anketi aylık olarak uygulanmıştır. Tümör kitlesi Gd-MRI ve kontrastlı CT görüntüleme ile 2 ayda bir görüntülenmiştir. İlerlemenin, görüntüleme bulguları ile daha hızlı saptandığı gözlenmiştir. Hastalar bu süreçte, nörolojik stabilitenin sağlanması için mümkün olan en küçük dozda steroid kullanmışlardır. Uygulanan tedaviye karşı verilen cevap tipleri aşağıda özetlenmiştir;

- *Tümüyle yanıt: (Complete response=CR)*

Tüm tümörlerin 1 aydan fazla süre aralıkla yapılan görüntülerde kayboluşunun gözlenmesi,
Steroid kullanımının kesilmesi (fizyolojik doz uygulaması haricinde),
Nörolojik durumda stabilite veya iyileşme

- *Kısmi cevap:*

1 aydan fazla aralıkla yapılan görüntülemelerde ölçülebilen lezyon boyutlarında % 50 azalma,
Ölçülemeyen lezyonlarda iyileşme gözlenmesi,
Her görüntülemeden önce 7 gün sabit dozda steroid kullanımı,
Nörolojik durumda stabilite/iyileşme

- *İlerleyen hastalık*

Ölçülebilen lezyon boyutlarında % 25 artış, kontrastlanmanın artması veya yeni tümör görülmesi.

- *Diğer tüm koşullar stabil hastalık (SD) kabul edilmektedir.*

Yapılan çalışmalar sonucunda altı aylık hastalıksız sağ kalım TMZ alan hastalarda % 21, PCB alan hastalarda % 8 olarak saptanmıştır. 6 ayda TMZ grubunda sağ kalım oranının % 60, PCB grubunda % 44 olduğu görülmüştür. Genel hastalıksız sağ kalım TMZ alan hastalarda ortalama 12.4 hafta, PCB alan hastalarda 8.32 hafta olarak belirlenmiştir, fakat elde edilen verilerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirtilmiştir (P = 0,33) (Yung ve ark., 2000).

Stupp ve ekibinin yaptığı çalışmada hastaların çalışmaya girdikleri ilk 14 gün içinde tam tıbbi geçmiş alma, fiziksel muayene, performans durumunun belirlenmesi ve Gd-MRI/CT görüntüleme gibi temel değerlendirmeler yapılmıştır. Gd-MRI ilk ek tedavi döngüsünden önce, ilk yıl içinde 2 ayda bir ve 2. yılda 2-3 ayda bir olmak üzere uygulanmıştır.

TMZ 75 mg/m^2/gün olmak üzere altı hafta boyunca her gün, RT 60 Gy olmak üzere 6 hafta boyunca haftada beş gün x 2 Gy olarak, sonrasında TMZ 28 günlük döngüler içinde ilk 5 gün 200 mg/m^2/gün olmak üzere altı hafta boyunca uygulanmıştır. Tedavide kullanılacak RT dozları, operasyon öncesinde uygulanan kontrastlı CT scan veya Gd-MRI yardımıyla belirlenmiştir. RT'nin uygulanacağı tedavi hacmi, tümör bölgesi ve bölgenin 2-3 cm periferi olarak belirlenmiştir. RT'den 4 hafta sonra hastalara her 28 günün ilk 5 günü 200 mg/m^2/gün TMZ tatbik edilmiştir.

Hastaların % 77'si çalışmadan önce kitle rezeksiyonu operasyonu geçirdiği literatürde verilmiştir. Bu hastaların % 42'sine makroskopik tam rezeksiyon, % 23'ne stereotaktik biyopsi uygulanmıştır. Yapılan çalışmada teşhisten RT+TMZ terapisine kadar olan süre ortalama 25 gün olarak saptanmıştır (14-45 gün arası). Sonuçta, ortalama sağ kalım süresinin 16 ay olduğu ve 1. ve 2. yıl sağ kalım oranlarının sırayla % 58 ve % 31 olduğu saptanmıştır (Stupp ve ark., 2002).

Stupp ve ekibi, 2005'te sonuçlarını yayınladıkları çalışmada hasta özelliklerini şu şekilde belirlemişlerdir;

- 18-70 yaş arası;
- Teşhisi yeni konmuş ve histolojik olarak doğrulanmış GBM;
- Steroid dozu alımı en geç 14 gün önceden sabitlenmiş veya azaltılmış olmalı.

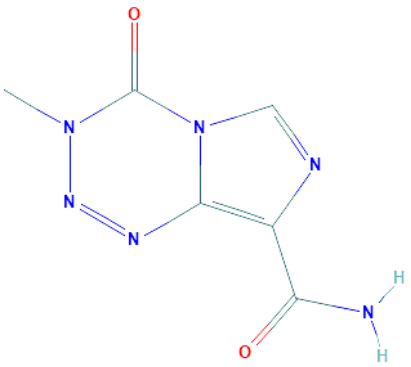
Hastalar GBM teşhisini kapsayan 6 hafta içerisinde fokal RT (kontrol grubu) veya RT+günlük TMZ'yi takip eden ek TMZ tedavisi gruplarına rastgele ayrılmışlardır. RT önceki çalışma standartları ile aynı tutulmuştur, buna ek olan TMZ tedavisi 7 haftayı geçmeyecek şekilde 75 mg/m^2/gün olarak verilmiştir. 4 haftalık aradan sonra yapılan ek TMZ tedavisi her 28 günde, ilk 5 gün 150 mg/m^2/gün ve tolere edilebilirse sonraki günlerde 200 mg/m^2/gün olmak üzere uygulanmıştır. Sonuçlar aşağıdaki muayene/testlerle değerlendirilmiştir;

- CT veya MRI,
- Fiziksel muayene,
- Kısa duygu durum muayenesi,
- Yaşam kalitesi anketi içermektedir.

Ek TMZ tedavisi esnasında hastalar aylık klinik değerlendirme ve 3. ve 6. döngüler sonunda kapsamlı bir değerlendirmeye tabii tutulmuşlardır. Ortalama 28 aylık bir takip süreci sonucunda ortalama sağ kalım RT+TMZ grubunda 14.6 ay iken sadece RT alan grupta 12.1 olarak saptanmıştır. 2 yıllık sağ kalım oranı RT+TMZ grubunda % 26 iken sadece RT alanlarda % 10.4 olarak tespit edilmiştir (Stupp ve ark., 2005).

Stupp ve ekibinin belirlediği tedavi protokolü, günümüzde hala glioblastoma multiforme tedavisinde kullanılmaktadır.

1.4. Temozolomid



Şekil 1.1. Temozolomid'in formülü (PubChem Database)

- **Molekül ağırlığı:** 194.151 g/mol
- **CAS:** 85622-93-1
- **Formülü:** $C_6H_6N_6O_2$
- **Kimyasal okunuşu**
  - **IUPAC:** 3-metil-4-oksoimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazin-8-karboksamid
  - **USP 33:** Imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazine-8-carboxamide,
- **Erime noktası:** 212 °C
- **Yarı ömrü:** 1.8 saat
- **Form:** Katı, toz
- **Rengi:** Beyaz
- **Çözünürlük verileri;**
  - Su: 5 mg/mL
  - DMSO: >20 mg/mL
- **Maksimum absorbans:** 335 nm, 254 nm (metaboliti MTIC)

(DrugBank, PubChem Database, USP 2010)

1.4.1. Piyasa preparatları

Çizelge 1.4. Türkiye de temozolomid içeren piyasa preparatları (İlaç Rehberi)

Jenerik Adı	Dozaj formu ve dozu	Firma
MİDİZOL	100 mg 5 kapsül 20 mg 5 kapsül 250 mg 5 kapsül 5 mg 5 kapsül	Deva
TEMOZOLİD	100 mg 5 kapsül 20 mg 5 kapsül 250 mg 5 kapsül	Dem
TEMOMİD	100 mg 20 kapsül 100 mg 5 kapsül 20 mg 20 kapsül 20 mg 5 kapsül 250 mg 20 kapsül 250 mg 5 kapsül 5 mg 20 kapsül 5 mg 5 kapsül	Koçak
TEMODAL	5 mg 5 kapsül 20 mg 5 kapsül 100 mg 5 kapsül 250 mg 5 kapsül 140 mg 5 sert kapsül 180 mg 5 sert kapsül	Merck Sharp & Dohme
TEMODAL (Schering-Plough)	5 mg 5 kapsül 20 mg 5 kapsül 100 mg 5 kapsül 250 mg 5 kapsül	Schering-Plough

1.4.2. Farmakodinamik özellikleri

DNA alkilasyon reaktifleri, anti-kanser ilaçlarının en eski sınıfıdır, ve bu maddeler nükleik asit bazları ile farklı küçük veya büyük eklentiler oluşturarak DNA'ya zarar verir (Abbaszade, 2018). TMZ alkilleyici ajanlar grubuna ait imidazotetrazin türevi bir antikanser ajandır (Agarwala ve Kirkwood, 2000, Stupp ve ark., 2002). Fizyolojik pH'da aktif metaboliti olan 5-(3-metiltriazen-1-il)-imidazol-4-karboksamid (MTIC)'e dönüşmektedir. MTIC ise pürin ve nükleik asit biyosentezine aracı olan 5-amino-imidazol-4-karboksamid (AIC) ve metilhidrazin'e hidrolize olur (Pires, 2014).

1.4.3. Farmakokinetik özellikleri

TMZ oral uygulamadan sonra hızlı bir şekilde emilmektedir ve biyoyararlanımı yaklaşık olarak % 100 kabul edilmektedir (Li ve ark., 2015). TMZ midenin asit pH'sında oldukça stabil iken kan ve dokuların bazik pH'sı ile temas ettiğinde aktif metaboliti MTIC'ye dönüşmektedir (Agarwala ve Kirkwood, 2000). Oral TMZ hızlı bir şekilde emilime uğrayarak sırayla MTIC ve AIC'ye dönüşmektedir. Tek dozdan sonra MTIC'nin Tmax değeri 1,5-2 saat iken AIC'nin Tmax değeri ise 2,5 saat olarak belirlenmiştir. TMZ MTIC, ve AIC'nin pik plazma konsantrasyonları (Cmax) sırayla % 13, % 2,5 ve % 4,7 olarak saptanmıştır (Pires, 2014).

Otoradyografi verisi ^{14}C-TMZ (karbon işaretli TMZ) 'nin tüm dokulara hızlı ve geniş ölçüde yayıldığını göstermektedir. Temel atılım yolu böbrekler olmakla birlikte eser miktarda feçes yoluyla atılım veya karbondioksit olarak atılım gözlenmiştir. Oral uygulamadan 1 hafta sonra idrar ile atılımın % 37.7, fekal yoldan atılımın % 0,8 olduğu saptanmıştır. Oral uygulamadan 24 saat sonra idrardaki radyolojik bulgulara göre verilen dozun % 5.6'sını metabolize olmamış TMZ, % 12'sini AIC, % 2.3'ünü temozolomidin asit metaboliti ve % 17'sini tanımlanmamış polar metabolitleri oluşturmaktadır (Merck, 2017, Pires, 2014). Temozolomidin genel klirensi yaklaşık 5.5 L/saat/m^{2}'dir ve ortalama 1,8 saatlik yarı ömre sahiptir (Merck, 2017).

1.4.4. Etki Mekanizması

TMZ, fizyolojik pH'da aktif metaboliti olan 5-(3-metiltriazen-1-il)-imidazol-4-karboksamid (MTIC)'e dönüştükten sonra etkisini göstermeye başlamaktadır (Lee, 2016). MTIC'nin, guaninin N7 pozisyonunda DNA, adenozinin O3 pozisyonunda ve guanozinin O6 pozisyonunda alkillendiği, en yaygın alanın N7 pozisyonu olduğu söylenir. Guanin artıklarının bu metilasyonu, tek ve çift iplikli DNA kopmalarına ve ardından apoptotik hücre ölümüne yol açmaktadır. N7-metilguaninin, tümör hücrelerinin temozolomide duyarlılığı ile spesifik olarak DNA onarım proteini olan O6-alkilguanin alkiltransferazın aktivitesi arasında bir korelasyon olduğu için ilacın antitümör aktivitesinde rol oynadığı ileri sürülmektedir (Lee, 2016, Merck, 2017, Villano ve ark., 2009).

1.5. Kan-beyin bariyeri

İlaçların beynin içine nüfuz etmesindeki en büyük engel, kan-beyin bariyeri (KBB)'dir. KBB, beyindeki ve omurilikteki damarları kaplayan oldukça seçici bir bariyerdir (Bodor ve Buchwald, 2002). Temel amacı, beyni ve omuriliği ilaçların, nörotoksinlerin, invazif organizmaların geçişinden korumak ve sistemik dolaşım ile beyin dokusu arasındaki esansiyel besin maddelerinin hareketinin düzenlenmesi için fiziksel bir bariyer olarak davranmaktır. KBB temel ve birincil olarak birbirlerine "tight junctions" (sıkı kavşaklar) proteinleri adı verilen sıkı bağlantılarla bağlanmış, özelleşmiş beyin endotel hücrelerinden oluşmaktadır (Gutkin ve ark., 2016). Bu kesintisiz hücre yapıları, beyin dokusuna özgü yapılar olan perisitler ve uç kısımlarından bariyer yapısına tutunmuş astrositlerle desteklenmektedir, bazal membran da bariyer yapısına mekanik destek sağlamaktadır (Abbott, 2013).

KBB yapısında bulunan taşıyıcı sistemler genel olarak;

1- *Taşıyıcı aracılı transport sistemleri,*
2- *Reseptör aracılı transport sistemleri,*
3- *Adsorpsiyon aracılı transport sistemleri*
4- *Aktif efluks transport sistemleri* olmak üzere 4 grupta toplanmaktadır (Doğan ve ark., 2013).

Bu sistemlerden taşıyıcı aracılı transport sistemleri ve aktif efluks transport sistemleri, kan ve beyin arasında küçük moleküllerin (glukoz ve aminoasit gibi moleküller ve metabolik ürünleri) taşınmasından sorumluyken reseptör aracılı transport sistemleri ve adsorpsiyon aracılı transport sistemleri kandaki bazı büyük endojen moleküllerin beyne girişinden sorumludur. Taşıyıcı aracılı transport sistemleri kandan beyne çift yönlü taşıma gerçekleştirirken, aktif efluks transport sistemleri genellikle efluks pompa şeklinde çalışarak beyindeki ilaç molekülleri ya da endojen molekülleri kana vermektedir (Arısoy ve ark., 2017). Bu sistemler de KBB'nin transport bariyerini oluşturmaktadır.

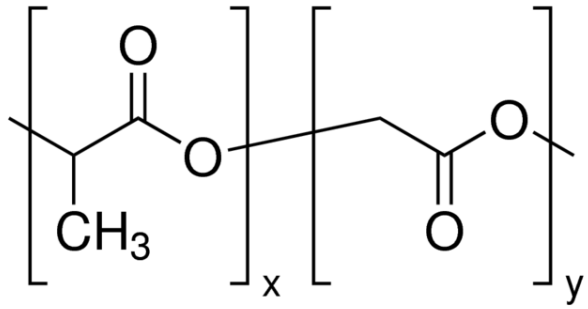
Fakat kan beyin bariyerini oluşturan birbirine sıkı kavşaklarla bağlı endotelyal hücrelerin çoğu, bileşenlerin kan akışından beyin parenkimasına geçişini engellemektedir. KBB, çok küçük sayıdaki küçük hidrofobik moleküllerin beyin vasküler sisteminde taşınmasına izin verir. Bununla birlikte, birçok anti-kanser ajan, KBB'ni serbestçe geçemeyen büyük hidrofobik moleküllerdir ve hem KBB vaskülatürü hem de tümör hücreleri tarafından ekspres edilen efluks pompaları için substrattırlar (Juillerat-Jeanneret, 2008).

KBB'ni aşmanın bir yolu taşıyıcı olarak nanopartiküllerin kullanılmasıdır (Abbott 2013). Nanopartiküler taşıyıcı sistem içerisinde verilen bir etkin maddenin KBB'yi geçişini artık etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri değil NP'ün fizikokimyasal ve biyomimetik özellikleri belirlemektedir. Bu özellik etkin maddeye herhangi bir modifikasyon yapılması gerekliliğini ortadan kaldırmaktadır (Arısoy ve ark., 2017).

Polimerik nanopartiküllerin çoğu biyoparçalanır ve biyouyumludur, bu nedenle nanotaşıyıcı ilaç sistemleri için tercih edilmektedirler. Nanopartikül üretimi için kullanılan polimerler jelatinler, kitozan, poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) kopolimeri, polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA), poli (alkilsiyanoakrilat) (PACA), poli (metilmetakrilat) (PMMA), ve poli (bütil)siyanoakrilat (PBCA)'tır. ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), insan kullanımı için PLA ve PLGA gibi biyoparçalanır polimerik nanopartikülleri onaylamıştır. Bu nanopartiküller, birçok terapötik madde sınıfını enkapsüle etmek için formüle edilebilmektedir (Faraji ve Wipf, 2009).

1.6. PLGA

PLGA, ilaç taşıyıcı sistemler, doku mühendisliği, tıbbi ve cerrahi cihazlara uygulanabilirliği, toksik olmayışı ve biyouyumlu oluşu sayesinde en sık kullanılan önemli polimerlerden biri haline gelmiştir. FDA ve EMA tarafından biyobozunur özelliği, biyouyumluluğu ve kontrollü salım özellikleri sayesinde çeşitli ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanımı için onay almıştır. Bu polimerler farklı molekül ağırlıklı, kopolimer kompozisyonlu veya ester/asit son gruplu olmak üzere farklı çeşitlerde piyasada yer almaktadır (Danhier ve ark., 2012, Kapoor ve ark., 2015).



Şekil 1.2. PLGA'nın moleküler yapısı (PubChem Database)

Polimer yapısında hidrolize uğramış ester bağları, bir hidroksil ve bir karboksilik asit grubu oluşturmaktadır. Uzun polimer zincirlerinin kopması polimerlerin molekül ağırlığını azaltmakta, hidrofil özelliği arttırmakta ve suda çözünür ürünler oluşturmaktadır. Bu suda çözünür ürünler laktik ve glikolik aside hidroliz olup daha sonrasında vücudun normal metabolik yolakları tarafından enerji, karbon dioksit ve su oluşturmak üzere parçalanmaktadırlar (Kapoor ve ark., 2015).

PLGA'nın fiziksel özellikleri molekül ağırlığına, laktit: glikolit oranına, yüzey özelliklerine ve depolama sıcaklıklarına bağlı olarak değişmektedir. PLGA'nın mekanik dayanıklılığı; molekül ağırlığı ve polidispersite indeksinden etkilenmektedir. Bu özellikler ilaç taşıyıcı sistem olarak üretilebilirliğini etkilemekte ve taşıyıcı sistemin bozulma hızı ve hidroliz oluşunu kontrol edebilmektedir.

1- **Kristallenme özelliği:** Kristallenme özelliğini sağlayan bileşen PGA olup, polimer içinde daha yüksek PGA oranı daha hızlı biyobozulmaya ve daha düşük Tg (camsı geçiş sıcaklığı)'na neden olmaktadır. Mekanik dayanıklılık,

şişme kapasitesi, hidroliz olma özelliği ve biyobozunma hızı PLGA'nın kristallenme derecesinden doğrudan etkilenmektedir.

2- **Hidrofilisite/hidrofobisite:** PLA'daki metil gruplarının varlığı laktit gruplarınca zengin PLGA polimerlerini daha hidrofobik kılmakta daha az su absorbe etmesini sağlamakta ve daha yavaş bozulmasına neden olmaktadır (Makadia ve Siegel 2011).

Son grubu ester olan polimerlerin hidrolitik bozulmaya daha dayanıklı olduğu söylenmektedir. % 100 PLA'dan oluşan polimerin in vivo rezorpsiyon süresi 12-24 ay iken tamamen (% 100) PGA'dan oluşan polimerin ise 6-12 ay olarak belirlenmiştir. Rezorpsiyon süresindeki bu farklılık PLA'nın hidrofil özelliğinin kötü olmasından ve yavaş bozulma hızından; PGA'nın PLA'ya nazaran yüksek hidrofil özelliğinden ve hızlı bozulmasından kaynaklanmaktadır (Kapoor ve ark., 2015).

1.6.1. NP sistemler ve farmasötik alanda kullanımları

PLGA nanopartikülleri istenen her şekil ve boyutta üretilebilir ve her boyuttaki molekülleri hapsedebilir (Makadia ve Siegel, 2011).

PLGA nanopartiküler kanser kemoterapisinde kullanılan küçük antikanser ajanları enkapsüle etmek ve in vitro ve in vivo çalışmalarda çeşitli kanserlerin tedavisi için değerlendirilmişlerdir (Danhier ve ark., 2012).

Householder ve ark. çalışmalarında sistemik olarak uygulamak üzere kamptotesin yüklü PLGA nanopartiküller (CPT-PLGA NP) üretmiştir. CPT-PLGA NP'lerin kamptotesini intrakraniyal glioma'ya 10 kat daha fazla konsantrasyonda ulaştırabildiği görülmüştür. Kamptotesinin tolere edilebilirliğini 8-10 mg/kg'dan 20 mg/kg'a çıkarmıştır. CPT-PLGA NP'lerin C57 albino farelerdeki intrakraniyal GL261 glioma hücrelerinin büyümesini yavaşlattığı, ve yaşam süresini salin 28 gün, serbest CPT 32 gün olmak üzere, (ortalama olarak) 36.5 güne uzattığı gözlenmiştir (Householder ve ark., 2015).

Ali ve ark., inflamatuar barsak hastalığının tedavisi için inflamasyonlu intestinal mukozaya hedeflemek amacıyla budesonid yüklü PLGA nanopartiküller üretmişlerdir.

İnflame farelere ve sağlıklı farelere 40 mg/150 ml budesonid yüklü PLGA nanopartiküller verilmiş ve NP'lerin inflamasyon olan bölgelerde yoğunlaştığı, sağlıklı farelerde ise sisteme yayıldığı görülmüştür. Bu sayede budesonid yüklü PLGA nanopartiküllerin hedeflendirilebildiği gözlenmiştir (Ali ve ark., 2016).

Sharma ve ark., intranazal yoldan beyine hedeflendirme amacıyla diazepam (DZP) yüklü PLGA nanopartiküller üretmişlerdir. İşaretli DZP-PLGA nanopartiküller Sprague-Dawley farelere verilmiş ve gama sintigrafi ve biyodağılım çalışmaları ile burundan beyine ilaç iletimi olup olmadığına bakılmıştır. Beyin/kan uptake oranı, ilaç hedefleme etkinliği ve direk burundan beyne ilaç iletim oranı sıra ile serbest-DZP için 0.38-1.06, 125 ve % 1 iken, DZP-PLGA nanopartiküllerde 1.23-1.45, 258 ve % 61 olarak bulunmuştur. Sintigrafi sonuçları ise biyodağılım çalışmaları ile uyumluluk göstermiş ve görüntülerde burundan beyine diazepam uptake'i gözlenmiştir (Sharma ve ark., 2015).

Sokol ve ark., prostat kanseri tedavisi için abirateron asetat ve dosetaksel yüklü PLGA NP'ler üretmişlerdir. Üretilen PLGA NP'lerin abirateron asetat ve dosetaksel salımını 24 saat boyunca kontrol edebildiği görümüştür. Uptake ve dağılım çalışmaları için LNCaP hücre serisi üzerinde konfokal mikroskopi ile incelemeler yapılmıştır. Görüntüleme sonucunda hücre stoplazmasında NP'lerin akümüle olduğu gözlenmiştir (Sokol ve ark., 2019).

PLGA nanopartiküllerin endositozu sağlanarak merkezi sinir sistemine etkin bir şekilde ilaç taşınması sağlanabilmektedir. Fakat vücut hidrofobik partikülleri yabancı madde olarak kabul etmektedir. Retikülo-endotelyal sistem bu partikülleri kan akışından çıkarıp karaciğer veya dalakta depolayarak sonrada atılımını sağlamaktadır. Bu olay nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlere engel teşkil eden en önemli biyolojik bariyerlerden biri sayılmaktadır (Danhier ve ark., 2012).

1.6.2. Lokal tedavi

Lokal ilaç tedavisinin mantığı kan-beyin bariyerini geçme fikrinde yatmaktadır. Bahsettiğimiz gibi, kan-beyin bariyerini oluşturan hücreler neredeyse boşluksuz ve aşılamaz sıkı kavşaklarla bağlıdır. Kan-beyin bariyeri sadece fiziksel değil, metabolik bir bariyer de oluşturmaktadır.

Antikanser özellikli etkin maddelerin lokal olarak tümör bölgesine iletimi için kullanılabilecek taşıyıcıların bazı özellikler taşıması gerekmektedir.

- Biyolojik bir reaksiyona neden olmamalı,
- Tümüyle biyouyumlu olmalı,
- Yer değiştirerek ventriküler sistem veya anatomik yapıya zarar vermemeli,
- Yer değiştiren veya sızan bir parça olduğunda ağır yan etkilere neden olmamalıdır (Abdullah ve Burdick, 2016).

Fakat tedavi alternatifleri düşünüldüğünde, lokalize kemoterapinin avantajları;

- İlaç moleküllerinin dozaj formu içerisinde sabit kalması ve antikanser aktivitenin korunması,
- Tümör hücresi proliferasyon döngüleri süresince kontrollü ve uzatılmış antikanser ajan salımının difüzyonu ve hücre içine alımının sağlanması,
- Suda çözünmeyen ajanların yüklenebilmesi ve kullanılabilmesi,
- Hastalıklı bölgeye hedeflendirme yapılarak kullanılan ajan miktarının azaltılabilmesi,
- İlacın vücuda bir kezden fazla verilmesine gerek olmayışı,
- Sistemik uygulanan antikanser ajanlarla ilişkilendirilen yan etkilerin azaltılabilmesi olarak sayılabilmektedir (Wolinsky ve ark., 2012).

Lokalize tedavi için filmler, jeller, waferlar, çubuklar ve diğer şeklini koruyan, biyobozunur dozaj formları kullanılabilmektedir. Glioblastoma tedavisi için FDA onayı almış bir ilaç ise, BCNU içeren **"Gliadel wafer"**dır. Fakat, yapılan bir çalışmada placebo ile karşılaştırıldığında, sağkalım süresini sadece 2.3 ay uzatabildiği görülmüştür. Bunun da enfeksiyon, diğer yapılara sızma ve beynin şişmesi gibi ağır bir yan etki profilini ve toksisiteyi dengelemeye yetmediği düşünülmüştür.

Gliadel'in oluşturduğu yan etkilerin, kullanılan taşıyıcı sisteme bağlı olduğu düşünülmektedir. Kullanılan taşıyıcı sistemin sert olması ve beyin boşluğunda hareket edebilmesi ödeme neden olabilmektedir. Bu nedenle, şeklini koruyacak fakat esnekliğini de kaybetmeyecek, jel veya film gibi dozaj formları uygun olarak düşünülmektedir (Abdullah ve Burdick, 2016).

1.7. Pluronic® F-127

Pluronic® olarak anılan ABA tri-blok kopolimerler sınıfı, 50 adet amfifilik, suda çözünen materyal sunmaktadır (Pitto-Barry ve Barry, 2014). Bu polimer grubu kokusuz ve tatsız özellikte beyaz, mumsu akışkan granüllerden oluşmaktadır ve çözeltileri asit, alkali ve metal iyonların varlığında stabildir (Escobar-Chávez ve ark., 2006). Üretici BASF firması, her polimerin yapısal özelliğini belirten harfler ve sayılar içeren özel bir nomenklatür ortaya koymuştur. P harfi pasta kıvamını, L harfi sıvı formu (liquid) ve F harfi pulsu (flake) yapıyı ifade etmektedir (Pitto-Barry ve Barry, 2014).

Pluronic® polimerler etilen oksit ve propilen oksidin kondensasyonu ile üretilmektedirler (Escobar-Chávez ve ark., 2006). Fiziksel ve kimyasal özellikleri etilen ve propilen oksit blok oranları değiştirilerek ayarlanabilmektedir. Bu oranların değişmesi direkt olarak in vivo özellikler ve hücre ve hücre membranları ile etkileşimlerini değiştirmekte ve yeni nano ilaç biyomateryal tasarımları için yüksek bir potansiyel oluşturmaktadır (Pitto-Barry ve Barry, 2014).

En sık kullanılan Pluronic® polimerler PF-68 (poloksamer 188), PF-87 (poloksamer 237) ve PF-127 (poloksamer 407) tipidir (Escobar-Chávez ve ark., 2006).

Pluronic® F-127 (PF-127), polioksietilen-polioksipropilen kopolimerlerinden oluşan, non-iyonik bir sürfaktandır. $E_{106}P_{70}E_{106}$ genel formülüne sahiptir ve ortalama molekül ağırlığı 13.000'dir. PF-127'nin % 20-30'luk suda çözeltileri ters termal dönüşüm özelliğine sahiptir, bu da buzdolabı şartları altında (4-5°C) sıvı, fakat oda sıcaklığı ve daha yüksek sıcaklıklarda jel formunda olduğu anlamına gelir. Bu jeller tekrar soğutulduklarında sıvı formlarına geri dönmektedirler (Escobar-Chávez ve ark., 2006).

1.7.1. Pluronic® F-127'nin farmasötik alanda kullanımı

PF-127'nin iyi çözünürlük, ters termal dönüşüm ve düşük toksisitesi ilaç taşıyıcı sistem olarak araştırılmasında önemli bir faktör olmuştur. Ters termal dönüşüm özelliği sayesinde oluşan jel yapı, etkin madde deposu ve yapay bir bariyer görevi görebilmektedir (Escobar-Chávez ve ark., 2006).

Pluronic® polimerlerden oluşan ilaç taşıyıcı sistemler etkin maddeleri sadece hapsetmek ve onların farmakokinetik özelliklerini değiştirmekle kalmayıp aynı zamanda çoklu ilaca dirençli kanser hücrelerini hassaslaştırabilen ve hücresel bariyerlerden ilaç geçişini artıran potent, biyolojik cevap modifikatörleri görevi görmektedir. Çoklu ilaç direnci (ÇİD) olan hücrelerde Pluronic®'in etkisinin aşağıda verilen çeşitli önemli biyolojik mekanizmalara bağlı olduğu düşünülmektedir (Pitto-Barry ve Barry, 2014);

- Hücre membranlarının kıvamının değişmesi
- Kanser ve bariyer hücrelerinin mitokondri zinciri ve ATP seviyesinin azalmasının inhibisyonu
- İlaç efluks taşıyıcılarının inhibisyonu (P-glikoprotein ve çoklu ilaç direnci proteinleri)
- ÇİD hücrelerinde appoptoz yanlısı sinyalizasyonunun artışı ve appoptoz karşıtı savunma mekanizmalarının azalması
- Glutatyon/glutatyon-s-transferaz detoksifikasyon sisteminin inhibisyonu
- Sitoplazmik veziküllerde ilaç tutulumunun sonlandırılması

Potansiyel bir antikanser ajan olan deguelin, suda düşük çözünürlüğü ve nörotoksisitesi nedeniyle klinik uygulamayı kısıtlamaktadır. Men ve ekibi, bu zorlukları gidermek için yeni bir intravezikal ilaç dağıtım sistemi tasarlayarak mesane kanserinin intravezikal tedavisinde Deguelin'in nanopartikül yüklü termojel formülasyonu araştırılmıştır. Katyonik DOTAP ve monometoksi poli(etilen-glikol)-poli(ε-kaprolakton) (MPEG-PCL) hibrid nanopartiküllerine (DMP) deguelin'in yüklenmesiyle deguelin yüklü DMP nanopartiküllerini (D/DMP) üretildi. Deguelin'in DMP nanopartiküllere yüklenmesinin in vitro anti kanser aktivitesini artırdığı görülmüştür. Buna ek olarak, D/DMP nanoparçacıkları, termo duyarlı bir Pluronic® F-127 hidrojeline dahil edildi ve sol-jel dönüşüm sıcaklığı 25°C olan yeni bir D/DMP-F

sistemi oluşturmuştur. F-127 hidrojel sistemindeki (DMPF) DMP nanoparçacıkları, hidrofobik ilaç kalma süresini önemli ölçüde uzatmış ve mesane içindeki ilaç konsantrasyonunu artırmıştır. Bu sonuçlar, DMP-F'nin iyi bir intravezikal ilaç dağıtım sistemi olduğunu ve D/DMP-F'nin mesane kanserinin intravezikal tedavisinde umut verici uygulamaları olabileceğini düşündürmektedir (Men ve ark., 2012).

Ju ve ekibi, paklitakselin düşük yükleme kapasitesini artırmak için lokal tedavi amacı ile paklitaksel (PTX) içeren Poloksamer 407 (P407) bazlı sıcaklığa duyarlı bir misel-hidrojel sistemi hazırlanmıştır. CMCS ile modifiye edilmiş P407 jellerinin (PTX-M-MG) in vitro karakteristikleri, viskozite, şişme oranı, mekanik özellik ve ilaç salınımı, in vivo değerlendirme, hepatomda intratümöral uygulama yoluyla doku dağılımı ve antikanser etkinliği incelenmiştir. Sonuçlar, PTX-M-MG'nin, PTX'nin yükleme verimliliğini artırdığı görülmüş, daha düşük viskozite, daha yüksek şişme oranı, daha kuvvetli mekanik özellik ve daha uzun süreli etkin madde salımı sağlamıştır. Ayrıca PTX-M-MG; Taxol®, PTX-M ve PTX-M ile karşılaştırıldığında tümör bölgelerinde uzun süreli kalım ve daha üstün bir tümör inhibisyon oranı (% 64.27) ortaya koymuştur. PTX-M-MG'nin hem kanser tedavisinde hidrofobik özellikli bir ilaç için umut verici bir lokalize ilaç sistemi olduğu ve hem etkinliğin iyileştiği, hem de yan etkilerin hafiflediği sonucuna varılmıştır (Ju ve ark., 2013).

Park ve ekibi bu çalışmada, kıkırdak rejenerasyonu için enjekte edilebilir hücre iletim taşıyıcısı olarak sıcaklığa duyarlı bir kitosan-Pluronic® (CP) hidrojel tasarlamıştır. CP hidrojelin sol-jel faz geçişi ve mekanik özellikleri reolojik deneylerle incelenmiştir. CP çözeltisinin sol-jel geçişinin 25°C'de olduğu bulunmuştur, bu da maddenin kıkırdak rejenerasyonu için enjekte edilebilir bir iskele olabileceğini göstermiştir. Kurutulmuş CP hidrojelinin morfolojisi taramalı elektron mikroskobu ile gözlenmiştir. In vitro hücre kültürü sığır kondrositleri üzerinde yapıldığında kondrositlerin çoğaldığı ve sentetik glikozaminoglikanın miktarının 28 gün boyunca arttığı görülmüştür. Bu sonuçlar, CP hidrojelin, kıkırdak yenilenmesi için enjekte edilebilir hücre iletim taşıyıcısı olarak potansiyele sahip olduğunu ve doku mühendisliği için yeni bir biyomalzeme görevi görebileceğini önermektedir (Park ve ark., 2009).

Daha önce açıkladığımız üzere Glioblastoma Multiforme (GBM) yetişkinlerde en sık rastlanan malign primer beyin tümörü olup tanısı ve tedavisi oldukça zordur. Oldukça sık rastlanmasına rağmen GBM'de tedavi seçenekleri çok fazla değildir. Bu çalışmada amacımız; GBM tedavisinde cerrahi girişim sırasında tümör rezeksiyonu ile ulaşılamayan bölgelerde kalmış olabilecek kanser hücrelerinin yok edilmesi ve formülasyonun lokalizasyonu amacıyla TMZ taşıyan nanopartikülleri içeren hidrojel formülasyonunun hazırlanması ve cerrahi girişim esnasında uygulanmasıdır. Formülasyonun in situ jelleşmesi ile, beyindeki kan dolaşımına geçmesi ve emboli oluşumu engellenerek, tatbik edilen etkin maddenin o bölgede etkisini göstermesi hedeflenmektedir. Bu doğrultuda öncelikle TMZ yüklü nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesi amacıyla nanopartikül formülasyonları PLGA polimeri ve emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretilmiştir. Preformülasyon çalışmaları, hidrofilik özellik gösteren TMZ'in enkapsülasyon etkinliğini artırmak üzere nanopartiküllerde formülasyon parametrelerinin etkileri araştırılmıştır. Bu hususta ilk olarak PLGA polimerinin, molekül ağırlığı 24.000-38.000 ve 38.000-54.000 olan türevleri denenmiştir. Sonrasında optimum yükleme etkinliğinin sağlandığı PLGA ile formülasyon tasarımına devam edilmiştir. TMZ yüklü nanopartiküllerde, polimer tipinin, homojenizasyon parametrelerinin, etkin madde ve polimer miktarının, organik faz tipi ve stabilizer çözelti konsantrasyonun enkapsülasyon etkinliğine etkisi değerlendirilmiştir. En yüksek enkapsülasyon etkinliği, beyine hedeflendirme için en uygun ve dar aralıkta partikül boyutu, zeta potansiyeli ve transmisyon elektron mikroskopi ile saptanan morfolojik özellikleri gösteren formülasyonlar seçilmiştir. Nanopartiküllerden etkin maddenin in vitro salım çalışmaları yapılmış ve etkin madde salım profillerinin değerlendirilmesi ile optimum formülasyonlar seçilmiştir. Bu formülasyonlar üzerinde FTIR analizi ve DSC analizi yapılarak formülasyonların bileşenleri doğrulanmıştır. Optimum nanopartikül formülasyonları seçildikten sonra Pluronic® F-127 polimerinin sıcaklık değişimi ile in situ jelleşme özelliğinden yararlanılarak çeşitli konsantrasyonlarda (% 15, % 16, % 17, % 18, % 19, % 20 ve % 25 a/h) Pluronic® F-127 içeren hidrojeller üretilmiştir. Hidrojel formülasyonların in vitro karakterizasyon çalışmaları kapsamında jel formülasyonların pH seviyesi, jelasyon sıcaklığı, viskozite ve mekanik özellikleri değerlendirilmiştir. Formülasyonların jelasyon sıcaklığına bakılarak beyine tümör rezeksiyonu ardından

uygulama için en uygun sıcaklığa sahip konsantrasyon belirlenmiştir. Böylece uygulanacak hidrojelin oda sıcaklığında enjektörden geçecek kadar akıcı olması, ve in situ jele dönüşerek formunu koruyup bir etkin madde deposu işlevini görerek etkin maddenin kontrollü salımının sağlaması temin edilmiştir. Bu hususta 32°C'de sol-jel geçişi yapan, % 18 Pluronic® F-127 içeren hidrojel formülasyonu seçilmiştir. Optimum nanopartikül formülasyonları bu hidrojel içine yüklenerek nanopartikül-hidrojel sistemleri oluşturulmuş, ve bu formülasyonların etkin maddeyi in vitro salım profilleri incelenmiştir. Optimum nanopartikül formülasyonları ve jele yüklü nanopartikül formülasyonlarının sterilizasyonu, PLGA polimerinin radyasyon ve UV ile parçalandığı bilindiğinden ve nanopartiküllerin pDI ve partikül boyutları filtrasyon ile sterilizasyona uygun olduğundan filtrasyon ile gerçekleştirilmiş ve RG2 hücreleri üzerine etkinliği, MTT yöntemi ile canlılık analizi ve akım sitometri ile hücre uptake çalışmaları yapılarak formülasyonların etkinliğinin, serbest TMZ ile karşılaştırılarak gözlemi yapılmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve cihazlar

2.1.1. Kimyasal maddeler

Temozolomid	Sigma-Aldrich
Poli(d,l-laktit-ko-glikolit), asit bitişli, (50:50), Ma = 24.000 – 38.000)	Sigma-Aldrich
Poli(d,l-laktit-ko-glikolit), asit bitişli, (50:50), Ma = 35.000 – 54.000)	Sigma-Aldrich
Pluronic® F-127 Bioreagent	Sigma-Aldrich
N,N-Dimetilformamid REAGENTPLUS®, 99%	Sigma-Aldrich
Metanol CHROMASOLV®, 99.9%	Sigma-Aldrich
Disodyum hidrojen fosfat	Düzey Lab.
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck
Sodyum klorür	Molychem
Sodyum hidroksit	Kimetsan
Potasyum klorür	Merck
Hidrojen klorür	Riedel-de Halen
Askorbik asit	Aklar Kimya
Sodyum metabisülfit	Aklar Kimya

2.1.2. Cihazlar

Sonikatör	Bandelin Sonoplus
Manyetik karıştırıcı	Daihan Scientific
Santrifüj	Beckman Coulter
Liyofilizatör	Christ
Vakumlu etüv	Jelo-Tech
pH metre	İnolab
Tartım Terazisi	Sartorius
Zetasizer	Malvern
Homojenizatör	Ultraturrax T-25
Saf su cihazı	Millipore
Distile su cihazı	ISOLAB
Çalkalayıcılı su banyosu	GFL 1083
Çözünme Hızı Cihazı	Sotax
Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi (HPLC)	Agilent 1100, Agilent 1200

2.2. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

- ***pH 1.2 HCl tamponu***

Potasyum klorür (KCl), 0.2 M .....50 mL

Hidrojen klorür (HCl), 0.2 M.....85 mL

Distile Su.....y.m.....200 mL

0.2 M KCl çözeltisi için, 14,91 g KCl 1000 mL distile suda çözülmüştür. 0.2 M HCl çözeltisi için % 99 (a/h) konsantrasyondaki HCl çözeltisinden 1 mL alınıp distile su ile 61 mL'ye tamamlanmıştır. 0.2 M KCl çözeltisinden 50 mL, 0.2 M HCl çözeltisinden 85 mL alınarak karıştırılmış ve distile su ile 200 mL'ye tamamlanmıştır. Gerektiğinde pH'ı 1 M NaOH çözeltisi veya 1 M HCl çözeltisi ile ayarlanmıştır.

- ***pH 4.5 tamponu***

Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) ..... 6,8 g

Distile Su.....y.m.....1000 mL

6.8 g KH_2PO_4 1000 mL distile suda çözülmüş, pH'ı 1 M NaOH çözeltisi ile ayarlanmıştır.

- ***pH 5 fosfat tamponu***

Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) ..... 2,72 g

Distile Su.....y.m.....1000 mL

2.72 g KH_2PO_4 1000 mL distile suda çözülmüş, gerektiğinde pH'ı 1 M NaOH çözeltisi veya 1 M HCl çözeltisi ile ayarlanmıştır.

- ***pH 6.8 fosfat tamponu***

Potasyum dihidrojen fosfat, 0.2 M.....50 mL

Sodyum hidroksit, 0.2 M.....22.4 mL

Distile Su.....y.m.....200 mL

0.2 M KH_2PO_4 çözeltisi için, 27.22 g KCl 1000 mL distile suda çözülmüştür. 0.2 M NaOH çözeltisi için, 8 g NaOH 1000 mL distile suda çözülmüştür. 50 mL KH_2PO_4 çözeltisi ile 22.4 mL NaOH çözeltisi karıştırılmış ve 200 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır. Gerektiğinde pH'ı 1 M NaOH çözeltisi veya 1 M HCl çözeltisi ile ayarlanmıştır.

- ***pH 7.4 fosfat salin tamponu***

Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO4)..... 2,38 g

Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) ..... 0,19 g

Sodyum klorür (NaCl) ..... 8 g

Distile Su.....y.m.....1000 mL

Na_2HPO_4, KH_2PO_4 ve NaCl, 1000 mL'ye distile su ile tamamlanarak çözülmüştür. Gerektiğinde pH'ı 1 M NaOH çözeltisi veya 1 M HCl çözeltisi ile ayarlanmıştır.

2.3. Etkin maddenin kromatografik analizi ve yöntem validasyonu

Etkin maddenin stabilitesini saptamak üzere koruyucu içermeyen ve askorbik asit veya sodyum metabisülfit içeren pH 1.2, 4.5, 5, 6.8 ve 7.4 tamponları, in vitro çözünme çalışmalarında kullanılmak üzere pH 4,5 ve 6,8 fosfat tamponları (PBS), etkin maddenin süpernatandaki ve liyofilizasyon sonrası enkapsülasyon etkinliğini saptamak üzere PVA çözeltisi ve dimetilformamid (DMF) içinde kromatografik analizi yapılmıştır.

Stok çözeltiler 1,5 mg TMZ, 3 mL seçilen ortam içinde çözülerek hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiler farklı konsantrasyonlara seyreltilerek farklı derişimlerde standart çözeltiler elde edilmiştir. Çözeltiler UV spekrofotometrede tarandığında tespit edilen en yüksek absorbans değerini veren dalga boyunun 335 nm olduğu tespit edilmiştir. Ters Faz Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC) yöntemi ile kalibrasyon doğrusu ve kalibrasyon denklemi elde edilmesinde TMZ miktarı bu dalga boyları ile alınan eğri altı alanların konsantrasyona karşı lineer regresyon ile verdiği denklem yardımı ile hesaplanmıştır.

Literatür taramalarında Ters Faz Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC) yöntemi ile gerekli hassaslık, kesinlik ve tekrarlanabilirliğin elde edibileceği düşünülmektedir. Bu amaçla, kullanılan tüm tampon çözelti ortamlarında hassaslık, kesinlik ve tekrarlanabilirlik parametreleri yönünden analitik validasyon çalışmaları yapılmıştır.

Literatür taramaları sonrası tüm tampon çözeltileri, su ve PVA çözeltisi için Çizelge 2.1'de, DMF için Çizelge 2.2'de belirtilen kromatografik yöntem kullanılmıştır (Saravanan ve ark., 2007).

Çizelge 2.1. Tampon çözeltileri, PVA çözeltisi ve su için kullanılan kromatografik koşullar

Mobil faz	% 0,5 asetik asit : metanol (90:10)
Akış Hızı	1 ml/dakika
Enjeksiyon hacmi	10 µL
Kolon	250 mm × 4.6 mm , 5 µm, C18 kolon
Dedektör	UV-diod
Sıcaklık	25 °C
Analiz Süresi	5 dakika

Çizelge 2.2. DMF için kullanılan kromatografik koşullar

Mobil faz	Metanol
Akış Hızı	1 ml/dakika
Enjeksiyon hacmi	10 µL
Kolon	250 mm × 4.6 mm , 5 µm, C18 kolon
Dedektör	UV-diod
Sıcaklık	25 °C
Analiz Süresi	5 dakika

Etkin maddenin alkali ortamda stabil olmadığı bilinmektedir (AlSwisi ve Ghannam, 2015, Ananta ve ark., 2016, Jain ve ark., 2014, Thirupathy ve ark., 2011, Zhang ve Gao, 2007). Bu nedenle koruyucu içeren (askorbik asit veya sodyum metabisülfit) veya içermeyen çeşitli pH değerlerindeki ortamlarda (pH 1.2, 4.5, 5, 6.8, 7.4) analizleri yapılarak (AlSwisi ve Ghannam, 2015) etkin maddenin stabilitesi araştırılmış ve in vitro salım çalışmaları için tümör mikroçevresine en yakın ortam (Sutradhar ve Amin, 2014) bu şekilde belirlenmiştir.

2.4. TMZ yüklü PLGA nanopartiküllerin hazırlanması için formülasyon çalışmaları

TMZ yüklü PLGA nanopartikülleri hazırlamak üzere emülsiyon oluşturma çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. Optimum formülasyonu belirlemek üzere farklı değişkenlerle çalışma tasarımı yapılmıştır ve tüm formülasyonlar değerlendirilerek en uygun formülasyon/formülasyonlar seçilmiştir. Tasarımlar literatürdeki veriler ışığında nanopartikül hazırlama esasları dikkate alınarak oluşturulmuştur (Ananta ve ark., 2016).

Formülasyon çalışmalarında PLGA, DMF ve sulu faz olarak PVA'nın sudaki çözeltisi kullanılmıştır. Miktarı belirtilen aralıkta kullanılacak PLGA, 1 mL DMF içerisinde çözülerek değişik oranlarda TMZ, bu çözeltiye yağ fazını oluşturmak üzere ilave edilmiştir (Çizelge 2.3).

Formülasyon çalışmalarında 2 yöntem kullanılmıştır;

1- Organik çözücü:sulu faz oranı 1:5 olmak üzere PVA (% 1-2 a/h) çözeltisine % 40 güçte 1 dk boyunca yağ fazı damla damla eklenmiş ve ultrasonik homojenizatör ile homojenize edilmiş, ardından 5 dakika boyunca 9400 rpm hızla mekanik homojenizatörde emülsifiye edilmiştir. Elde edilen s/y emülsiyonu manyetik karıştırıcı üzerinde 600 rpm hızla 5 saat karıştırılmıştır. Böylece organik çözücü uçurulmuştur. Daha sonra 15.000 rpm'de 45 dakika santrifüj edilerek nanopartiküller toplanmıştır. Nanopartiküller distile su ile birkaç kere yıkanıp yüklenmeyen TMZ ve

PVA'dan arındırılmış ve toplanan nanopartiküller liyofilize edilerek 4°C sıcaklıkta saklanmıştır.

2- Organik çözücü:sulu faz oranı 1:5 olmak üzere PVA (% 1-2 a/h) çözeltisine % 30 güçte 3 dk boyunca yağ fazı damla damla eklenmiş ve ultrasonik homojenizatör ile homojenize edilmiş, ardından 5 dakika boyunca 9400 rpm hızla mekanik homojenizatörde emülsifiye edilmiştir. Elde edilen s/y emülsiyonu manyetik karıştırıcı üzerinde 600 rpm hızla 5 saat karıştırılmıştır. Böylece organik çözücü uçurulmuştur. Daha sonra 15.000 rpm'de 45 dakika santrifüj edilerek nanopartiküller toplanmıştır. Nanopartiküller distile su ile birkaç kere yıkanıp yüklenmeyen TMZ ve PVA'dan arındırılmış ve toplanan nanopartiküller liyofilize edilerek 4°C sıcaklıkta saklanmıştır.

Çizelge 2.3. TMZ içeren PLGA nanopartikül formülasyonları

Formülasyon	PLGA (mg)	PVA çözeltisinin %'si	Formülasyondaki TMZ oranı (%)
F1	20	1	10
F2	40	1	10
F3	20	1	25
F4	40	1	25
F5	20	1	50
F6	40	1	50
F7	20	1,5	10
F8	40	1,5	10
F9	20	1,5	25
F10	40	1,5	25
F11	20	1,5	50
F12	40	1,5	50
F13	20	2	10
F14	40	2	10
F15	20	2	25
F16	40	2	25
F17	20	2	50
F18	40	2	50

2.4.1. TMZ yüklü PLGA nanopartiküllerin enkapsülasyon ve yükleme etkinliğinin değerlendirilmesi

TMZ yüklü PLGA nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliğinin değerlendirilmesi için iki yöntem kullanılmıştır;

- **İndirekt Yöntem:** Nanopartiküller santrifüjlendikten sonra süpernatandan enkapsülasyon etkinliğine bakılabilmesi için TMZ'nin su içinde kalibrasyonu yapılmış doğru denkleminden süpernatanda kalan etkin madde konsantrasyonu, Şekil 2.1'den enkapsülasyon etkinliği hesaplanmıştır.

Şekil 2.1. Enkapsülasyon etkinliği (indirekt yöntem)

$$\% \text{ Enkapsülasyon etkinliği} = \frac{\text{Formülasyondaki TMZ miktarı - supernatandaki TMZ miktarı}}{\text{Formülasyondaki TMZ miktarı}} \text{ x } 100$$

- **Direkt Yöntem:** 5 mg liyofilize edilmiş nanopartikül 5 mL DMF içinde çözülmüştür. 7 dk boyunca 30W güç, 3x cycle'da ultrasonik homojenizatörde parçalanarak, 24 saat boyunca 600 rpm hızda manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Çizelge 2.1'de belirtilen kromatografik şartlarda analiz edilerek enkapsülasyon etkinliği hesaplanmıştır.

Şekil 2.2. Enkapsülasyon etkinliği (direkt yöntem)

$$\% \text{ Enkapsülasyon etkinliği} = \frac{\textbf{Nanopartikü}\textbf{llerdeki TMZ miktarı}}{\text{Formülasyondaki TMZ miktarı}} \text{ x } 100$$

Yukarıdaki denklemler ile nanopartiküllere yüklenen etkin madde miktarı hesaplanmıştır.

Yükleme etkinliği için ise aynı veriler kullanılarak Şekil 2.3'teki denklem ile hesaplama yapılmıştır.

Şekil 2.3. Yükleme etkinliği

$$\% \text{ Yükleme etkinliği} = \frac{\text{Formülasyondaki TMZ miktarı}}{\text{Formülasyondaki TMZ miktarı} + \text{Formülasyondaki PLGA miktarı}} \text{ x } 100$$

2.5. TMZ yüklü PLGA nanopartiküllerin in vitro karakterizasyon çalışmaları

2.5.1. Partikül büyüklüğü, poli-dispersite indeksi (pDI) ve zeta potansiyeli değerinin tayini

Hazırlanan formülasyonlar liyofilize edilmeden önce 10 µL alınarak 200 mL ultra saf su içerisinde seyreltilmiştir. Seyreltme sonrası Zeta-sizer'da dinamik lazer ışık saçılımı ile partikül büyüklüğü, pDI ve zeta potansiyeli ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler 3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir (Saravanan ve ark., 2007).

2.5.2. FTIR (Fourier Transform Infrared) spektrumu analizi

Etkin maddenin, nanopartikül formülasyonlarında kullanılan polimerin ve nanopartikül formülasyonlarının FTIR spektroskopisi ile tanımlanmasında disk yöntemi kullanılmıştır. IR bandında spektrum vermeyen 200 mg potasyum bromür ile 4 mg örnek havanda homojen olacak şekilde karıştırılıp hidrolik pres ile 10.000 kg/cm3'lük basınç altında disk haline getirilmiştir. Elde edilen disklerin 4000 – 400 cm^{-1} dalga boyları arasındaki spektrumu alınmıştır.

2.5.3. DSC (Differential Scanning Calorimetry) analizi

Etkin maddenin, nanopartikül formülasyonlarında kullanılan polimerin ve nanopartikül formülasyonlarının termal davranışını incelemek ve kristal formunu belirlemek için alüminyum pan içine konulan TMZ, polimer, fiziksel formülasyon karışımı ya da nanopartikül formülasyonu preslenerek cihaza yerleştirilmiştir. 20-260ºC sıcaklık aralığında 10ºC/dak. hızında termogramı alınmıştır.

2.5.4. TEM (Transmission Electron Microscopy) Analizi

Lantan hekzaborür (LaB6) elektron tabancalı, 20-120 kV aralığında hızlandırıcı voltaj altında çalışan FEI marka Tecnai G2 Spirit Biotwin model Yüksek Kontrastlı Geçirimli Elektron Mikroskobu (CTEM), özellikle biyolojik ve polimerik malzemelerin yüksek kontrastlı görüntüleme ile incelenmeleri amacıyla kullanılmaktadır. CTEM'in 20 kV ile 120 kV arasında değişen hızlandırıcı voltaj ile hızlı bir geçiş ile çalışabilmesi biyolojik ve polimerik örneklerde elektron demeti

hasarını azaltmak için ideal bir özelliktir. Bu cihazla, elde edilen nanopartiküllerin yüzey özellikleri ve yapıları incelenmiştir.

2.6. Pluronic® F-127 ile hidrojel üretimi

Hidrojellerin hazırlanmasında "soğuk yöntem" kullanılmıştır (Nie ve ark., 2011). Belirli miktar Pluronic® F-127 tartılarak, 50 mL ultrasaf su içine eklenmiş ve Pluronic® F-127 homojen şekilde çözünene kadar buz banyosu içinde 900 rpm hızda manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır. % 15, 16, 17, 18, 20, ve 25 (a/h) Pluronic® F-127 içeren jeller hazırlanmıştır.

2.7. Pluronic® F-127 hidrojeller üzerinde yapılan in vitro karakterizasyon çalışmaları

2.7.1. Üretilen hidrojellerin pH seviyeleri

Hidrojel formülasyonların jel formlarının pH seviyeleri Eutech Instruments pH 700 ile ölçülmüştür (n=3). Örnekler, 1:10 oranını sağlayacak şekilde 2 g hidrojelin 20 mL distile suda çözülmesi ile hazırlanmıştır.

2.7.2. Sol-jel geçiş sıcaklığı

Çözelti halinde bulunan karışımlar 10 mL'lik beherlere konmuş ve manyetik karıştırıcı üzerinde sıcaklıkları takip ve kontrol edilerek 10-60°C arasında ısıtılmıştır. Sol-jel geçiş sıcaklığı karışımın görünür şekilde jel olduğu ve beher ters çevirildiğinde karışımın akmaması şartları konularak belirlenmiştir. Ölçümler 3 kez tekrarlanmıştır. Optimum formülasyon konsantrasyonu jelasyon sıcaklığına karşı Pluronic® F-127 konsantrasyonu grafiği çizilerek ve in situ sol-jel geçiş sıcaklığı düşünülerek seçilmiştir.

2.7.3. Viskozite

Üretilen formülasyonların sol ve jel halinde viskoziteleri, viskozimetre 5→100→5 rpm hız ayarlarında çalıştırılarak ölçülmüştür. Solüsyon halindeki

viskoziteler Brookfield DVI Prime cihazında S03 disk spindle ile, jel halindeki viskoziteler Brookfield DVII cihazında T96 spindle ile ölçülmüştür. Ölçümler üç kez tekrarlanmıştır ve grafikler viskozite (cP) – kayma hızı (rpm) olarak çizilmiştir.

2.7.4. Mekanik özellikler

Tekstür profil analizi (TPA) TA-XT2 Texture Analyser (Stable Micro Systems, Surrey, İngiltere) cihazının TPA modu ile gerçekleştirilmiştir. Formülasyonlar jel halinde 25 mL'lik beherlere aktarılmıştır. Silindirik bir prob ile (0,5 inç çapında) örnekler belirli bir batma hızı (1 mm/s) ve batma derinliği (5 mm) ile delinerek ölçümler kaydedilmiştir. Analizler üç kez tekrarlanmıştır. Analiz sonucunda oluşan kuvvet (kg) – zaman (sn) grafiklerinden sertlik, elastisite ve koheziflik değerleri hesaplanmıştır (Pande ve ark., 2014).

2.7.5. Şişme/erozyon çalışmaları

Sol-jel geçişi yapabilen hidrojel formülasyonlarından 1 mL alınıp darası alınmış flakonların dibine yayılmıştır. 60°C'lik etüvde ters döndüğünde akmayacak şekilde jelleşmesi beklenmiş ve tartımı yapılmıştır. Jelleşen formülasyonların üzerine 1 mL pH 7.4 (PBS) tamponu akıtılarak çalkalayıcı su banyosunda 37°C 50 rpm hızda çalkalanmıştır (Liu ve ark. 2017). Belirlenen zaman aralıklarında üstte kalan PBS tamponu alınarak formülasyonlar etüvde kurutulmuş ve tartılarak zamana karşı grafiği çizilmiştir.

2.8. TMZ yüklü PLGA nanopartiküllerden ve TMZ-PLGA yüklü NP'leri içeren Pluronic® F-127 hidrojelinden in vitro etkin madde salım çalışmaları

Tüm formülasyonlar için in vitro etkin madde salım deneyleri 50 rpm hızda çalkalanan, 37°C ± 1°C sıcaklıkta çalkalayıcı banyoda ve % 0,1 askorbik asit içeren pH 5 tamponu ortamında yapılmıştır. Hedef dozu sağlayacak ve yükleme kapasitesinden elde edilen verilere göre hesaplanan miktar nanopartiküller tartılıp % 0,1 askorbik asit içeren pH 5 tamponu içerisinde süspande edilerek, hidrojel formülayonları için ise Pluronic® F-127 hidrojeli içerisinde süspande edilerek diyaliz

membran tüpü içerisinde iki ucu ağırlıklı klipslerle tutturularak beher içine yerleştirilmiştir. Her bir behere 20 mL tampon çözeltisi konulmuştur. Çeşitli zaman aralıklarında numune alınmış, ortamla tamamlanmış ve 24 saatten sonra etkin maddenin bozunmasını engellemek amaçlı salım ortamı, yeni ortamla değiştirilmiştir.

2.8.1. Tamamlayıcı in vitro etkin madde salım çalışmaları

Etkin maddenin salım profilinin değişiminin gözlenmesi için hedef dozu sağlayacak ve yükleme kapasitesinden elde edilen verilere göre hesaplanan etkin madde ayrı ayrı Pluronic® F-127 hidrojeli ve kullanılan % 0,1 askorbik asit içeren pH 5 tamponu içerisinde süspande edilerek diyaliz membran tüpü içerisinde iki ucu ağırlıklı klipslerle tutturularak beher içine yerleştirilmiştir. Her bir behere 20 mL tampon çözeltisi konulmuştur. Çeşitli zaman aralıklarında numune alınmış, ortamla tamamlanmış ve 24 saatten sonra etkin maddenin bozunmasını engellemek amaçlı salım ortamı, yeni ortamla değiştirilmiştir.

2.8.2. In vitro etkin madde salım çalışmalarının kinetik açıdan değerlendirilmesi

Formülasyonlardan in vitro salım çalışması yapılarak açığa çıkan etkin madde miktarının belirlenmesiyle çözünme hızı profilleri elde edilmiştir. Etkin madde salım profillerinin hangi matematiksel modele uyum sağladığını belirlemek için sıfır derece, birinci derece, Higuchi, Weibull ve Korsmeyer-Peppas kinetik modellerinin denklemleri Microsoft Office Excel'in DDSolver eklentisinde (Zhang ve ark., 2010) uygulanmış, elde edilen bulgular değerlendirilmiştir.

Sıfır derece kinetiğinde birim zamanda açığa çıkan etkin madde miktarı madde konsantrasyonundan bağımsızdır ve etkin maddenin çıkış hızı sabittir.

$$C = C_0 - k_0 t \qquad \text{(Şekil 2.4)}$$

C_0 : Başlangıçtaki etkin madde miktarı (mg)
C : t anında çözünmeden kalan etkin madde miktarı (mg)
k_0 : Sıfır derece salım hız sabiti (mg/sa)
t : Zaman (sa)

Birinci derece salım kinetiğinde dozaj şekillerinde çıkış ortamdaki madde konsantrasyonu ile orantılıdır.

$$\ln C = \ln C_0 - k_1 t \qquad \text{(Şekil 2.5)}$$

C_0 : Başlangıçtaki etkin madde miktarı (mg)
C : t anında çözünmeden kalan etkin madde miktarı (mg)
k_1 : Sıfır derece salım hız sabiti (sa^{-1})
t : Zaman (sa)

Taşıyıcı sistemin içinde çeşitli porların, kanalların ve çatlakların olduğu, etkin maddenin matris içindeki bu porları dolduran ortam sıvısı içinde çözünüp matris yüzeyine difüze olduğu heterojen matris sistemler ise Higuchi'nin heterojen matrisler için olan kinetik modeline uyum göstermektedir.

$$Q = \sqrt{\frac{D\varepsilon}{\tau}(2A - \varepsilon . Cs)Cs . t} \qquad \text{(Şekil 2.6)}$$

Q : Birim yüzeyden t anında salınan etkin madde miktarı (mg/cm2)
D : Etkin maddenin ortam sıvısındaki difüzyon katsayısı (cm2/s)
ε : Matrisin porozitesi (%)
Cs : Etkin maddenin ortam sıvısındaki çözünürlüğü (mg/mL)
τ : Kapiller sistemin kıvrımlılık katsayısı

Korsmeyer-Peppas salım kinetiği etkin maddenin açığa çıkışının difüzyonla ve/veya polimerde meydana gelen gevşeme ile oluşunu açıklamak üzere geliştirilmiştir.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k . t^n \qquad \text{(Şekil 2.7)}$$

M_t : t anında çıkan etkin madde miktarı (mg)
M_∞ : Toplam etkin madde miktarı (mg)
k : Salım yapan sistemin yapısal ve geometrik özelliklerini bileştiren bir sabit
n : Difüzyonal sabit

Weibull salım kinetiği matriks tipi ilaç iletiminde kullanılmaktadır.

$$\log [\ln\{1/(1 - \varphi)\}] = \beta \log \tau - \beta \log \tau_d \qquad \text{(Şekil 2.8)}$$

ϕ : Çözünen etkin madde yüzdesi
τ : Zaman (dk)
β : Şekil faktörü
τ_d : Etkin maddenin %63,2'sinin salınması için geçen süre (dk)

(Ramteke ve ark. 2014, Serim 2011)

2.9. Hücre kültürü çalışmaları

Canlılık ve uptake analiz çalışmaları için kullanılacak hücre kültürü etkin madde, etkin maddeyi içeren nanopartiküller, boş haldeki jel ve nanopartikülleri içeren jele uygun olacak şekilde çeşitli kaynaklardan araştırılarak hazırlanmıştır (Ananta ve ark., 2016, Arai ve ark., 2006, Men ve ark., 2012). Hücre kültürü çalışmaları için seçilen tüm formülasyonlar filtrasyon ile sterilize edilmiştir.

2.9.1. Glioma hücrelerin kültüre edilmesi

RG2 [D74], sıçan glioma hücreleri, son konsantrasyonları % 1 penisilin/streptomisin, % 1 L-glutamin ve % 10 Fötal buzağı serumu (FBS) (ısı-inaktive) olacak şekilde hazırlanmış tam Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ile kültüre edilmiştir. Hücre yoğunluğunun hücre kabının % 80'ini doldurmasıyla (confluency) hücreler tripsin-EDTA solüsyonu (% 0.05) ile pasajlanarak ilgili deneylerde kullanılmıştır. Hücreler 37ºC'de, nemli ve % 5 CO2 içeren inkübatörde muhafaza edilmiştir.

2.9.2. MTT yöntemi ile canlılık analizleri

RG2 hücreleri $25x10^3$ oranında 96-kuyulu düz tabanlı plakalara 50 µL hacimde olacak şekilde eklenmiştir. Hücre sayısının belirlenmesinin ardından konsantrasyon titrasyonu yapılarak 50 µL hacim içerinde olacak şekilde Temozolomid (TMZ) (5 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM, 100 mM) eklenmiş ve kontrol grubu dahil inkübe edilen hücrelerin üzerlerine yine 50 µL hacimde MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromür (5mg/ml) ajanı eklenerek ve 4 saat boyunca etüvde (37°C, % 5 CO_2) inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyulara 80 µl DMF/SDS (% 45DMF/% 23SDS) lizis tamponu eklenerek 12-15 saat boyunca etüvde (37°C, % 5 CO_2) inkübe edilmesinin ardından oluşan formazan kristallerinin iyice çözünmesi sağlanmıştır. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonunda hücre canlılığı bilgisi spektrofotometrik analiz sonucu elde edilen absorbans değerleri ile belirlenmiştir. Böylece spektrofotometrik ölçüm hesaplanırken sadece tam DMEM içeren koşulların optik dansite (OD) değeri hücre ve tam DMEM içeren koşuldan çıkarılarak daha hassas ve doğru bir sonuç elde edilmiştir. Analiz sonucunda

formülasyon uygulanacak hücrelerin canlılığı oransal olarak (% canlılık) ve hücrelere uygulama süresi belirlenmiştir.

Bu aşamadan sonra sadece TMZ, optimum nanopartikül formülasyonları, sadece jel, jel içinde TMZ, jel içinde optimum formülasyonlar ve jel içinde boş nanopartikül için MTT çalışmaları yapılmıştır. Nanopartikül formülasyonları DMEM içinde disperse edilerek hücrelere uygulanmıştır. Jel formülasyonların sol-jel geçişi yapması için inkübe edilerek ardından tüm kuyucuklara hücre kültürü ortamı (DMEM) ilave edilmiş ve 6 saat boyunca etkin maddenin çıkış yapması beklenmiştir. Salım süresi bittikten sonra DMEM hücreler üstünden toplanarak 14.000 rpm'de 5 dk santrifüjlenerek, varsa jel kalıntısı veya nanopartiküllerin çöktürülmesi sağlanmıştır. Süpernatandan alınan hücre kültürü ortamı, RG2 hücreleri üzerine uygulanmış ve önceki MTT çalışması ile belirlenen uygulama süresi boyunca bekletilmiştir.

2.9.3. Akım sitometri ile hücre uptake analizi

RG2 hücreleri, kuyu başına $1x10^6$ hücre olacak şekilde 6-kuyulu plakalara ekilmiştir. Hücrelerin üzerine, nil kırmızısı yüklü Temozolomid (TMZ)+polilaktik-ko-glikolikasit (PLGA) nanopartikül formülasyonu eklenmiş ve belirlenen sürelerde (15 dk, 30 dk, 1, 2, 4 ve 8 saat) etüvde (37°C, %5 CO_2) inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda hücreler PBS ile yıkandıktan sonra tripsin-EDTA solüsyonu (0.05%) ile kaldırılarak, üzerine tam DMEM eklenip santrifüjlenmiştir. Hücreler PBS içerisinde tekrar süspande hale getirilerek akım sitometri ile analizleri gerçekleştirilmiş ve floresan işaretli yüzde pozitif hücre sayısı ve ortalama floresan yoğunluğu (median fluorescence intensity; MFI) yine akım sitometri cihazı ile hesaplanmıştır. Analizlerin güvenilirliği açısından her hücrenin kendi verdiği ışıma (otoflorasan) değeri de belirlenip ilgili koşullar normalize edilmiştir.

2.10. Sterilizasyon çalışmaları

Sterilizasyon işlemi, bir farmasötik üründeki tüm mikroorganizmaların, vejetatif ve spor şekillerinin ve de virüslerin öldürülmesi veya uzaklaştırılmasıdır. Bu amaçla kullanılan sterilizasyon yöntemleri aşağıda yer almaktadır;

- Isı ile Sterilizasyon

    - Buharla sterilizasyon
        - Akım halinde buhar
        - Basınçlı buhar
    - Kuru sıcak hava
- Işınlarla Sterilizasyon
    - Elektromanyetik ışınlar ile sterilizasyon
        - Gama ışınları
        - UV ışınları
        - X ışınları
- Filtrasyon ile Sterilizasyon
- Gaz ile Sterilizasyon –
    - Etilen oksit
- Aseptik Teknik

İmplant sistemlerin sterilizasyonunda buhar, kuru ısı uygulamasının ve radyasyon ve UV ile sterilizasyonun polimerlerde degredasyon ve hidrolize neden olabilmesi, etilen oksitin ise toksik kalıntı bırakması nedeniyle biyoparçalanabilir polimerik dozaj formlarının terminal sterilizasyonunda ışınlarla sterilizasyonun, bunun uygun olmaması durumunda da aseptik tekniğin kullanılması önerilmektedir (Yapar, 2009).

2.11. İstatistiksel hesaplamalar

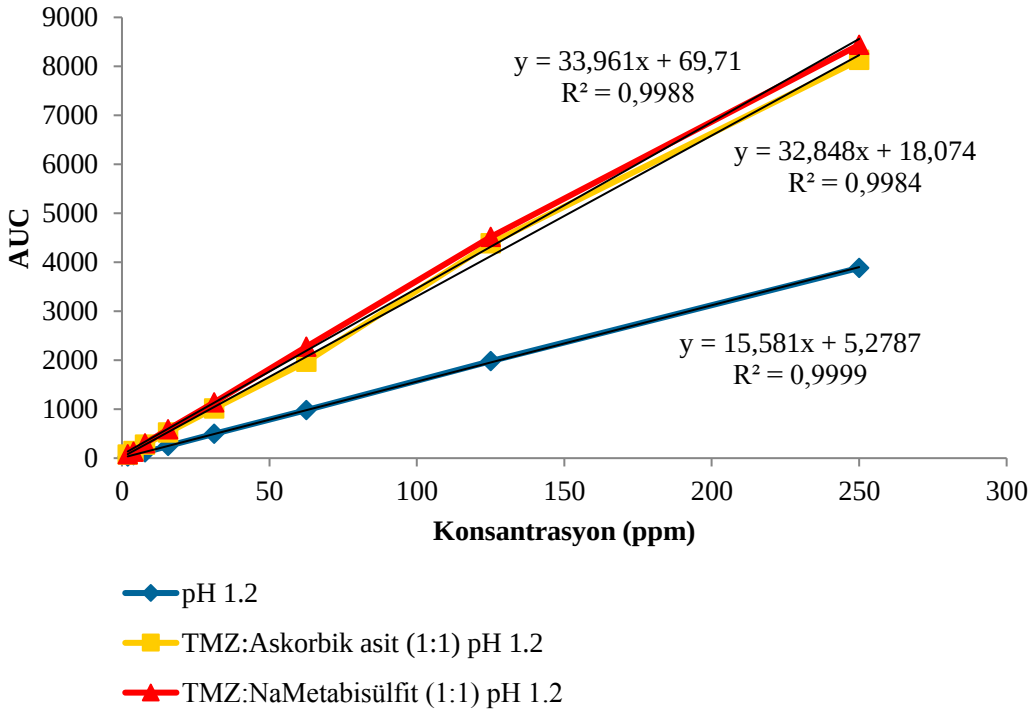
Tüm veriler, üç bağımsız paralelin ortalama ± standart sapma değeri olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz, Minitab 17, GraphPad InStat+ (GraphPad Software, USA), Microsoft Office Excel ve eklentisi DDSolver (Zhang ve ark. 2010) kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arası istatistiksel farkların anlamlılığı, tek faktörlü ANOVA ile tespit edilmiştir. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı sayılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Kullanılan analitik yöntemler

3.1.1. pH 1.2 tamponu ile yapılan HPLC analizleri

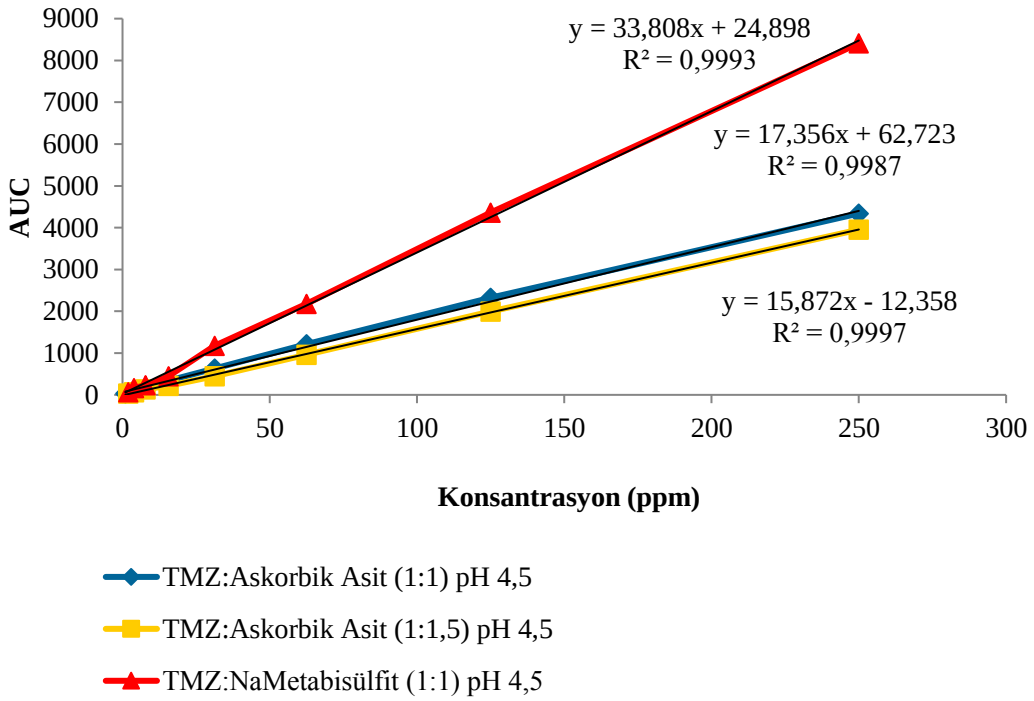
Stok çözeltiler 1,5 mg TMZ, 1,5 mg askorbik asit içeren, 1,5 mg sodyum metabisülfit içeren ve koruyucu içermeyen 3 mL pH 1,2 tamponu içinde çözülerek hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiler 1.953, 3.906, 7.812, 15.625, 31.25, 62.5, 125 ve 250 ppm konsantrasyonlarına seyreltilerek farklı derişimlerde standart çözeltiler elde edilmiştir. Standart çözeltiler Çizelge 2.1'de verilen kromatografik koşullarda analiz edilerek ve elde edilen eğri altı alanların konsantrasyona (ppm) karşı lineer regresyon ile verdiği denklem ve doğru Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. TMZ in koruyucu içeren ve içermeyen pH 1.2 tamponlarında kalibrasyon doğruları ve denklemleri

3.1.2. pH 4.5 tamponu ile yapılan HPLC analizleri

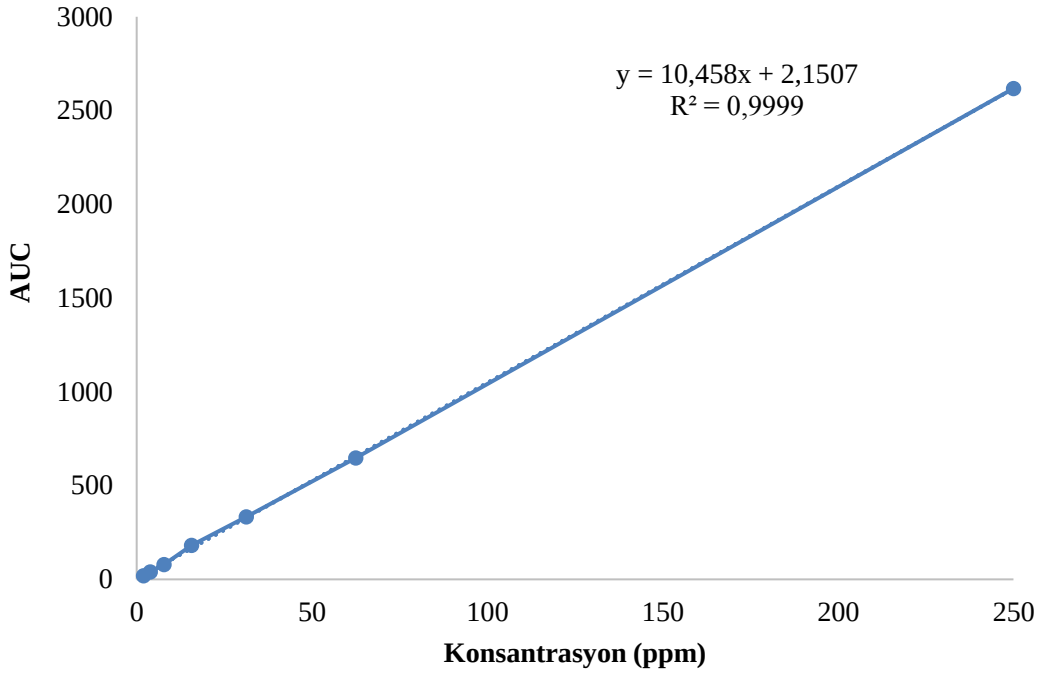
Stok çözeltiler 1,5 mg TMZ, 1,5 mg askorbik asit içeren, 2,25 mg askorbik asit içeren ve 1,5 mg sodyum metabisülfit içeren 3 mL pH 4.5 tamponu içinde çözülerek hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiler 0.976, 1.953, 3.906, 7.812, 15.625, 31.25, 62.5, 125 ve 250 ppm konsantrasyonlarına seyreltilerek farklı derişimlerde standart çözeltiler elde edilmiştir. Standart çözeltiler Çizelge 2.1'de verilen kromatografik koşullarda analiz edilerek ve elde edilen eğri altı alanların konsantrasyona (ppm) karşı lineer regresyon ile verdiği denklem ve doğru Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2. TMZ'in çeşitli oranlarda koruyucu içeren pH 4.5 tamponlarında kalibrasyon doğruları ve denklemleri

3.1.3. pH 5 tamponu ile yapılan HPLC analizleri

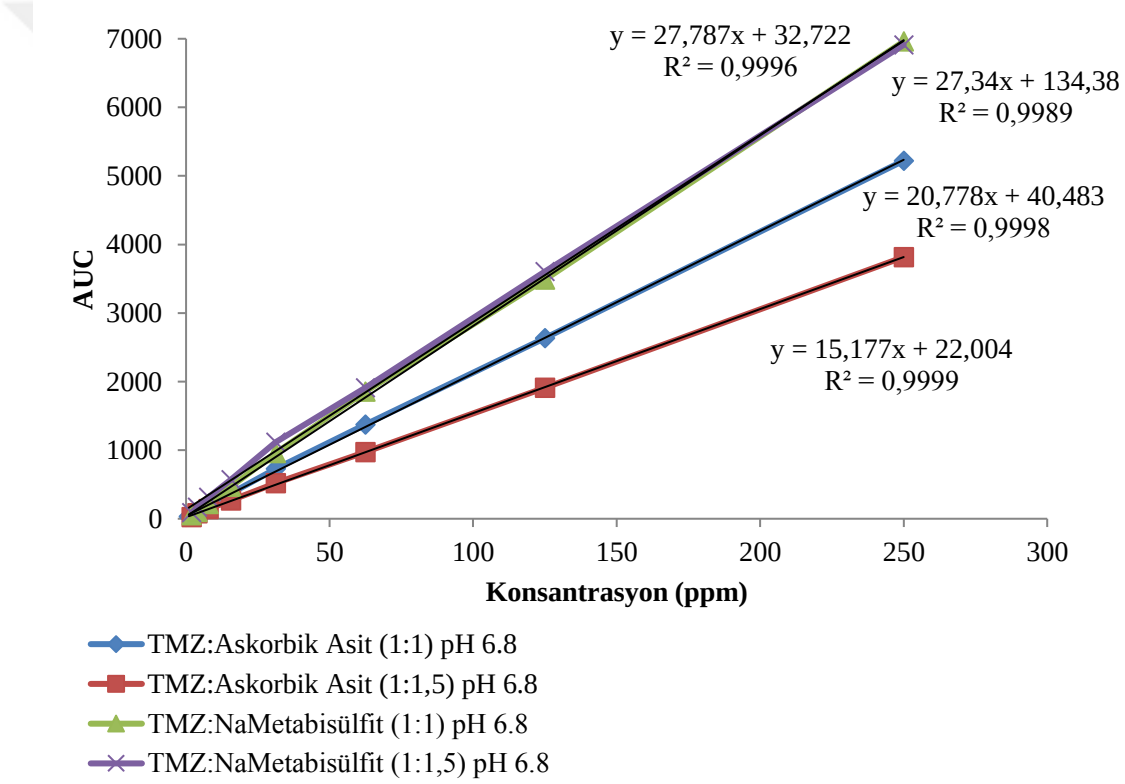
Stok çözeltiler 1,5 mg TMZ, % 0,1 askorbik asit içeren 3 mL pH 5 (PBS) tamponu içinde çözülerek hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiler 1.953, 3.906, 7.812, 31.25, 62.5 ve 125 ppm konsantrasyonlarına seyreltilerek farklı derişimlerde standart çözeltiler elde edilmiştir. Standart çözeltiler Çizelge 2.1'de verilen kromatografik koşullarda analiz edilerek ve elde edilen eğri altı alanların konsantrasyona (ppm) karşı lineer regresyon ile verdiği denklem ve doğru Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.3. TMZ'in % 0,1 askorbik asit içeren pH 5 tamponlarında kalibrasyon doğrusu ve denklemi

3.1.4. pH 6.8 tamponu ile yapılan HPLC analizleri

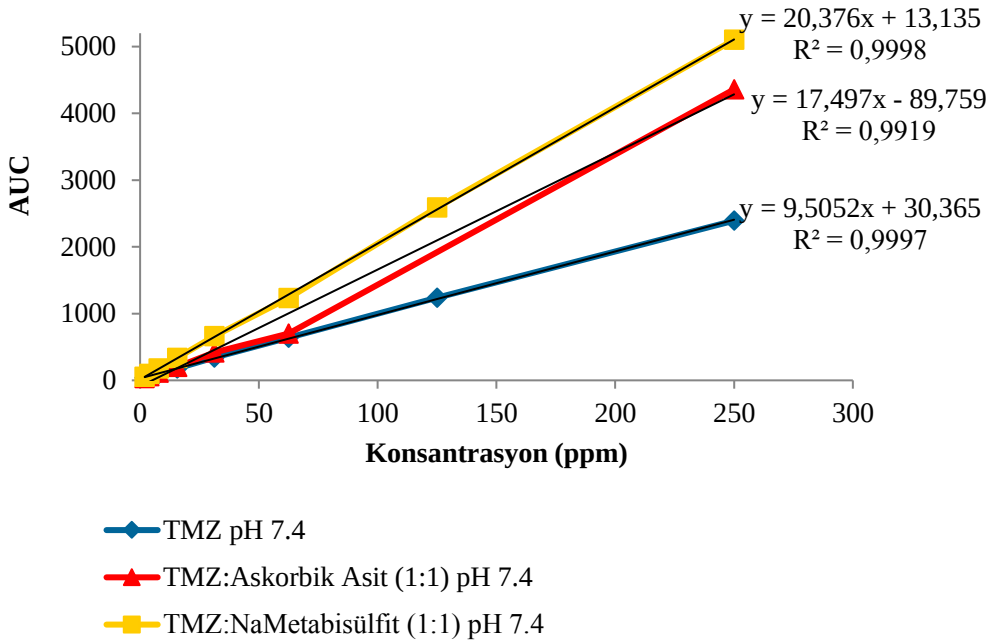
Stok çözeltiler 1,5 mg TMZ, 1,5 mg askorbik asit içeren, 2,25 mg askorbik asit içeren ve 1,5 mg sodyum metabisülfit içeren 3 mL pH 6.8 tamponu içinde çözülerek hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiler 1.953, 3.906, 7.812, 15.625, 31.25, 62.5, 125 ve 250 ppm konsantrasyonlarına seyreltilerek farklı derişimlerde standart çözeltiler elde edilmiştir. Standart çözeltiler Çizelge 2.1'de verilen kromatografik koşullarda analiz edilerek ve elde edilen eğri altı alanların konsantrasyona (ppm) karşı lineer regresyon ile verdiği denklem ve doğru Şekil 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.4. TMZ'in çeşitli oranlarda koruyucu içeren pH 6.8 tamponlarında kalibrasyon doğruları ve denklemleri

3.1.5. pH 7.4 tamponu ile yapılan HPLC analizleri

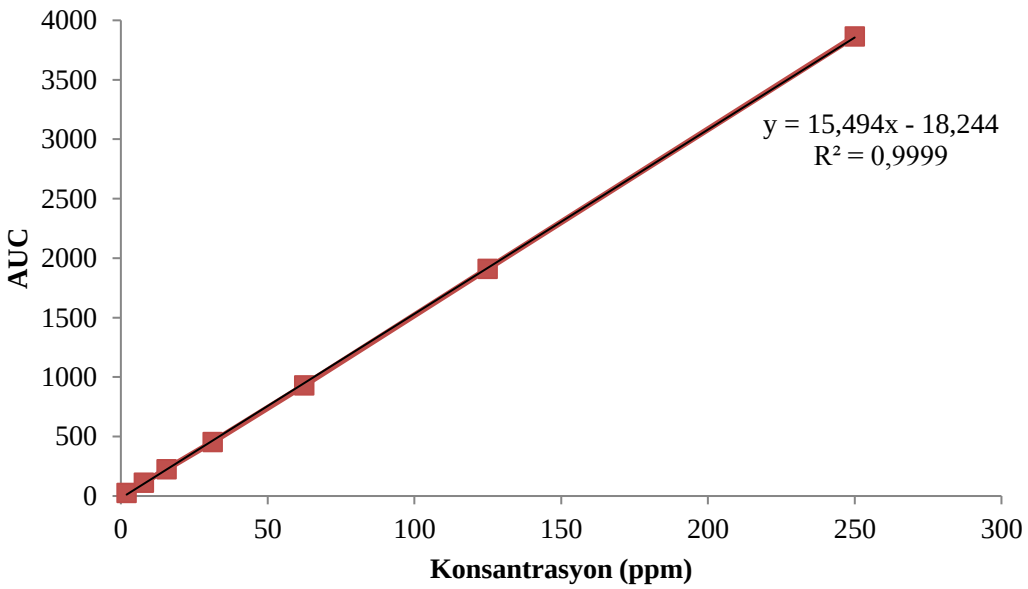
Stok çözeltiler 1,5 mg TMZ, 1,5 mg askorbik asit içeren, 2,25 mg askorbik asit içeren ve 1,5 mg sodyum metabisülfit içeren 3 mL pH 7.4 (PBS) tamponu içinde çözülerek hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiler 1.953, 3.906, 7.812, 15.625, 31.25, 62.5, 125 ve 250 ppm konsantrasyonlarına seyreltilerek farklı derişimlerde standart çözeltiler elde edilmiştir. Standart çözeltiler Çizelge 2.1'de verilen kromatografik koşullarda analiz edilerek ve elde edilen eğri altı alanların konsantrasyona (ppm) karşı lineer regresyon ile verdiği denklem ve doğru Şekil 3.5'te verilmiştir.



Şekil 3.5. TMZ'in çeşitli oranlarda koruyucu içeren pH 7.4 tamponlarında kalibrasyon doğruları ve denklemleri

3.1.6. PVA çözeltileri ile yapılan HPLC analizleri

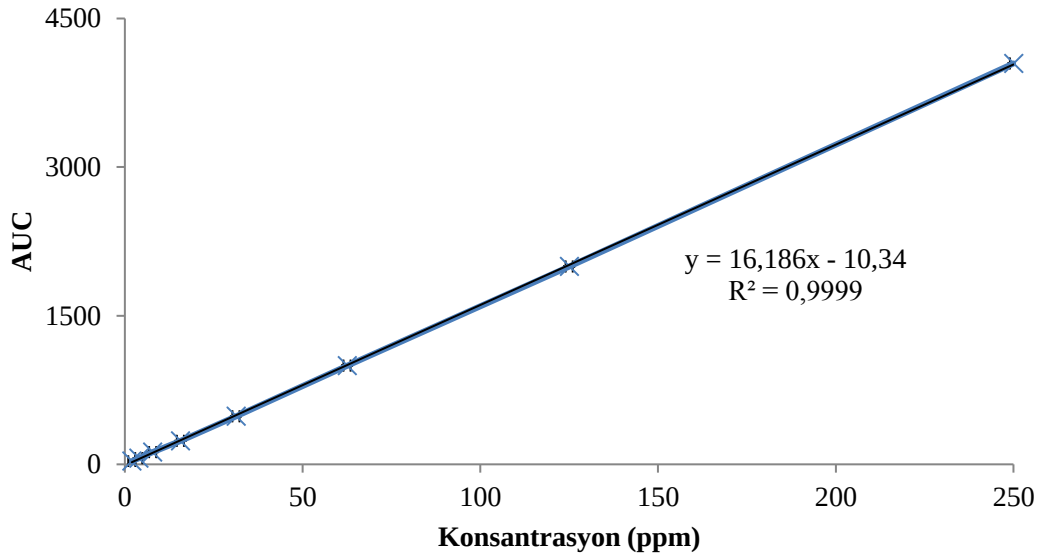
Stok çözeltiler 1,5 mg TMZ içeren 3 mL % 2'lik PVA çözeltisi içinde çözülerek hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiler 1.953, 3.906, 7.812, 15.625, 31.25, 62.5, 125, ve 250 ppm konsantrasyonlarına seyreltilerek farklı derişimlerde standart çözeltiler elde edilmiştir. Standart çözeltiler Çizelge 2.1'de verilen kromatografik koşullarda analiz edilerek ve elde edilen eğri altı alanların konsantrasyona (ppm) karşı lineer regresyon ile verdiği denklem ve doğru Şekil 3.6'da verilmiştir.



Şekil 3.6. TMZ'in % 2 oranında PVA içeren çözeltisinde kalibrasyon doğrusu ve denklemi

3.1.7. DMF ile yapılan HPLC analizleri

Stok çözeltiler 1,5 mg TMZ, 2,25 mg askorbik asit içeren 3 mL DMF içinde çözülerek hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiler 1.953, 3.906, 7.812, 15.625, 31.25, 62.5, 125 ve 250 ppm konsantrasyonlarına seyreltilerek farklı derişimlerde standart çözeltiler elde edilmiştir. Standart çözeltiler Çizelge 2.2'de verilen kromatografik koşullarda analiz edilerek ve elde edilen eğri altı alanların konsantrasyona (ppm) karşı lineer regresyon ile verdiği denklem ve doğru Şekil 3.7'de verilmiştir.



Şekil 3.7. TMZ'in askorbik asit içeren DMF içinde kalibrasyon doğrusu ve denklemi

3.2. Kullanılan yöntemin analitik validasyonu ile ilgili bulgular

3.2.1. Doğruluk ile ilgili bulgular

- **pH 1.2 tamponunda yapılan analizler için doğruluk çalışmaları**

Doğruluk çalışmaları için TMZ'nin 1,953 ppm; 15,625 ppm ve 250 ppm konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin HPLC analizi sonucunda elde edilen alanlardan hareketle pratik konsantrasyon (C_{pratik}) ve % geri elde değerleri hesaplanmıştır. Ortalama % geri elde, standart sapma ve bağıl sapma değerleri belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.1, 3.2 ve 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.1. pH 1.2 tamponunda yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		**15,625 ppm**		**250 ppm**	
C_{pratik}	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**
1,59	81,24	15,48	99,04	249,18	99,67
1,55	79,26	15,82	101,26	249,02	99,61
1,60	81,89	15,49	99,16	248,89	99,56
2,56	130,85	19,70	126,07	252,96	101,18
2,56	131,18	19,74	126,32	253,03	101,21
2,59	132,50	19,70	126,07	252,98	101,19
Ortalama % Geri elde	106,15	**Ortalama % Geri elde**	112,99	**Ortalama % Geri elde**	100,40
SS	27,80	**SS**	14,45	**SS**	0,87
BSS	26,18	**BSS**	12,78	**BSS**	0,86

Çizelge 3.2. 1.5 mg askorbik asit içeren pH 1.2 tamponunda yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		**15,625 ppm**		**250 ppm**	
C_{pratik}	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**
0,89	45,40	9,86	63,07	247,91	99,16
2,21	113,20	18,20	116,50	240,91	96,36
2,06	105,41	18,03	115,39	251,98	100,79
2,11	107,90	18,13	116,05	243,42	97,37
2,07	106,19	18,63	119,25	243,25	97,30
2,21	113,05	18,50	118,39	247,17	98,87
Ortalama % Geri elde	98,52	**Ortalama % Geri elde**	108,11	**Ortalama % Geri elde**	98,31
SS	26,24	**SS**	22,11	**SS**	1,61
BSS	26,63	**BSS**	20,45	**BSS**	1,63

Çizelge 3.3. 1.5 mg sodyum metabisülfit içeren pH 1.2 tamponunda yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		**15,625 ppm**		**250 ppm**	
C_{pratik}	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**
0,18	9,03	15,26	97,69	251,87	100,75
0,43	22,00	15,00	96,01	242,60	97,04
0,18	9,18	15,49	99,10	244,89	97,96
0,54	27,42	16,07	102,84	231,01	92,40
0,29	14,61	15,18	97,13	238,21	95,28
0,20	10,09	15,03	96,16	234,61	93,84
Ortalama % Geri elde	15,39	**Ortalama % Geri elde**	98,16	**Ortalama % Geri elde**	96,21
SS	7,70	**SS**	2,55	**SS**	3,01
BSS	50,02	**BSS**	2,60	**BSS**	3,13

- **pH 4,5 fosfat tamponu ortamında yapılan analizler için doğruluk çalışması**

Doğruluk çalışmaları için TMZ'nin 1,953 ppm; 15,625 ppm ve 250 ppm konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin HPLC analizi sonucunda elde edilen alanlardan hareketle pratik konsantrasyon ve % geri elde değerleri hesaplanmıştır. Ortalama % geri elde, standart sapma ve bağıl sapma değerleri belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.4, 3.5 ve 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.4. 1.5 mg askorbik asit içeren pH 4.5 tamponunda yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		**15,625 ppm**		**250 ppm**	
C_{pratik}	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**
1,95	1,95	17,02	108,94	234,92	93,97
2,00	2,00	15,65	100,19	198,16	79,27
1,76	1,76	14,69	94,01	199,90	79,96
1,30	1,30	12,98	83,08	173,56	69,42
1,29	1,29	12,72	81,39	205,73	82,29
1,32	1,32	13,79	88,26	179,12	71,65
Ortalama % Geri elde	1,60	**Ortalama % Geri elde**	92,65	**Ortalama % Geri elde**	79,43
SS	0,34	**SS**	10,60	**SS**	8,72
BSS	21,06	**BSS**	11,44	**BSS**	10,98

Çizelge 3.5. 1.5 mg sodyum metabisülfit içeren pH 4.5 tamponunda yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		**15,625 ppm**		**250 ppm**	
C_{pratik}	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**
0,43	21,96	7,84	50,20	253,84	101,53
1,77	90,41	15,29	97,83	253,22	101,29
1,25	63,76	14,64	93,72	236,83	94,73
1,28	65,43	18,22	116,59	242,40	96,96
1,17	59,82	17,19	110,02	263,06	105,22
1,26	64,67	15,43	98,72	234,82	93,93
Ortalama % Geri elde	61,01	**Ortalama % Geri elde**	94,52	**Ortalama % Geri elde**	98,95
SS	22,05	**SS**	23,33	**SS**	4,44
BSS	36,14	**BSS**	24,68	**BSS**	4,48

Çizelge 3.6. 2.25 mg askorbik asit içeren pH 4.5 tamponunda yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		**15,625 ppm**		**250 ppm**	
C_{pratik}	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**
3,01	154,06	14,46	92,52	249,41	99,76
3,01	154,06	14,55	93,13	248,50	99,40
3,02	154,38	14,31	91,60	251,57	100,63
2,98	152,45	14,27	91,35	244,37	97,75
2,92	149,54	14,33	91,72	243,07	97,23
2,90	148,57	14,32	91,64	242,31	96,92
Ortalama % Geri elde	152,18	**Ortalama % Geri elde**	91,99	**Ortalama % Geri elde**	98,62
SS	2,53	**SS**	0,68	**SS**	1,52
BSS	1,66	**BSS**	0,74	**BSS**	1,54

- **pH 5 tampon ortamında yapılan analizler için doğruluk çalışması**

Doğruluk çalışmaları için TMZ'nin 1,953 ppm; 31,25 ppm ve 250 ppm konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin HPLC analizi sonucunda elde edilen alanlardan hareketle pratik konsantrasyon ve % geri elde değerleri hesaplanmıştır. Ortalama % geri elde, standart sapma ve bağıl sapma değerleri belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.7. % 0,1 askorbik asit içeren pH 5 tamponunda yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları

3,90625 ppm		**31,25 ppm**		**250 ppm**	
C_{pratik}	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**
3,90	99,75	34,03	108,88	224,00	89,60
3,82	97,79	33,88	108,43	228,38	91,35
3,87	99,02	34,19	109,41	228,14	91,25
3,93	100,48	34,33	109,86	222,72	89,09
3,84	98,28	33,67	107,75	223,13	89,25
3,88	99,26	33,30	106,56	223,74	89,50
Ortalama % Geri elde	99,10	**Ortalama % Geri elde**	108,48	**Ortalama % Geri elde**	90,01
SS	0,98	**SS**	1,20	**SS**	1,02
BSS	0,98	**BSS**	1,10	**BSS**	1,13

- **pH 6.8 tamponunda yapılan analizler için doğruluk çalışmaları**

Doğruluk çalışmaları için TMZ'nin 1,953 ppm; 15,625 ppm ve 250 ppm konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin HPLC analizi sonucunda elde edilen alanlardan hareketle pratik konsantrasyon ve % geri elde değerleri hesaplanmıştır. Ortalama % geri elde, standart sapma ve bağıl sapma değerleri belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.8, 3.9, 3.10 ve 3.11'de verilmiştir.

Çizelge 3.8. 1.5 mg askorbik asit içeren pH 6.8 tamponunda yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		**15,625 ppm**		**250 ppm**	
C_{pratik}	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**
0,73	37,57	17,99	115,14	293,44	117,38
0,35	17,83	14,23	91,07	233,30	93,32
0,17	8,94	14,46	92,56	221,78	88,71
-*	-*	5,34	34,19	107,15	42,86
-*	-*	4,97	31,81	108,95	43,58
-*	-*	4,93	31,57	109,06	43,63
Ortalama % Geri elde	21,45	**Ortalama % Geri elde**	66,06	**Ortalama % Geri elde**	71,58
SS	14,65	**SS**	37,72	**SS**	32,42
BSS	68,32	**BSS**	57,11	**BSS**	45,29

*Regresyon denklemi negatif sonuç vermiştir.

Çizelge 3.9. 2.25 mg askorbik asit içeren pH 6.8 tamponunda yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		**15,625 ppm**		**250 ppm**	
C_{pratik}	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**
0,89	45,40	9,86	63,07	247,91	99,16
2,21	113,20	18,20	116,50	240,91	96,36
2,06	105,41	18,03	115,39	251,98	100,79
2,11	107,90	18,13	116,05	243,42	97,37
2,07	106,19	18,63	119,25	243,25	97,30
2,21	113,05	18,50	118,39	247,17	98,87
Ortalama % Geri elde	98,52	**Ortalama % Geri elde**	108,11	**Ortalama % Geri elde**	98,31
SS	26,24	**SS**	22,11	**SS**	1,61
BSS	26,63	**BSS**	20,45	**BSS**	1,63

Çizelge 3.10. 1.5 mg sodyum metabisülfit içeren pH 6.8 tamponunda yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		**15,625 ppm**		**250 ppm**	
C_{pratik}	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**
0,00	0,14	15,66	100,21	268,29	107,31
0,94	48,24	14,68	93,94	248,30	99,32
1,09	55,79	16,75	107,19	231,47	92,59
0,89	45,47	13,42	85,88	223,76	89,50
0,82	41,79	16,21	103,73	224,57	89,83
0,85	43,44	13,29	85,08	238,78	95,51
Ortalama % Geri elde	39,15	**Ortalama % Geri elde**	96,01	**Ortalama % Geri elde**	95,68
SS	19,73	**SS**	9,26	**SS**	6,79
BSS	50,40	**BSS**	9,64	**BSS**	7,10

Çizelge 3.11. 2.25 mg sodyum metabisülfit içeren pH 6.8 tamponunda yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		**15,625 ppm**		**250 ppm**	
C_{pratik}	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**
-*	-*	16,70	106,85	245,15	98,06
-*	-*	16,38	104,85	251,67	100,67
-*	-*	17,59	112,59	247,06	98,82
-*	-*	3,08	19,73	86,73	34,69
-*	-*	3,05	19,52	86,12	34,45
-*	-*	3,03	19,38	85,81	34,32
Ortalama % Geri elde	-*	**Ortalama % Geri elde**	63,82	**Ortalama % Geri elde**	66,84
SS	-*	**SS**	48,57	**SS**	35,45
BSS	-*	**BSS**	76,11	**BSS**	53,03

*Regresyon denklemi negatif sonuç vermiştir.

- **pH 7,4 fosfat tamponu ortamında yapılan analizler için doğruluk çalışması**

Doğruluk çalışmaları için TMZ'nin 1,953 ppm; 15,625 ppm ve 250 ppm konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin HPLC analizi sonucunda elde edilen alanlardan hareketle pratik konsantrasyon ve % geri elde değerleri hesaplanmıştır. Ortalama % geri elde, standart sapma ve bağıl sapma değerleri belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.12, 3.13 ve 3.14'te verilmiştir.

Çizelge 3.12. pH 7,4 fosfat tamponu ortamında yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		**15,625 ppm**		**250 ppm**	
C_{pratik}	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**
4,32	221,04	19,42	124,32	320,75	128,30
-*	-*	13,51	86,48	213,87	85,55
-*	-*	13,81	88,36	210,86	84,34
3,20	163,94	37,79	241,88	317,82	127,13
3,16	161,78	37,34	238,98	313,27	125,31
3,55	181,71	36,75	235,21	309,41	123,77
Ortalama % Geri elde	182,12	**Ortalama % Geri elde**	169,21	**Ortalama % Geri elde**	112,40
SS	27,44	**SS**	77,33	**SS**	21,33
BSS	15,07	**BSS**	45,70	**BSS**	18,97

Çizelge 3.13. 1,5 mg askorbik asit içeren pH 7,4 fosfat tamponu ortamında yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		**15,625 ppm**		**250 ppm**	
C_{pratik}	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**
6,74	344,88	15,99	102,37	371,67	148,67
7,41	379,41	17,46	111,77	203,85	81,54
7,19	368,29	17,06	109,21	187,34	74,94
6,23	318,84	12,37	79,18	162,48	64,99
6,14	314,16	11,98	76,65	156,52	62,61
6,05	309,77	12,11	77,53	150,30	60,12
Ortalama % Geri elde	339,22	**Ortalama % Geri elde**	92,78	**Ortalama % Geri elde**	82,15
SS	29,68	**SS**	16,73	**SS**	33,58
BSS	8,75	**BSS**	18,03	**BSS**	40,88

Çizelge 3.14. 1,5 mg sodyum metabisülfit içeren pH 7,4 fosfat tamponu ortamında yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		**15,625 ppm**		**250 ppm**	
C_{pratik}	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**
2,60	133,09	22,39	143,28	328,68	131,47
1,60	81,83	12,69	81,21	220,38	88,15
1,50	77,05	12,33	78,89	200,18	80,07
0,63	32,08	7,74	49,52	174,28	69,71
0,49	25,04	7,41	47,42	164,47	65,79
0,41	20,77	7,27	46,51	164,35	65,74
Ortalama % Geri elde	61,64	**Ortalama % Geri elde**	74,47	**Ortalama % Geri elde**	83,49
SS	43,90	**SS**	37,24	**SS**	25,12
BSS	71,21	**BSS**	50,01	**BSS**	30,08

- **% 2 PVA çözeltisi ortamında yapılan analizler için doğruluk çalışması**

Doğruluk çalışmaları için TMZ'nin çeşitli konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin farklı dalga boylarında HPLC analizi sonucunda elde edilen alanlardan hareketle pratik konsantrasyon ve % geri elde değerleri hesaplanmıştır. Ortalama % geri elde, standart sapma ve bağıl sapma değerleri belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.15'de verilmiştir.

Çizelge 3.15. % 2 PVA çözeltisi ortamında yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		**31,25 ppm**		**250 ppm**	
C_{pratik}	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**
2,94	150,50	29,10	93,11	246,67	98,67
2,91	149,18	31,17	99,74	253,39	101,36
3,02	154,47	31,58	101,07	251,76	100,70
2,95	150,83	29,10	93,13	222,90	89,16
2,95	150,83	28,94	92,62	205,10	82,04
2,92	149,51	29,03	92,89	252,60	101,04
Ortalama % Geri elde	150,89	**Ortalama % Geri elde**	95,43	**Ortalama % Geri elde**	95,50
SS	1,89	**SS**	3,88	**SS**	8,04
BSS	1,25	**BSS**	4,10	**BSS**	8,42

- **DMF'de yapılan analizler için doğruluk çalışması**

Doğruluk çalışmaları için TMZ'nin 3,90625 ppm; 15,625 ppm ve 250 ppm konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin HPLC analizi sonucunda elde edilen alanlardan hareketle pratik konsantrasyon ve % geri elde değerleri hesaplanmıştır. Ortalama % geri elde, standart sapma ve bağıl sapma değerleri belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.16'da verilmiştir.

Çizelge 3.16. DMF'de yapılan doğruluk değerlendirmesi bulguları

3,90625 ppm		**15,625 ppm**		**250 ppm**	
C_{pratik}	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**	**C_{pratik}**	**% Geri Elde**
4,36	111,74	14,93	90,56	250,66	100,26
4,34	111,11	15,29	97,85	250,54	100,22
4,45	113,96	15,34	98,17	250,88	100,35
4,41	113,01	15,08	96,51	249,69	99,88
4,27	109,37	15,02	96,15	249,77	99,91
4,43	113,33	15,25	97,57	251,10	100,44
Ortalama % Geri elde	112,10	**Ortalama % Geri elde**	96,97	**Ortalama % Geri elde**	100,17
SS	1,69	**SS**	1,04	**SS**	0,23
BSS	1,51	**BSS**	1,10	**BSS**	0,23

3.2.2. Kesinlik ile ilgili bulgular (Tekrarlanabilirlik çalışmaları)

- **pH 1.2 tamponunda yapılan analizler için tekrarlanabilirlik çalışmaları**

Tekrarlanabilirlik çalışmaları için TMZ'nin 1,953 ppm; 15,625 ppm ve 250 ppm konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin HPLC analizi sonucunda elde edilen alanlardan hareketle pratik konsantrasyon (C_{pratik}) hesaplanmıştır. Ortalama pratik konsantrasyon, standart sapma ve bağıl sapma değerleri belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.17, 3.18 ve 3.19'da verilmiştir.

Çizelge 3.17. pH 1.2 tamponunda yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		15,625 ppm		250 ppm	
Alan	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**
30	1,59	246,4	15,47	3887,8	249,18
29,4	1,55	251,8	15,82	3885,3	249,02
30,2	1,60	246,7	15,49	3883,3	248,89
45,1	2,56	312,2	19,70	3946,6	252,96
45,2	2,56	312,8	19,74	3947,7	253,03
45,6	2,59	312,2	19,70	3947	252,98
Ortalama	2,10	**Ortalama**	17,65	**Ortalama**	251,01
SS	0,49	**SS**	2,00	**SS**	1,98
BSS	23,60	**BSS**	11,31	**BSS**	0,79

Çizelge 3.18. 1.5 mg askorbik asit içeren pH 1.2 tamponunda yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		15,625 ppm		250 ppm	
Alan	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**
47,2	0,89	341,8	9,85	8161,5	247,91
90,7	2,21	616	18,2	7931,5	240,91
85,7	2,06	610,3	18,03	8295	251,98
87,3	2,11	613,7	18,13	8014	243,42
86,2	2,07	630,1	18,63	8008,5	243,25
90,6	2,21	625,7	18,50	8137	247,17
Ortalama	1,92	**Ortalama**	16,89	**Ortalama**	245,77
SS	0,11	**SS**	0,62	**SS**	3,88
BSS	5,56	**BSS**	3,66	**BSS**	1,60

Çizelge 3.19. 1.5 mg sodyum metabisülfit içeren pH 1.2 tamponunda yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		15,625 ppm		250 ppm	
Alan	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**
75,7	0,18	588,1	15,26	8623,4	251,87
84,3	0,43	579,2	15,00	8308,5	242,60
75,8	0,18	595,6	15,48	8386,4	244,89
87,9	0,54	615,4	16,07	7914,9	231,01
79,4	0,28	585,1	15,18	8159,4	238,20
76,4	0,20	580	15,03	8037,2	234,61
Ortalama	0,30	**Ortalama**	15,34	**Ortalama**	240,53
SS	0,14	**SS**	0,397625	**SS**	5,16
BSS	45,86	**BSS**	2,59	**BSS**	2,14

- **pH 4,5 fosfat tamponu ortamında yapılan analizler için tekrarlanabilirlik çalışması**

Tekrarlanabilirlik çalışmaları için TMZ'nin 1,953 ppm; 15,625 ppm ve 250 ppm konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin HPLC analizi sonucunda elde edilen alanlardan hareketle pratik konsantrasyon hesaplanmıştır. Ortalama pratik konsantrasyon, standart sapma ve bağıl sapma değerleri belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.20, 3.21 ve 3.22'de verilmiştir.

Çizelge 3.20. 1.5 mg askorbik asit içeren pH 4.5 tamponunda yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		**15,625 ppm**		**250 ppm**	
Alan	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**
54,4	1,95	363,3	17,02	4829,2	234,92
55,4	2,00	335,3	15,65	4075,8	198,16
50,5	1,76	315,5	14,69	4111,4	199,90
41,1	1,30	280,5	12,98	3571,5	173,56
40,9	1,29	275,1	12,72	4230,8	205,72
41,5	1,32	297,1	13,79	3685,6	179,12
Ortalama	1,60	**Ortalama**	14,47	**Ortalama**	198,56
SS	0,29	**SS**	1,11	**SS**	12,93
BSS	18,29	**BSS**	7,66	**BSS**	6,51

Çizelge 3.21. 1.5 mg sodyum metabisülfit içeren pH 4.5 tamponunda yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		**15,625 ppm**		**250 ppm**	
Alan	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**
39,4	0,43	290,1	7,84	8606,6	253,84
84,6	1,77	541,7	15,29	8585,9	253,22
67	1,24	520	14,64	8031,7	236,83
68,1	1,28	640,8	18,22	8220,1	242,40
64,4	1,17	606,1	17,19	8918,4	263,06
67,6	1,26	546,4	15,42	7963,8	234,82
Ortalama	1,19	**Ortalama**	14,77	**Ortalama**	247,36
SS	0,22	**SS**	1,45	**SS**	10,64
BSS	18,72	**BSS**	9,81	**BSS**	4,30

Çizelge 3.22. 2.25 mg askorbik asit içeren pH 4.5 tamponunda yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		**15,625 ppm**		**250 ppm**	
Alan	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**
35,4	3,01	217,1	14,46	3946,3	249,41
35,4	3,01	218,6	14,55	3931,8	248,50
35,5	3,01	214,8	14,31	3980,5	251,57
34,9	2,98	214,2	14,27	3866,3	244,37
34	2,92	215,1	14,33	3845,7	243,07
33,7	2,90	214,9	14,32	3833,6	242,31
Ortalama	2,97	**Ortalama**	14,37	**Ortalama**	246,54
SS	0,05	**SS**	0,10	**SS**	3,53
BSS	1,55	**BSS**	0,69	**BSS**	1,43

- **pH 5 tampon ortamında yapılan analiz için tekrarlanabilirlik çalışması**

Tekrarlanabilirlik çalışmaları için TMZ'nin 1,953 ppm; 31,25 ppm ve 250 ppm konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin HPLC analizi sonucunda elde edilen alanlardan hareketle pratik konsantrasyon hesaplanmıştır. Ortalama pratik konsantrasyon, standart sapma ve bağıl sapma değerleri belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.23'te verilmiştir.

Çizelge 3.23. % 0,1 askorbik asit içeren pH 5 tamponunda yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları

3,90625 ppm		**31,25 ppm**		**250 ppm**	
Alan	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**
42,9	3,90	358	34,03	2344,7	224,00
42,1	3,82	356,5	33,88	2390,6	228,38
42,6	3,87	359,7	34,19	2388	228,14
43,2	3,93	361,2	34,33	2331,4	222,72
42,3	3,84	354,3	33,67	2335,6	223,13
42,7	3,88	350,4	33,30	2342	223,74
Ortalama	3,87	**Ortalama**	33,90	**Ortalama**	225,02
SS	0,04	**SS**	0,37	**SS**	2,55
BSS	0,98	**BSS**	1,10	**BSS**	1,13

- **pH 6.8 tamponunda yapılan analizler için tekrarlanabilirlik çalışmaları**

Tekrarlanabilirlik çalışmaları için TMZ'nin 1,953 ppm; 15,625 ppm ve 250 ppm konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin HPLC analizi sonucunda elde edilen alanlardan hareketle pratik konsantrasyon hesaplanmıştır. Ortalama pratik konsantrasyon, standart sapma ve bağıl sapma değerleri belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.24, 3.25, 3.26 ve 3.27'de verilmiştir.

Çizelge 3.24. 1.5 mg askorbik asit içeren pH 6.8 tamponunda yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		**15,625 ppm**		**250 ppm**	
Alan	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**
61	0,73	419	17,99	6133,5	293,44
53	0,35	341	14,23	4885,8	233,30
49,4	0,17	345,8	14,46	4646,8	221,78
40,4	-*	156,6	5,34	2268,7	107,15
38,8	-*	148,9	4,97	2306,1	108,95
39,1	-*	148,1	4,93	2308,4	109,06
Ortalama	-*	**Ortalama**	10,32	**Ortalama**	178,95
SS	-*	**SS**	4,58	**SS**	59,23
BSS	-*	**BSS**	44,42	**BSS**	33,1

*Regresyon denklemi negatif sonuç vermiştir.

Çizelge 3.25. 2.25 mg askorbik asit içeren pH 6.8 tamponunda yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		**15,625 ppm**		**250 ppm**	
Alan	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**
26,7	0,31	270	16,34	3988,9	261,37
27,2	0,34	268,2	16,22	3991,1	261,52
27	0,33	265,3	16,03	3469,5	227,15
23,6	0,10	240,9	14,42	3339,9	218,61
23,6	0,10	239,5	14,33	3311,4	216,74
23,4	0,09	236,3	14,12	3270,4	214,03
Ortalama	0,21	**Ortalama**	15,24	**Ortalama**	233,24
SS	0,12	**SS**	0,91	**SS**	17,66
BSS	54,03	**BSS**	5,97	**BSS**	7,57

Çizelge 3.26. 1.5 mg sodyum metabisülfit içeren pH 6.8 tamponunda yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		**15,625 ppm**		**250 ppm**	
Alan	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**
32,8	0,003	467,8	15,66	7487,6	268,29
58,9	0,94	440,6	14,68	6932,3	248,30
63	1,09	498,1	16,75	6464,5	231,47
57,4	0,89	405,6	13,42	6250,4	223,76
55,4	0,82	483,1	16,21	6272,9	224,57
56,3	0,85	402,1	13,29	6667,7	238,78
Ortalama	0,76	**Ortalama**	15,001	**Ortalama**	239,19
SS	0,11	**SS**	1,41	**SS**	9,53
BSS	14,97	**BSS**	9,41	**BSS**	3,98

Çizelge 3.27. 2.25 mg sodyum metabisülfit içeren pH 6.8 tamponunda yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		**15,625 ppm**		**250 ppm**	
Alan	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**
100,8	-*	567,8	16,70	6834,1	245,15
82,3	-*	559,2	16,38	7012,9	251,67
81	-*	592,4	17,59	6886,4	247,06
40,6	-*	194,4	3,08	2488,8	86,73
40,9	-*	193,5	3,05	2472	86,12
40,5	-*	192,9	3,03	2463,5	85,81
Ortalama	-*	**Ortalama**	9,97	**Ortalama**	167,09
SS	-*	**SS**	6,86	**SS**	80,19
BSS	-*	**BSS**	68,78	**BSS**	47,99

*Regresyon denklemi negatif sonuç vermiştir.

- **pH 7,4 fosfat tamponu ortamında yapılan analizler için tekrarlanabilirlik çalışması**

Tekrarlanabilirlik çalışmaları için TMZ'nin 1,953 ppm; 15,625 ppm ve 250 ppm konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin HPLC analizi sonucunda elde edilen alanlardan hareketle pratik konsantrasyon hesaplanmıştır. Ortalama pratik konsantrasyon, standart sapma ve bağıl sapma değerleri belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.28, 3.29 ve 3.30'da verilmiştir.

Çizelge 3.28. pH 7,4 fosfat tamponu ortamında yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		15,625 ppm		250 ppm	
Alan	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**
71,4	4,32	215	19,42	3079,2	320,75
26	-*	158,8	13,51	2063,2	213,87
25,5	-*	161,6	13,81	2034,6	210,86
60,8	3,20	389,6	37,79	3051,3	317,82
60,4	3,16	385,3	37,34	3008,1	313,27
64,1	3,55	379,7	36,75	2971,4	309,41
Ortalama	3,56	**Ortalama**	26,44	**Ortalama**	281,00
SS	0,54	**SS**	11,60	**SS**	49,73
BSS	15,07	**BSS**	43,87	**BSS**	17,70

*Regresyon denklemi negatif sonuç vermiştir.

Çizelge 3.29. 1,5 mg askorbik asit içeren pH 7,4 fosfat tamponu ortamında yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		15,625 ppm		250 ppm	
Alan	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**
28,1	6,74	190,1	15,99	6413,3	371,67
39,9	7,41	215,8	17,46	3477	203,85
36,1	7,19	208,8	17,06	3188,2	187,34
19,2	6,23	126,7	12,37	2753,2	162,48
17,6	6,14	119,8	11,98	2648,9	156,52
16,1	6,05	122,2	12,11	2540,1	150,30
Ortalama	6,62	**Ortalama**	14,50	**Ortalama**	205,36
SS	0,58	**SS**	2,51	**SS**	24,38
BSS	8,71	**BSS**	17,33	**BSS**	11,87

Çizelge 3.30. 1,5 mg sodyum metabisülfit içeren pH 7,4 fosfat tamponu ortamında yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		15,625 ppm		250 ppm	
Alan	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**
66,1	2,60	469,3	22,39	6710,4	328,68
45,7	1,60	271,7	12,69	4503,6	220,38
43,8	1,50	264,3	12,33	4092,1	200,18
25,9	0,63	170,8	7,74	3564,3	174,28
23,1	0,49	164,1	7,41	3364,3	164,47
21,4	0,41	161,2	7,27	3362	164,35
Ortalama	1,20	**Ortalama**	11,64	**Ortalama**	208,72
SS	0,53	**SS**	2,63	**SS**	24,18
BSS	44,00	**BSS**	22,57	**BSS**	11,59

- **% 2 PVA çözeltisi ortamında yapılan analizler için tekrarlanabilirlik çalışması**

Tekrarlanabilirlik çalışmaları için TMZ'nin çeşitli konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin HPLC analizi sonucunda elde edilen alanlardan hareketle pratik konsantrasyon hesaplanmıştır. Ortalama pratik konsantrasyon, standart sapma ve bağıl sapma değerleri belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.31'de verilmiştir.

Çizelge 3.31. % 2 PVA çözeltisi ortamında yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları

1,953 ppm		**31,25 ppm**		**250 ppm**	
Alan	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**
27,3	2,94	432,6	29,10	3803,7	246,67
26,9	2,91	464,7	31,17	3907,8	253,39
28,5	3,02	471,1	31,58	3882,5	251,76
27,4	2,95	432,7	29,10	3435,4	222,90
27,4	2,95	430,2	28,94	3159,5	205,09
27	2,92	431,5	29,03	3895,6	252,60
Ortalama	2,95	**Ortalama**	29,82	**Ortalama**	238,74
SS	0,04	**SS**	1,21	**SS**	20,11
BSS	1,25	**BSS**	4,07	**BSS**	8,42

- **Askorbik asit içeren DMF'de yapılan analizler için tekrarlanabilirlik çalışması**

Tekrarlanabilirlik çalışmaları için TMZ'nin 3,90625 ppm; 15,625 ppm ve 250 ppm konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin HPLC analizi sonucunda elde edilen alanlardan hareketle pratik konsantrasyon hesaplanmıştır. Ortalama pratik konsantrasyon, standart sapma ve bağıl sapma değerleri belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.32'de verilmiştir.

Çizelge 3.32. DMF'de yapılan tekrarlanabilirlik değerlendirmesi bulguları

3,90625 ppm		**15,625 ppm**		**250 ppm**	
Alan	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**	**Alan**	**C_{pratik}**
62	4,36	232,9	14,93	4045,8	250,66
61,6	4,34	238,7	15,29	4043,9	250,54
63,4	4,45	239,5	15,34	4049,3	250,87
62,8	4,41	235,3	15,08	4030,1	249,69
60,5	4,27	234,4	15,02	4031,4	249,77
63	4,43	238	15,25	4052,9	251,10
Ortalama	4,38	**Ortalama**	15,15	**Ortalama**	250,44
SS	0,07	**SS**	0,12	**SS**	0,57
BSS	1,50	**BSS**	0,82	**BSS**	0,23

3.2.3. Teşhis sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) ile ilgili bulgular

LOD= **3,3 α/s**

LOQ= **10 α/s**

α=kesişimin standart sapması

s= kalibrasyon doğrusunun eğimi

Teşhis ve tayin sınırı ICH kılavuzunda verilen formüllere göre kalibrasyon denkleminin eğimi ve kesişim değerlerinin standart sapması (n=3) kullanılarak hesaplanmıştır. Çizelge 3.33'de sonuçlar listelenmiştir.

Çizelge 3.33. LOD ve LOQ değerlerinin listesi

Çözeltiler	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
pH 1.2	0,23	0,69
TMZ:Askorbik Asit (1:1) pH 1.2	4,02	12,19
TMZ:NaMetabisülfit (1:1) pH 1.2	2,64	8,01
TMZ:Askorbik Asit (1:1) pH 4.5	3,48	10,53
TMZ:NaMetabisülfit (1:1) pH 4.5	2,21	6,70
TMZ:Askorbik Asit (1:1,5) pH 4.5	0,98	2,96
% 0,1 Askorbik Asitli pH 5	0,46	1,40
TMZ:Askorbik Asit (1:1) pH 6.8	3,14	9,51
TMZ:NaMetabisülfit (1:1) pH 6.8	5,06	15,35
TMZ:Askorbik Asit (1:1,5) pH 6.8	5,96	18,06
TMZ:NaMetabisülfit (1:1,5) pH 6.8	4,56	13,83
pH 7.4	1,51	4,57
TMZ:Askorbik Asit (1:1) pH 7.4	28,08	85,08
TMZ:NaMetabisülfit (1:1) pH 7.4	10,66	32,31
TMZ:Askorbik Asit (1:1,5) DMF	0,21	0,64
% 2 PVA (330 nm)	0,48	1,47
% 2 PVA (335 nm)	1,56	4,72

3.3. TMZ yüklü PLGA nanopartiküllerin formülasyon çalışması sonuçları

Yapılan yöntem tasarımına göre üretilen F13 I ve II kodlu nanopartiküllerin formülasyon parametreleri ile enkapsülasyon etkinliği verileri Çizelge 3.34'te verilmiştir. Çizelge 3.34'te verilen yükleme etkinliklerinin yetersiz olması nedeniyle yöntem değişikliğine gidilmesine karar verilmiştir. Enkapsülasyon etkinliğinin yükseltilmesi amacıyla referans makale olarak kullanılan (Ananta ve ark., 2016) makaledeki iki yöntem değerlendirilmiştir;

- **Tek emülsiyon yöntemi:** TMZ ve PLGA'dan belirli miktar tartılarak 1 mL DMF içinde çözülmüş ve ultrasonik homojenizatörde 10 sn % 40 güç, x3 cycle'da homojenize edilmiştir. 5 mL % 2 PVA çözeltisine eklenerek 60 sn boyunca aynı koşullarda homojenizasyon devam ettirilmiştir. Manyetik karıştırıcı üzerinde 600 rpm hızda 5 saat boyunca DMF'in uçması için karıştırılmıştır. Eppendorf tüplere alınarak 15.000 rpm'de 20 dk'lık periyotlarla nanopartikül çökmeyene kadar santrifüj edilmiştir.
- **İkili emülsiyon yöntemi:** TMZ ve PLGA'dan belirli miktar tartılarak TMZ, 1 mL DMF:su (1:1) içinde, PLGA ise % 3 Span 80 içeren 1 mL DCM içinde çözülmüş, TMZ çözeltisi PLGA çözeltisine eklenerek ultrasonik homojenizatörde 10 sn % 40 güç, x3 cycle'da homojenize edilmiştir. Oluşan karışım 5 mL % 2 PVA çözeltisine eklenerek 60 sn boyunca aynı koşullarda homojenizasyon devam ettirilmiştir. Manyetik karıştırıcı üzerinde 600 rpm hızda 5 saat boyunca DMF'in uçması için karıştırılmıştır. Eppendorf tüplere alınarak 15.000 rpm'de 20 dk'lık periyotlarla nanopartiküllerin hepsinin çöktüğü emin olunana kadar santrifüj edilmiştir.

Çizelge 3.34. Belirlenen formülasyon yöntemleri ile üretilen F kodlu formülasyonlardan elde edilen enkapsülasyon etkinliği değerleri

Formülasyon kodu	**PVA konsantrasyonu ve miktarı**		**Organik faz ve miktarı (mL)**	**PLGA miktarı (mg)**	**TMZ miktarı (mg)**	**Ultrasonikasyon gücü, dönü ve süresi**	**Mekanik sonikasyon hızı ve süresi**	**Enkapsülasyon etkinliği (%)**
F13 (38-54) I	%2	5 mL	DMF ; 1 mL	20	2	40W ; 3 ; 60 sn	-	30,19
F13 (38-54) II	%2	5 mL	DMF ; 1 mL	20	2	30W ; 3 ; 3 dk	9400 rpm ; 5 dk	9,69
F13 (38-54) II (10 mL PVA, NaCl, DCM)	%2	10 mL (0,05 M NaCl)	DCM ; 1 mL	20	2	30W ; 3 ; 3 dk	9400 rpm ; 5 dk	1,11
F13 (38-54) II (DCM)	%2	5 mL	DCM ; 1 mL	20	2	30W ; 3 ; 3 dk	9400 rpm ; 5 dk	6,99
F13 (38-54) II (Etil asetat)	%2	5 mL	Etil asetat ; 1 mL	20	2	30W ; 3 ; 3 dk	9400 rpm ; 5 dk	0,97
F13 (38-54) I (10 mL PVA, NaCl, DCM)	%2	10 mL (0,05 M NaCl)	DCM ; 1 mL	20	2	40W ; 3 ; 60 sn	-	1,56

Buna göre,

- ✓ Tek emülsiyon yöntemi ile 4 mg TMZ, 20 mg PLGA içeren; (SE % 20 kodlu)
- ✓ İkili emülsiyon yöntemi ile 2 mg TMZ, 20 mg PLGA içeren (DE % 10) ve 4 mg TMZ, 20 mg PLGA içeren (DE % 20) formülasyonların hazırlanmasına karar verilmiştir.

Çizelge 3.35. Referans makaledeki formülasyon yöntemi ile üretilen formülasyonlardan elde edilen enkapsülasyon etkinliği değerleri

Formül kodu	**PVA konsantrasyonu ve miktarı**		**Organik faz ve miktarı (mL)**	**PLGA miktarı (mg)**	**TMZ miktarı (mg)**	**Enkapsülasyon etkinliği (%)**
SE % 20	%2	5 mL	DMF ; 1 mL	20	4	2,49
DE % 10	%2	5 mL (% 3 SPAN 80)	DMF:su (1:1) ; 1 mL	20	2	2,45
DE % 20	%2	5 mL (% 3 SPAN 80)	DMF:su (1:1) ; 1 mL	20	4	1,30

Bu yöntemle elde edilen nanopartiküllerde enkapsülasyon etkinliğini artırmak üzere formülasyon değişkenleri ve yöntem parametrelerinde değişiklik yapılarak yöntem modifiye edilmiştir. Değiştirilen parametrelerden ilki PLGA polimerinin molekül ağırlığı olmuştur. Bu hususta 35.000-54.000 molekül ağırlığına sahip polimerden 24.000-38.000 molekül ağırlıklı polimere geçilmiştir.

TMZ ve PLGA'dan belirli miktar ayrı ayrı tartılarak toplam 1 mL DMF içinde ultrasonik banyoda çözülmüş ve birbirine karıştırılmıştır. Karışım insülin enjektörüne alındıktan sonra 5 mL PVA çözeltisine damlatılarak 9400 rpm homojenizasyon altında belirli süre eklenmiş ve belirli süre boyunca aynı koşullarda homojenizasyon devam ettirilmiştir. Manyetik karıştırıcı üzerinde 600 rpm hızda belirli süre boyunca DMF'in uçması için karıştırılmıştır. Eppendorf tüplere alınarak değişen şartlarda ve sürelerde nanopartikül çökmeyene kadar santrifüj edilmiştir. A kodlu formülasyonlar ve parametrelerinde yapılan değişiklikler Çizelge 3.36'da verilmiştir.

Çizelge 3.36. A kodlu formüllerin parametre değişiklikleri

Formül kodu	TMZ (mg)	PLGA (mg)	yağ fazı	su fazı	Cihaz ve Parametreleri	Buharlaştırma süresi	Santrifüj süresi
A1	2	20	DMF	% 2 PVA	sonikatör % 40, % 3, 1 dk	5 sa, 600 rpm	1 saat
A2	2	20	DMF	% 2 PVA	homojenizatör 2,5 dk ilave, 0,5 dk karıştırma	2 sa, 600 rpm	1 saat
A3	2	20	DMF	% 2 PVA	sonikatör % 40, % 3, 1 dk	2 sa, 600 rpm	1 saat
A5	2	20	DMF	% 2 PVA	homojenizatör 1 dk ilave, 0,5 dk karıştırma	2 sa, 600 rpm	1 saat
A4	5	20	DMF	% 2 PVA	homojenizatör 1 dk ilave, 0,5 dk karıştırma	2 sa, 600 rpm	1 saat
A6	2	20	DMF	% 2 PVA	homojenizatör 1 dk ilave, 0,5 dk karıştırma	2 sa, 600 rpm	1 saat
A7	2	20	DMF	% 2 PVA	homojenizatör 1 dk ilave, 0,5 dk karıştırma	2 sa, 600 rpm	2 saat
A8	5	20	DMF	% 2 PVA	homojenizatör 1 dk ilave, 0,5 dk karıştırma	2 sa, 600 rpm	2 saat
A9	10	20	DMF	% 2 PVA	homojenizatör 1 dk ilave, 0,5 dk karıştırma	2 sa, 600 rpm	2 saat
A10	10	40	DMF	% 2 PVA	homojenizatör 1 dk ilave, 0,5 dk karıştırma	2 sa, 600 rpm	2 saat
A11	10	40	DMF	% 5 PVA	homojenizatör 1 dk ilave, 0,5 dk karıştırma	2 sa, 600 rpm	2 saat
A12	10	40	etil asetat	% 5 PVA	homojenizatör 1 dk ilave, 0,5 dk karıştırma	2 sa, 600 rpm	2 saat
A13	10	40	aseton	% 5 PVA	homojenizatör 1 dk ilave, 0,5 dk karıştırma	2 sa, 600 rpm	2 saat

Formülasyonların, santrifüjden sonra süpernatandan indirekt yöntem ile elde edilen enkapsülasyon etkinliği değerleri Çizelge 3.37'de verilmiştir.

Çizelge 3.37. A kodlu formülasyonların, değişen parametrelere göre üretimleri sonucu elde edilen enkapsülasyon etkinliği verileri

Formül kodu	TMZ (mg)	PLGA (mg)	Dış faz	Yağ fazı	Cihaz ve parametreleri	Santrifüj parametreleri	% EE
A1	2	20	% 2 PVA	DMF	sonikatör % 40, % 3, 1 dk	26.000 rpm, 1 saat Sigma 3-30KS	62,29
A2	2	20	% 2 PVA	DMF	homojenizatör 2,5 dk ilave, 0,5 dk karıştırma	26.000 rpm, 1 saat Sigma 3-30KS	89,24
A3	2	20	% 2 PVA	DMF	sonikatör % 40, % 3, 1 dk	15.000, 1 saat Dynamica Velocity 15µ	67,57
A5	2	20	% 2 PVA	DMF	homojenizatör 1 dk ilave, 0,5 dk karıştırma	15.000, 1 saat Dynamica Velocity 15µ	68,27
A4	5	20	% 2 PVA	DMF	homojenizatör 1 dk ilave, 0,5 dk karıştırma	15.000, 1 saat Dynamica Velocity 15µ	71,03
A6	2	20	% 2 PVA	DMF	homojenizatör 1 dk ilave, 0,5 dk karıştırma	15.000, 1 saat Dynamica Velocity 15µ	55,30
A7	2	20	% 2 PVA	DMF	homojenizatör 1 dk ilave, 0,5 dk karıştırma	15.000, 1 saat Dynamica Velocity 15µ	56,53
A8	5	20	% 2 PVA	DMF	homojenizatör 1 dk ilave, 0,5 dk karıştırma	15.000, 1 saat Dynamica Velocity 15µ	72,13
A9	10	20	% 2 PVA	DMF	homojenizatör 1 dk ilave, 0,5 dk karıştırma	15.000, 1 saat Dynamica Velocity 15µ	75,56
A10	10	40	% 2 PVA	DMF	homojenizatör 1 dk ilave, 0,5 dk karıştırma	15.000, 1 saat Dynamica Velocity 15µ	68,45
A11	10	40	% 5 PVA	DMF	homojenizatör 1 dk ilave, 0,5 dk karıştırma	15.000, 1 saat Dynamica Velocity 15µ	69,36
A12	10	40	% 5 PVA	etil asetat	homojenizatör 1 dk ilave, 0,5 dk karıştırma	15.000, 1 saat Dynamica Velocity 15µ	56,35
A13	10	40	% 5 PVA	aseton	homojenizatör 1 dk ilave, 0,5 dk karıştırma	15.000, 1 saat Dynamica Velocity 15µ	55,63

Çizelge 3.38. Formülasyonlara göre % yükleme ve enkapsülasyon etkinliği

Formülasyon	% Enkapsülasyon etkinliği	Teorik etkinlik	% Yükleme etkinliği
A1	62,29	9,09	5,86
A2	89,24	9,09	8,19
A3	67,57	9,09	6,33
A4	71,03	20,00	15,08
A5	68,27	9,09	6,39
A6	55,30	9,09	5,24
A7	56,53	9,09	5,35
A8	72,13	20,00	15,28
A9	75,56	33,33	27,42
A10	68,45	20,00	14,61
A11	69,36	20,00	14,78
A12	56,35	20,00	12,35
A13	55,63	20,00	12,21
A2-2	52,63	9,09	5,00
A2-5	60,69	9,09	5,72
A2-10	69,67	9,09	6,51

Çizelge 3.38'de görüldüğü gibi, ortalama yükleme etkinliği ve enkapsülasyon etkinliği sıra ile % 10,4 ± 6,09 ve % 65,67 ± 9,51 olarak tespit edilmiştir. Temozolomid'in suda çözünürlüğü 5 mg/mL olduğundan, stabilizer faza geçerek enkapsülasyon etkinliğinin ve yükleme etkinliğinin düşmesine neden olabilmektedir (Lee ve Ooi 2016).

3.4. TMZ yüklü PLGA nanopartiküllerin in vitro karakterizasyon çalışmaları

3.4.1. Partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (pDI) ve zeta potansiyelinin tayini

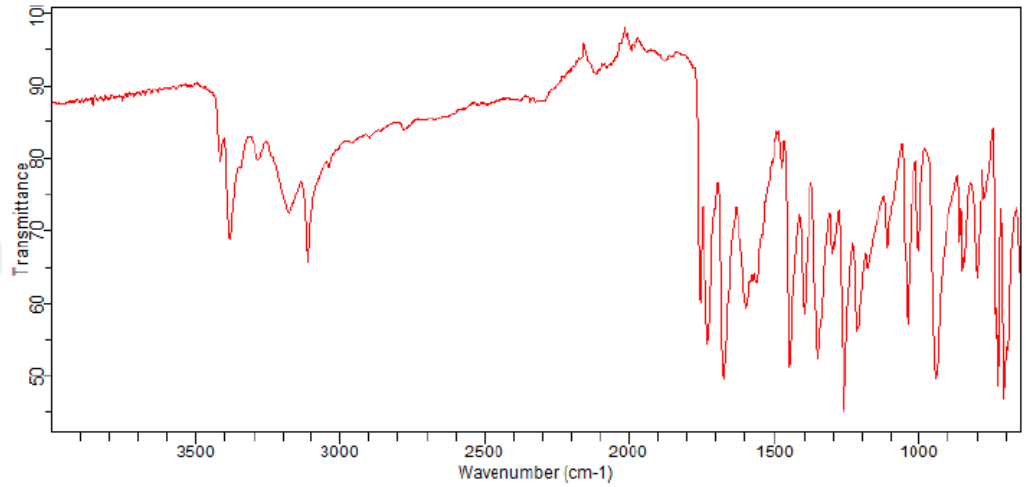
İki yöntemle de üretilen tüm formülasyonların, 2.3.1 başlığında verilen yöntemle ölçülen partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri, standart sapma değerleri ile birlikte Çizelge 3.40'ta verilmiştir.

Çizelge 3.39. Formülasyonların partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri (n=3)

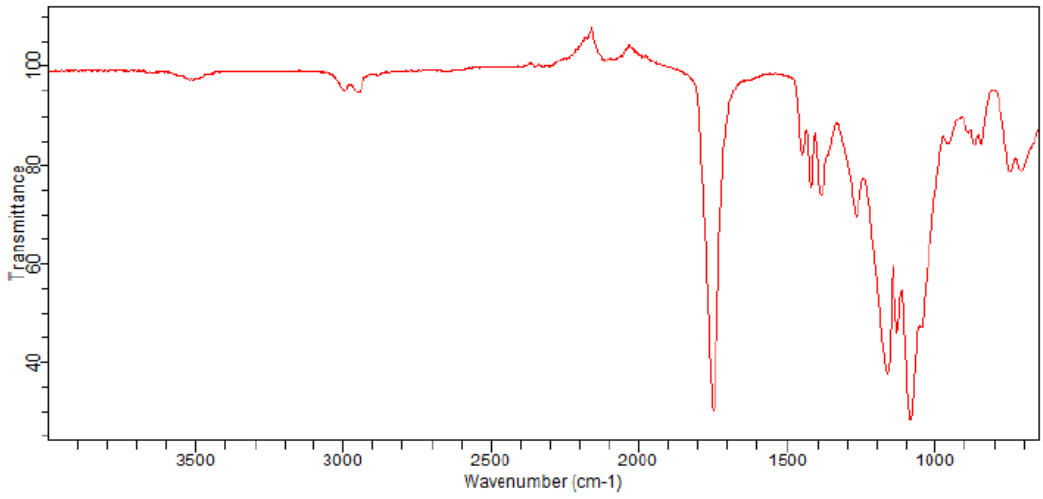
Formülasyon kodu	Partikül boyutu (nm)	Polidispersite indeksi (pDI)	Zeta potansiyeli (mV)
F13 (38-54) I	192,1 ± 0,306	0,11 ± 0,008	-7,11 ± 0,85
F13 (38-54) II	267,1 ± 3,27	0,30 ± 0,032	-13,20 ± 1,56
F13 (38-54) II (10 mL PVA, NaCl, DCM)	1084 ± 100,6	0,92 ± 0,073	-4,89 ± 3,10
F13 (38-54) II (DCM)	680,2 ± 53,76	0,57 ± 0,125	-5,37 ± 0,27
F13 (38-54) II (Etil asetat)	609,5 ± 15,31	0,24 ± 0,048	-3,46 ± 0,19
F13 (38-54) I (10 mL PVA, NaCl, DCM)	514,8 ± 51,13	0,39 ± 0,057	-15,80 ± 0,79
SE % 20	273,2 ± 2,55	0,17 ± 0,021	-12,90 ± 0,90
DE % 10	698,4 ± 17,88	0,48 ± 0,095	-5,64 ± 0,22
DE % 20	883,3 ± 48,38	0,49 ± 0,128	-16,10 ± 1,25
A1	190,8 ± 2,48	0,21 ± 0,066	-13,90 ± 1,60
A2	169,3 ± 4,05	0,26 ± 0,014	-13,10 ± 0,42
A3	297,4 ± 3,44	0,24 ± 0,056	-19,40 ± 2,03
A4	281,7 ± 1,51	0,17 ± 0,018	-13,70 ± 0,75
A5	193,8 ± 2,25	0,20 ± 0,010	-15,30 ± 1,18
A6	227,1 ± 5,02	0,24 ± 0,040	-16,30 ± 1,67
A7	478,2 ± 102,8	0,59 ± 0,221	-16,80 ± 0,27
A8	180,9 ± 3,50	0,16 ± 0,031	-5,21 ± 2,87
A9	250,2 ± 2,30	0,23 ± 0,001	-5,59 ± 0,94
A10	328,3 ± 3,02	0,22 ± 0,012	-7,54 ± 0,14
A11	473,2 ± 4,61	0,35 ± 0,021	-4,64 ± 1,10
A12	1025 ± 243,7	0,74 ± 0,107	-3,93 ± 0,25
A13	372 ± 107,5	0,45 ± 0,056	-9,97 ± 1,79
A2-T	205,5 ± 7,65	0,44 ± 0,486	-5,61 ± 1,59
A2-5	235,5 ± 24,96	0,36 ± 0,100	-13,10 ± 1,05
A2-10	164,4 ± 4,24	0,14 ± 0,046	-4,16 ± 0,34

3.4.2. FTIR (Fourier Transform Infrared) spektrumu analizi

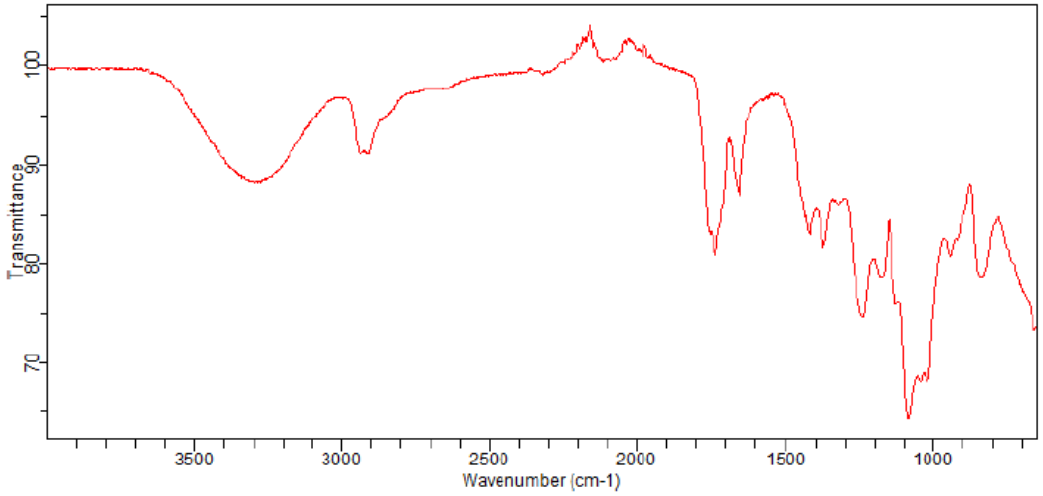
2.3.2 başlığı altında verilen yöntem ile etkin maddenin (TMZ), polimerin (PLGA (50:50, Ma= 24.000 – 38.000)), seçilen optimum formülasyonların (A2-2, A2-5, A2-10) ve formülasyon içeriklerinin fiziksel karışımlarının IR spektrumu alınmıştır. Sonuçlar, dalga sayısı (cm^{-1}) – geçirgenlik grafiği şeklinde Şekil 3.8-15'te verilmiştir.



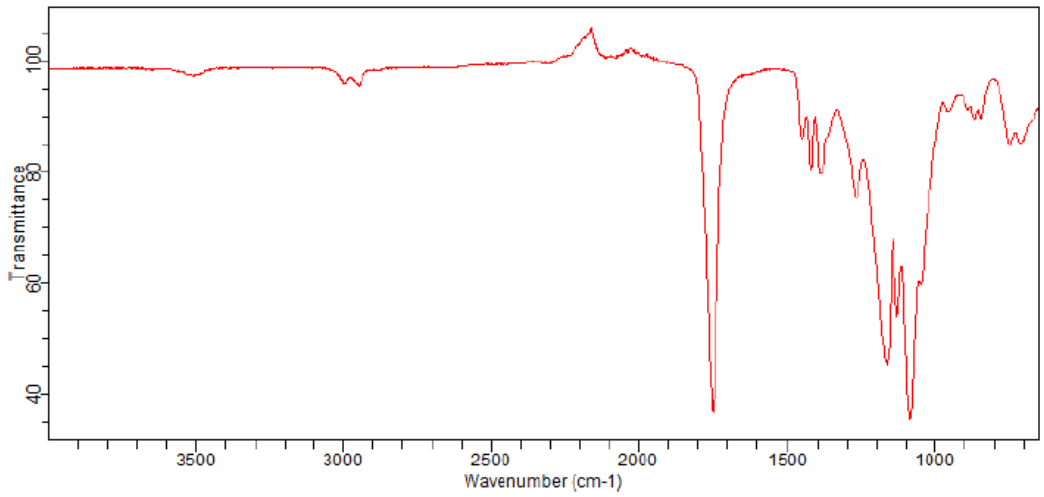
Şekil 3.8. TMZ'in IR spektrumu



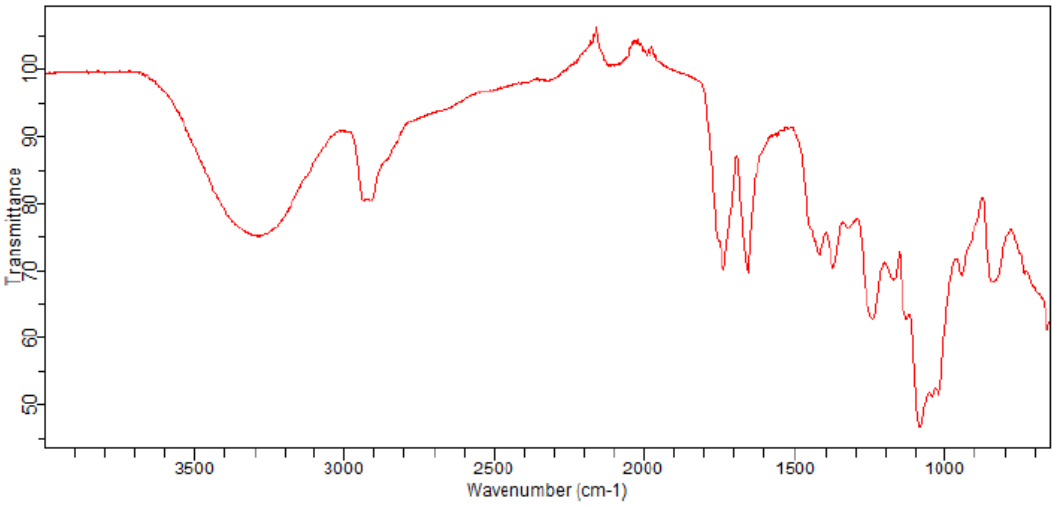
Şekil 3.9. PLGA'nın IR spektrumu



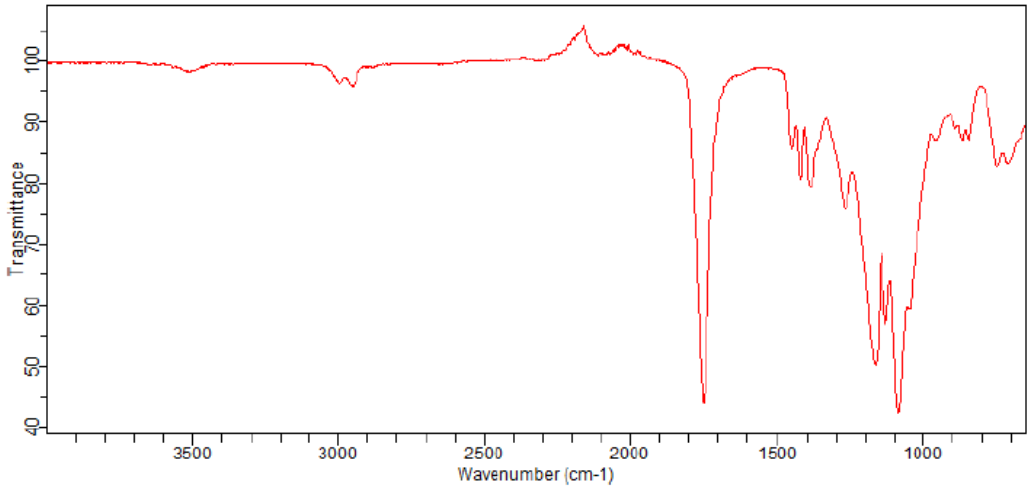
Şekil 3.10. A2-2'nin IR spektrumu



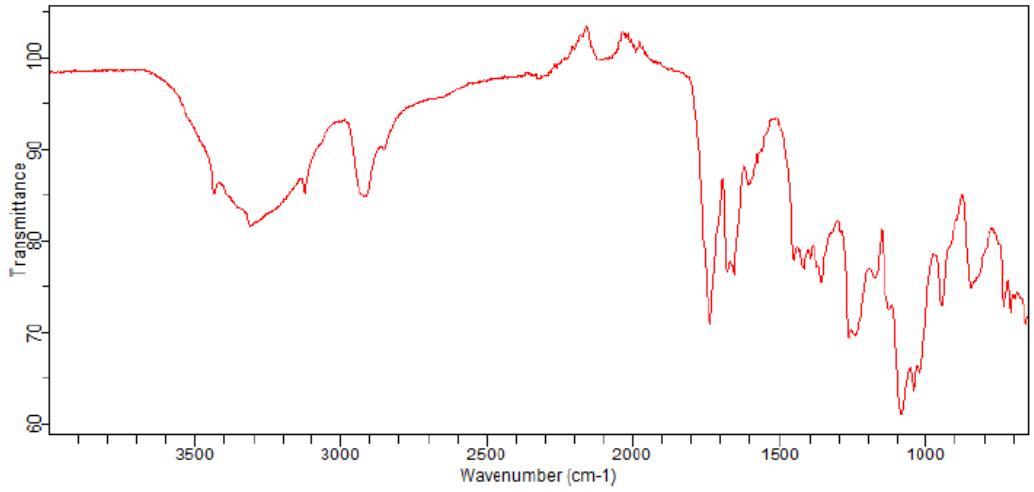
Şekil 3.11. A2-2'nin fiziksel karışımının IR spektrumu



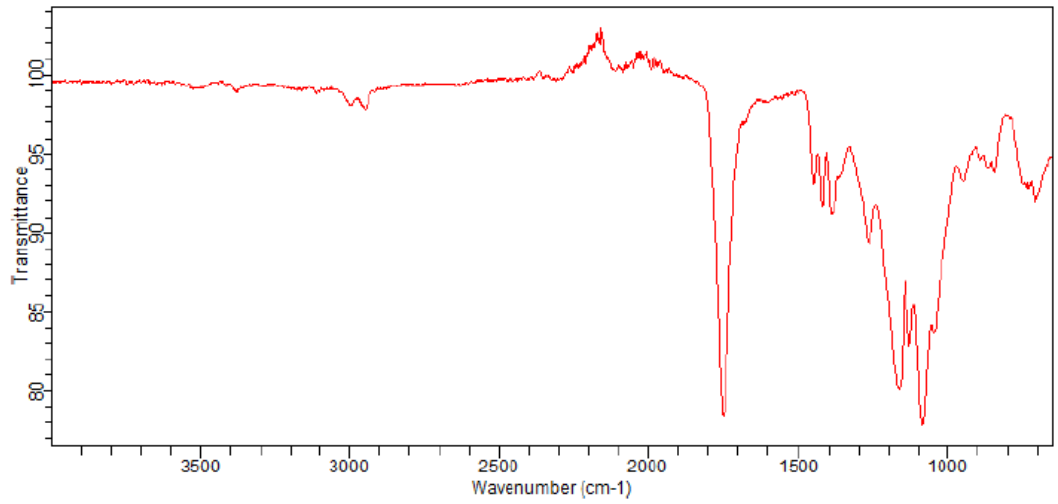
Şekil 3.12. A2-5'in IR spektrumu



Şekil 3.13. A2-5'in fiziksel karışımının IR spektrumu



Şekil 3.14. A2-10'un IR spektrumu



Şekil 3.15. A2-10'un fiziksel karışımının IR spektrumu

TMZ'in ve PLGA'nın dalga sayısına karşı titreşim nitelikleri Çizelge 3.40 ve 3.41'de verilmiştir.

Çizelge 3.40. TMZ'in titreşim nitelik listesi

Dalga Sayısı (cm^{-1})	**Titreşim niteliği**
3416, 3382	Sekonder amidden gelen NH gerilmesi
3114	CH_3 grubunun asimetrik gerilmesi
1757-1727	Primer ve tersiyer amidden gelen ilk amid bandı (C=O)
1673	İkinci amid bandından gelen NH eğilmesi / C=N / C=C
1449	CH_3 grubunun CH eğilmesi
1263	C-O gerilmesi

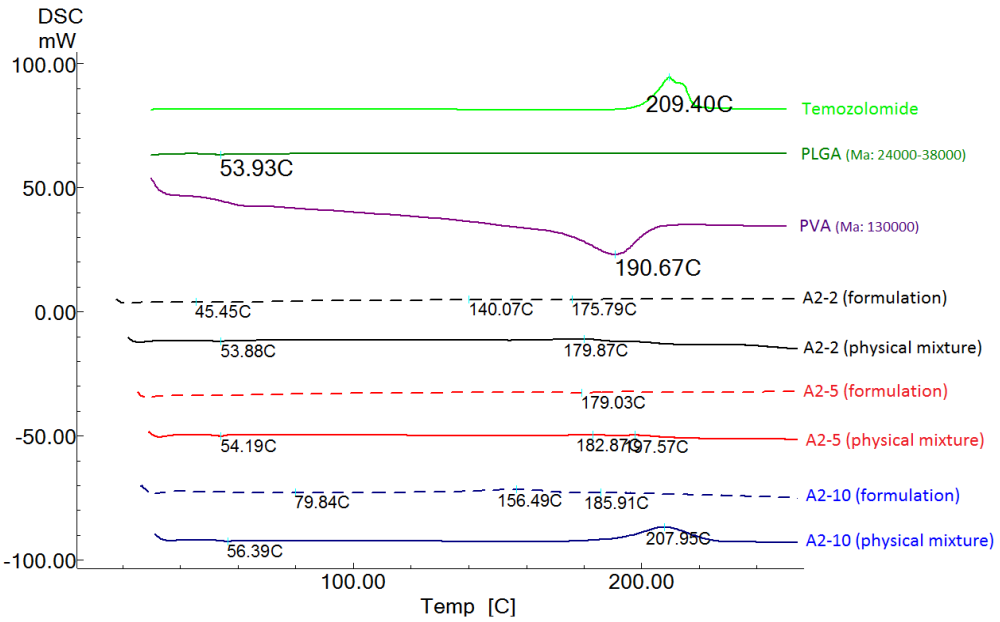
Çizelge 3.41. PLGA'nın titreşim nitelik listesi

Dalga Sayısı (cm^{-1})	**Titreşim niteliği**
3000 civarı	CH_3 grubunun asimetrik gerilmesi
1748	C=O gerilmesi
1451	CH_3 grubunun CH eğilmesi
1422	Glikolik asitin CH, OH eğilmesi
1384	CH_3 grubunun CH eğilmesi
1269	Karboksilik asitin C-O gerilmesi
1164	Ester grubunun C-C-O gerilmesi
1086	Ester grubunun O-C-C gerilmesi
957	OH eğilmesi

3.4.3. DSC (Differential Scanning Calorimetry) analizi

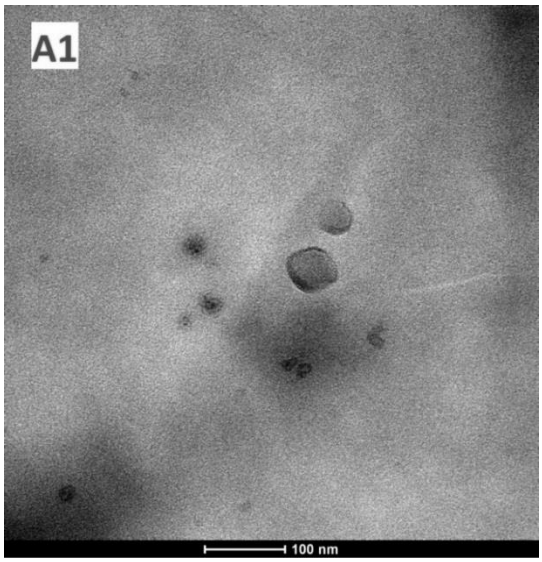
2.3.3 başlığı altında verilen yöntem ile etkin maddenin (TMZ), polimerin (PLGA (50:50, Ma= 24.000 – 38.000)), su fazı olarak kullanılan PVA'nın (Mowiol 18-88, Ma = 130.000) seçilen optimum formülasyonların (A2-T, A2-5, A2-10) ve formülasyon içeriklerinin fiziksel karışımlarının DSC analizi yapılmıştır. Sonuçlar, sıcaklık (°C) – mW grafiği şeklinde Şekil 3.16'da verilmiştir.

Şekil 3.16. TMZ, PLGA, PVA, formüller ve fiziksel karışımların DSC analizi

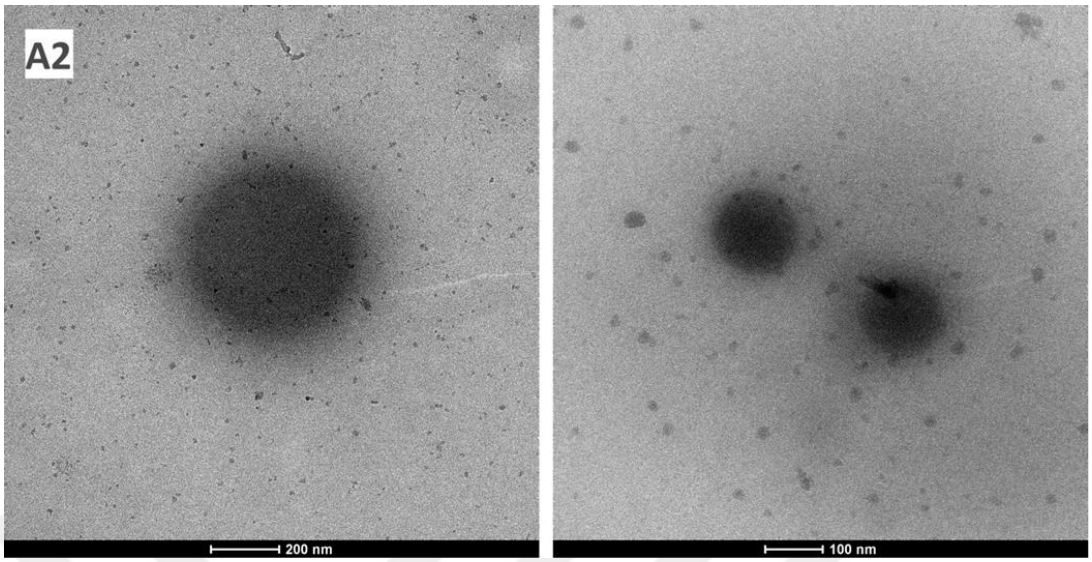


3.4.4. TEM analizi

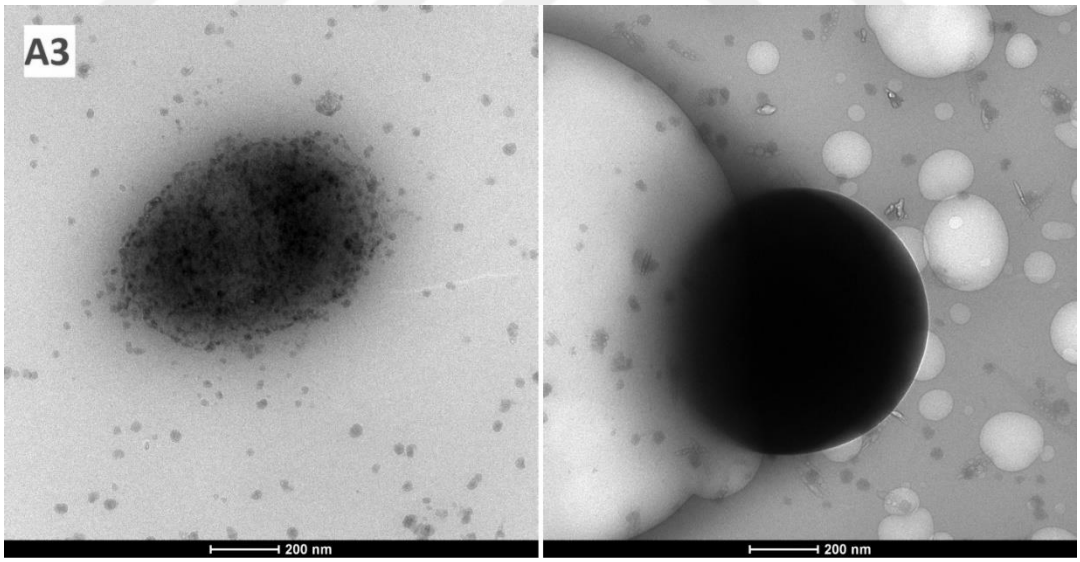
Tüm A kodlu formülasyonların TEM analizi sonuçları Şekil 3.17-31'de verilmiştir.



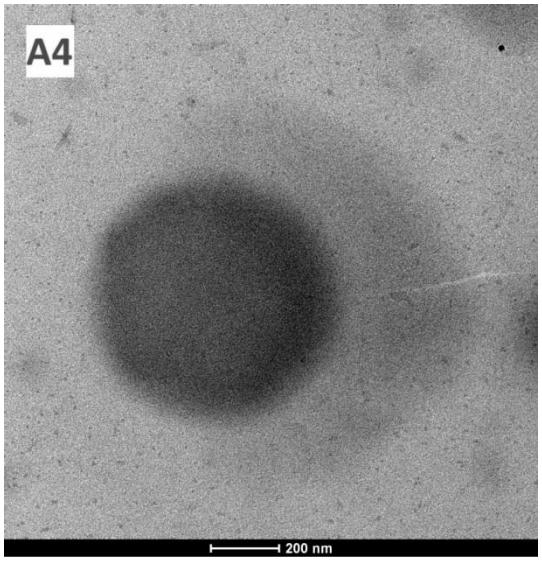
Şekil 3.17. A1 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü



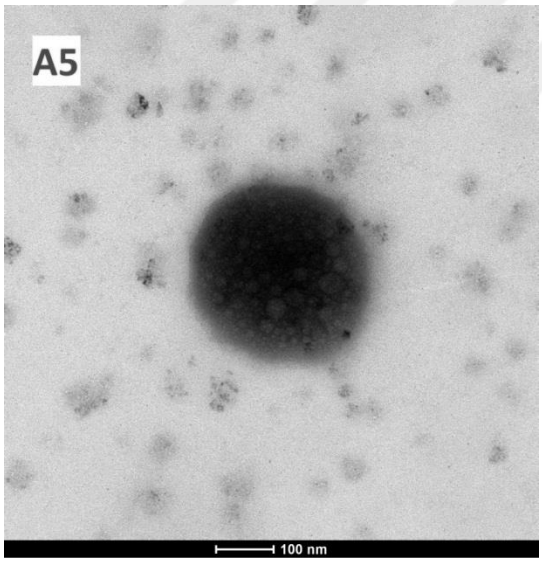
Şekil 3.18. A2 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü



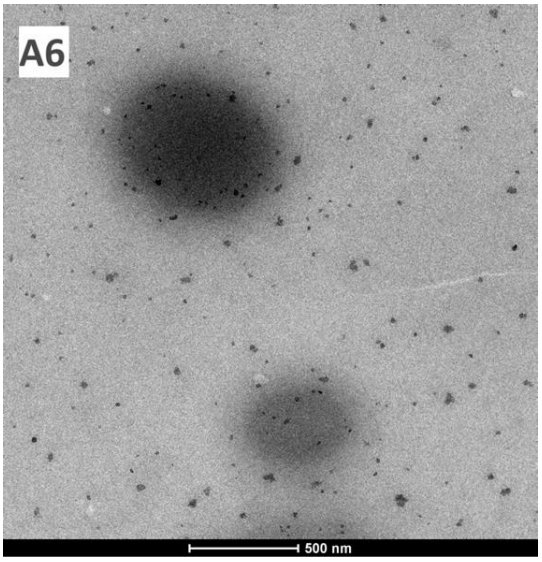
Şekil 3.19. A3 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü



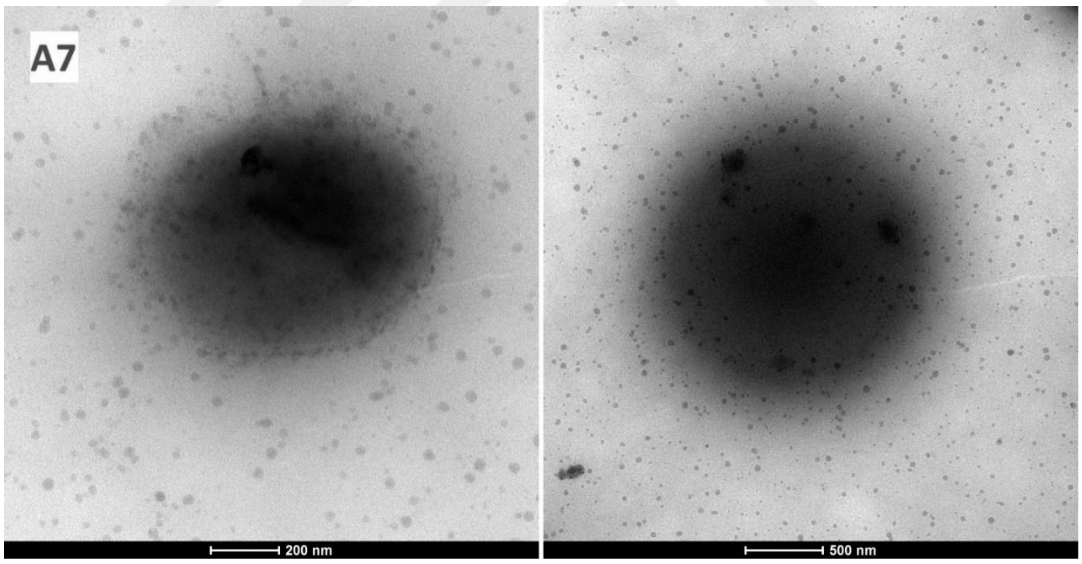
Şekil 3.20. A4 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü



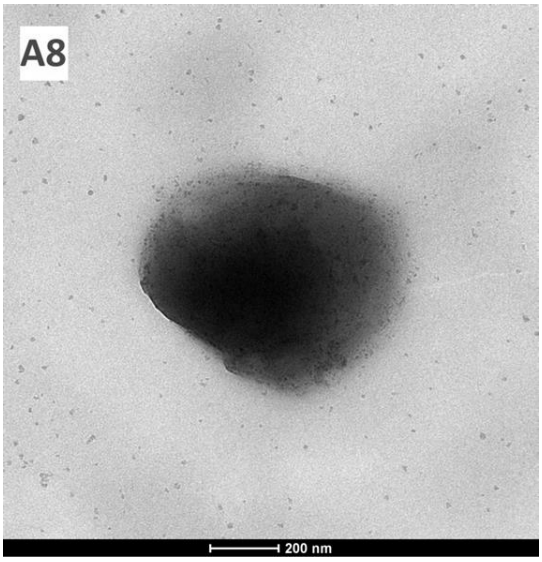
Şekil 3.21. A5 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü



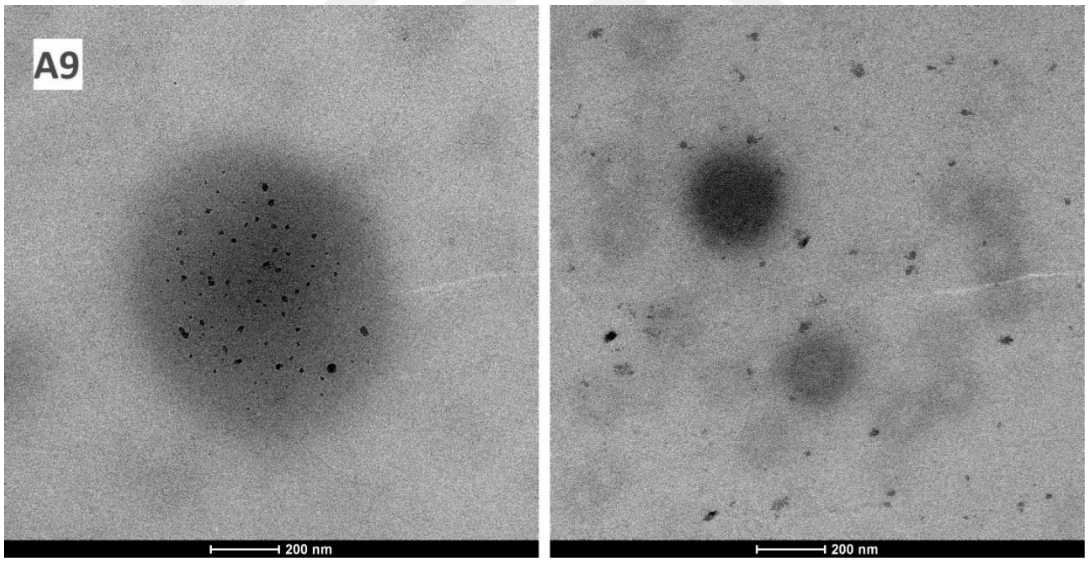
Şekil 3.22. A6 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü



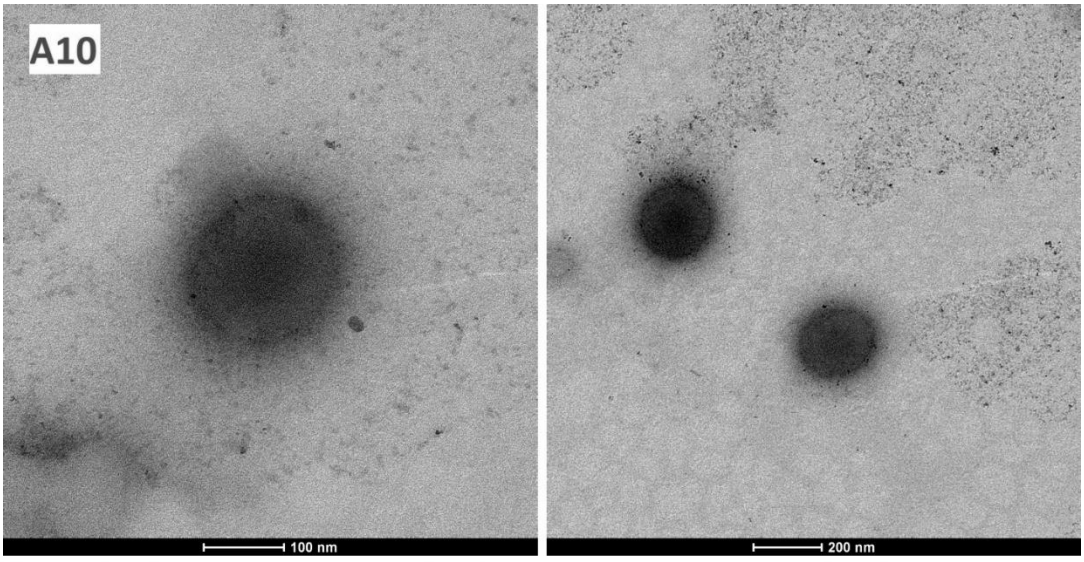
Şekil 3.23. A7 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü



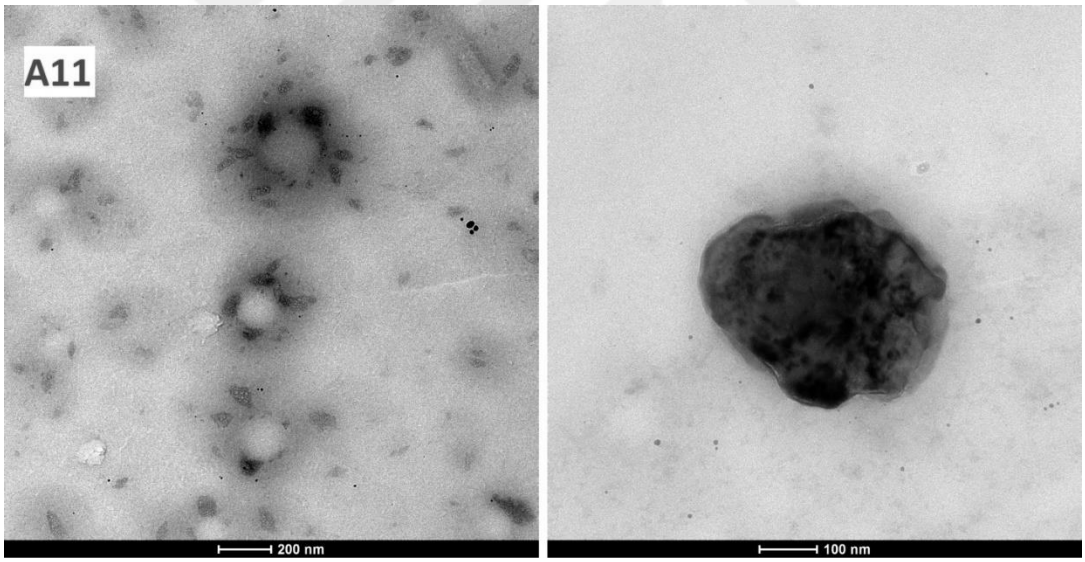
Şekil 3.24. A8 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü



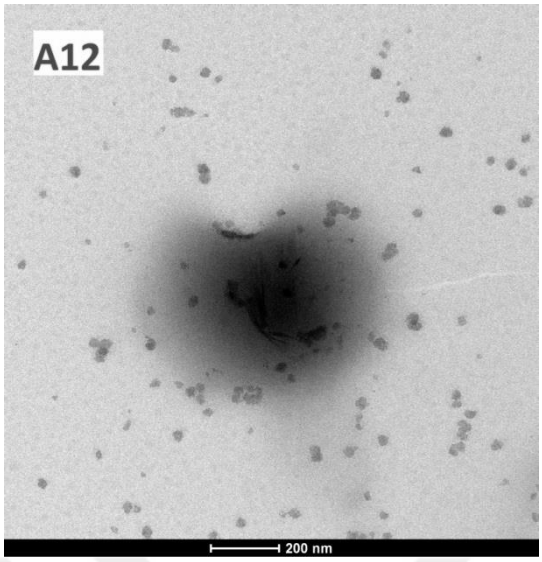
Şekil 3.25. A9 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü



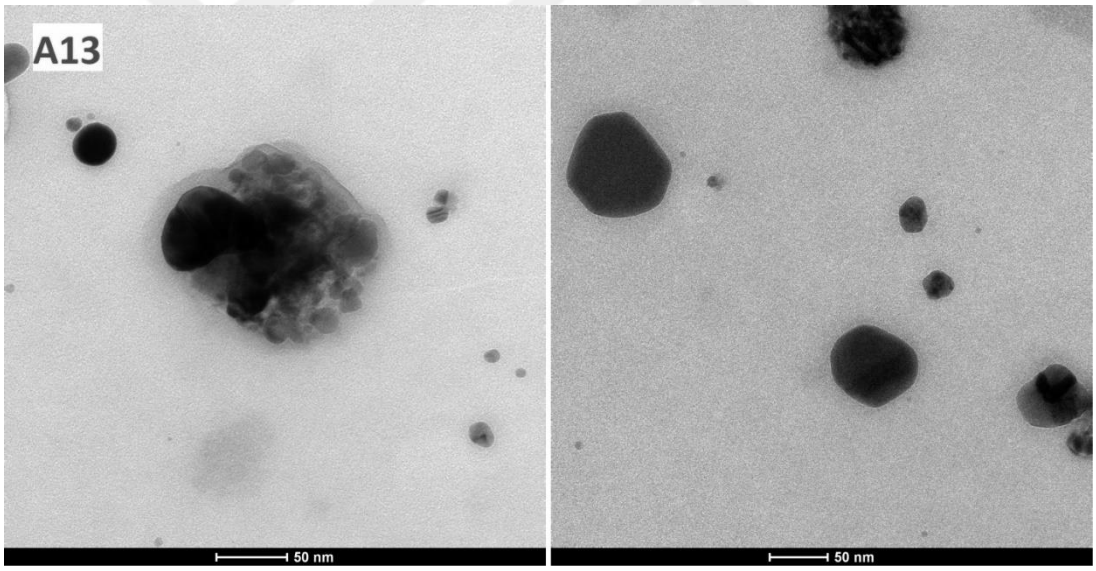
Şekil 3.26. A10 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü



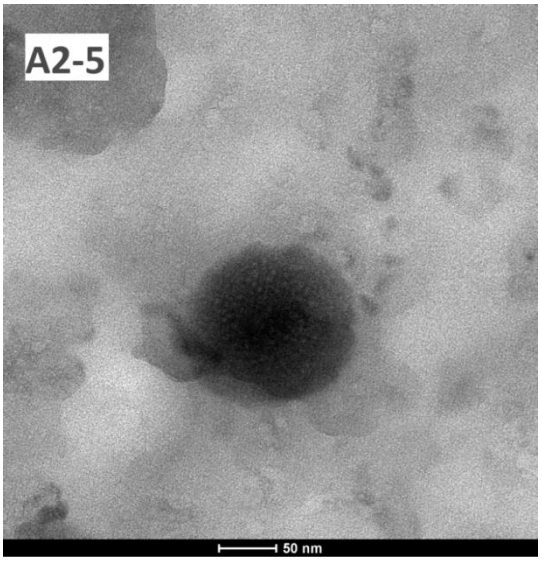
Şekil 3.27. A11 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü



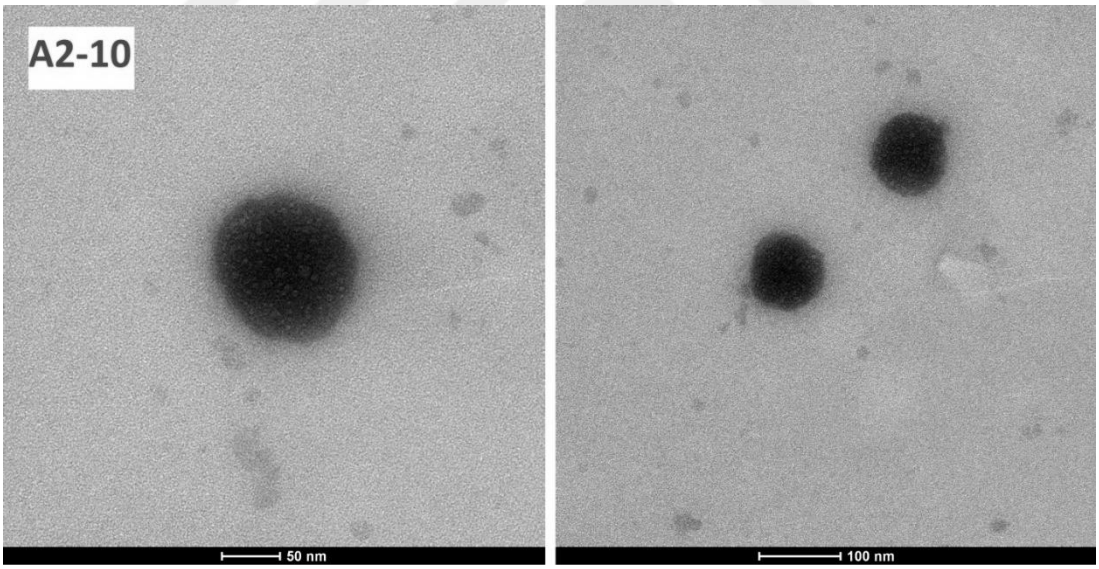
Şekil 3.28. A12 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü



Şekil 3.29. A13 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü



Şekil 3.30. A2-5 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü



Şekil 3.31. A2-10 formülasyonunun TEM analizi görüntüsü

Üretilen nanopartiküller üzerinde yapılan in vitro karakterizasyon çalışmaları doğrultusunda nanopartiküllerin en iyi temsil edildiği TEM analizi görüntüleri A1, A2, A4, A5, A7, A2-5 ve A2-10 formülasyonlarında sağlanmıştır.

3.5. Optimum formülasyonların seçilmesi

Formülasyonlar, üretim parametrelerinin partikül boyutu, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli değerleri ve enkapsülasyon etkinliğine etkisi yönüyle değerlendirilmiştir. Optimum formülasyonlar belirtilen parametreler ile doğrultusunda seçilip in vitro karakterizasyon ve in vitro etkin madde salım çalışmaları seçilen formülasyonlarla yürütülmüştür. Preformülasyon çalışmaları doğrultusunda partikül boyutu, pDI, zeta potansiyel değeri ve üretimin tekrarlanabilirliği göz önünde tutularak A2 formülasyonu optimum formülasyon olarak seçilmiş ve etkin madde miktarının artırılmasının enkapsülasyon etkinliği başta olmak üzere formülasyon parametrelerine etkisini incelemek amacıyla 5 ve 10 mg TMZ içeren (A2-5 ve A2-10) üretilmesine karar verilmiştir. Formülasyon parametreleri Çizelge 3.43'de verilmiştir.

Çizelge 3.42. A kodlu formülasyonların parametre değişiklikleri

Formül kodu	TMZ (mg)	PLGA (mg)	Dış faz	Yağ fazı	Santrifüj parametreleri
A2-2	2	20	% 2 PVA	DMF	26.000 rpm, 1 saat, Sigma 3-30KS
A2-5	5	20	% 2 PVA	DMF	26.000 rpm, 1 saat, Sigma 3-30KS
A2-10	10	20	% 2 PVA	DMF	26.000 rpm, 1 saat, Sigma 3-30KS

Çizelge 3.43'deki değişiklikler uygulanarak üretilen formülasyonların, santrifüjden sonra süpernatandan indirekt yöntem ile elde edilen enkapsülasyon etkinliği değerleri Çizelge 3.44'te verilmiştir.

Çizelge 3.43. Tekrarlanan formülasyonların değişen parametrelere göre enkapsülasyon etkinliği verileri

Formül kodu	TMZ (mg)	PLGA (mg)	Santrifüj parametreleri	%EE
A2-2	2	20	26.000 rpm, 1 saat, Sigma 3-30KS (10 mL tüp)	52,63
A2-5	5	20	26.000 rpm, 1 saat Sigma 3-30KS (10 mL tüp)	60,69
A2-10	10	20	26.000 rpm, 1 saat Sigma 3-30KS (10 mL tüp)	69,67

Teorik etkin madde - % enkapsülasyon etkinliği korelasyonu elde edildiği için A2-2, A2-5, A2-10, A7, A8, A9 formülasyonlarının in vitro karakterizasyon çalışmalarının yapılmasına karar verilmiştir.

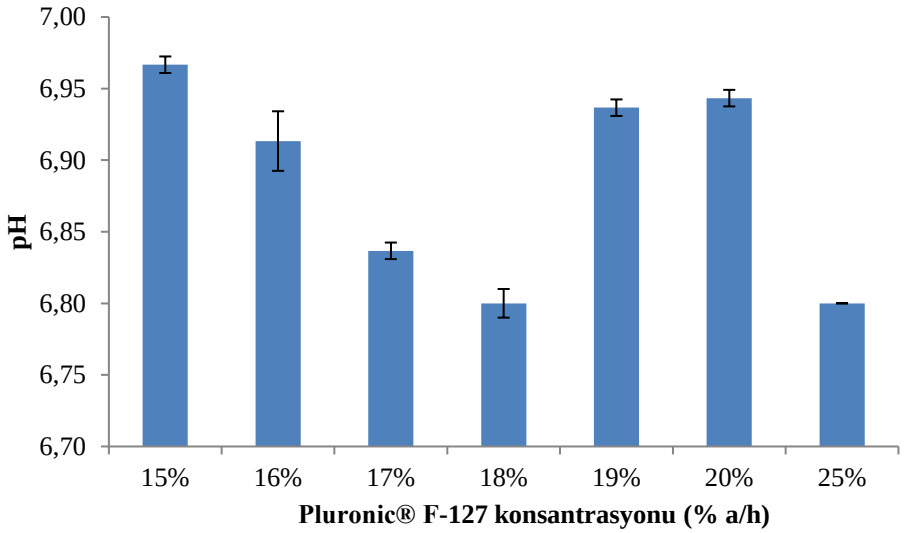
Çizelge 3.44. Karşılaştıma kriterleri ve formülasyon parametrelerine göre partikül özellikleri ve enkapsülasyon etkinliği verileri

Karşılaştırma kriteri	Formülasyon	Parametre	Partikül büyüklüğü (nm)	Polidispersite indeksi (pDI)	Zeta potansiyeli (mV)	% EE
Homojenizasyon	A1	ultrasonik, % 40W, x3 cycle, 60 sn	190,80 ± 2,48	0,21 ± 0,07	-13,90 ± 1,60	62,29
	A2	mekanik, 9400 rpm, 180 sn	169,30 ± 4,05	0,26 ± 0,01	-13,10 ± 0,42	89,24
TMZ miktarı (mg)	A2	2	169,30 ± 4,05	0,26 ± 0,01	-13,10 ± 0,42	52,63
	A2-5	5	235,50 ± 24,96	0,36 ± 0,10	-13,10 ± 1,05	60,69
	A2-10	10	164,40 ± 4,24	0,14 ± 0,05	-4,16 ± 0,34	69,67
	A7	2	478,20 ± 102,80	0,59 ± 0,22	-16,80 ± 0,27	56,53
	A8	5	180,90 ± 3,50	0,16 ± 0,03	-5,21 ± 2,87	72,13
	A9	10	250,20 ± 2,30	0,23 ± 0	-5,59 ± 0,94	75,56
PLGA miktarı (mg)	A9	20	250,20 ± 2,30	0,23 ± 0	-5,59 ± 0,94	75,56
	A10	40	328,30 ± 3,02	0,224 ± 0,01	-7,54 ± 0,14	68,45
Organik faz	A11	DMF	473,20 ± 4,61	0,35 ± 0,02	-4,64 ± 1,10	69,36
	A12	Etil asetat	1025 ± 243,70	0,74 ± 0,11	-3,93 ± 0,25	56,35
	A13	Aseton	372 ± 107,50	0,45 ± 0,06	-9,97 ± 1,79	55,63
PVA konsantrasyonu (%)	A10	% 2	328,30 ± 3,02	0,224 ± 0,01	-7,54 ± 0,14	68,45
	A11	% 5	473,20 ± 4,61	0,35 ± 0,02	-4,64 ± 1,10	69,36

3.6. Pluronic® F-127 ile hazırlanan hidrojel formülasyonlarının in vitro karakterizayon çalışmaları

3.6.1. Üretilen hidrojellerin pH seviyeleri

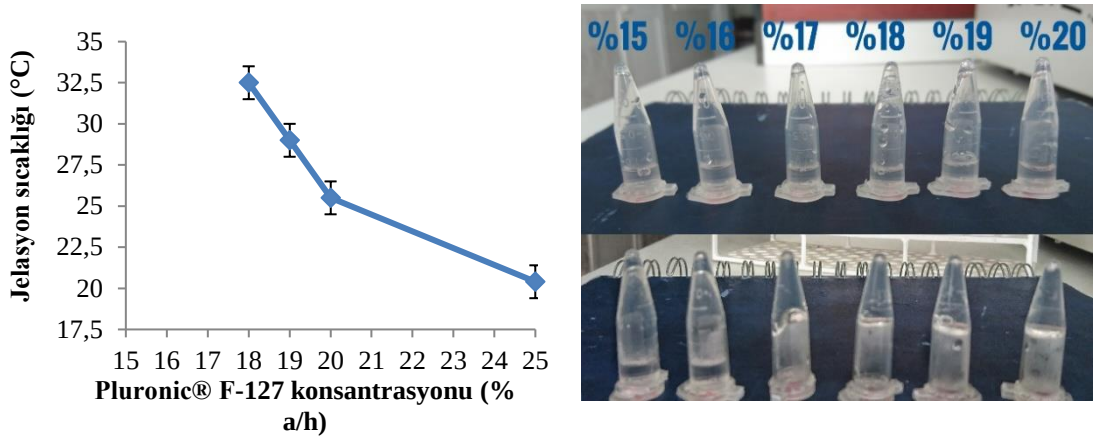
Tüm formülasyonların pH seviyeleri fizyolojik pH aralığında bulunmuştur (Nawaz ve ark., 2013).



Şekil 3.32. Jel formülasyonların pH değerleri

3.6.2. Sol-jel geçiş sıcaklığı

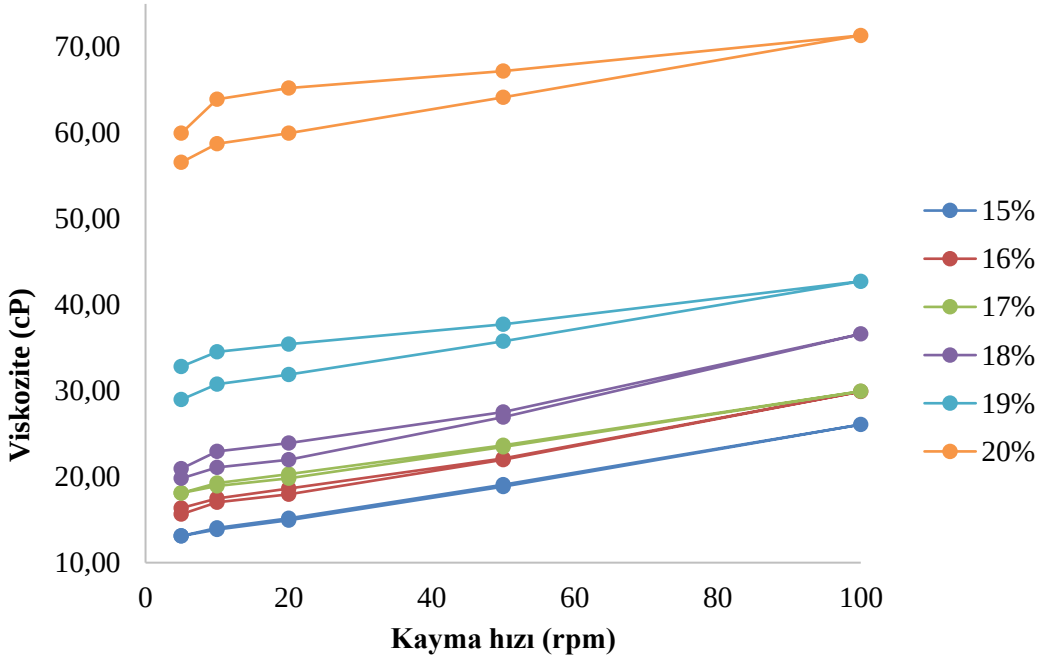
Sol-jel geçiş sıcaklığı, optimum formülasyonun oda sıcaklığında sol halde kalarak akışkanlığını koruması ve in situ doğru sıcaklıkta jelleşerek vücut içinde salım yapacak bir depo oluşturması için tüm formülasyonlar için ölçülmüştür. Amaçlanan sol-jel geçiş sıcaklığını gösteren formülasyon % 18 Pluronic® F-127 içeren hidrojel formülasyonu olmuştur. Sol-jel geçiş sıcaklığı, ters tüp yolu ile de doğrulanmıştır. Sonuçlar Şekil 3.33'te verilmiştir.



Şekil 3.33. Hidrojel formülasyonlarının jelasyon sıcaklıkları ve ters tüp yöntemi

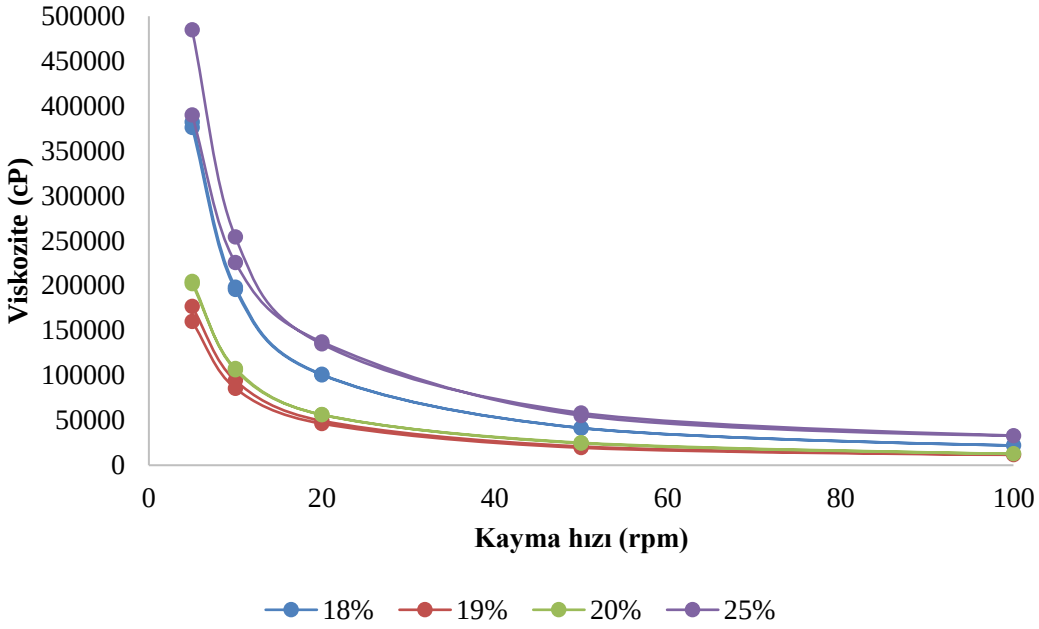
3.6.3. Viskozite

Formülasyonların sol halindeki viskoziteleri Şekil 3.34'te verilmiştir.



Şekil 3.34. Sol halinde kalabilen formülasyonların reogramları

Sol halinde kalabilen tüm formülasyonlar tiksotropik, kayma ile kıvamlanan (shear-thickening) davranış göstermektedir. Pluronic® F-127 konsantrasyonunun artışı ile hem tiksotropide, hem de viskozitede artış gözlenmiştir.

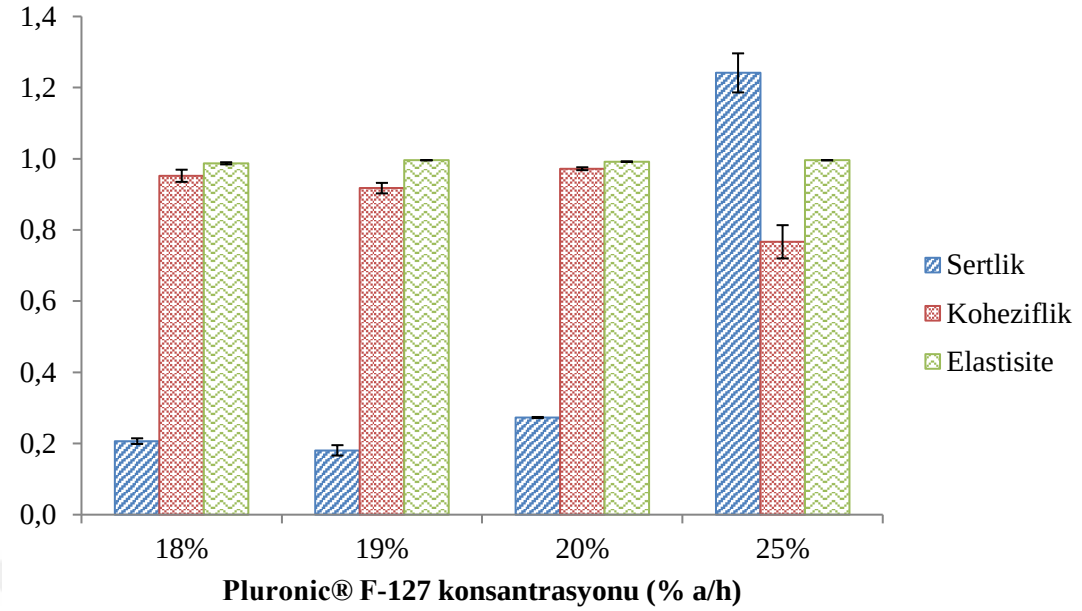


Şekil 3.35. Jel haline geçebilen formülasyonların reogramları

Jel haline geçebilen tüm formülasyonlar tiksotropik, kayma ile incelen (shear-thinning) davranış göstermektedir.

3.6.4. Mekanik özellikler

Tekstür profil analizi sertlik, koheziflik ve elastisite cinsinden mekanik parametreleri tanımlamaktadır. Sertlik parametresi, yarı katı formülasyonları deforme edebilmek için veya istenen bölgeye uygulayabilmek için gerekli olan kuvveti tanımlamaktadır (Baloğlu ve ark., 2010). Formülasyonların kolayca uygulanabilmesi için sertlik değerlerinin düşük olması istenmektedir. Koheziflik, yarı katı formülasyon uygulandıktan sonra eski halini alabilme olarak tanımlanmaktadır. Yüksek değerlerde koheziflik, uygulama sonrası eski halini tümüyle alma anlamına gelmektedir. Elastisite, yarı katı formülasyonun sıkıştırıldığında zamana karşı tekrar eski halini almasıdır (Tuğcu-Demiröz, 2017). Sol-jel geçişi yapabilen formülasyonların ve jel halini koruyabilen % 25 Pluronic® F-127 içeren formülasyonun mekanik özellikleri Şekil 3.36'da verilmiştir.

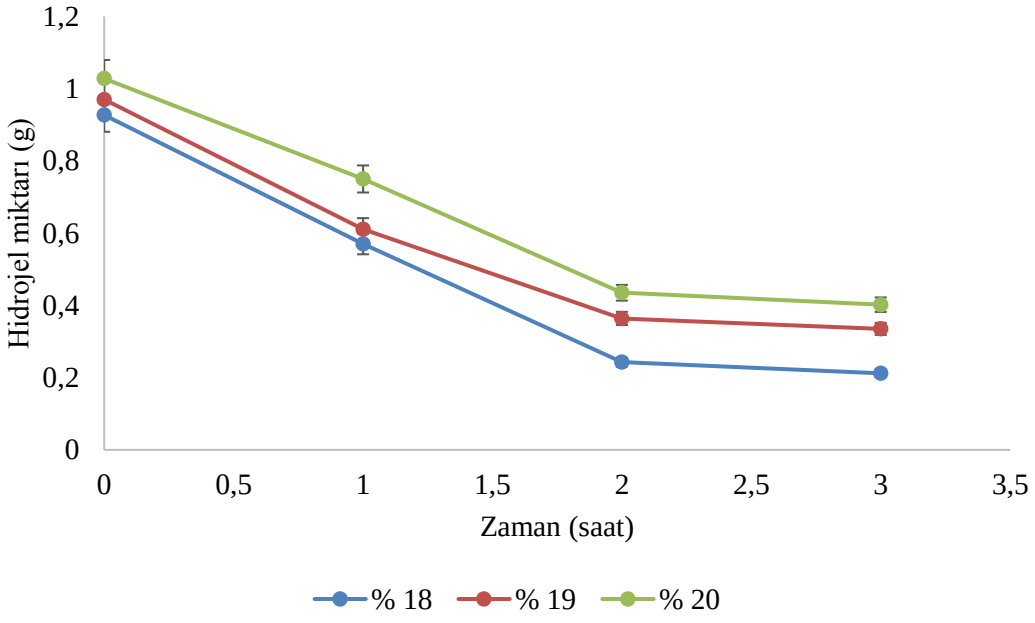


Şekil 3.36. Hidrojel formülasyonların mekanik özelliklerinin karşılaştırılması

3.6.5. Şişme/erozyon çalışmaları bulguları

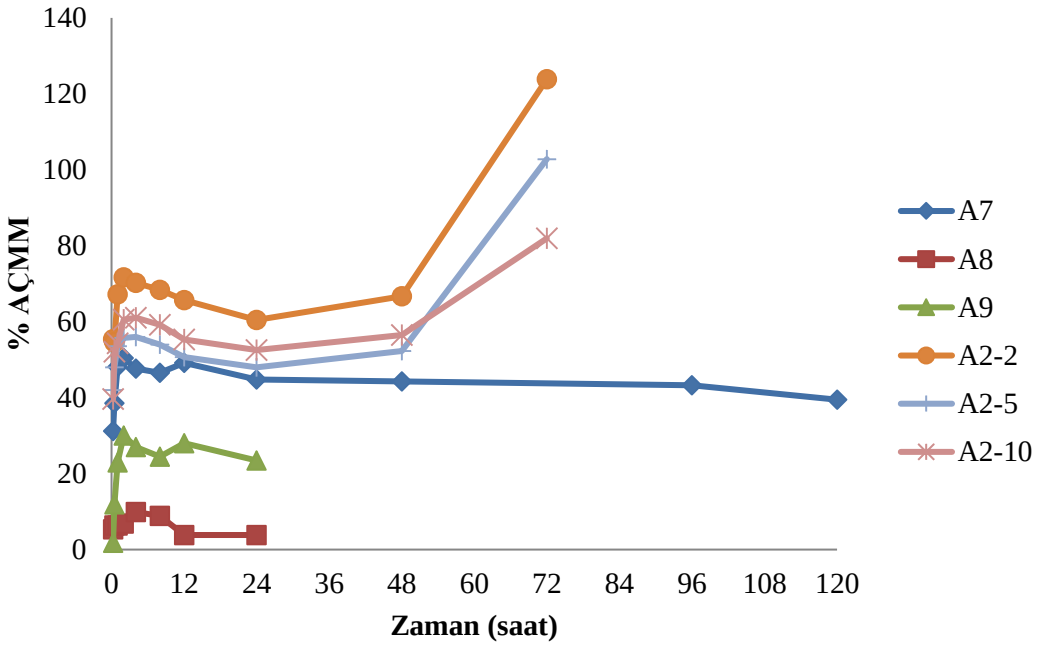
% 18, % 19 ve % 20 Pluronic® F-127 içeren hidrojellerin erozyon çalışması bulguları Şekil 3.37'de verilmiştir.

Şekil 3.37. Hidrojellerin zamana karşı erozyon grafiği



3.7. In vitro etkin madde salım çalışmaları bulguları

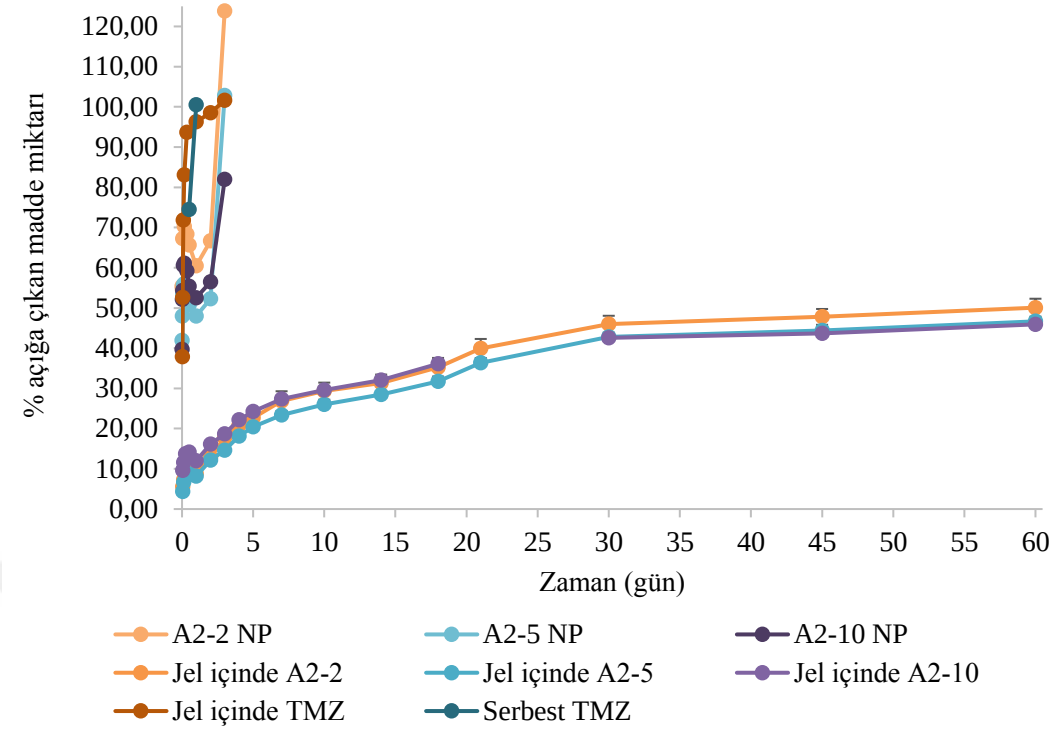
In vitro etkin madde çıkış profillerinin değerlendirilmesi için diyaliz membran yöntemi kullanılmıştır. Beyin tümör mikroçevresinin pH'ını taklit etmek üzere seçilen pH 5 tamponu ortamlarında deneyler yapılmıştır. Belirlenen zaman aralıklarında ortamdan 0,5 mL tampon numunesi alınarak aynı miktarda yeni tampon çözelti ilave edilmiştir, 24 saatten sonra ise etkin maddenin bozunmasını engellemek amaçlı salım ortamı, yeni ortamla değiştirilmiştir. Belirlenen analiz yöntemi ile numunedeki etkin madde miktarı belirlenmiştir.



Şekil 3.38. A kodlu nanopartiküler formülasyonlardan optimum özelliklere sahip formülasyonların pH 5 tamponu içerisinde in vitro salım profilleri

In vitro etkin madde salım çalışması verilerine göre A2-2, A2-5, A2-10 formülasyonları diğer nanopartikül formülasyonlarına göre daha iyi bir etkin madde salımı gösterdiği için, çalışmamızın ikinci aşaması olan hidrojel formülasyonlarının hazırlanması için optimum formülasyonlar olarak seçilmiştir.

Etkin maddenin, nanopartikül yüklü hidrojel, sadece hidrojel ve ortama yüklü olduğu koşullarda in vitro salım çalışması sonucunda, 60 günlük sonuçlar Şekil 3.39'da verilmiştir.



Şekil 3.39. pH 5 tamponu içerisinde tüm formülasyonlardan etkin maddenin in vitro salım profilleri

3.7.1. In vitro etkin madde salım çalışmalarının kinetik hesaplamalarına ait bulgular

2.10. başlığında verilen DDSolver programı ile ile etkin maddenin in vitro salım kinetikleri ve lineer regresyon ile determinasyon katsayıları, hız sabitleri (Korsmeyer-Peppas için n değerleri) ve RMS (residual mean square) değerleri hesaplanmış, elde edilen bulgular Çizelge 3.45'te verilmiştir.

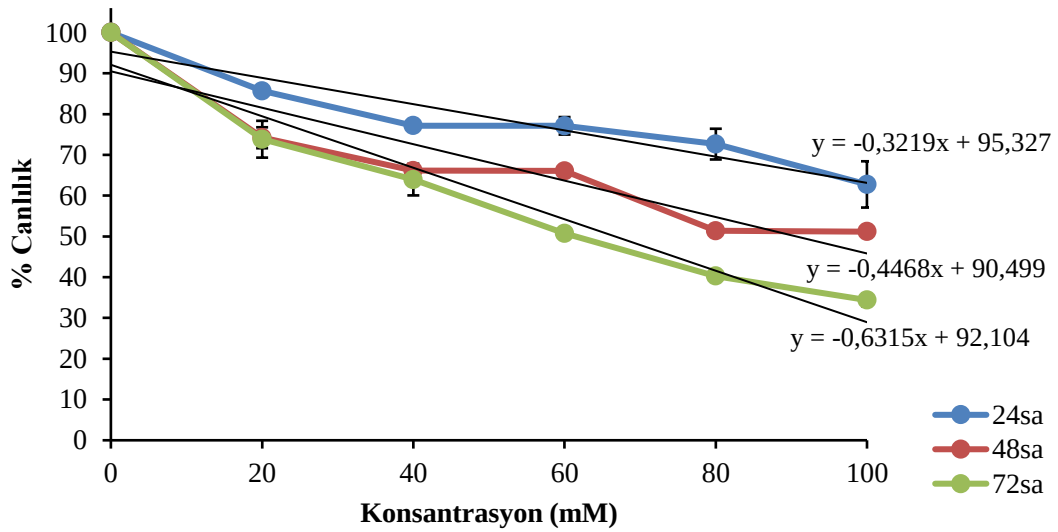
Çizelge 3.45. In vitro etkin madde salımının kinetik modellere uyumunun incelenmesi

		A2-2	A2-5	A2-10	A2-2 jel	A2-5 jel	A2-10 jel
0 Derece	**k_0**	-10,433	-3,004	-0,412	-0,032	-0,030	-0,025
	r^2	0,804	0,580	0,723	0,794	0,816	0,794
	RMS	30,924	20,283	67,400	50,383	39,287	32,877
1. Derece	**k_1**	-0,292	-0,061	-0,013	-0,001	0	0
	r^2	0,844	0,601	0,876	0,853	0,866	0,841
	RMS	0,018	0,008	0,026	0,007	0,005	0,005
$Q \rightarrow t^{1/2}$	**k**	23, 344	8,637	4,122	1,326	1,243	1,042
	r^2	0,871	0,736	0,813	**0,960**	**0,966**	**0,960**
	RMS	20,334	12,714	45,476	9,605	6,666	6,424
Peppas	**n**	0,197	0,105	0,113	0,332	0,341	0,226
	r^2	0,915	0,872	0,904	**0,961**	**0,967**	**0,959**
	RMS	0,001	0,001	0,001	0,004	0,004	0,002
Weibull	**β**	0,339	0,151	0,195	0,375	0,379	0,260
	r^2	**0,931**	**0,881**	**0,952**	0,955	0,961	0,949
	RMS	0,002	0,001	0,002	0,006	0,005	0,004

3.8. Hücre kültürü çalışmaları bulguları

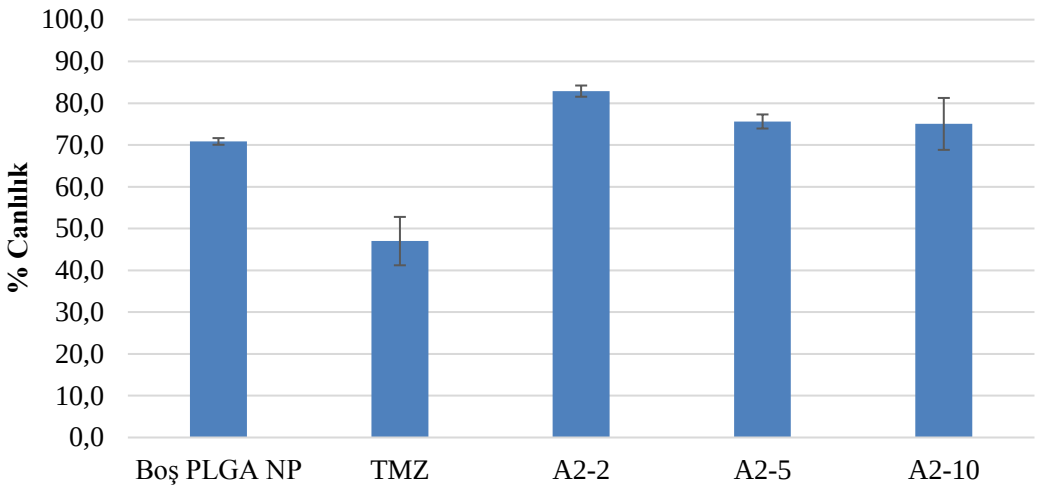
3.8.1. MTT yöntemi ile canlılık analizleri bulguları

Temozolomidin hücre canlılığı üzerine etkileri daha önce belirtilen dozlarda RG2 hücreleri üzerinde denenmiştir. 24, 48 ve 72 saatte alınan sonuçlar % canlılık – konsantrasyon olarak Şekil 3.40'ta verilmiştir.

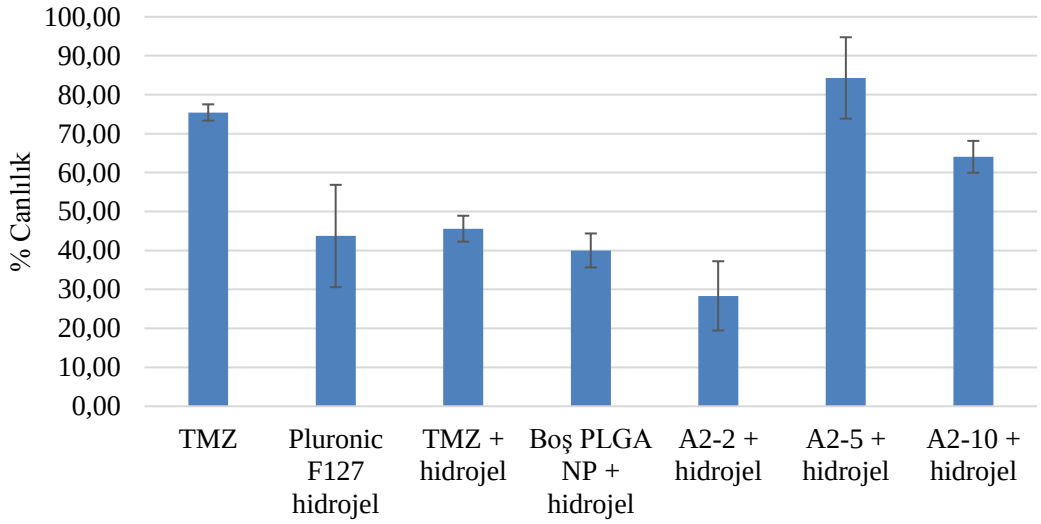


Şekil 3.40. TMZ'nin MTT yöntemi ile canlılık analizleri

Elde edilen verilere göre, etkin maddenin % canlılık değerinin % 50 olduğu konsantrasyon ve zaman olarak, 100 mM ve 72 saat seçilmiştir. Buna göre, optimum olarak seçilen A2-2, A2-5 ve A-10 nanopartikül formülasyonları, boş PLGA nanopartikülleri ve hücre kültürü ortamı DMEM içinde TMZ için yürütülen MTT çalışması sonuçları Şekil 3.41'de; jel içinde A2-2, A2-5 ve A-10 formülasyonları, sadece jel, jel içinde TMZ, jel içinde boş PLGA nanopartikülleri ve hücre kültürü ortamı DMEM içinde TMZ için yapılan MTT çalışmalarının sonuçları ise Şekil 3.42'de verilmiştir.



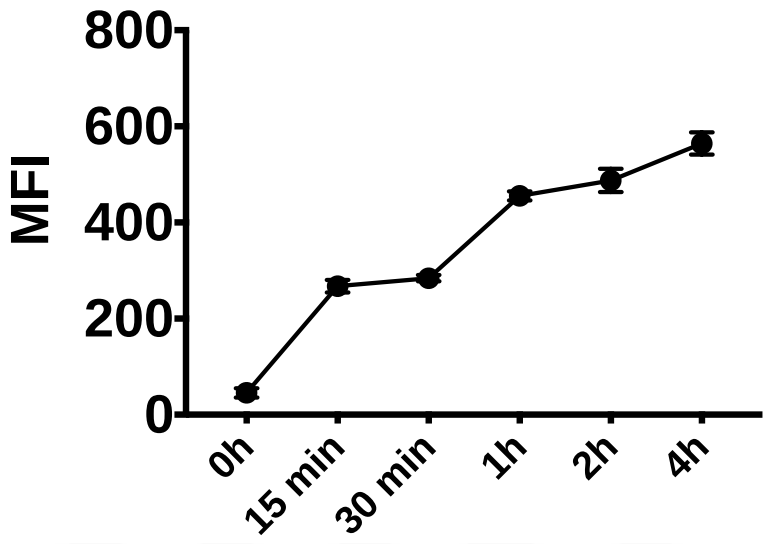
Şekil 3.41. Nanopartiküller için yapılan MTT çalışmaları sonucu canlılık değerleri



Şekil 3.42. Nanopartikül içeren hidrojeller için yapılan MTT çalışmaları sonucu canlılık değerleri

3.8.2. Akım sitometri çalışması bulguları

2.9.3 başlığı altında verilen yöntem ile yapılan akım sitometri çalışmalarının sonuçları ortalama floresan yoğunluğu olarak Şekil 3.43'te verilmiştir.



Şekil 3.43. Nil kırmızısı yüklü PLGA nanopartiküllerinin belirli zaman aralıklarındaki ortalama floresan yoğunluğu

4. TARTIŞMA

4.1. Kullanılan analitik yöntemlere ait bulguların değerlendirilmesi

Temozolomidin UV spektrumu sonucunda bulunan en yüksek absorbans değerini veren dalga boyunun 330 nm civarında olduğu literatürlerle de doğrulanmıştır (Gürten ve ark., 2018).

Etkin maddenin pH 5'in altındaki asidik ortamlarda stabil, ve pH 7'nin üstünde dayanıksız olduğu rapor edilmiştir (AlSwisi ve Ghannam, 2015). Bu nedenle, etkin maddenin stabil olduğu ortamın belirlenmesi amacıyla beş farklı pH seviyesinde kalibrasyon ve validasyon yapılmış ve bunların determinasyon katsayısı (R^2 değeri) ve analitik yöntem validasyon çalışmaları sonucu elde edilen bağıl standart sapma (BSS) değerleri üzerinden stabiliteleri değerlendirilmiştir. ICH kılavuzunda determinasyon katsayısının (R^2 değerinin) 0.995 olması, bağıl standart sapmanın ise % 2'den küçük olması önerilmektedir (Ermer ve Miller, 2006, ICH, 2005)

pH 1.2 tamponunda yapılan analizlerden elde edilen kalibrasyon verilerinde, determinasyon katsayısı (R^2 değerinin) regresyon doğrusunun gözlemlere ne kadar uyduğunu ve determinasyon katsayısının 1'e yakınlığı değişkenler arasındaki ilişkinin ideale yakın olduğunu göstermektedir. TMZ'in koruyucu içermeyen kalibrasyon verilerinde R^2 (pH 1.2 için 0,9999), koruyucu içeren verilere göre 1'e daha yakın çıkmıştır (askorbik asit içeren tampon için 0,9988, sodyum metabisülfit için 0,9984). Ayrıca BSS değerlerine bakıldığında da doğruluk ve kesinlik çalışmasındaki bulguların teşhis ve tayin sınırı bulguları ile uyumluluk göstererek, genel olarak bağıl standart sapmanın en düşük olduğu ortamın pH 1.2 tamponu olduğu ve 1.5 mg sodyum metabisülfit içeren pH 1.2 tamponunda yapılan tüm analizlerde en düşük konsantrasyon olarak belirlenen 1.953 ppm'in verimli şekilde ölçülemediği gözlenmiştir.

TMZ'in çeşitli oranlarda koruyucu içeren pH 4.5 tamponunda kalibrasyon verilerinin R^2 değerleri incelendiğinde, koruyucu etkinliği açısından TMZ:Askorbik Asit (1:1) (R^2 = 0,9987) < TMZ:NaMetabisülfit (1:1) (R^2 = 0,9993) < TMZ:Askorbik Asit (1:1,5) (R^2 = 0,9997) şeklinde sıralandığı görülmektedir. Stok

çözelti içinde askorbik asit miktarı arttığında etkinliğinin arttığı gözlenmiştir. Bağıl standart sapma verileri incelendiğinde etkin maddenin en stabil olduğu ortam, tüm konsantrasyonlarda tüm bağıl standart sapma değerlerinin % 2'nin altında çıkması nedeniyle yine 2.25 mg askorbik asit içeren pH 4.5 tamponu olmuştur. Yapılan çalışmaların tümü, teşhis ve tayin sınırları ile uyumluluk göstermiştir.

% 0,1 askorbik asit içeren pH 5 tamponu üzerinde yapılan analitik yöntemde maddenin stabil olduğu R^2 değeri ile kanıtlanmıştır (R^2 = 0,9999), ve analitik validasyonu çalışmalarında teşhis ve tayin sınırı, doğruluk ve kesinlik analizleri ile uyumluluk göstermiştir. Bağıl standart sapma verilerinin tümü % 2'nin altındadır.

TMZ'in çeşitli oranlarda koruyucu içeren pH 6.8 tamponunda kalibrasyon verilerinin R^2 değerleri incelendiğinde, koruyucu etkinliği açısından TMZ:NaMetabisülfit (1:1) (R^2 = 0,9989) < TMZ:NaMetabisülfit (1:1,5) (R^2 = 0,9996) < TMZ:Askorbik Asit (1:1) (R^2 = 0,9998) < TMZ:Askorbik Asit (1:1,5) (R^2 = 0,9999) şeklinde sıralandığı görülmektedir. Stok çözelti içinde koruyucu miktarı arttığında etkinliğinin arttığı, ve askorbik asidin sodyum metabisülfitten daha etkin bir koruyucu olduğu gözlenmiştir. Doğruluk ve kesinlik analizlerindeki bağıl standart sapma verileri incelendiğinde teşhiş ve tayin sınırlarının yüksekliğinden dolayı en düşük konsantrasyon olan 1,953 ppm, tamponların hiçbirinden verimli bir şekilde ölçülememiştir. Bu nedenle, pH 6.8 fosfat tamponu in vitro çalışmalar için seçilmemiştir.

TMZ'in koruyucu içeren ve içermeyen pH 7.4 tamponunda kalibrasyon verilerinin R^2 değerleri incelendiğinde, koruyucu etkinliği açısından TMZ:Askorbik Asit (1:1) (R^2 = 0,9919) < TMZ (sade pH 7.4) (R^2 = 0,9997) < TMZ:NaMetabisülfit (1:1) (R^2 = 0,9998) şeklinde sıralandığı görülmektedir. Etkin maddenin pH 7.4'te yarı ömrünün 1.8 saat olduğu bilinmektedir (Fang ve ark., 2015), bu nedenle pH 7.4 fosfat tamponu in vitro çalışmalar için seçilmemiştir.

PVA çözeltileri ve DMF ile yapılan çalışmalarda etkin maddenin hem determinasyon katsayıları (R^2_{PVA} = 0,9999 ve R^2_{DMF} = 0,9999) ve bağıl standart sapma değerleri (düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda PVA için % 1; % 4 ve % 8,4; DMF için % 1,5; % 1 ve % 0.23) incelendiğinde etkin maddenin, DMF içinde daha

dayanıklı olduğu görülmüştür. Burada, etkin maddenin bozunma mekanizmasının hidroliz olması ve PVA çözeltisinin distile su ile hazırlanması rol almaktadır.

Seçilen tamponlara uygulanan analitik yöntemler ile elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, tümör mikroçevresinin beyin pH'ından daha asidik olduğu bilindiğinden (AlSwisi ve Ghannam, 2015), in vitro çalışma ortamı olarak pH 5 tamponu seçilmiştir. TMZ'in pH 5 tamponunda 24 saati aşkın süre stabil kaldığı gözlenmiştir. Ayrıca, alkali özellikli tamponlarda koruyucu olarak askorbik asidin, sodyum metabisülfitten daha etkin olduğu gözlendiğinden, etkin maddenin yarılanma süresini uzatmak amacı ile askorbik asit seçilmiştir.

4.2. Formülasyonların üretimine ve in vitro karakterizasyon çalışmalarına ait bulguların değerlendirilmesi

4.2.1. Formülasyon parametrelerinin partikül özelliklerine etkisinin değerlendirilmesi

Formülasyonlar homojenizasyon, TMZ miktarı, PLGA miktarı, organik faz ve PVA konsantrasyonu parametrelerinin partikül özellikleri üzerine etkisi incelenerek değerlendirilmişlerdir. Karşılaştırmalı sonuçlar Çizelge 3.42'de yer almaktadır.

Partikül boyutu biyouyumluluk ve stabilitenin sağlanmasında en önemli parametrelerden biridir (Sun ve ark., 2015). Beyinde kan beyin bariyerini geçecek ve tümör bölgesine ulaşacak, lokal uygulama amaçlı tasarlanan bir nano taşıyıcı sistem için 10-200 nm boyutta nanopartiküller uygun bulunmaktadır. Çünkü 10 nm'den küçük nanopartiküller renal yoldan atılmakta ve 300 nm'den büyük nanopartiküller RES tarafından vücuttan uzaklaştırılmaktadır (Lu ve ark., 2019).

Polidispersite indeksi (pDI) partikül boyutu dağılımını ifade ettiği için önemli bir parametredir (Derman, 2015).

- 0,03-0,06 arası monodispers
- 0,1- 0,2 dar dağılımlı
- 0,25- 0,5 geniş dağılımlı

- 0,5'den büyük pDI ise pDI kavramından uzak derecede geniş olarak tanımlanmıştır (Dangi ve Shakya, 2013).

Polimerik nanopartiküllerin pDI değerinin 0,3'den küçük olması istenmektedir. Çalışmamızda elde edilen pDI verilerine göre (Çizelge 3.42), 15 formülasyondan 10'unun pDI değerinin kabul edilebilir aralıkta olduğu görülmektedir.

Zeta potansiyeli yüzey yükünün ölçüsünü veren, nanopartiküllerin stabilitesini belirleyen bir parametredir. Zeta potansiyeli değerleri negatif ya da pozitif olsun, stabiliteyi korumak ve dispers sistemlerin agregasyonunu önlemek için uygun derecede yüksek olmalıdır. (Sahana ve ark., 2008). Aşırı negatif veya pozitif zeta potansiyeli nanopartiküller arasındaki çekim kuvvetini yenecek kadar itme kuvveti oluşturarak aglomerasyona ve stabilitenin bozulmasına neden olabilir (Derman, 2015).

A2, A2-5, A-10 ve A7, A8, A9 TMZ miktarının partikül özelliklerine etkisini görmek için seçilmiştir. Çizelge 3.42'ye bakıldığında etkin maddenin PLGA nanopartiküllerin uç karboksil gruplarına adsorbe olduğu formülasyonlarda partikül büyüklüğü ve pDI'nın arttığı, zeta potansiyelinin ise azaldığı görülmüştür. Bunun sebebinin, uç karboksil gruplarının nanopartiküllerin yüzeyinde yer almasıdır (Lu ve ark., 2019). Ayrıca bu olay daha fazla etkin maddenin daha viskoz bir yağ fazına neden olup fazların fazların birbiri içine dağılmasını zorlaştırarak daha büyük partiküllerin üretilmesiyle açıklanabilmektedir (Mainardes ve Evangelista, 2005). Bundan dolayı A2-5, A7 ve A9 formülasyonlarında TMZ'nin nanopartikül yüzeyine adsorbe olduğu söylenebilir.

A9 ve A10 PLGA miktarının partikül özelliklerine etkisi olup olmadığını saptamak için seçilmiştir. Polimer konsantrasyonunun yükselmesiyle partikül büyüklüğünün ve zeta potansiyelinin artmış olması literatürlerle de doğrulanmıştır (Derman, 2015, Huang ve Zhang, 2018). pDI verilerinden de görüldüğü gibi, zeta potansiyelin artması daha dar partikül boyutu dağılımı olan stabil nanopartiküllerin oluşmasına neden olmuştur (Sun ve ark., 2015).

A10 ve A11 PVA konsantrasyonunun partikül özellikleri üzerine etkisini görmek için seçilmiştir. Bizim çalıştığımız konsantrasyon aralığında (% 2 ve % 5) partikül büyüklüğü ve pDI'nın PVA konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak arttığı

görülmektedir. Artan PVA konsantrasyonunun stabilizer fazda viskoziteyi arttırdığı, artan viskozitenin kayma gerilimini azaltmakta ve damlacıkların daha az parçalanmasına neden olmaktadır (Budhian ve ark., 2007).

A11, A12 ve A13, organik çözücü seçiminin partikül özelliklerine etkisini incelemek için seçilmiştir. Partikül büyüklüğünün viskozite ve geçimliliğe bağlı olduğu gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada yüksek geçimlilik ve viskozitenin oluşturulan birincil emülsiyonun stabil olmaması nedeniyle nanopartikül oluşturmakta başarılı olunamadığı rapor edilmiştir. DMF, etil asetat ve asetonun viskozite değerleri (cP) sıra ile 0,802, 0,46, 0,32 ve suda çözünürlük verileri dağılabilir, 10:1 ve dağılabilir olarak literatürlerden doğrulanmıştır (Sahana ve ark., 2008). Bizim çalışmamızda DMF, en yüksek viskozite ve geçimlilik değerlerine sahip olmasına rağmen en stabil ve dar boyut dağılımlı nanopartiküllerin üretilmesini sağlamıştır.

4.2.2. Nanopartikül formülasyonlarının transmisyon elektron mikroskopi (TEM) görüntülerine ait bulguların değerlendirilmesi

Şekil 3.17-31'de yer alan TEM görüntüleri partikül boyutlarının zetasizer analizleri ile tutarlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca A10-A13 formülasyonlarının etkin maddeyi, analiz için kullanılan su ortamına salım yaptığı gözlenmiştir. A12 ve A13 hariç yani organik faz olarak DMF içeren tüm formülasyonların küresel olduğu ve partikül boyutunun analizlerle tutarlı olduğu gözlenmiştir.

Ultrasonik homojenizasyon ile üretilen A1'in partikül özelliklerinin, Zetasizer verilerine uygun olmadığı ve küresel yapıda olmadığı görülmüştür. Bunun, homojenizasyon hızındaki artışın, nanopartkülleri parçalamasından dolayı olduğu düşünülmüştür (Masilamani ve Ravichandiran, 2012).

4.2.3. DSC analizi sonuçlarının değerlendirilmesi

Kalorimetri, kimyasal reaksiyonlar, faz geçişleri ve diğer fiziksel değişikliklerden dolayı malzemedeki termodinamik değişikliklerin ölçümü için kullanılan genel bir terimdir. Materyalin erime, kristalleşme ve cam geçişleri gibi fiziksel değişikliklerinin tümü DSC kullanılarak gözlemlenebilmektedir (Mansfield, 2015).

Şekil 3.16'da yer alan TMZ (Gürten ve ark., 2018), PLGA (Varshosaz ve ark., 2017) DSC grafikleri ve PVA'nın erime noktası literatürler ile doğrulanmıştır. Formülasyon grafiklerinde PLGA'nın camsı geçiş sıcaklığının arttığı ve 210°C civarında TMZ pikinin olmadığı görülmüştür, bu da etkin maddenin nanopartiküller içine başarıyla yüklenebildiği anlamına gelmektedir. Fiziksel karışım grafiklerinin hepsinde PLGA'nın camsı geçiş sıcaklık piki sadece A2-10 karışımında gözlenmiştir. Bunun, diğer iki karışımda yetersiz miktar TMZ bulundurduğundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.2.4. FTIR analizi sonuçlarının değerlendirilmesi

FTIR analizi etkin madde-polimer arası etkileşimlerin belirlenmesinde ve incelenmesinde kullanılmaktadır. Analiz ile elde edilen piklerin şekli, yeri ve şiddetinin değerlendirilmesiyle, oluşan yapıların özellikleri saptanabilmektedir (Da Silva Júnior ve ark., 2017).

Şekil 3.8 ve Çizelge 3.41'de görüldüğü gibi TMZ'in IR spektrumu literatürlerle uyumluluk göstermiştir (Daniel ve Dhas, 2016, Łaszcz ve ark., 2013, Tian ve ark., 2011). Çizelge 3.42'de görüldüğü gibi PLGA'nın IR spektrumu literatürlerle uyumluluk göstermiştir (Portaccio ve ark., 2014).

Tüm formüllerin 3500-3000 cm^{-1} aralığında, nanopartiküllere yüklü TMZ'in sekonder amidden gelen NH pikinin ve metil grubundan gelen asimetrik gerilmenin, yüklenmiş miktarla orantılı olarak artarak pik verdiği düşünülmektedir. Ayrıca, 1500-1000 cm^{-1} aralığında TMZ ve PLGA titreşimlerinin birleşimine denk düşen bir spektrum görülmektedir. Tüm fiziksel karışımlarda ise PLGA'dan gelen 3000-2950

aralığındaki asimetrik gerilme ve 1750 cm^{-1} civarındaki C=O piki görülmektedir. Fakat TMZ'in karakteristik piklerine rastlanmamıştır, bu da verilen fiziksel karışımlardaki TMZ miktarının FTIR analizi için yetersiz kaldığını düşündürmektedir.

4.2.5. Formülasyon parametrelerinin enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisinin değerlendirilmesi

F kodlu formülasyonlar için ilk olarak ultrasonik homojenizasyon parametrelerinin, organik faz türünün, stabilizer fazı miktarının, ve stabilizer faz içinde tuz varlığının enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi incelenmiştir. Çizelge 3.34'te görüldüğü üzere ilk olarak ultrasonik homojenizasyon parametreleri değiştirildiğinde, ultrasonikasyon süresinin kısalması ile enkapsülasyon etkinliği artmaktadır. Ultrasonik homojenizatörün sonikasyon süresindeki azalmaya rağmen, parçalama hızındaki artıştan dolayı enkapsülasyon etkinliğini düşürdüğü rapor edilmiştir (Mainardes ve Evangelista 2005, Masilamani ve Ravichandiran, 2012).

Stabilizer faza NaCl ilavesi ve fazın hacminin artırılmasının, enkapsülasyon etkinliğini azalttığı görülmektedir. Stabilizer fazın, organik çözücü için yüksek konsantrasyonlu bir gradyan oluşturmasının ve tuz varlığının nanopartiküllerin hızlı bir şekilde katılaşıp oluşmasına neden olduğu düşünülmektedir. Bu durum da nanopartiküllerin içine etkin maddenin hapsolamayışına neden olmaktadır (Dhakar ve ark., 2010).

F kodlu formülasyonlarda organik fazın etkinliğini incelemek için DMF, DCM ve etil asetat kullanılmıştır. Enkapsülasyon etkinliği DMF > DCM > Etil asetat sıralamasına göre artış göstermektedir. Bunun, kullanılan organik fazın hızlıca buharlaşması ile etkin maddenin kullanılan dış stabilizer faza geçmesi ile olduğu düşünülmektedir (Xu, 2016, Yeo ve Park, 2004).

A kodlu formülasyonların üretim aşamasında homojenizasyon parametrelerinin, eklenen TMZ miktarının, eklenen PLGA miktarının, organik fazın ve PVA konsantrasyonunun enkapsülasyon etkinliği üzerine etkileri araştırılmıştır. Optimum formülasyon seçimi, en yüksek enkapsülasyon etkinliği, dar partikül boyutu aralığı,

küresel yapı ve yüksek zeta potansiyeli aranarak seçilmiştir. Karşılaştırmalı sonuçlar Çizelge 3.42'de verilmiştir.

Polimerik nanopartiküller "bottom up" veya "top down" yaklaşımları ile üretilebilmektedir. "Bottom up" yaklaşımında nanopartiküller, nanopartikül çekirdeğine polimerlerin agregasyonu ile üretilmektedirler. "Top down" yaklaşımında ise, karmaşık polimer yapılarını nanoemülsiyona dönüştürmek için dış bir enerji kaynağı gerekmektedir (Madani ve ark., 2018). Nano büyüklükte partikül elde etmek için, homojenizasyon ile dış enerjiyi sisteme vermek, üretim sürecinde önemli bir basamaktır (Mainardes ve Evangelista, 2005).

Karakterizasyonun ilk basamağında homojenizasyon parametrelerinin nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliğine olan etkisi araştırılmıştır. A1 ve A2 formülasyonları sadece homojenizatör parametreleri farklı tutularak üretilmiştir. Nanopartikül emülsiyonu hazırlanırken kullanılan homojenizatörün mekanik homojenizatör olmasının enkapsülasyon etkinliğini yükselttiği gözlemlenmiştir (Mainardes ve Evangelista 2005, Masilamani ve Ravichandiran, 2012).

A2, A2-5, A2-10 ve A7, A8, A9 grupları ayrı ayrı, TMZ miktarının enkapsülasyon etkinliği üzerine etkilerini incelemek üzere üretilmiştir. Tüm formülasyonlarda etkin madde miktarının artışının, enkapsülasyon etkinliğini artırdığı gözlemlenmiştir (Derman, 2015). Bu durum, organik faz içindeki etkin madde konsantrasyonunun artması ile, daha fazla miktarda etkin maddenin nanopartiküller içerisine hapsolması ile açıklanmaktadır (Mehrotra ve Pandit, 2015).

A9 ve A10 formülasyonları, eklenen PLGA miktarının enkapsülasyon etkinliğine olan etkisini incelemek için üretilmiştir. PLGA konsantrasyonunun artışının (yani PLGA miktarının artışının), A9 % 75 ve A10 % 68 olmak üzere enkapsülasyon etkinliğini düşürdüğü gözlemlenmiştir. Yüksek polimer konsantrasyonları ile üretilen formülasyonların daha büyük damlacıklara sahip emülsiyonlara, bu özellikte emülsiyonların da difüzyon esnasında daha büyük boyutlu ve daha az sayıda nanopartiküllere neden olduğu söylenmektedir. Bu nedenle enkapsülasyon etkinliğinin azaldığı, literatürler ile de doğrulanmıştır (Bilati ve ark., 2005). Fakat, bazı çalışmalarda enkapsülasyon etkinliğindeki artışın PLGA

konsantrasyonunun, dolayısıyla viskozitenin artışından dolayı olduğu düşünülmektedir. Viskozite artışının, etkin maddenin stabilizer faza geçmesini engelleyeceği ve bu yolla etkin maddenin enkapsülasyon etkinliğinin artacağı savunulmuştur (Mehrotra ve Pandit, 2015).

A11, A12 ve A13 formülasyonları, etkin maddeyi ve polimeri çözmek için kullanılan organik çözücünün enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi olup olmadığını anlamak için DMF, etil asetat ve aseton ile üretilmiştir. Organik çözücülerin su içinde dağılma özellikleri DMF, etil asetat ve aseton için dağılabilir, 10:1 ve dağılabilir olarak literatürde verilmiştir (Sahana ve ark., 2008). Organik çözücünün suda çözünürlüğünün artmasının, enkapsülasyon etkinliğini düşürdüğü rapor edilmiştir. Enkapsülasyon etkinliği etil asetat ile üretilen A12 ve aseton ile üretilen A13 için % 55 ve % 56 olarak, DMF ile üretilen A11 için ise % 69 olarak tespit edilmiştir. F kodlu formülasyonlarda da belirtildiği üzere, kullanılan organik fazın buharlaşma hızı, etkin maddenin stabilizer faza geçişini artırmaktadır. Bu nedenle, suda çözünürlüğü az olan, veya hiç çözünmeyen bir organik çözücünün kullanılması uygun olacaktır.

A10 ve A11 formülasyonları, PVA konsantrasyonunun enkapsülasyon etkinliğine etkisini görmek için üretilmiştir. A10 (% 2) ve A11 (% 5) formülasyonlarının enkapsülasyon etkinlikleri sıra ile % 68 ve % 69 bulunmuştur. Bizim elde ettiğimiz sonuçlar, literatür ile karşılaştırıldığında dar bir aralıkta kalmaktadır, fakat daha düşük PVA konsantrasyonlarının enkapsülasyon etkinliğini artırdığı rapor edilmiştir (Derman, 2015).

4.3. Pluronic® F-127 içeren hidrojellerin in vitro karakterizasyon çalışmaları

% 15 - % 17 Pluronic® F-127 içeren, sol-jel geçişi göstermeyen formülasyonlar ve % 25 Pluronic® F-127 içeren, sadece jel halinde bulunan formülasyon için pH seviyesi ile Pluronic® F-127 konsantrasyonu arasında korelasyon gözlenememiştir. Fakat, sol jel geçişi yapabilen % 18, % 19 ve % 20 Pluronic® F-127 içeren formülasyonlarda, artan konsantrasyon ile pH seviyesinin arttığı görülmüştür (Małolepsza-Jarmołowska, 2010). Yapılan istatistiksel hesaplamalara göre pH seviyeleri arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($P < 0.0001$), fakat tümör

mikroçevresinin pH seviyesine yakın olduğu için (Sutradhar ve Amin, 2014), elde edilen pH seviyesi tümör bölgesine lokal ilaç uygulaması için uygundur.

Sol-jel geçiş sıcaklığının önemi, formülasyonun oda sıcaklığında akışkan sol halinde kalarak ambalaj veya enjektörden çıkması ve in situ jel haline dönüşerek şeklini korumasıdır. Formülasyon içerisindeki Pluronic® F-127 konsantrasyonunun artışı ile jelasyon sıcaklığının düştüğü gözlenmiş, literatürlerle de bu doğrulanmıştır (Geng ve ark., 2011).

Şekil 3.33'e bakıldığında, oda sıcaklığında formülasyonların sol halinde tüplerin dibinde oldukları görülmektedir (25°C). Jeller düz çevrilip inkübe edildikten sonra (37°C) çevrildiklerinde, % 18 ve üstündeki konsantrasyonların akmayan jel halinde olduğu görülmektedir. % 17 Pluronic® F-127 içeren formülasyon sol haline geri döndüğü, ve % 15 ile % 16 Pluronic® F-127 içeren formülasyonların sol halinde kaldıkları görülmüştür. Bu veriler viskozite ve TPA analizi verileriyle tutarlıdır.

Mekanik özellikler (sertlik, koheziflik, elastisite), viskozite ile birlikte değerlendirilmektedir. Buna göre, viskozitenin artışıyla sertliğin arttığı, koheziflik ve elastisitenin ise azaldığı görülmektedir.

Şişme/erozyon çalışmaları sonucunda hidrojel formülasyonların, şişme özelliğinden çok erozyon özelliği ortaya çıkarılmış olup, Şekil 3.37'de verilen grafiğe göre Pluronic® F-127 konsantrasyonunun ve dolayısıyla viskozitenin yükseldikçe bozunma miktarının azaldığı, yani jelin dayanıklılığının arttığı gözlenmiştir (Lee ve ark. 2010).

4.4. In vitro etkin madde salım çalışmalarına ait bulguların değerlendirilmesi

Şekil 3.38'de görüldüğü üzere, A2-2, A2-5, A2-10, A7, A8 ve A9 formülasyonlarının salım profili incelendiğinde, A7, A8 ve A9 formülasyonları bifazik, A2-2, A2-5, ve A2-10 formülasyonları trifazik profil göstermiştir. Tüm formülasyonlarda ilk 4 saat içerisinde ani salım (burst effect), takip eden 72 saatte ise platoya ulaşım gözlenmektedir. Formülasyonlardan açığa çıkan etkin madde yüzdesinin farkının nedeninin, etkin maddenin enkapsülasyon oranı yükseldikçe birim

zamanda açığa çıkan etkin madde yüzdesinin azalması ile orantılı olması olarak düşünülmektedir (Averineni ve ark., 2012). Açığa çıkan etkin madde yüzdesinin en yüksek olduğu A2-2, A2-5, ve A2-10 formülasyonları, hidrojel içinde hazırlanmak üzere optimum formüasyonlar olarak seçilmiştir.

Şekil 3.39'da verildiği üzere, hidrojel içinde nanopartikül ve hidrojel içinde etkin madde in vitro salım çalışmaları sonucunda, etkin maddenin yaklaşık % 50'sinin hidrojel formülasyonlarının tümünden salımının 60 günü bulduğu görülmektedir. A2-2, A2-5, ve A2-10 formülasyonları yüklenmiş hidrojel sistemlerinden açığa çıkan etkin madde yüzdesinin, nanopartikül formülasyonlarından in vitro salım profili ile eşleştiği gözlenmiştir. Etkin maddenin hidrojel içinde nanopartikül sisteminden in vitro salım profili ilk 12 saatte ortalama % 10 ani salım gösterirken, sonraki 60 günde platoya ulaşmaktadır. Etkin maddenin hidrojel+etkin madde karışımından in vitro salım profili ilk 8 saatte % 93 ani salım göstermekte ve sonraki 3 günde platoya ulaşmaktadır. Etkin maddenin hidrojel içinde nanopartikül sisteminden salım profili, uzun sürede düşük dozla etkinlik göstermesine olanak sağlayacaktır.

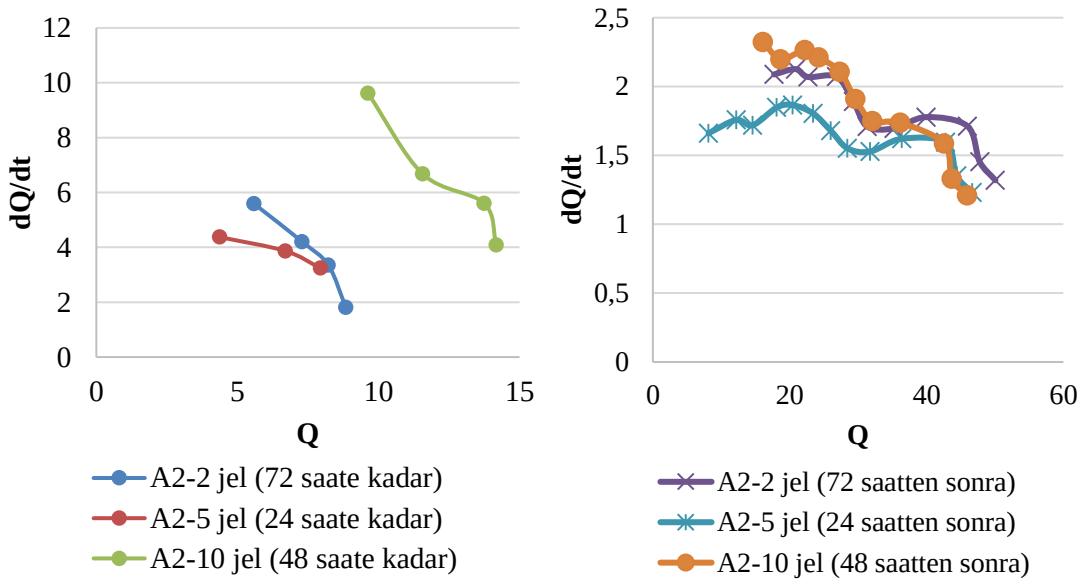
Hidrojeller üzerinde yapılan in vitro salım çalışmalarında hidrojel içinde nanopartikül formülasyonlarının hidrojel içinde etkin madde koşulundan farkı, etkin maddenin bozunma kinetiklerinde gözlenmiştir. Etkin maddenin yarı ömrünün, hidrojel içinde nanopartikül formülasyonlarından salımı esnasında 1.8 saatten 18 saate çıktığı görülmüştür. Bu da, etkin maddenin ön-ilaç formunun KBB'nden geçmesini ve beyinde aktif metabolite dönüşüp etki etmesine olanak tanıyacaktır.

4.4.1. In vitro etkin madde salım çalışmalarının kinetik hesaplamalarına ait bulguların değerlendirilmesi

Çizelge 3.45'te görüldüğü üzere, etkin maddenin in vitro salım kinetikleri A2-2, A2-5, ve A2-10 formülasyonlarında Weibull kinetik modeli ile uyumluluk göstermektedir. Hesaplanan β değerlerinin tümünün 1'den küçük olması, etkin madde salım hızının en başta daha hızlı gerçekleştiği, sonrasında 1. derece kinetik profiline benzediği ve platoya ulaştığı bir kinetik profiline işaret etmektedir (Comoglu ve ark. 2008).

Etkin maddenin açığa çıkışının difüzyonla ve/veya polimerik sistemde olan gevşeme ile meydana gelmesi Korsmeyer-Peppas kinetiği ile açıklanmaktadır. Hidrojel içinde A2-2, A2-5 ve A-10 formülasyonlarından yapılan hesaplama ile elde edilen R^2 değerlerine göre etkin maddenin açığa çıkış kinetiği Korsmeyer-Peppas kinetiğine uyumluluk göstermektedir. Bu bulgu, Pluronic® F-127 hidrojelinin su alarak şiştiği ve etkin maddenin hidrojel sistemi içerisinde difüze olarak açığa çıktığı olgusunu doğrulamaktadır (Ramos ve ark., 2019). Hesaplanan n değerlerinin 0,45'ten küçük oluşu ise Fickian difüzyon profiline işaret etmektedir (Dwivedi ve ark. 2017).

Formülasyonlarda aynı anda Higuchi ve 1. derece kinetik modeline uyumluluk görüldüğünden, hangisine uyum olduğunun belirlenmesi için açığa çıkan etkin madde miktarına (Q) karşı belli bir zaman aralığında açığa çıkan etkin madde miktarı (dQ/dt) grafiği çizilmektedir. Bifazik özellik gösteren grafikler için iki faz da, profilin tamamı da grafiğe uygulanmıştır ve üç grafikte de dQ/dt ve Q değerlerinin ters orantı gösterdiği görülmüştür. Bu da, salımın Higuchi kinetiğine uygun olduğunu göstermektedir (Serim, 2011).



Şekil 4.1. Hidrojel içinde nanopartikül formülasyonlarının dQ/dt – Q grafikleri

4.5. Sterilizasyon yöntemlerinin değerlendirilmesi

Yapılan bir çalışmada, 5-florourasil yüklü PLGA nanopartiküllerin farklı gama radyasyon seviyelerinde sterilize edilerek etkin madde salım profilleri incelenmiştir. Gama sterilizasyon sırasında, polimer zincir kırılması meydana gelmektedir. Bu olay, polimer zincirinin dolaşma derecesinin azalmasına ve makromoleküllerin hareketliliğinin artmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak, difüzyon için mevcut serbest hacim ve dolayısıyla bir ilaç molekülünün bir boşluktan diğerine atlayabilme olasılığı artmaktadır. Dolayısıyla, açığa çıkan madde miktarının artmakta olduğu görülmüştür (Faisant ve ark. 2002).

Yapılan başka bir çalışmada, siprofloksasin yüklü %10,15 ve 25 (a/h) Pluronic® F-127 içeren hidrojelleri üretilmiştir. Sonuç olarak, oftalmik siprofloksasin içeren hidrojellerin gama sterilizasyonu sonucunda jel viskozitesinin arttığı ve dolayısıyla birim zamanda açığa çıkan madde miktarının azaldığı gözlenmiştir. Hidrojellerin sterilizasyonunda gama ışınımının kullanılması, ışınlamanın özellikle yüksek ışınlama dozlarında hidrojellerin hem fiziksel hem de kimyasal özelliklerini etkilemesi nedeniyle kontrollü şartlar altında olması gerektiğini rapor etmişlerdir (El-Bagory ve ark. 2010). Bu nedenle gama sterilizasyonun, bizim ürettiğimiz nanopartiküllerin ve nanopartikül yüklü hidrojellerin sterilizasyonunda kullanılmasının uygun olmadığına karar verilmiştir.

UV ile sterilize edilmiş PLGA mikroküreleri, sterilize edilmemiş PLGA mikroküreleri ile karşılaştırıldığında mikroküre yüzeyinin zarar gördüğü SEM görüntüleri ile tespit edilmiştir. UV sterilizasyonundan sonra aktif madde salım oranının önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. UV işleminden sonra etkin madde salım hızındaki bu azalma, UV sterilizasyonundan sonra PLGA mikro küreciklerinin bozucu yüzey yapılarının SEM gözlemiyle desteklendiği rapor edilmiştir (Moioli ve ark. 2006). Bu nedenle, bizim çalışmamızda üretilen PLGA nanopartiküllerin UV sterilizasyon ile sterilize edilmesinin uygun olmayacağına karar verilmiştir.

Bu nedenle, üretilen tüm formülasyonlarda işlem kolaylığı dolayısıyla filtrasyonla sterilizasyon işlemi seçilmiştir.

4.6. Hücre kültürü çalışmalarına ait bulguların değerlendirilmesi

Hücre kültürü çalışmalarında ilk önce MTT ile canlılık analizi yapılmıştır. Şekil 3.38'de görüldüğü şekilde, etkin maddenin % canlılık verileri incelendiğinde, 72 saat içinde 100 mM (0,2 mg/mL'ye denk gelmektedir) konsantrasyonunda hücrelerin sadece % 50'sinin canlılığını koruduğu gözlenmiştir. Bu bilgi literatür ile de onaylanmıştır (Lee, 2016). Bununla birlikte, kontrol grubu canlılığını korumuştur.

IC50 değerinin 100 mM ve inkübasyon süresinin 72 saat olarak belirlenmesinin ardından, optimum olarak belirlenen formülasyonlar A2-2, A2-5, A2-10, boş PLGA nanopartiküller ve TMZ çözeltisi hücrelere 72 saat boyunca uygulanmıştır. Şekil 3.40'ta görüldüğü üzere, etkin maddenin uygulanan konsantrasyonda etkin madde ile yapılan MTT çalışması verileri doğrulanmıştır. Fakat, nanopartikül formülasyonlarında % canlılık verilerinde korelasyon gözlenememiştir. Bunun, etkin maddenin inkübasyon esnasında nanopartikül içinden yeterli miktarda salınmamasından veya hücre kültürü ortamı olan DMEM'de aktif metabolitine dönüşerek hücre içine girmeden etkisinin kaybolmasından ötürü olabileceği düşünülmektedir. Boş PLGA nanopartiküllerinde canlılığın, TMZ yüklü nanopartikül formülasyonlardan daha düşük olmasının sebebinin ise, konsantrasyonu sağlayacak polimer miktarının daha yüksek olduğu ve santrifüjle yıkanma sonrasında kalıntı olarak, kullanılan stabilizer PVA'nın hücre ölümüne katkısı olduğu düşünülmektedir. Hidrojel içinde nanopartikül formülasyonlarının MTT çalışması ile canlılık analizi çalışmaları sonucunda, Şekil 3.43'te görüldüğü üzere, Pluronic® F-127 içinde A2-2 formülasyonunun, Pluronic® F-127 içinde TMZ, Pluronic® F-127 içinde boş PLGA nanopartikülleri ve Pluronic® F-127 hidrojeline göre canlılık oranını daha fazla azalttığı görülmüştür.

Yapılan akım sitometri çalışmalarında Şekil 3.42'de görüldüğü gibi nil kırmızısı yüklü nanopartikül uygulanmış hücrelerde, ortalama floresans yoğunluğu (MFI) zamana bağlı bir artış sergilemiştir. Ortalama floresans yoğunluğu, hücreler içine giren floresan madde/nanopartikül miktarını temsil etmektedir. Ortalama floresans yoğunluğunun 15 dakikalık maruz kalmadan sonra kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttığı gözlenmiş, 60. dakikada ise MFI iki katına çıkmıştır. Bu da, nanopartiküllerin veya nil kırmızısının hücreler içine girdiğini göstermektedir.

İstatistiksel olarak ortalamalar arasındaki farkın anlamlılığı incelendiğinde ise, iki gruba ayrılmak üzere 15 ve 30 dakikalar ile 60-240 dakikalar arasında anlamlı bir fark gözlenirken ($P < 0,001$), gruplar içinde farkın anlamı olmadığı gözlenmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Glioblastoma multiforme tedavisi için, tümör rezeksiyonu sonrasında bölgeye uygulanamak üzere in situ jelleşme yaparak kontrollü salımı sağlayacak hidrojel içinde temozolomid yüklü nanopartiküler formülasyonlar hazırlanmıştır. Ön-formülasyon ve formülasyon çalışmalarına ait bulgular aşağıda verilmiştir;

- Analitik çalışmalarda etkin maddenin pH 5 ve daha düşük pH seviyesinde stabil olduğu gözlenmiştir.
- PLGA nanopartiküller emülsiyon oluşturma-çözücü uçurma yöntemi ile başarılı bir şekilde üretilmiş, optimum formülasyon üretimi için homojenizasyon parametreleri, TMZ miktarı, PLGA miktarı, organik faz türü ve PVA konsantrasyonu değiştirilerek partikül özellikleri ve enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi incelenmiştir.
- PLGA nanopartikül formülasyonları ortalama % 65,67 ± 9,51 enkapsülasyon etkinliği ile üretilmiştir. Partikül büyüklüğü 164 – 1025 nm arasında olan, negatif yüzey yüklü, küresel nanopartiküller elde edilmiştir. Seçilen formülasyonlar A2-2, A2-5 ve A2-10'un, beyine hedeflendirme için uygun boyutta olduğu literatürlerle de doğrulanmıştır.
- Pluronic® F-127 ile hidrojeller, % 15-25 (a/h) konsantrasyonları arasında soğuk yöntem ile başarılı bir şekilde üretilmiştir. Optimum hidrojel formülasyonunun seçilmesi için pH, jelasyon sıcaklığı, viskozite, mekanik özellikler ve erozyon profili incelenmiştir.
- Üretilen formülasyonlardan 32°C jelasyon sıcaklığı, pH değeri 6,8 olan %18 Pluronic® F-127 içeren hidrojel optimum taşıyıcı olarak seçilmiş, hedeflenen dozu içeren optimum nanopartiküller hidrojel içine yüklenmiştir.
- Yapılan in vitro salım çalışmaları sonucunda, seçilen nanopartikül formülasyonlarda etkin maddenin salım süresi 3 gün iken, seçilen optimum nanopartiküller hidrojele yüklendiğinde in vitro salım profili 60 güne uzatılmıştır.
- Nanopartiküllerden in vitro salım kinetiği Weibull kinetiği ile, hidrojel içinde nanopartikül formülasyonlarından in vitro salım kinetiği Korsmeyer-Peppas kinetiği ile uyumluluk göstermiştir. Etkin maddenin nanopartiküllerinin

hazırlanmasıyla yarı ömrünün uzatıldığı in vitro salım çalışmaları esnasında gözlenmiştir.

- Hücre kültürü çalışmalarından önce formülasyonlar, filtrasyon ile sterilize edilmiştir. Yapılan MTT çalışmaları ile etkin maddenin nanopartikül içine yüklendiğinde toksisitesini koruduğu, akım sitometri çalışmaları ile ise 1 saat içinde nanopartiküllerin hücre içine aldığı gözlemlenmiştir. Yapılan sterilizasyon işlemlerine rağmen, nanopartikül içeren formülasyonların toksisitesinin, DMF'in yeterince uçurularak formülasyonlardan arındırılamamasından dolayı olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle, nanopartikül formülasyonlarının yıkanarak liyofilize edilmesine ve hücre kültürü çalışmalarının tekrarına karar verilmiştir.
- Yapılan in vitro karakterizasyon çalışmaları, in vitro salım çalışmaları ve hücre kültürü çalışmaları doğrultusunda en ideal formülasyon olarak A2-2 formülasyonu seçilmiştir.

Bu hususta, yapılacak öneriler aşağıdaki gibi özetlenebilir;

- Etkin maddenin ve polimerin daha iyi çözündüğü, fakat suda çözünürlüğü daha az olan bir organik çözücünün seçilmesi,
- Organik çözücü buharlaştırma yöntemine alternatif bir başka yöntem ile üretim yapılarak her iki yöntemin karşılaştırılması,
- Farklı üretim yöntemlerinin enkapsülasyon etkinliğine etkisinin araştırılması,
- Hidrojel formülasyonlarında, özellikleri fonksiyonel gruplarla değiştirilebilecek fakat kullanılan polimerin oluşturduğu jellerden daha dayanıklı ve daha az su çeken bir kopolimer sisteminin kullanılması,
- Üretilen nanopartikül + hidrojel sisteminin in vivo çalışmalar ile etkin maddenin plazma konsantrasyonunun ve nanopartikül formülasyonlarının hedeflendirilme potansiyelinin gözlenmesi konusunda düzenlemeler yapılabilir.

Yapılan bu çalışma ile, GBM tedavisinde kullanılabilmesi muhtemel alternatif bir formülasyon geliştirilmiştir.

ÖZET

Beyine Hedeflendirilmiş Etkin Madde Yüklü Nanopartiküllerin Hidrojel Formülasyonlarının Geliştirilmesi

Sistemik dolaşıma katıldığında bir çok yan etkiye sebep olan etkin maddelerin nanopartiküler taşıyıcı sistemlere yüklenerek belirli bir organ, doku ya da hücreye hedeflendirilmesi ile bu etkin maddeler daha güvenli ve etkili bir şekilde kullanılabilmektedir. Nanotaşıyıcılar içine yüklenen etkin maddenin plazma düzeyinin istenilen sürede istenilen seviyede tutulabileceği, sisteme yüklenen total etkin madde miktarının klasik dozaj formlarına göre daha az olabileceği böylece tedavi masraflarının konvansiyonel dozaj formlarına göre azalabileceği, etkin maddelerin enzimatik degredasyondan korunarak stabilitesinin artırılabileceği, ilacın toksik ve yan etkilerinin azaltılabileceği, in vivo yarılanma ömrü kısa etkin maddelerin parçalanmasının önlenebileceği ve toplam yüzey alanının artışına bağlı olarak etkin maddenin çözünme hızının ve buna bağlı olarak da absorpsiyonunun ve biyoyararlanımının artacağı bildirilmektedir.

Temozolomid (TMZ), glioblastoma hastalarının tedavisi için altın standart olarak kullanılan 5-(3 metiltriazen-1-il) imidazol-4-karboksiimit (MTIC) molekülünün ön ilacı (prodrug) olan alkilleyici bir anti kanser bileşendir. Temozolomid, oral alınımını takiben yüksek miktarlarda kana geçebilmekte ancak hızlıca hidroliz olarak MTIC'ye dönüşmektedir. Bu projedeki amacımız beyin tümorlerinde ameliyat ile ulaşılamayan bölgelerde tümör ölümünü sağlamak ya da ameliyat sonrası hastalığın tekrarlama oranını azaltmak üzere beyine uygulanabilecek güvenli ve etkili bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirmektir. Bu amaçla öncelikle TMZ'in polilaktik-ko-glikolikasit (PLGA) nanopartiküllerine yüklenmesi ve ardından bu nanopartiküllerin termojel özelliği gösteren Pluronic® F-127 ile formüle edilerek intrakranial veya intratekal uygulanabilecek, ameliyat bölgesinde lokalize olabilecek enjektabl formülasyonunun hazırlanması, karakterize edilmesi ve in vitro ve hücre kültürü çalışmaları ile formülasyonun etkinliğinin tespiti planlanmaktadır.

Anahtar kelimeler: Beyine hedeflendirme, Hidrojel, Nanopartikül, Pluronic® F-127, Temozolomid

SUMMARY

Development of Hydrogel Formulations of Brain-Targeted Active Substance-Loaded Nanoparticles

Active substances can be used more safely and effectively by targeting the active substances that cause many side effects when they are introduced into the systemic circulation to a certain organ, tissue or cell by loading them into nanosized carriers. Advantages to this are; plasma level of the active substance loaded into the nanocarriers can be kept at the desired level for a desired time, the total amount of active substance loaded into the system is less than the conventional dosage forms thus the treatment costs may be reduced, the stability and toxicity of the active substances can be increased by protection from the enzymatic degradation, the degradation of the active substances that have a short half-life in vivo can be prevented and the rate of dissolution of the active substance and consequently its absorption and bioavailability can increase due to the increase of the total surface area.

Temozolomide (TMZ) is an alkylating anti-cancer agent which is used as the gold standard for the treatment of glioblastoma patients, and is a prodrug of the 5- (3-methyltriazen-1-yl) imidazole-4-carboxyimide (MTIC). After oral administration, temozolomide quickly enters the bloodin high concentrations, but rapidly converts to MTIC by hydrolysis. Our aim in this project is to develop a safe and effective drug delivery system that can be administrated to the brain in order to decrease tumor recurrence rate or to prevent tumor death in areas that cannot be reached by resection surgery in brain tumors. For this purpose, we planned to load TMZ into polylactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles and then load these nanoparticles into Pluronic® F-127 hydrogel which shows thermoreversible properties, preparation of injectable hydrogel formulation which can be applied intracranially or intrathecally and can be localized in the surgical region; and it is planned to determine the formulations' effectiveness via in vitro characterization studies of both systems and cell culture studies.

Keywords: Brain targeting, Hydrogel, Nanoparticle, Pluronic® F-127, Temozolomide

KAYNAKLAR

ABBASZADE, Z. (2018) Glioma Hücrelerinde Temozolomid ve KC7F2 Ajanlarının Kombinasyonlarının Moleküler Biyolojik Açıdan İncelenmesi. 105.

ABBOTT, N. J. (2013) Blood–brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *Journal of inherited metabolic disease* **36(3)**:437-449.

ABDULLAH, K. G., ADAMSON, C. VE BREM, S. (2016) The Molecular Pathogenesis of Glioblastoma. *Glioblastoma* 21-31.

ABDULLAH, K. G. VE BURDICK, J. A. (2016) Local Drug Delivery in the Treatment of Glioblastoma. *Glioblastoma* 207-211.

ADAMSON, C., KANU, O. O., MEHTA, A. I., DI, C., LIN, N., MATTOX, A. K. VE BIGNER, D. D. (2009) Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert opinion on investigational drugs* **18(8)**:1061-1083.

AGARWALA, S. S. VE KIRKWOOD, J. M. (2000) Temozolomide, a novel alkylating agent with activity in the central nervous system, may improve the treatment of advanced metastatic melanoma. *The oncologist* **5(2)**:144-151.

AGNIHOTRI, S., BURRELL, K. E., WOLF, A., JALALI, S., HAWKINS, C., RUTKA, J. T. VE ZADEH, G. (2013) Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* **61(1)**:25-41.

ALI, H., WEIGMANN, B., COLLNOT, E.-M., KHAN, S. A., WINDBERGS, M. VE LEHR, C.-M. (2016) Budesonide loaded PLGA nanoparticles for targeting the inflamed intestinal mucosa—pharmaceutical characterization and fluorescence imaging. *Pharmaceutical research* **33(5)**:1085-1092.

ALSWISI, M. S. VE GHANNAM, M. A. (2015) Stabilized pharmaceutical formulations comprising antineoplastic compounds.

ANANTA, J. S., PAULMURUGAN, R. VE MASSOUD, T. F. (2016) Temozolomide-loaded PLGA nanoparticles to treat glioblastoma cells: a biophysical and cell culture evaluation. *Neurological research* **38(1)**:51-59.

ARAI, T., JOKI, T., AKIYAMA, M., AGAWA, M., MORI, Y., YOSHIOKA, H. VE ABE, T. (2006) Novel drug delivery system using thermoreversible gelation polymer for malignant glioma. *Journal of neuro-oncology* **77(1)**:9-15.

ARıSOY, S., SAYıNER, Ö. VE ÇOMOĞLU, T. (2017) Santral Sinir Sistemi Hastalıklarının Tedavisinde Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Yeri. *Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi* **6(2)**:110-125.

AVERINENI, R. K., SHAVI, G. V., GURRAM, A. K., DESHPANDE, P. B., ARUMUGAM, K., MALIYAKKAL, N., MEKA, S. R. VE NAYANABHIRAMA, U. (2012) PLGA 50: 50 nanoparticles of paclitaxel: development, in vitro anti-tumor activity in BT-549 cells and in vivo evaluation. *Bulletin of Materials Science* **35(3)**:319-326.

BALOĞLU, E., KARAVANA, S. Y., HYUSEIN, I. Y. VE KÖSE, T. (2010) Design and formulation of mebeverine HCl semisolid formulations for intraorally administration. *AAPS PharmSciTech* **11(1)**:181-188.

BAYKARA, O. (2016) Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi* **5(3)**:154-165.

BILATI, U., ALLÉMANN, E. VE DOELKER, E. (2005) Poly (D, L-lactide-co-glycolide) protein-loaded nanoparticles prepared by the double emulsion method—processing and formulation issues for enhanced entrapment efficiency. *Journal of microencapsulation* **22(2)**:205-214.

BODOR, N. VE BUCHWALD, P. (2002) Barriers to remember: brain-targeting chemical delivery systems and Alzheimer's disease. *Drug discovery today* **7(14)**:766-774.

BUDHIAN, A., SIEGEL, S. J. VE WINEY, K. I. (2007) Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug content. *International Journal of Pharmaceutics* **336(2)**:367-375.

COMOGLU, T., GONUL, N., DOGAN, A. VE BASCI, N. (2008) Development and in vitro evaluation of pantoprazole-loaded microspheres. *Drug delivery* **15(5)**:295-302.

DA SILVA JÚNIOR, W. F., DE OLIVEIRA PINHEIRO, J. G., MOREIRA, C. D., DE SOUZA, F. J. VE DE LIMA, Á. A. (2017) Alternative Technologies to Improve Solubility and Stability of Poorly Water-Soluble Drugs. *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics* 281-305.

DANGI, R. VE SHAKYA, S. (2013) Preparation, optimization and characterization of PLGA nanoparticle. *Int J Pharm Life Sci* **4(7)**:2810-2818.

DANHIER, F., ANSORENA, E., SILVA, J. M., COCO, R., LE BRETON, A. VE PRÉAT, V. (2012) PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release* **161(2)**:505-522.

DANIEL, A. B. VE DHAS, D. A. (2016) Vibrational Spectra and Natural Bond Orbital Analysis of Temozolomide Acid. *Journal of Applied Science and Engineering Methodologies* **2(3)**:322-325.

DAVIS, M. E. (2016) Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin J Oncol Nurs* **20(5)**:S2-8.

DERMAN, S. (2015) Caffeic acid phenethyl ester loaded PLGA nanoparticles: effect of various process parameters on reaction yield, encapsulation efficiency, and particle size. *Journal of Nanomaterials* **16(1)**:318.

DHAKAR, R. C., MAURYA, S. D., SAGAR, B. P., BHAGAT, S., PRAJAPATI, S. K. VE JAIN, C. P. (2010) Variables influencing the drug entrapment efficiency of microspheres: A pharmaceutical review. *Der Pharmacia Lettre* **2(5)**:102-116

DOĞAN, S. S., ÇABAN, S. VE ÇAPAN, Y. (2013) Beyine ilaç hedeflendirme stratejileri. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* **33(2)**:231-250.

DRUGBANK Temozolomide. (**04/07/2019 tarihinde erişildi)**:

DWIVEDI, R., SINGH, A. K. VE DHILLON, A. (2017) pH-responsive drug release from dependal-M loaded polyacrylamide hydrogels. Journal of Science: Advanced Materials and Devices **2(1):**45-50.

EL-BAGORY, I. M., BAYOMI, M., MAHROUS, G., ALANAZI, F. VE ALSARRA, I. A. (2010) Effect of gamma irradiation on pluronic gels for ocular delivery of ciprofloxacin: in vitro evaluation. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 4(9):4490-4498.

ERMER, J. VE MILLER, J. H. M. (2006) Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice.

ESCOBAR-CHÁVEZ, J. J., LÓPEZ-CERVANTES, M., NAIK, A., KALIA, Y., QUINTANAR-GUERRERO, D. VE GANEM-QUINTANAR, A. (2006) Applications

of thermo-reversible Pluronic® F-127 gels in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* **9(3)**:339-358.

FAISANT, N., SIEPMANN, J., OURY, P., LAFFINEUR, V., BRUNA, E., HAFFNER, J. VE BENOIT, J. (2002) The effect of gamma-irradiation on drug release from bioerodible microparticles: a quantitative treatment. International Journal of Pharmaceutics 242(1-2):281-284.

FANG, C., WANG, K., STEPHEN, Z. R., MU, Q., KIEVIT, F. M., CHIU, D. T., PRESS, O. W. VE ZHANG, M. (2015) Temozolomide nanoparticles for targeted glioblastoma therapy. *ACS applied materials & interfaces* **7(12)**:6674-6682.

FARAJI, A. H. VE WIPF, P. (2009) Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & medicinal chemistry* **17(8)**:2950-2962.

FOURNIOLS, T., RANDOLPH, L. D., STAUB, A., VANVARENBERG, K., LEPRINCE, J. G., PRÉAT, V., DES RIEUX, A. VE DANHIER, F. (2015) Temozolomide-loaded photopolymerizable PEG-DMA-based hydrogel for the treatment of glioblastoma. *Journal of Controlled Release* **210:**95-104.

GENG, H., SONG, H., QI, J. VE CUI, D. (2011) Sustained release of VEGF from PLGA nanoparticles embedded thermo-sensitive hydrogel in full-thickness porcine bladder acellular matrix. *Nanoscale Research Letters* **6(1)**:312.

GUTKIN, A., COHEN, Z. R. VE PEER, D. (2016) Harnessing nanomedicine for therapeutic intervention in glioblastoma. *Expert Opinion on Drug Delivery* **13(11)**:1573-1582.

GÜRTEN, B., YENIGÜL, E., SEZER, A. D. VE MALTA, S. (2018) Complexation and enhancement of temozolomide solubility with cyclodextrins. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **54(2)**.

HOTTINGER, A. F., ABDULLAH, K. G. VE STUPP, R. (2016) Current Standards of Care in Glioblastoma Therapy. *Glioblastoma* 73-80.

HOU, L. C., VEERAVAGU, A., HSU, A. R. VE VICTOR, C. (2006) Recurrent glioblastoma multiforme: a review of natural history and management options. *Neurosurgical focus* **20(4)**:E3.

HOUSEHOLDER, K. T., DIPERNA, D. M., CHUNG, E. P., WOHLLEB, G. M., DHRUV, H. D., BERENS, M. E. VE SIRIANNI, R. W. (2015) Intravenous delivery of camptothecin-loaded PLGA nanoparticles for the treatment of intracranial glioma. *International Journal of Pharmaceutics* **479(2)**:374-380.

ICH, H. T. G. (2005) Validation of analytical procedures: text and methodology. *Q2 (R1)*.

İLAÇ REHBERI Etkin Maddesi Temozolomid Olan İlaçların Listesi. (**04-07-2019 tarihinde erişildi)**

JAIN, D. S., ATHAWALE, R. B., BAJAJ, A. N., SHRIKHANDE, S. S., GOEL, P. N., NIKAM, Y. VE GUDE, R. P. (2014) Unraveling the cytotoxic potential of Temozolomide loaded into PLGA nanoparticles. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* **22(1)**:18.

JU, C., SUN, J., ZI, P., JIN, X. VE ZHANG, C. (2013) Thermosensitive micelles–hydrogel hybrid system based on poloxamer 407 for localized delivery of paclitaxel. *Journal of pharmaceutical sciences* **102(8)**:2707-2717.

JUILLERAT-JEANNERET, L. (2008) The targeted delivery of cancer drugs across the blood–brain barrier: chemical modifications of drugs or drug-nanoparticles? *Drug discovery today* **13(23-24)**:1099-1106.

KAPOOR, D. N., BHATIA, A., KAUR, R., SHARMA, R., KAUR, G. VE DHAWAN, S. (2015) PLGA: a unique polymer for drug delivery. *Therapeutic delivery* **6(1)**:41-58.

ŁASZCZ, M., KUBISZEWSKI, M., JEDYNAK, Ł., KACZMARSKA, M., KACZMAREK, Ł., ŁUNIEWSKI, W., GABARSKI, K., WITKOWSKA, A., KUZIAK, K. VE MALIŃSKA, M. (2013) Identification and physicochemical characteristics of temozolomide process-related impurities. *Molecules* **18(12)**:15344-15356.

LEE, Y., CHUNG, H. J., YEO, S., AHN, C.-H., LEE, H., MESSERSMITH, P. B. VE PARK, T. G. (2010) Thermo-sensitive, injectable, and tissue adhesive sol–gel transition hyaluronic acid/pluronic composite hydrogels prepared from bio-inspired catechol-thiol reaction. *Soft Matter* **6(5)**:977-983.

LEE, C. VE OOI, I. (2016) Preparation of temozolomide-loaded nanoparticles for glioblastoma multiforme targeting—ideal versus reality. *Pharmaceuticals* **9(3)**:54.

LEE, S. Y. (2016) Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes & Diseases* **3(3)**:198-210.

LEVIN, V. A., CRAFTS, D. C., NORMAN, D. M., HOFFER, P. B., SPIRE, J.-P. VE WILSON, C. B. (1977) Criteria for evaluating patients undergoing chemotherapy for malignant brain tumors. *Journal of neurosurgery* **47(3)**:329-335.

LI, R.-H., HOU, X.-Y., YANG, C.-S., LIU, W.-L., TANG, J.-Q., LIU, Y.-Q. VE JIANG, G. (2015) Temozolomide for treating malignant melanoma. *J Coll Physicians Surg Pak* **25(9)**:680-688.

LIU, Y., YANG, F., FENG, L., YANG, L., CHEN, L., WEI, G. VE LU, W. (2017) In vivo retention of poloxamer-based in situ hydrogels for vaginal application in mouse and rat models. *Acta pharmaceutica sinica B* **7(4)**:502-509.

LU, B., LV, X. VE LE, Y. (2019) Chitosan-Modified PLGA Nanoparticles for Control-Released Drug Delivery. *Polymers* **11(2)**:304.

MACDONALD, D. R., CASCINO, T. L., SCHOLD JR, S. C. VE CAIRNCROSS, J. G. (1990) Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma. *J Clin Oncol* **8(7)**:1277-1280.

MADANI, F., ESNAASHARI, S. S., MUJOKORO, B., DORKOOSH, F., KHOSRAVANI, M. VE ADABI, M. (2018) Investigation of Effective Parameters on Size of Paclitaxel Loaded PLGA Nanoparticles. *Advanced pharmaceutical bulletin* **8(1)**:77-84.

MAINARDES, R. M. VE EVANGELISTA, R. C. (2005) PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. *International Journal of Pharmaceutics* **290(1-2)**:137-144.

MAKADIA, H. K. VE SIEGEL, S. J. (2011) Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers* **3(3)**:1377-1397.

MAŁOLEPSZA-JARMOŁOWSKA, K. (2010) The effect of poloxamer 407 on the properties of hydrophilic gels containing lactic acid complexed with chitosan. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives* **15:**143-148.

MANSFIELD, E. (2015) Recent advances in thermal analysis of nanoparticles: methods, models and kinetics. Modeling, Characterization, and Production of Nanomaterials 167-178.

MASILAMANI, K. VE RAVICHANDIRAN, V. (2012) Effect of formulation and process variables on drug content and entrapment efficiency of aceclofenac nanosuspension. *Int Res J Pharm* **3(3)**:315-318.

MEHROTRA, A. VE PANDIT, J. K. (2015) Preparation and characterization and biodistribution studies of lomustine loaded PLGA nanoparticles by interfacial deposition method. J Nanomedine Biotherapeutic Discov **5(138)**:2.

MEN, K., LIU, W., LI, L., DUAN, X., WANG, P., GOU, M., WEI, X., GAO, X., WANG, B. VE DU, Y. (2012) Delivering instilled hydrophobic drug to the bladder by a cationic nanoparticle and thermo-sensitive hydrogel composite system. *Nanoscale* **4(20)**:6425-6433.

MERCK (2017) Temodar PI. (**30.06.2019 tarihinde erişildi)**.

MESFIN, F. B. VE AL-DHAHIR, M. A. (2018) Cancer, Brain, Gliomas. *StatPearls [Internet]*

MOIOLI, E. K., HONG, L., GUARDADO, J., CLARK, P. A. VE MAO, J. J. (2006) Sustained release of TGFbeta3 from PLGA microspheres and its effect on early osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. Tissue engineering 12(3):537-546.

NAWAZ, A., JAN, S. U., KHAN, N. R., HUSSAIN, A. VE KHAN, G. M. (2013) Formulation and in vitro evaluation of clotrimazole gel containing almond oil and tween 80 as penetration enhancer for topical application. *Pak J Pharm Sci* **26(3)**:617-622.

NIE, S., HSIAO, W. W., PAN, W. VE YANG, Z. (2011) Thermoreversible Pluronic® F-127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: in vitro drug release, cell cytotoxicity, and uptake studies. *International Journal of Nanomedicine* **6:**151-166.

OMURO, A. VE DEANGELIS, L. M. (2013) Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *JAMA* **310(17)**:1842-1850.

OSTROM, Q. VE BARNHOLTZ-SLOAN, J. (2016) Epidemiology of glioblastoma and trends in Glioblastoma survivorship. *Glioblastoma* 11-19.

PANDE, V., PATEL, S., PATIL, V. VE SONAWANE, R. (2014) Design expert assisted formulation of topical bioadhesive gel of sertaconazole nitrate. *Advanced pharmaceutical bulletin* **4(2)**:121-130.

PARK, K. M., LEE, S. Y., JOUNG, Y. K., NA, J. S., LEE, M. C. VE PARK, K. D. (2009) Thermosensitive chitosan–Pluronic hydrogel as an injectable cell delivery carrier for cartilage regeneration. *Acta Biomaterialia* **5(6)**:1956-1965.

PÉREZ-HERRERO, E. VE FERNÁNDEZ-MEDARDE, A. (2015) Advanced targeted therapies in cancer: drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **93**:52-79.

PHILLIPS, H. W. VE CHI, A. S. (2016) Chapter 9 - Chemotherapeutics and Their Efficacy. *Glioblastoma* 133-141.

PIRES, M. H. M. (2014) Nanoparticle Drug Delivery Systems for Temozolomide in the Treatment of Glioblastoma.

PITTO-BARRY, A. VE BARRY, N. P. (2014) Pluronic® block-copolymers in medicine: from chemical and biological versatility to rationalisation and clinical advances. *Polymer Chemistry* **5(10)**:3291-3297.

PORTACCIO, M., MENALE, C., DIANO, N., MITA, D. G. VE LEPORE, M. (2014) FT-IR microspectroscopy of cisplatin loaded PLGA nanoparticles. 1-3.

PUBCHEM DATABASE Temozolomide, CID=5394. (**04/07/2019 tarihinde erişildi)**:

RAMOS, D., CARRELO, H., BORGES, J., CALERO ROMERO, N., SANTOS GARCÍA, J. VE CIDADE, M. T. (2019) Injectable Hydrogels Based on Pluronic/Water Systems

Filled with Alginate Microparticles for Biomedical Applications. *Materials* **12 (7):**1-13.

RAMTEKE, K., DIGHE, P., KHARAT, A. VE PATIL, S. (2014) Mathematical models of drug dissolution: a review. Sch. Acad. J. Pharm **3(5):**388-396.

SAHANA, D., MITTAL, G., BHARDWAJ, V. VE KUMAR, M. R. (2008) PLGA nanoparticles for oral delivery of hydrophobic drugs: influence of organic solvent on nanoparticle formation and release behavior in vitro and in vivo using estradiol as a model drug. *Journal of pharmaceutical sciences* **97(4)**:1530-1542.

SARAVANAN, G., RAVIKUMAR, M., JADHAV, M., SURYANARAYANA, M., SOMESWARARAO, N. VE ACHARYULU, P. (2007) A stability-indicating LC assay and degradation behavior of temozolomide drug substances. *Chromatographia* **66(3-4)**:291-294.

SCHWAB, M. (2008) Encyclopedia of Cancer.

SERIM, T. (2011) Kontrollü salım yapan rivastigmin içeren implante partiküler sistemlerin formülasyonu üzerine çalışmalar. Ankara Üniversitesi, 152.

SHARMA, D., SHARMA, R. K., SHARMA, N., GABRANI, R., SHARMA, S. K., ALI, J. VE DANG, S. (2015) Nose-to-brain delivery of PLGA-diazepam nanoparticles. *AAPS PharmSciTech* **16(5)**:1108-1121.

SOKOL, M. B., NIKOLSKAYA, E. D., YABBAROV, N. G., ZENIN, V. A., FAUSTOVA, M. R., BELOV, A. V., ZHUNINA, O. A., MOLLAEV, M. D., ZABOLOTSKY, A. I. VE TERESHCHENKO, O. G. (2019) Development of novel PLGA nanoparticles with co-encapsulation of docetaxel and abiraterone acetate for a highly efficient delivery into tumor cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **107(4)**:1150-1158.

STOYANOV, G. S. VE DZHENKOV, D. L. (2018) On the concepts and history of glioblastoma multiforme-morphology, genetics and epigenetics. *Folia medica* **60(1)**:48-66.

STUPP, R., DIETRICH, P.-Y., KRALJEVIC, S. O., PICA, A., MAILLARD, I., MAEDER, P., MEULI, R., JANZER, R., PIZZOLATO, G. VE MIRALBELL, R. (2002) Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. *Journal of Clinical Oncology* **20(5)**:1375-1382.

STUPP, R., MASON, W. P., VAN DEN BENT, M. J., WELLER, M., FISHER, B., TAPHOORN, M. J., BELANGER, K., BRANDES, A. A., MAROSI, C. VE BOGDAHN, U. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New England Journal of Medicine* **352(10)**:987-996.

SUN, S.-B., LIU, P., SHAO, F.-M. VE MIAO, Q.-L. (2015) Formulation and evaluation of PLGA nanoparticles loaded capecitabine for prostate cancer. *International journal of clinical and experimental medicine* **8(10)**:19670-19681.

SUTAR, P. VE JOSHI, V. (2013) Preparation and characterisation of 5-fluorouracil loaded PLGA nanoparticles for colorectal cancer therapy. *Unique J Pharm Biol Sci* **1(02)**:52-58.

SUTRADHAR, K. B. VE AMIN, M. L. (2014) Nanotechnology in cancer drug delivery and selective targeting. *ISRN Nanotechnology* **2014.**

THIRUPATHY, A., SRINIVAS, P., BABU, D. R. VE MAMIDI, S. (2011) Formulation and evaluation of sustained release implantable microspheres of temozolomide for brain targeting prepared by a novel technique. *Int J Pharm Pharm Sci* **3:**187-194.

TIAN, X.-H., LIN, X.-N., WEI, F., FENG, W., HUANG, Z.-C., WANG, P., REN, L. VE DIAO, Y. (2011) Enhanced brain targeting of temozolomide in polysorbate-80 coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine* **6:**445-452.

TSAI, W.-C., HUENG, D.-Y., LIN, C.-R., YANG, T. VE GAO, H.-W. (2016) Nrf2 expressions correlate with WHO grades in gliomas and meningiomas. *International journal of molecular sciences* **17(5)**:722.

TUĞCU-DEMIRÖZ, F. (2017) Development of in situ poloxamer-chitosan hydrogels for vaginal drug delivery of benzydamine hydrochloride: Textural, mucoadhesive and in vitro release properties. *Marmara Pharmaceutical Journal* **21(4)**:762-770.

URBAŃSKA, K., SOKOŁOWSKA, J., SZMIDT, M. VE SYSA, P. (2014) Glioblastoma multiforme–an overview. *Contemporary oncology* **18(5)**:307-312.

USP, C. (2010) USP Monograph - Temozolomide. *USP 33 ; NF 28: First Supplement to the USP-NF Reissue* .

VARSHOSAZ, J., TAYMOURI, S., HAMISHEHKAR, H., VATANKHAH, R. VE YAGHUBI, S. (2017) Development of dry powder inhaler containing tadalafil-loaded PLGA nanoparticles. *Research in pharmaceutical sciences* **12(3)**:222-232.

VILLANO, J. L., SEERY, T. E. VE BRESSLER, L. R. (2009) Temozolomide in malignant gliomas: current use and future targets. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **64(4)**:647-655.

WEN, P. Y., MACDONALD, D. R., REARDON, D. A., CLOUGHESY, T. F., SORENSEN, A. G., GALANIS, E., DEGROOT, J., WICK, W., GILBERT, M. R. VE LASSMAN, A. B. (2010) Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group. *J Clin Oncol* **28(11)**:1963-1972.

WIRSCHING, H.-G., GALANIS, E. VE WELLER, M. (2016) Glioblastoma. *Handbook of clinical neurology* **134:**381-397.

WOLINSKY, J. B., COLSON, Y. L. VE GRINSTAFF, M. W. (2012) Local drug delivery strategies for cancer treatment: gels, nanoparticles, polymeric films, rods, and wafers. *Journal of Controlled Release* **159(1)**:14-26.

XU, J. (2016) Synthesis of Polymeric Nanoparticles for the Controlled Release of Hydrophobic and Hydrophillic Theraputic Compounds.

YAPAR, E. (2009) In situ oluşum yolu ile meydana gelen enjekte edilebilen implant formunda sürekli etkili ilaç salım sistemlerinin geliştirilmesi.

YEO, Y. VE PARK, K. (2004) Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Archives of pharmacal research* **27(1)**:1.

YUNG, W., ALBRIGHT, R., OLSON, J., FREDERICKS, R., FINK, K., PRADOS, M., BRADA, M., SPENCE, A., HOHL, R. VE SHAPIRO, W. (2000) A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. *British journal of cancer* **83(5)**:588-593.

ZHANG, H. VE GAO, S. (2007) Temozolomide/PLGA microparticles and antitumor activity against glioma C6 cancer cells in vitro. *International Journal of Pharmaceutics* **329(1-2)**:122-128.

ZHANG, Y., HUO, M., ZHOU, J., ZOU, A., LI, W., YAO, C. VE XIE, S. (2010) DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. The AAPS journal **12(3):**263-271.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Özgün SAYINER
Doğum yeri ve tarihi: SAMSUN / 27.04.1993
Uyruğu: TC
Medeni durumu: Bekar
İletişim adresi: Zafer Mah. Süleymaniye Sok. Sayıner Apt. No:1, İlkadım/SAMSUN

II- Eğitimi

- Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Eylül 2016 – Eylül 2019)

Farmasötik Teknoloji Yüksek Lisans Programı

- Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (Eylül 2011 – Haziran 2016)
- Samsun Fen Lisesi (Eylül 2007 – Haziran 2011)

Yabancı dili: İngilizce (Fluent in both written and spoken English)

III- Mesleki Deneyimi

- Stajyer Eczacı - Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (Şubat 2016 – Nisan 2016)
- Stajyer Eczacı – Pelin Eczanesi (Temmuz 2015, Temmuz – Ağustos 2016, Temmuz – Ağustos 2017)

IV- Bilimsel İlgi Alanları

Ö. Sayıner, T. Çomoğlu, "Development and Validation of HPLC Analytical Methods for Determination of Temozolomide" IPTS-2018, September 17-19, 2018, Antalya, Türkiye.

Sayıner, Ö., Arısoy, S., Çomoğlu, T., Özbay F., Esendağlı, G. "Formulation and in vitro and ex vivo evaluation of locally administrated TMZ-loaded-PLGA nanoparticles in a thermoreversible hydrogel system" (The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal'a gönderilmek üzere hazırlandı)