



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**HEPATOSELLÜLER KARSİNOM TEDAVİSİNE
YÖNELİK ANTİPROLİFERATİF AJAN İÇEREN
NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ
GELİŞTİRİLMESİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Bilge BAYRAM

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Ceyda Tuba ŞENGEL TÜRK

ANKARA

2022

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOM TEDAVİSİNE
YÖNELİK ANTİPROLİFERATİF AJAN İÇEREN
NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ
GELİŞTİRİLMESİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Bilge BAYRAM

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Ceyda Tuba ŞENGEL-TÜRK

**Bu proje Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü' nün
21L0237008 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2022

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü' ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp " Hepatosellüler Karsinom Tedavisine Yönelik Antiproliferatif Ajan İçeren Nanopartikül Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve Değerlendirilmesi " başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezden yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Bilge BAYRAM

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında Biyofarmasötik-Farmakokinetik Tezli
Yüksek Lisans Programında
Bilge BAYRAM tarafından hazırlanan
"Hepatosellüler Karsinom Tedavisine Yönelik Antiprolifetatif Ajan İçeren
Nanopartikül Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve Değerlendirilmesi" adlı tez
çalışması
aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/OY
ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 02.02.2022

Prof. Dr. Ayşe Nurten ÖZDEMİR
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Ayhan SAVAŞER
Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Doç. Dr. Ceyda Tuba ŞENGEL-TÜRK
Ankara Üniversitesi

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

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser Nedir?	1
1.1.1. Kanser Oluşumu	2
1.1.2. Kanserde Rol Oynayan Risk Faktörleri	3
1.1.3. Kanser Tedavi Seçenekleri	4
1.1.4. Kanser Tedavisinde Siklooksijenazların Yeri ve Önemi	5
1.1.5. Kanser Tedavisinde COX İnhibitörlerinin Rolü	6
1.2. Hepatosellüler Karsinom	7
1.2.1. Hepatosellüler Karsinomda Risk Faktörleri	9
1.2.2. Hepatosellüler Karsinomda Tedavi Seçenekleri	11
1.2.3. Hepatosellüler Karsinom Tedavisinde COX İnhibitörlerinin Yeri	12
1.3. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler	13
1.3.1. Polimer Bazlı Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler	14
1.3.2. Kanser Tedavisinde Nanopartiküller ve Polimer Bazlı Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Yeri	16
1.3.3. Hepatosellüler Karsinomda Nanopartiküler Sistemlerin Yeri	17
1.4. Nanopartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler	18
1.4.1. Çalışmamızda Kullanılan Yardımcı Maddeler	19
1.4.1.1. PLGA	19
1.4.1.2. Poloksamer 188	21
1.5. Polimerik Nanopartikülleri Hazırlama Teknikleri	22
1.5.1. Emülsiyon-Çözücü Buharlaştırma Yöntemi	23
1.5.2. Emülsiyon-Çözücü Difüzyon Yöntemi	25
1.5.3. Tuzla Çöktürme Yöntemi	27
1.5.4. Nanoprespitasyon Tekniği	28
1.6. Piroksikam	30
1.6.1. Piroksikamın Fizikokimyasal Özellikleri ve Miktar Tayini Yöntemleri	31
1.6.2. Piroksikamın Farmakolojik Özellikleri	32
1.6.3. Piroksikamın Farmakokinetik Özellikleri ve Biyoyararlanımı	32
1.6.4. Piroksikamın Metabolizması ve Eliminasyonu	33
1.6.5. Piroksikamın Antikanser Etkinliği	34
2. GEREÇ ve YÖNTEM	36
2.1. Gereçler	36

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	36
2.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler	37
2.2. Yöntem	38
2.2.1. Etken Maddenin Özelliklerinin Belirlenmesi	38
2.2.1.1. Etken Maddenin Fourier Transform Infrared (FTIR) Spektroskopisi ile Analizi	38
2.2.1.2. Etken Maddenin Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC) Analizi	38
2.2.1.3. Etken Maddenin UV Spektrumunun İncelenmesi	39
2.2.2. Etken Maddenin Kalibrasyonu ve Analitik Validasyonu	39
2.2.2.1. Etken Maddenin Kalibrasyon Doğrularının ve Grafiklerinin Belirlenmesi	40
2.2.2.2. Etken Maddenin UV Spektrofotometrik Yöntemle Kalibrasyonuna Yönelik Analitik Validasyon Çalışmaları	40
2.2.2.2.1. Seçicilik	40
2.2.2.2.2. Doğrusallık Aralığı	41
2.2.2.2.3. Doğruluk	41
2.2.2.2.4. Kesinlik	42
2.2.2.2.4.1. Tekrarlanabilirlik	42
2.2.2.2.4.2. Orta Kesinlik	42
2.2.2.2.5. Teşhis Sınırı (LOD)	42
2.2.2.2.6. Tayin Sınırı (LOQ)	43
2.2.3. Polimerik Nanopartikül Formülasyon Çalışmaları	43
2.2.3.1. Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması	43
2.2.3.2. Nanopartikül Formülasyonlarının Optimizasyonu	44
2.2.3.3. Nanopartikül Formülasyonları Üzerinde Yapılan Kontroller	45
2.2.3.3.1. Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliğinin Tayini	45
2.2.3.3.2. Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Polidispersite (PDI) İndeksi Tayini	46
2.2.3.3.3. Nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Analizi	47
2.2.3.3.4. İn Vitro Etken Madde Açığa Çıkış Hızı Tayini	47
2.2.3.3.5. Açığa Çıkan Etken Madde Miktarının Tespiti	48
2.2.3.3.6. Nanopartiküllerin DSC Analizi	49
2.2.3.3.7. Nanopartiküllerin FTIR Analizi	49
2.2.3.3.8. Nanopartiküllerin Morfolojik Özellikleri	50
2.2.3.3.9. Stabilité Çalışmaları	50
2.2.3.4. Nanopartiküllerin Antiproliferatif Aktivitelerinin Tayini	51
2.2.3.4.1. Test Maddesi	51
2.2.3.4.2. Hücre Kültürü	51
2.2.3.4.3. Hücre Canlılık Testi	51
3. BULGULAR	53
3.1. Etken Maddenin Özelliklerinin Belirlenmesi	53
3.1.1. Etken Maddenin FTIR Spektroskopisi Analizi Bulguları	53
3.1.2. Etken Maddenin DSC Analizi Bulguları	53
3.1.3. Etken Maddenin UV Spektrum Bulguları	54
3.2. Etken Maddenin Kalibrasyon Doğruları ve Grafikleri Bulguları	55
3.3. Etken Maddenin UV Spektrofotometrik Yöntemle Belirlenen	56

Kalibrasyonuna Yönelik Analitik Validasyon Bulguları	
3.3.1. Seçicilik	56
3.3.2. Doğrusallık Aralığı	56
3.3.3. Doğruluk	58
3.3.4. Kesinlik	59
3.3.4.1. Tekrarlanabilirlik	59
3.3.4.2. Orta Kesinlik	61
3.3.5. Teşhis Sınırı (LOD)	62
3.3.6. Tayin Sınırı (LOQ)	62
3.4. Polimerik Nanopartikül Formülasyonu Çalışmaları Bulguları	63
3.4.1. Nanopartikül Formülasyonlarının 3^2 Faktöriyel Deney Tasarımı ile Optimizasyon Bulgular	63
3.4.2. Nanopartiküllerin PDI Tayinine Ait Bulgular	68
3.4.3. İn Vitro Etken Madde Açığa Çıkış Hızı Tayini Bulguları	68
3.4.4. Açığa Çıkan Etken Madde Miktarının Bulguları	69
3.4.5. Optimum Formülasyonun DSC Analizi Bulguları	72
3.4.6. Optimum Formülasyonun FTIR Analizi Bulguları	73
3.4.7. Nanopartiküllerin Morfolojik Özellikleri Bulguları	73
3.4.8. Stabilité Çalışmaları Bulguları	74
3.4.9. Piroksikam Yüklü Nanopartiküllerin Antiproliferatif Etkinlik Bulguları	75
4. TARTIŞMA	77
4.1. Etken Maddenin Özelliklerinin Belirlenmesine Yönelik Bulguların Değerlendirilmesi	77
4.1.1. Etken Maddenin FTIR Analizi Bulgularının Değerlendirilmesi	77
4.1.2. Etken Maddenin DSC Analizi Bulgularının Değerlendirilmesi	78
4.1.3. Etken Maddenin UV Spektrumunun Değerlendirilmesi	78
4.2. Seçilen Analitik Yöntemin Validasyon Bulgularının Değerlendirilmesi	78
4.3. Nanopartikül Formülasyonlarının 3^2 Faktöriyel Deney Tasarımı ile Optimizasyon ve Özellik Bulgularının Değerlendirilmesi	80
4.3.1. Optimizasyon Bulgularının Değerlendirilmesi	80
4.3.2. Nanopartiküllerin PDI Tayinine Yönelik Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi	83
4.3.3. İn Vitro Etken Madde Açığa Çıkış Hızı Tayini Bulgularının Değerlendirilmesi	84
4.3.4. Optimum Nanopartikül Formülasyonun Belirlenmesi Bulgularının Değerlendirilmesi	84
4.3.5. Açığa Çıkan Etken Madde Miktarının Tahmini Bulgularının Değerlendirilmesi	85
4.3.6. Optimum Nanopartikül Formülasyonunun DSC Analizi Bulgularının Değerlendirilmesi	86
4.3.7. Optimum Nanopartikül Formülasyonunun FTIR Analizi Bulgularının Değerlendirilmesi	87
4.3.8. Optimum Nanopartikül Formülasyonunun Morfolojik Özellik Bulgularının Değerlendirilmesi	88
4.3.9. Optimum Formülasyonun Stabilité Çalışması Bulgularının	88

Değerlendirilmesi	
4.3.10. Nanopartiküllerin Antiproliferatif Aktivite Tayini Bulgularının	89
Değerlendirilmesi	

5. SONUÇ ve ÖNERİLER	90
ÖZET	93
SUMMARY	94
KAYNAKLAR	95
ÖZGEÇMİŞ	104



ÖNSÖZ

Bu çalışmada hepatosellüler karsinom tedavisinde antikanser aktivitesinden yararlanmak üzere piroksikamın polimerik nanopartiküler ilaç taşıyıcı sisteminin geliştirilmesi amaçlanmış ve 3² faktöriyel deney tasarımı kullanılarak hazırlanan polimerik nanopartiküllerin etken madde yükleme etkinliği, partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi, zeta potansiyeli, morfolojik özellikleri araştırılmıştır. Ayrıca piroksikam yüklü nanopartiküller etken madde açığa çıkış hızı, stabilite ve antiproliferatif aktiviteleri bakımından incelenerek bu kapsamda hazırlanan formülasyonlar değerlendirilmiştir.

Tezli yüksek lisans eğitim sürecimde deneysel çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için gerekli imkanları sunan Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanlığına, bilgi ve tecrübesi ile her zaman çalışmalarına katkıda bulunan Prof. Dr. Ayşe Nurten ÖZDEMİR başta olmak üzere tüm Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı hocalarıma teşekkür ederim.

Bu çalışmada lisans eğitim sürecimden itibaren eğitim hayatımda bilgisi, tecrübesi, ilgisi ve sevecenliğiyle bana yol gösteren, tezli yüksek lisans dönemi çalışmalarında benden yardımlarını esirgemeyen, sonsuz sabır ve özenle çalışmalarına ışık tutan sevgili danışman hocam Doç. Dr. Ceyda Tuba ŞENGEL-TÜRK 'e desteklerinden ötürü çok teşekkür ederim.

Can dostum, kardeşim, sevgili arkadaşım Dr. Şerife Özkarakoç'a, bana hep inanan ve yanımda olan arkadaşlarım beraberce çok kez neşelendiğimiz zaman zaman zorlandığımız Ecz. Büşra Yaylacı ve Ecz. Tuğba Vahapoğlu'na destekleri için teşekkür ederim.

Canım ablama, sevgili enişteme ve biricik yeğenlerim İrem ve Gökçe'ye destekleri ve inançları için teşekkür ederim. Varlıklarına hep şükrettiğim en zor günümünden en mutlu günüme kadar her zaman yanımda olan, beni koşulsuz seven canlarım anneme ve babama özverileri ve tüm emekleri için sonsuz teşekkür ederim.

SİMGE VE KISALTMALAR

α	Alfa
AUC	Plazma derişim-zaman eğrisi
BCLC	Barselona klinik karaciğer kanser
BT	Bilgisayarlı tomografi
COX	Siklooksijenaz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonüklesik asit
DSC	Diferansiyel tarama kalorimetresi
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EPR	Geçirgenlik ve tutma etkisi
FBS	Fötal sığır serumu
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
GCO	Global Cancer Observatory
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
g	Gram
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
$\lambda_{\max}$	Maksimum dalga boyu
L	Litre
LOD	Tayin sınırı
LOQ	Teşhis sınırı
LOX	Lipooksijenaz
μ	Mikro
μM	Mikromolar
mg	Miligram
mL	Mililitre

MTT	3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür
MRI	Manyetik rezonans görüntüleme
n	Çözünme hızı deneyi esnasında alınan numune sayısı
nm	Nanometre
NSAİİ	Nonsteroidal anti-enflamatuvar ilaç
PCL	Poli-Kapro-Lakton
PCL-PEG	Poli-Kapro-Lakton-Poli-Etilen-Glikol
PDI	Polidispersite indeksi
PICBA	Poli-İsobütil-Siyano-Akrilat
PLA	Polilaktik Asit
PLA-PEG	Polilaktik Asit-Polietilen Glikol
PLGA	Polilaktik-ko-Glikolik Asit
PLGA-PEG	Polilaktik-ko-Glikolik Asit-Polietilen Glikol
PPE	Polietilen Oksit
PPO	Polipropilen Oksit
PVAL	Polivinilalkol
°C	Santigrat derece
RNA	Ribonükleik Asit
Rt	Referansın t anında çözünen etken madde yüzdesi
h	Saat
SEM	Taramalı elektron mikroskopisi
TACE	Transarteriyal kemoembolizasyon
TARE	Transarteriyal radyoembolizasyon
Tg	Cam geçiş sıcaklığı
Tt	Testin t anında çözünen etken madde yüzdesi
UV	Ultraviyole spektrofotometri

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. DSÖ 2018 tahmini kanser çeşitlerinin insidans dağılımı.	2
Şekil 1.2. DSÖ 2018 tahmini kanser çeşitlerinin mortalite dağılımı.	2
Şekil 1.3. Karaciğer kanserinin kıtalara göre insidans dağılımları.	8
Şekil 1.4. Karaciğer kanserinin kıtalara göre mortalite dağılımları.	8
Şekil 1.5. Nanoküre ve nanokapsül yapıları.	14
Şekil 1.6. PLGA kimyasal yapısı.	19
Şekil 1.7. PLGA hidrolizi.	20
Şekil 1.8. Emülsiyon-çözücü buharlaştırma şematik gösterimi.	24
Şekil 1.9. Emülsiyon-çözücü difüzyon tekniği şematik gösterimi.	26
Şekil 1.10. Tuzla çöktürme tekniğinin şematik gösterimi.	28
Şekil 1.11. Nanoprespitasyon tekniğinin şematik gösterimi.	29
Şekil 1.12. Piroksikamın kimyasal yapısı.	31
Şekil 1.13. Piroksikamın tautomerik şekilleri.	31
Şekil 1.14. Piroksikam metabolizması.	34
Şekil 3.1. Piroksikamın FTIR spektrumu.	53
Şekil 3.2. Piroksikamın DSC termogramı.	53
Şekil 3.3. Piroksikamın asetonitril ortamındaki UV spektrumu.	54
Şekil 3.4. Piroksikamın pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki UV spektrumu.	54
Şekil 3.5. Piroksikamın asetonitril ortamındaki kalibrasyon doğrusu.	55
Şekil 3.6. Piroksikamın pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki kalibrasyon doğrusu.	55
Şekil 3.7. Asetonitril ortamı için Instant paket programı ile çizilen lineer regresyon grafiği	57
Şekil 3.8. pH 7,4 fosfat tamponu ortamı için Instant paket programı ile çizilen lineer regresyon grafiği	58
Şekil 3.9. PLGA miktarı ve Poloksamer 188 derişiminin piroksikam nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisini gösteren yüzey cevap grafiği.	64
Şekil 3.10. PLGA miktarı ve Poloksamer 188 derişiminin piroksikam nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü üzerine etkisini gösteren yüzey cevap grafiği	64
Şekil 3.11. PLGA miktarı ve Poloksamer 188 derişiminin piroksikam nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü üzerine etkisini gösteren yüzey cevap grafiği	65

Şekil 3.12. Optimum formülasyonu gösteren kontür grafiği. Sarı bölge hedeflenen cevap değişkenlerine ulaşmak için çalışılması gereken bağımsız değişken düzeylerini yani optimum formülasyonu tanımlamaktadır.	67
Şekil 3.13. İn vitro etken madde açığa çıkış hızı profilleri.	69
Şekil 3.14. Optimum formülasyonun tahmini ve deneysel verilerine ait korelasyon grafiği.	71
Şekil 3.15. Optimum formülasyonun deneysel ve tahmini çözünme hızı profilleri.	72
Şekil 3.16. Optimum formülasyonda yer alan piroksikam yüklü nanopartiküllerin ve boş nanopartiküllerin DSC termogramı.	72
Şekil 3.17.a. Piroksikam yüklü optimum nanopartikül formülasyonun FTIR spektrumu; b. Piroksikam içermeyen boş optimum nanopartikül nanopartikül formülasyonunun FTIR spektrumu.	73
Şekil 3.18. Nanopartiküllerin morfolojik görünümü.	74
Şekil 3.19. Saf piroksikamın 48 saat inkübasyon sonrası HepG2 hücre canlılığı üzerine etkisi.	75
Şekil 3.20. Piroksikam yüklü optimum nanopartikül formülasyonunun 48 saat inkübasyon sonrası HepG2 hücre canlılığı üzerine etkisi.	76

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Nanoprespitasyon tekniği kullanılarak hazırlanan formülasyon denemeleri.	43
Çizelge 2.2. Deney tasarımı kapsamında incelenecek bağımsız değişkenleri ve düzeyleri.	44
Çizelge 2.3. Deney tasarımı kapsamında hazırlanan formülasyon içerikleri.	45
Çizelge 3.1. Piroksikamın asetonitril ve pH 7,4 tamponunda gösterdiği maksimum dalga boyları.	55
Çizelge 3.2. Piroksikamın asetonitril ve pH 7,4 ortamlarında elde edilen kalibrasyon verileri.	56
Çizelge 3.3. Doğrusallık aralığının saptanmasında asetonitril ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamlarına ait veriler,	57
Çizelge 3.4. Doğruluğun saptanmasında asetonitril ortamına ait veriler.	58
Çizelge 3.5. Doğruluğun saptanmasında pH 7,4 fosfat tamponu ortamına ait veriler.	59
Çizelge 3.6. Asetonitril ortamında tekrarlanabilirlik parametresi için elde edilen veriler.	60
Çizelge 3.7. pH 7,4 fosfat tamponu ortamında tekrarlanabilirlik parametresi için elde edilen veriler.	60
Çizelge 3.8. Asetonitril ortamında orta kesinlik parametresi için elde edilen veriler.	61
Çizelge 3.9. pH 7,4 fosfat tamponu ortamında orta kesinlik parametresi için elde edilen veriler.	62
Çizelge 3.10. Piroksikamın asetonitril ve pH 7,4 fosfat tampon ortamlarındaki LOD değerleri.	62
Çizelge 3.11. Piroksikamın asetonitril ve pH 7,4 fosfat tampon ortamlarındaki LOQ değerleri.	63
Çizelge 3.12. Nanopartikül formülasyonlarının 3^2 faktöriyel deney tasarımı ile elde edilen cevap değişkenlerine ait bulgular.	63
Çizelge 3.13. Polimerik nanopartiküllerin özellik parametrelerine uygulanan program analizi sonucunda elde edilen doğru denklemlerine ait katsayılar ve istatistiksel veriler.	66
Çizelge 3.14. Nanopartikül formülasyonlarının PDI değerleri.	68
Çizelge 3.15. Programa girilen bağımsız değişkenlerin düzeyleri ile her bir formülasyon için tayin edilen açığa çıkan etken madde miktarları.	70
Çizelge 3.16. Optimum formülasyona ait deneysel çözünme hızı verilerine karşılık program tarafından oluşturulan tahmini çözünme hızı çıktı verileri.	71
Çizelge 3.17. Optimum formülasyonun f_1 fark ve f_2 benzerlik testi sonuçları.	72

Çizelge 3.18. Optimum formülasyonun 4°C sıcaklık değerindeki 6 aylık stabilite verileri.	74
Çizelge 3.19. Optimum formülasyonun liyofilizasyon işlemi sonrasında ve 3 ile 6 aylık stabilite dönemleri sonrasında tayin edilen redispersibilite indeksi değerleri.	75

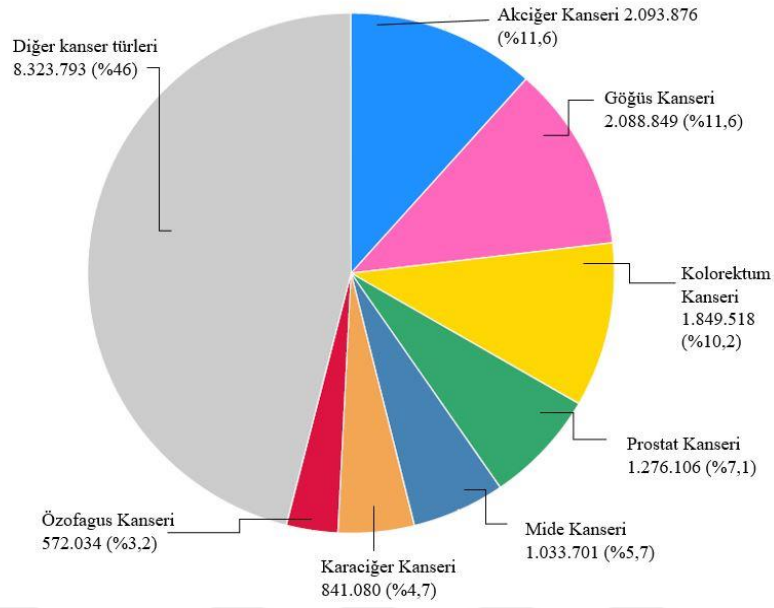


1. GİRİŞ

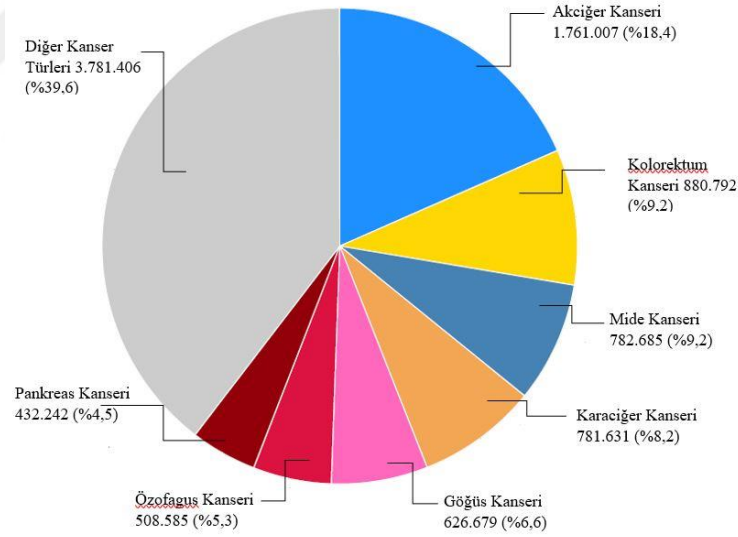
Kanser çeşitleri arasında mortalite bakımından dördüncü sırada yer alan hepatoselüler karsinom tanı konulduktan sonraki düşük sağkalım oranı nedeniyle alternatif tedavi seçeneklerine ihtiyaç duyulan bir hastalıktır (Dünya Sağlık Örgütü, ‘Cancer’, Erişim: 22 Kasım 2020). Polimerik nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerle sahip oldukları özellikleri sayesinde hepatoselüler karsinomda da umut verici sonuçlar elde edilmektedir. Kronik enflamasyonu engelleyen COX (Siklooksijenaz) inhibitörleri polimerik nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerle uygulandığında antiproliferatif etki göstermektedirler (Ahmadian ve ark.,2018; Jin ve ark., 2014). Hepatoselüler karsinomda nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler ve oksikam grubu COX inhibitörü etken maddeler üzerinde antiproliferatif etkiye yönelik mevcut çalışmalar bulunmakta ve araştırmalar devam etmektedir (Cervello ve Montalto, 2006).

1.1. Kanser Nedir?

Kanser hücrelerin ya da dokuların büyümesini ve bölünmesini kontrol eden gen mekanizmalarının bozulması sonucunda hücrelerin ya da dokuların anormal düzeyde çoğalması ile ortaya çıkan ve dünyadaki en ölümcül hastalıklardan biri olarak kabul gören somatik genetik hastalıkların en yaygın ve en karmaşık olanıdır (Abriata ve ark., 2019; Rajeshkumar, 2016; Yokuş ve Ülker, 2012). Kanser türlerinin Dünya Sağlık Örgütü’nün 2018 tahmini verilerine göre dünyada görülme sıklığı ve mortalite oranları sırasıyla Şekil 1.1 ve Şekil 1.2’de görülmektedir. Kanser dünya çapında morbidite ve mortalite oranlarında önemli bir paya sahiptir. (Rajeshkumar, 2016; Villanueva ve ark., 2013; Yokuş ve Ülker, 2012). DSÖ’ye göre sadece 2018’de tahmini 9,6 milyon ölümden sorumlu olan kanser, küresel olarak ölüm nedenleri arasında ikinci sıradadır. Küresel açıdan yaklaşık altı ölümden biri kanser kaynaklıdır. Kanser kaynaklı ölümlerin ortalama %70’i düşük ve orta gelirli ülkelerde gözlenmektedir (Dünya Sağlık Örgütü, ‘Cancer’, Erişim: 22 Kasım 2020).



Şekil 1.1. DSÖ 2018 tahmini kanser çeşitlerinin insidans dağılımı (Global Cancer Observatory, (GCO), Cancer Today, Erişim: 30 Kasım 2020).



Şekil 1.2. DSÖ 2018 tahmini kanser çeşitlerinin mortalite dağılımı (Global Cancer Observatory, (GCO), Cancer Today, Erişim: 30 Kasım 2020).

1.1.1. Kanser Oluşumu

Kanserlerin temel oluşum mekanizmasının sebebi DNA diziliminde meydana gelen beklenmedik değişikliklerdir. Bu hastalığın %10 ile %15’lik kısmının

ebeveynden bebeğe genetik olarak geçtiği, %85 ile %90'lık kısmının yaşam süresince canlı hücrelerde bulunan DNA'nın çeşitli sebeplerle hasara uğraması sonucu meydana geldiği düşünülmektedir (Rajeshkumar, 2016; Villanueva ve ark., 2013; Yokuş ve Ülker, 2012). Bu sebepler hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki bozukluklar ve bunu takip eden hücre siklusu anormallikleri, apoptozda meydana gelen bozulmalar, protoonkogenler ve onkogenlerde anormal hücre bölünmesi ya da farklılaşması lehine değişikliklerdir (Corn ve El-Deiry, 2002). Hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki hasar, hücrenin sıradışı bir biçimde büyümesi ve bölünmesine yol açarak kanser klonu oluşmasına sebep olmaktadır (Rajeshkumar, 2016; Villanueva ve ark., 2013; Yokuş ve Ülker, 2012). Anormal şekilde bölünen ya da büyüyen hücre topluluğu ilk olarak bulunduğu doku ya da organı baskılayarak normal işlevini yerine getirmesini engellemektedir (Oylar ve Tekin, 2011).

Protoonkogenlerin işlev gördüğü apoptoz ise programlanmış hücre ölümüdür. Neoplazinin sebebi olarak yaygın görüş hücre çoğalmasındaki artış olması iken, yakın zamanda kanser hücrelerinin programlanmış hücre ölümü sürecine girememeleri hipotezi destek görmektedir. Apoptoz bağlamında kanser hücreleri aslında hücre bölünmesi ve takiben hücre çoğalması ile ölüm arasındaki dengesizlikten oluşmaktadır. Aynı zamanda geri dönüşümsüz bir şekilde zarar görmüş hücre için en iyi savunma mekanizması olan apoptoz yeteneği kaybedildiğinde hasarlı DNA'ya sahip hücreler meydana gelmekte ve çoğalma devam etmektedir (Corn ve El-Deiry, 2002). Apoptozu uyaran ve inhibe eden genlerdeki bir mutasyon ise kansere neden olmaktadır (Rajeshkumar, 2016; Villanueva ve ark., 2013; Yokuş ve Ülker, 2012).

1.1.2. Kanserde Rol Oynayan Risk Faktörleri

Kanserin risk faktörleri çevresel ve genetik faktörlerden oluşmaktadır. Çevresel faktörler içerisinde radyasyon, pestisit maruziyeti olduğu gibi yaşam şekline bağlı faktörlerde mevcuttur. Bunlar sigara içmek, alkol tüketmek, sebze ve meyve oranı düşük diyet, fiziksel aktivite yetersizliği gibi yaşam tarzıyla ilgili

faktörlerdir. Genetik bozukluklar da kanser için risk faktörü olabilmektedir. Wiskott-Aldrich ve Beckwith-Wiedemann sendromları gibi bağışıklık sistemini etkileyen genetik bozukluklar da kansere yol açabilmektedir. Bunların dışında belirli virüslere maruziyet de risk faktörü olabilmektedir. Epstein-Barr, HIV gibi virüslerin çocukluk dönemlerinde görülen kanser türleri ile bağlantılı olduğu düşünülmüş ve olasılıkla virüsün hücrelerde değişikliklere yol açtığı sonrasında bu değişen hücrelerden yine değişmiş hücreler meydana geldiği ve bu hücrelerden de kanserli hücrelerin oluştuğu sonucuna varılmıştır (Goyal ve Kumar, 2014). Virüs maruziyetinin risk faktörü olduğunu bir başka örnekle de açıklamak mümkündür. Bu kanserlerden biri de Hepatit B ve Hepatit C virüslerinin oluşturduğu hepatoselüler karsinomadır (Breuhahn ve ark., 2011).

1.1.3. Kanser Tedavi Seçenekleri

Küresel çapta kanser tedavisinde kullanılan temel tedavi yöntemleri; cerrahi yöntemler, radyasyonla tedavi, kemoterapi ve immunoterapidir (Masood, 2016). Cerrahi operasyon kanser tedavisinde en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Hastalıktan etkilenmiş doku vücuttan çıkarılmakta ve beraberinde radyoterapi ve kemoterapi ile tedaviye devam edilmektedir. Radyasyonla tedavide gama ışınları, yüklü parçacıklar yardımıyla kanserli bölgeye yüksek enerjili radyasyon ışınları gönderilmektedir. Vücudun iç ya da dış kısmından olacak şekilde uygulanabilmektedir. Bu tedavi kanserli doku hücrelerinin gen yapısını bozarak çoğalmasını önlemeyi sağlamak ve kullanılan ışınlarla oldukça duyarlı tümörlü yapı yok edilmektedir. Kemoterapi ise kanserli hücre ya da dokunun ilaçla tedavisini ifade etmektedir (Goyal ve Kumar, 2014). Düşük molekül ağırlığına sahip kemoterapötik ilaçlar yüksek farmakokinetik dağılım hacmi sergilerler bu sebeple sitotoksosite lehine sonuçlar doğurmaktadırlar. Bu ilaçlar vücuttan hızlı bir şekilde elimine edildiklerinden sitotoksosite oluşturacak terapötik yanıt oluşturmak için daha yüksek derişimde kullanılmaları gerekmektedir (Kumari ve ark., 2016). Kullanıldıkları yüksek doz seviyesi ile oldukça yüksek sitotoksosite kapasitesine sahip ilaçlar kullanıldığından çoğu zaman normal doku ve hücrelerde zarar görebilmektedir.

Kullanılan ilaçlar hücre bölünmesine etki etmektedir dolayısıyla sürekli bölünme özelliğine sahip doku ve hücrelerde birtakım istenmeyen yan etkiler oluşmaktadır. Kemik iliği hücreleri, gastrointestinal sistem ve saç folikülleri bunlardan bazılarıdır (Souto, 2011). İmmunoterapi geleneksel tedavilerle kıyaslandığında yeni bir tedavi şekli olup vücudun bağışıklık sistemi ile entegre olan kanserle savaşan hücrelerin ortadan kaldırılmasına yönelik olarak kullanılanlar interferon, monoklonal antikorlar, aşılarda, gen terapisi, interleokinlerdir (Goyal ve Kumar, 2014).

1.1.4. Kanser Tedavisinde Siklooksijenazların Yeri ve Önemi

Kanserin başlaması ve ilerlemesi; hücre proliferasyonu, hücre göçü, kan ya da lenf damarlarına doğru yayılım, metastaz oluşmuş bölgelerde yapışma ve sonuç olarak tekrar tümör oluşumu meydana gelmesi şeklinde kademeli olaylardır. Kanser başlangıç bölgesinde ve yeni tümör oluşan bölgelerde tümör hücresinin fonksiyonları; büyüme faktörleri ve reseptörleri, kemokinler, nükleer reseptörler, hücre-hücre etkileşimleri, hücre-matris etkileşimleri ve araşidonik asitten oluşan prostaglandinler gibi öncüller ile kontrol edilmektedir. COX ve lipooksijenazlar (LOX) ile bu enzimlerden araşidonik asitten üretilen eikosanoid ürünü prostanooidlerin tümör hücreleri tarafından da oluşturulduğu gözlemlenmiştir ve bu enzimlerin hücre büyümesini, hücrenin yaşamını sürdürebilmesini, göçünü düzenlediği bulgusu, kanser tedavisinde rol oynayabileceklerini düşündürmüştür. 1980'li yılların sonlarına kadar tek bir COX şekli bilinirken 1990'lı yıllarda COX-2 adıyla bir COX izoformu daha tanımlanmıştır (Schneider ve Pozzi, 2011). Günümüzde ise COX enziminin vücutta artık üç çeşidi bulunduğu öne sürülmektedir. Bunlar araşidonik asidi prostaglandinlere dönüştüren COX-1, COX-2 ve yeni izoform COX-3'tür (Günaydın ve Bilge, 2018). COX-1 vücudun birçok dokusunda yapısal olarak sentezlenerek fizyolojik süreçlere katılmaktadır (Hidalgo-Estévez ve ark., 2020). Gastrointestinal sitoproteksiyon, böbreklerde vazodilastasyon, trombositler tarafından agregatif prostanooid tromboksan üretimi bu fizyolojik süreçlerden bazılarıdır (Kapoor ve ark., 2010). COX-2; makrofajlar, enflamatuvar sitokinler büyüme faktörleri ile uyarılarak 10-80 kat artmakta ve iltihaplı dokularda bulunmaktadır (Günaydın ve Bilge, 2018;

Subongkot ve ark, 2003). COX-2 yalnızca enflamasyon sırasında oluşan bir enzim değil böbrekler gibi sağlıklı organlarda az miktarda bulunabilen bir enzimdir. COX-3 omurilik ve serebral korteksten salgılanan endotel hücreleri, monositler ve kalpte bulunabilen COX-1 ile aynı genden meydana gelen şekli olmasına karşın işlevi halen kesin olarak saptanamamıştır (Günaydın ve Bilge, 2018). COX ve LOX, tümör hücresi proliferasyonu, büyümesi, hücrenin yaşamını devam ettirmesinde direkt olarak rol oynayarak tümörjenez meydana getirmektedirler (Schneider ve Pozzi, 2011). Ayrıca COX-2 izoformunun aşırı ekspresyonu çoğu kanserde oluşmakta ve tümörün ileri seviyelere ulaşmasında rol oynamaktadır (Thomas ve Morton, 2017). COX-1 izoformunun kanserdeki potansiyel rolüne nispeten daha az yer verilmesine karşın cilt ve bağırsak kanserlerinde etkisi kanıtlanmıştır. COX-1; göğüs, prostat, yumurtalık kanserlerinde artan düzeydedir ve yapılan araştırmalar COX-1 geninin yok edilmesi sonucu Min farelerinde intestinal tümörjenez seviyesinin azaldığını ortaya koymuştur (Cervello ve Montalto, 2006).

1.1.5. Kanser Tedavisinde COX İnhibitörlerinin Rolü

Steroid olmayan antienflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) analjezik, antipiretik ve antienflamatuvar etkinlik göstermektedirler (Günaydın ve Bilge, 2018). NSAİİ'ler COX enziminin güçlü inhibitörleridir (Li ve ark., 2009). Bu gruptaki moleküller kanserin önlenmesi için gelecek vaat etmektedir. Bu bulgu, tümör hücrelerinin büyümesini uyaran prostaglandinlerin oluşumunu inhibe etmelerinden kaynaklanmaktadır (Denda ve ark., 1997). Ayrıca bilim insanlarının neoplastik bölgelerde tespit ettikleri artmış prostaglandin seviyeleri bu ajanların ve metabolitlerinin tümör oluşumuna katkıda bulunduklarını ortaya koymuştur (Hawk ve ark., 2002). Prostaglandinler ateş, ağrı, enflamasyon öncülleridirler (Günaydın ve Bilge, 2018). Kronik enflamasyon ise kanser için temel bir risk faktörü olarak tanımlanmaktadır. Antienflamatuvar bir ajanın kullanımı bu patogenezin önüne geçmekte ve tümör oluşumu engelleyen şekilde sonuçlar vermektedir (Shiff ve ark., 2003). Prostaglandin seviyesinin azalması hücre proliferasyonunun engellenmesi ve

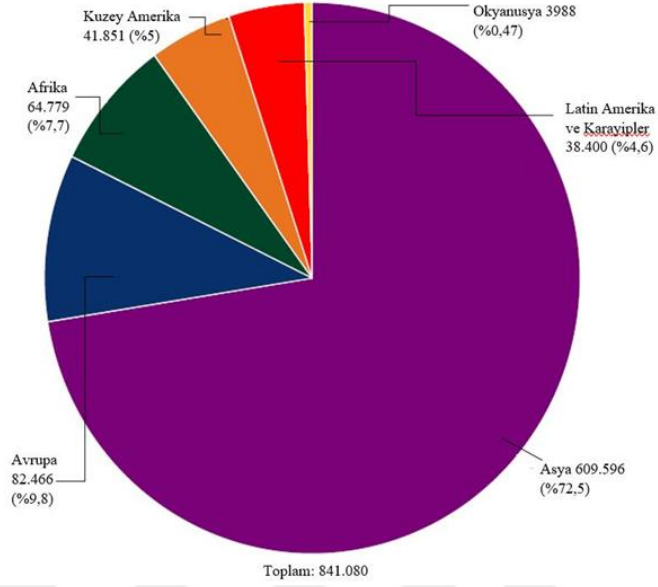
anjiogenezin inhibisyonu ile sonuçlanmakta ve NSAİİ'ler böylelikle antitümör etkilerini göstermektedirler (Schmidt ve ark., 2001).

Li ve ark. (2009) tarafından NSAİİ grubundan bir etken madde olan ibuprofen ile tümör anjiogenezi üzerine çalışılmış ve ibuprofenin prostaglandin sentezini engellemesinin yanı sıra hücre içi anjiogeneze de inhibe edici etkisinin olduğu sonucuna varılmıştır. Kolorektal kanserde uzun süreli aspirin ve NSAİİ kullanımı riski %40-%50 oranında azaltmaktadır (Kapoor ve ark., 2010). Leahy ve ark. (2002) tarafından sıçan korneasında selektif COX-2 inhibitörü selekoksib ile yapılan bir çalışmada ise antiproliferatif bulgular elde edilmiş ayrıca tümör hücrelerinin apoptozunda da artışlar saptanmıştır. Goldman ve ark. (1998) tarafından yine farelerde HCA-7 hücre hatlarında yapılan bir başka çalışmada meloksikam ile tedaviden dört hafta sonra tümör boyutlarında %51 oranında azalma belirlenmiştir. Anderson ve ark. (2002) tarafından pankreas kanserine yönelik olarak yapılan bir araştırmada ise yedi yıl boyunca araştırmaya katılanların verileri takip edilerek aspirin kullanımının kemopreventif olabileceği sonucuna varılmıştır.

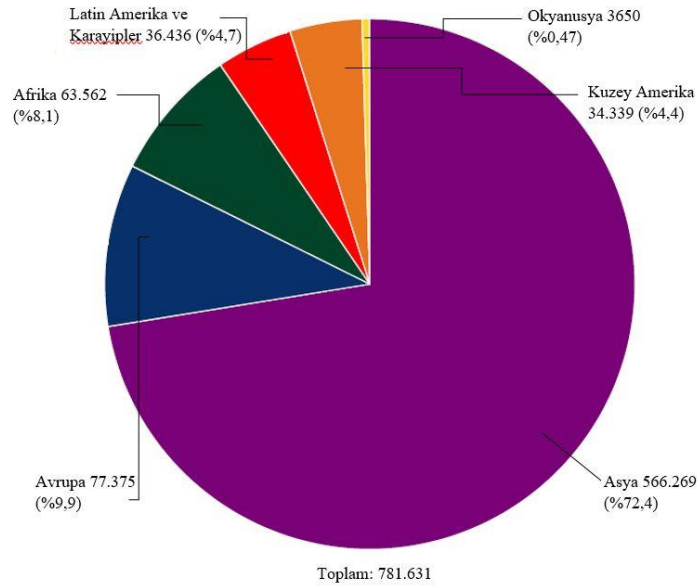
1.2. Hepatosellüler Karsinom

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı verilerine göre karaciğer kanseri dünya üzerinde insidans oranı olarak tüm toplum üzerinde kanser çeşitleri içerisinde beşinci sırada yer almaktadır. Mortalite oranları göz önünde bulundurulduğunda ise üçüncü sırada bulunmaktadır (Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı, 'Cancer', Erişim: 15 Ekim 2020). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2018 verilerine göre karaciğer kanserinin dünyada her iki cinsiyet ve yaş gruplarında insidans oranları Şekil 1.3'te, mortalite oranları Şekil 1.4'de görülmektedir. Hepatosellüler karsinom, dünya çapında en sık görülen primer karaciğer kanseri türüdür ve karaciğer kanseri vakalarının %75'ini oluşturur. Hepatosellüler karsinom ilerleyen evrelerine kadar spesifik bir semptom göstermeyen oldukça agresif bir hastalıktır (Al-Shakarchi ve ark., 2018). Uzun bir latent dönemine sahip olduğu için hepatosellüler kanser gelişen hastalara tanı konduğunda hastalık orta ya da ileri seviyeye ulaşmış durumdadır. Bu sebepten ötürü

bu aşamadan önce tedavi edilmesi oldukça güç bir hastalıktır (Zhang ve ark., 2016). Tanı konduktan sonraki beş yıllık hayatta kalma oranı ise %5'ten daha azdır (Li ve ark., 2015).



Şekil 1.3. Karaciğer kanserinin kıtalara göre insidans dağılımları (Global Cancer Observatory, (GCO), Cancer Today, Erişim: 30 Kasım 2020).



Şekil 1.4. Karaciğer kanserinin kıtalara göre mortalite dağılımları (Global Cancer Observatory, (GCO), Cancer Today, Erişim: 30 Kasım 2020).

Hepatoselüler karsinom, teşhis edilene kadar semptom göstermemekte ancak semptom gösterdiğinde de ateş, gözde ve ciltte sarılık, karında ağrı ve şişme halsizlik, kilo kaybı gibi kronik karaciğer hastalıklarında görülebilen belirtileri göstermektedir. Asemptomatik hastalarında tespit edilebilmesi amacıyla bu hastalığın risk grubuna giren kişilere belirli periyotlarda hepatoselüler karsinom taraması yaptırmaları tavsiye edilmektedir. Bu taramada serum alfa-fetaprotein testleri, ultrason, MRI ve CT yer almaktadır (Janevska ve ark., 2015). Patolojik tanı ise tümörlü dokudan biyopsi ve söz konusu dokunun etrafındaki parankimi de kapsamaktadır (Verslype ve ark., 2012). En başarılı tedavi için hastalığın oldukça erken evrelerde tespit edilmesi önemlidir (Balogh ve ark., 2016).

Karaciğer kanserine yönelik çeşitli klinik ve patolojik evrelendirme sistemleri bulunmaktadır. Bunlar arasında en kabul gören ve kullanılan evrelendirme sistemi Barselona Klinik Karaciğer Kanser (BCLC) evrelendirme sistemidir (Balogh ve ark., 2016). Bu sistem hepatoselüler karsinomlu ve siroz öyküsü olan hastalarda kullanılmaktadır. Hastalık evre 0, A, B, C ve D olarak gruplandırmıştır. Evre 0 ve A grubu küratif tedavilerden yarar görebilecek hasta grubunu temsil ederken evre D yaşam kalitesini de düşürecek düzeyde ilerlemiş seviyeyi ifade etmektedir (Verslype ve ark., 2012).

1.2.1. Hepatoselüller Karsinomda Risk Faktörleri

Hepatoselüler karsinomanın başlaması ve ilerlemesine neden olan risk faktörleri Hepatit C ve B viral enfeksiyonları ile hemokromatoz gibi genetik hastalıklar, cinsiyet, coğrafi bölge, diyabet öyküsü, alkol tüketimi, sigara, obezite, aflatoksin maruziyeti gibi etkenlerdir (Balogh ve ark., 2016; Breuhahn ve ark., 2011; Hatzaras ve ark., 2014). Bu risk faktörleri arasında Hepatit B ve C virüsü, alkol tüketimi ve buna bağlı olarak da gelişebilen siroz, aflatoksin maruziyeti öne çıkmaktadır. O kadar ki hepatoselüler karsinoma vakalarının %50'sini Hepatit B enfeksiyonu, %25'ini Hepatit C enfeksiyonu oluşturmaktadır (Janevska ve ark., 2015).

Hepatit B enfeksiyonuna yol açan virüs DNA virüsüdür ve kendi genetik materyalini bulunduğu hepatik hücreye aktarabilmektedir. Bu sebeple doğrudan genetik yapıyı değiştirebilmektedir. Hepatit B öyküsünün hepatoselüler karsinoma oranını artırmadaki temel sebebi de bu durumdur (Janevska ve ark., 2015). Meydana gelen genetik hasar kansere yol açmaktadır (Marrero ve ark., 2018). Hepatit B virüsünde taşıyıcı olmak dahi hepatosellüler karsinom riskini 223 kat artırmaktadır (Balogh ve ark., 2016).

Hepatit C enfeksiyonuna yol açan virüsün RNA virüsü olması konak hücreye entegrasyona imkan vermediği için apoptoz yolağı ya da tümör oluşumunda değişikliklere yol açma gibi nedenlerle hepatoselüler karsinom tablosu oluşmaktadır. (Janevska ve ark., 2015). Bu enfeksiyonla karşılaşmış bireylerde virüs ilk etapta kaybolmamakta ve enfeksiyon kronikleşmektedir. Böylelikle devamlı enflamasyon ile hepatosit rejenerasyonunu takip eden siroz gelişmektedir. Bu ilerleyiş, kromozomlarda hasar oluşturmakta ve hepatokarsinogenez meydana gelmektedir (Gomaa ve ark., 2008).

Günlük ağır alkol tüketiminin uzun süre boyunca devam etmesi hepatosellüler karsinomaya yol açmaktadır (El-Serag ve Kanwal, 2014). Aflatoksin ise iklim ve saklama koşullarına bağlı olarak nemli ve sıcak ortamlarda tahıl ürünleri, baklagil grubu besinler, mısır ya da yer fıstığı gibi ürünlerde *Aspergillus* türü mantarların ürettiği bir toksindir. Aflatoksin maruziyetinin yüksek seviyede olduğu bölgelerde hepatosellüler karsinom düzeyinin de yüksek olması risk faktörü olarak düşünülmeye yol açmıştır (Balogh ve ark., 2016; Gomaa ve ark., 2008).

Cinsiyete bağlı olarak hepatoselüler karsinom gelişme riskinin erkek bireylerde daha yüksek gözlemlenmesinin temel nedeni kadın bireylere göre daha fazla alkol tüketimleri, sigara içmeleri ve nispeten daha yüksek vücut kitle endeksine sahip olmaları ile ilişkilidir (Balogh ve ark., 2016). Fakat bu risk hormonlara da bağlıdır. Erkek bireylerde bulunan yüksek testosteron hormonu seviyesi hepatosit hücre siklusu lehine işlev gösterir ve hepatokarsinogenezin oluşumuna hız katmaktadır.

Kadın bireylerde bulunan östradiol hormonu ise hücre siklusu düzenleyicilerini inhibe edici etki gösterdiğinden karaciğer kanseri riskini azaltmaktadır (Marrero ve ark.,2018).

1.2.2. Hepatosellüler Karsinomda Tedavi Seçenekleri

Tedavi seçenekleri arasında girişimsel yöntemler olarak cerrahi rezeksiyon, karaciğer transplantasyonu sayılabilirken, cerrahi işlem gerektirmeyen seçenekler olarak da transarteriyal kemoembolizasyon (TACE), transarteriyal radyoembolizasyon (TARE) ve sistemik tedaviler yer almaktadır (Balogh ve ark., 2016; Marrero ve ark., 2018). Hepatosellüler karsinomun tedavisinde hangi yöntemin kullanılacağı, tümörün morfolojisine ve bulunduğu bölgeye, etrafındaki dokularla ilişkisine, tümör miktarına, damarlanma durumuna ve altta yatan karaciğer fonksiyonuna göre değişmektedir. Teşhis konulan hastalarda hastalık ilerlemiş durumda olduğu için bu durum uygulanan tedavilerden alınabilecek olumlu yanıtı zorlaştırmaktadır (Hatzaras ve ark., 2014).

Cerrahi rezeksiyon hastalığın erken evrelerinde bulunan ve yeterli karaciğer fonksiyonuna sahip olan kişilere uygulanmaktadır ve % 60'ın üzerinde beş yıllık sağkalım oranı sağlamaktadır (Flores ve Marrero, 2014). Karaciğer nakli de hastalığın erken evresindeki hastalar için son derece etkin bir tedavidir ancak organ bağışının az olması bu yöntemin uygulanabilirliğini kısıtlamaktadır (Marrero ve ark., 2018). TACE intraarteriyal girişimle uygulanan bir tedavidir. Tümör beslenmesini sağlayan arteriyal uzantılara kemoterapötik ilaçların doğrudan verilmesi temel tedavi seçeneğidir ve söz konusu bölgede spesifik embolizasyon oluşturmaktadır. Tatbik edilen kemoterapötik ilacın etkisi ve oluşan iskemi tümörde nekroz meydana getirmektedir (Hatzaras ve ark., 2014).

Transarteriyal radyasyonda Yttrium-90 adlı bir radyoizotop transarteriyal kemoembolizasyondakine benzer yollarla tümör dokusuna uygulanmaktadır (Balogh ve ark., 2016). Böylelikle minimum seviyede cerrahi girişimle tedavi gerçekleşmiş

olmaktadır (Marrero ve ark., 2018). Bu tedavi seçenekleri erken ve bazen orta seviye hepatosellüler karsinoma uygulanabilmektedir (Flores ve Marrero., 2014).

Sistemik tedavi ise rezeksiyona, karaciğer nakline, arteriyal girişimlere izin vermeyen ileri aşama hepatosellüler karsinomda kullanılmaktadır. Sistemik tedavi kemoterapötik ilaçlarla tedaviyi kapsamaktadır. Bu amaçla günümüzde en sık kullanılan ilaç ise sorafenibtir (Balogh ve ark., 2016). Sorafenib, Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış bir ilaçtır ancak çeşitli yan etkilere de sahiptir (Shoshan ve ark., 2019). En yaygın rastlanan yan etkiler ishal, halsizlik, el ve ayak derisinde reaksiyonlardır (Bruix ve Sherman, 2011).

1.2.3. Hepatosellüler Karsinom Tedavisinde COX İnhibitörlerinin Yeri

Tümör dokularında yüksek düzeyde COX-1 ve COX-2 izoformlarının bulunması ve bu enzimlerin prostaglandin oluşumunda rol oynamaları, hepatosellüler karsinom tedavisinde COX inhibitörlerinin kullanılabilirliğinin araştırılmasının yolunu açmıştır. COX-2 enzimi hücre proliferasyonu, apoptoz ve angiogeneze etkilidir. Hücre proliferasyonunda etkili olmasının sebebi ise prostaglandinlerin oluşumunda görev almasından kaynaklanmaktadır. Prostaglandin düzeyi sıçan hepatositleri ve insan hepatosellüler karsinom hücre proliferasyonunda artmaktadır. Hepatosellüler karsinom açısından farklılaşmış dokular ve normal dokular kıyaslandığında farklılaşmış dokularda yüksek oranda COX-2 enzimi tespit edilmiştir. Dolayısıyla COX-2 enzim inhibisyonu, bu ajanların hepatosellüler karsinom tedavisinde kullanımını akla getirmektedir. Bu yaklaşım, COX-2 enzim inhibisyonunun hepatom hücre büyümesinin baskılanmasını da indüklediğini gösteren verilerle desteklenmektedir (Cervello ve Montalto, 2006).

Cervello ve Montalto (2006) tarafından yapılan çalışmalarda COX-1 enzim inhibisyonunun da hepatosellüler karsinomda etkili olabileceği bulunmuştur. Hepatosellüler karsinomlu doku ve etrafındaki sağlam dokular COX-1 enzim içeriği açısından değerlendirilmiş ve farklılaşmış hepatosellüler karsinom hücrelerinde

oldukça yüksek oranda COX-1 ekspresyonu ile karşılaşmıştır. Bu durum COX-1 enzim varlığının erken dönem hücre büyümesinde rol oynayabileceğini göstermiştir.

1.3. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nanopartikül kavramı bilim dünyasına 1960'lı yıllardan sonra girmiştir. Nano ölçekli materyallerin ilaç tedavisinde kullanılabileceği fikri alman bakteriyolog Paul Erlich tarafından öne atılmış, 1959'da Amerikan Fizikçiler Derneği toplantısında fizik bilim insanı Richard Feynman'ın 'aşağıda çok yer var' söylemi ile günümüze girmiştir (Chugh ve ark., 2018).

Nanopartiküller boyutları 1-1000 nm arasında değişen, fizik, kimya, biyoloji ve tıp gibi farklı alanlarda kullanılabilen çeşitli nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler için kullanılan genel bir ifadedir. Bu sistemler alışlagelmişin dışında optik, mekanik, termal ve manyetik özelliklere de sahip olabilmektedirler (Goyal ve Kumar, 2014; Kumari ve ark., 2016). Taşıdıkları bu özellikler farmasötik, terapötik ve biyoteknolojik çalışmaların yanı sıra tıbbi görüntüleme, biyomedikal ve teşhis alanlarında da kullanılma imkanı sunmaktadır (Kadian, 2018; Liu ve ark., 2019).

Nanopartiküller, kullanım alanlarına yönelik yelpazenin geniş olmasıyla, boyutlarıyla, şekil özellikleriyle, farklı tasarımlara fırsat veren nano ölçekli sistemlerdir. Çok küçük boyutlarda olabilmeleri ve kullanım amaçlarına göre boyutlarının ayarlanabilmesi, yüksek yüzey alanları, hedefe yönelik farklı ligandlarla yüzey özelliklerinin modifiye edilebilmesi, farklı şekil özelliklerine sahip olabilmeleri dolayısıyla ilaç taşıyıcı sistemler olarak yoğun şekilde araştırılmaktadırlar (Kumari ve ark., 2016; Wang ve ark., 2020). Sahip oldukları küçük ve kontrol edilebilir boyut özellikleri, taşıdıkları terapötik ajanın in vivo biyodağılım özelliklerinde de önemli işlevler göstermektedir (Kadian, 2018; Kumari ve ark., 2016).

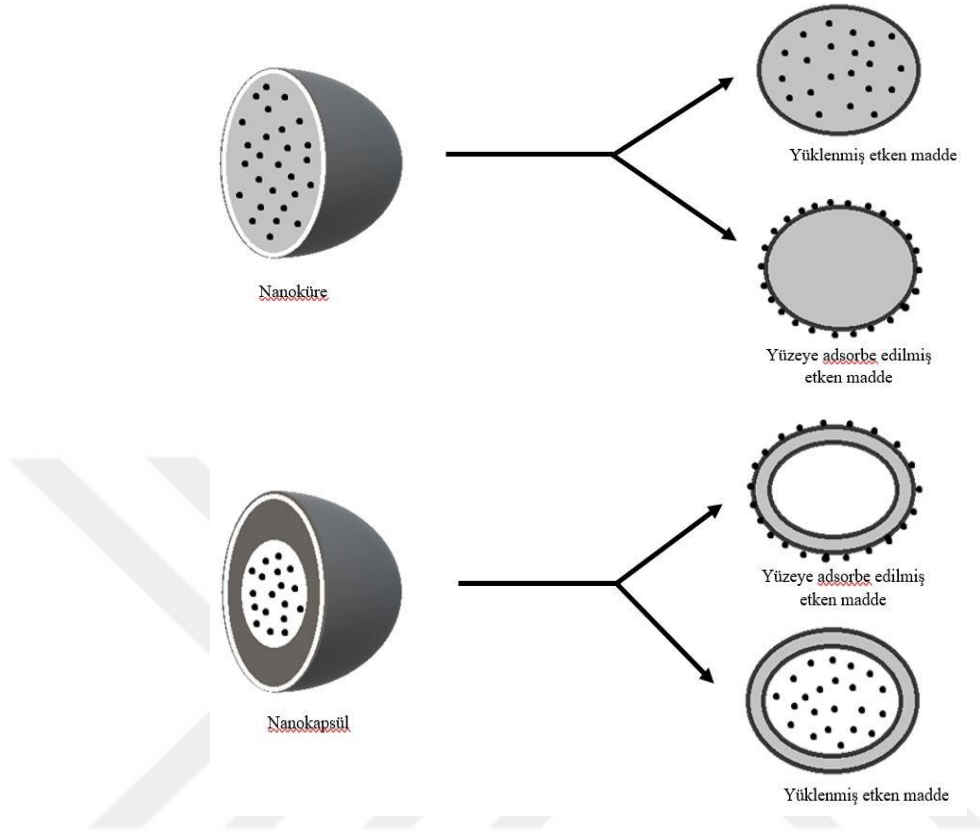
Yüklenmiş etken maddenin stabilitesini artırabilmekte, biyoyararlanım profilini iyileştirebilmekte ve dozlama sıklığını azaltabilmektedirler (Kadian, 2018). Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemin boyut dağılımı, retiküloendotelyal sistem vasıtasıyla açığa çıkan etken maddenin sistemik dolaşıma katılabilmesini sağlamaktadır (Kumar ve ark., 2017). Ayrıca boyutları karaciğer ve böbrek klirensinde de etkilidir. Nano boyutları sayesinde artmış spesifik yüzey alanları, etken madde ile biyolojik membranların etkileşimlerinin ve çözünürlük özelliği zayıf olan moleküllerin emilim miktarının artmasını sağlamaktadır (Kumari ve ark., 2016; Wu ve ark., 2018). Etken maddenin hedeflendirilebilmesi ve kontrollü salım profilinin temin edilmesi ilaçların farmasötik ve terapötik özelliklerinin iyileştirilebilmesi açısından önemli bir yaklaşımdır (Foroud ve ark., 2018).

1.3.1. Polimer Bazlı Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Polimerik yapılı nanopartiküller; lipozomlar, niozomlar, miseller, nanoemülsiyonlar gibi diğer ilaç taşıyıcı sistemlerle karşılaştırıldıklarında nispeten daha yüksek kimyasal ve biyolojik stabilite göstermektedirler. Ayrıca etken madde salım özellikleri de daha kolay modifiye edilebilmektedir. Bu sebepler ilaç taşıyıcı sistemler arasındaki kullanımlarını yaygın hale getirmektedir (Contreras-Cáceres ve ark., 2019; Kandasamy ve ark., 2019). Polimerik nanopartiküller boyut özellikleri, kullanım amacına göre yüzey özelliklerinin modifiye edilebilmesi, hedeflendirilebilmeleri ve kontrollü salım sağlayabilmeleri sayesinde özellikle kanser terapisinde oldukça öne çıkan sistemler olmuşlardır (Ahmad ve ark., 2018; Liechty ve Peppas, 2012; Masood, 2016).

Polimerik nanopartikülleri hazırlama yöntemlerine göre nanoküre ve nanokapsüller olarak sınıflandırmak mümkündür. Nanoküreler tamamı katı halde olan ve etken maddenin fiziksel olarak homojen şekilde polimerik matris içinde dağıldığı sistemlerdir (Mohanraj ve Chen., 2006; Rao ve Geckeler, 2011). Nanokapsüller ise etken maddenin polimer yapı ile çevrili bir kabuk içerisindeki yağ

veya sudan oluşan bir boşlukta bulunduğu veziküler sistemlerdir (Rao ve Geckeler, 2011). Nanoküre ve nanokapsül yapıları Şekil 1.5’de görülmektedir.



Şekil 1.5. Nanoküre ve nanokapsül yapıları (Derman ve ark., 2013).

Polimer bazlı nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin avantajlarını; hedeflendirmeye olanak sağlamalarından dolayı spesifik ilaç tedavisine izin vermeleri, toksisitenin düşürülmesi, biyouyumluluk göstermeleri, daha uzun süre kan dolaşımı temin edebilmeleri, yüksek oranda ilaç yükleme kapasitesi sağlamaları ve etken maddelerin farmakokinetik profillerinin iyileştirilmesi şeklinde sıralamak mümkündür. Ayrıca kontrollü salım temin edebilmeleri ve hedeflendirilebilmeleri daha düşük dozla daha etkin tedavi elde edilmesini sağlamaktadır. Daha düşük dozda ilaç kullanımı da toksisitenin azalmasında temel bir etkidir. Tüm bu avantajlar özellikle kanser tedavisinde polimerik nanopartiküllerin tercih edilebilirliğini artırmaktadır (Kumari ve ark., 2010; Liechty ve Peppas, 2012; Mandal ve ark., 2018; Masood., 2016).

1.3.2. Kanser Tedavisinde Nanopartiküller ve Polimer Bazlı Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Yeri

Konvansiyonel kanser terapisi; hastalığın erken dönemde tespitinin düşük olması, tümör hücresinde gerekli miktarda etken madde derişiminin sağlanamaması, spesifik olmayan dağılımın gözlenmesi gibi dezavantajları içermektedir (Goyal ve Kumar, 2014). Yaygın tedavi yöntemi olan kemoterapi ise yüksek derecede sitotoksik ilaçların kullanılması ve bu ilaçların hedefleme özgünlüğünün yetersizliği gibi önemli sınırlamalara sahiptir. Bu durum sağlıklı dokularda da hasara ve istenmeyen yan etkilere sebep olmaktadır. Saç dökülmesi, mide problemleri ve kusma, yorgunluk hissi gibi hastanın yaşam kalitesini düşüren durumlar hatta ikincil neoplazmalar dahi görülebilmektedir (Goyal ve Kumar, 2014; Kumari ve ark., 2016). Ayrıca bir başka kısıtlama da antikanser moleküllerin fizikokimyasal özellikleri ile ilgilidir. Bu moleküllerin çoğu hidrofobik özellikte olup düşük çözünürlük özelliği ve stabilite problemleri göstermektedirler (Xia ve ark., 2017). Tüm bu olumsuzluklar alternatif bir sistem arayışına yol açmaktadır. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler bu yaklaşım doğrultusunda ise kanser tanı ve tedavisi için oldukça yüksek avantajlar sunmaktadırlar (Kumari ve ark., 2016).

Nanopartiküllerin aktif ve pasif hedeflendirilebilmeleri, kanser tedavisinde bu sistemleri ideal ilaç taşıyıcı sistem haline getirmiştir. Nanopartiküller tümör bölgesi damar ağının artmış EPR (Geçirgenlik ve tutma etkisi) ile tümör dokusuna giriş yapabilmektedirler. Böylelikle pasif hedeflendirmeye istenilen bölgeye ulaşabilmektedirler. Ayrıca bölgeye özgü ligandlarla konjuge edilerek de istenilen tümörlü dokuya ulaşmaları temin edilmekte ve bu şekilde aktif hedeflendirilebilmektedirler (Chang ve ark., 2014). Klinik kullanımda FDA tarafından kaposi sarkom tedavisi için onaylanmış bir ürün olan Doxil, pasif hedeflendirilme mekanizmasına dayanarak geliştirilmiş bir nanopartiküler sistemdir (Stylianopoulos ve Jain, 2015; Wang ve ark., 2020).

Polimer bazlı nanopartiküller, biyolojik olarak parçalanabilmeleri, uzun süren kan dolaşımı temin edebilmeleri, yüksek düzeyde biyouyumluluk sergilemeleri, yüzeylerinin kolaylıkla işlevselleştirilebilmesi ile kanserin tanı ve tedavisinde ümit vaat eden sistemler olmuşlardır. Sudaki çözünürlük özelliği düşük olan etken maddelerin yüklendiği polimerik nanopartiküller tümör etrafından EPR etkisi ile hedef bölgeye alınmakta ve akabinde tümör hücresi içinde etken maddenin açığa çıkmasını temin edip biyolojik yollarla zaman içinde parçalanmaktadır (Kumari ve ark., 2016).

1.3.3. Hepatosellüler Karsinomda Nanopartiküler Sistemlerin Yeri

Hepatosellüler karsinom tedavisinde esas olan tedavi kemoterapi olarak görülmektedir (Li ve ark., 2015). Mevcut kemoterapötik tedavi rejimlerinde kullanılan etken maddelerin sahip olduğu zayıf su çözünürlüğü, düşük biyoyararlanım, istenmeyen yan etkiler ve toksisite ise temel sınırlamaları oluşturmaktadır (Al-Shakarchi ve ark., 2018; Poojari ve ark., 2015). Özellikle hepatosellüler karsinom hastalarında ilacın spesifikliğinin düşük olması sebebiyle sağlıklı karaciğer hücrelerinin zarar görmesi oldukça kritiktir ve karaciğer yetmezliği sonucu hasta kaybedilebilmektedir (Zamboni ve ark., 2017).

Mevcut tedavi rejimlerinin malignite ve metastazları önlemede yetersiz kalması, yüksek biyoyararlanım, daha etkili hedeflendirme, azaltılmış yan etki gerekliliği alternatif tedavi seçeneklerinin gelişmesine yol açmıştır (Chu ve ark., 2016; Jin ve ark., 2014; Taghizadeh ve ark., 2019). Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler hepatosellüler karsinomla mücadelede umut verici bir yaklaşım olarak görülmektedir. (Ahmadian ve ark., 2018). Son yıllarda hedeflendirme kapasitesi yüksek, sürekli ilaç salınımı sağlayabilen, biyolojik olarak parçalanabilir özellikteki polimerik nanopartiküller ise bu alanda öne çıkan en temel taşıyıcı sistemlerdir (Jin ve ark., 2014).

Li ve ark., tarafından yapılan bir çalışmada, 5-Florourasil yüklü nanopartiküllerin HepG2 hücrelerindeki antikanser etkinlikleri irdelenmiş ve sonuçlar tek başına 5-Florourasil ile inkübe edilmiş HepG2 hücrelerine kıyasla nanopartiküler sistemlerin uygulandıkları hücrelerde daha yüksek oranda 5-Florourasil içeriğinin tespit edildiğini göstermiştir (Li ve ark., 2016). Yapılan bir başka çalışmada ise beta trikalsiyum fosfat nanopartiküllerinin HepG2 hücrelerindeki antiproliferatif etkisi incelenmiştir. Beta trikalsiyum fosfat yüklü nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem HepG2 hücrelerinin siklusunu engellemiş ve 40 mg/kg gibi yüksek bir dozda uygulama yapılmasına rağmen herhangi bir toksik etki gözlenmemiştir (El-Hamıdy, 2020).

1.4. Nanopartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler

Polimerler tıbbi uygulamalarda kullanılabilen nanopartikül yapılarına entegre edilebilen sayıca çok ve çeşitli moleküllerin tasarımları için elverişli malzemelerdir (Nagavarma ve ark., 2012). Özellikle tıbbi kullanımda in vivo performans açısından çeşitli gereksinimleri karşılamaları gerekmektedir. Öncelikle biyolojik olarak parçalanabilmeli, vücutta toksisiteye yol açacak tarzda birikim göstermemeli, immunojenik olmamalı ve biyolojik ortamla uyumlu olmalıdırlar. Bozunma ürünleri de benzer şekilde toksik ve immunojenik olmamalıdır (Vauthier ve Bouchemal, 2009). Polimerlerin ilaç taşıyıcı sistemler şeklindeki uygulamalarında biyolojik olarak parçalanabilirlikleri ve biyoyumlulukları büyük rol oynamaktadır. Biyobozunur polimerler doğal yollarla vücuttan tamamen atılabildikleri için avantajlıdırlar. Doğal polimerler de biyobozunur özellik göstermektedirler ve genelde biyoyumludurlar ancak düşüğe olsa immunojenik etkinlik gösterebilmektedirler (Crucho ve Barros, 2017).

Nanopartiküllerin hazırlanmasında doğal polimer olarak;

- Kitozan
- Albümin
- Jelatin

- Aljinat

Sentetik homopolimerler olarak;

- PLA
- PCL
- PICBA
- PIHCA
- PBCA
- Poliakrilat ve polimetakrilatlar

Kopolimer olarak;

- PLA-PEG
- PLGA-PEG
- PCL-PEG
- PLGA

Kolloidal yüzey etken maddeler olarak ise;

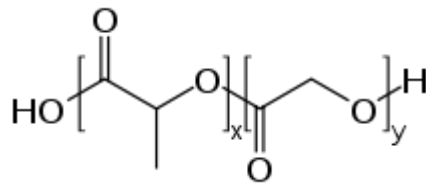
- Dekstran F68
- Polivinil alkol (PVA)
- Tween® 20 ya da Tween® 80,

kullanılabilmektedir (Crucho ve Barros, 2017; Derman ve ark., 2013).

1.4.1. Çalışmamızda Kullanılan Yardımcı Maddeler

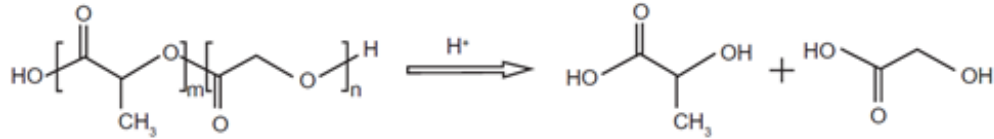
1.4.1.1. PLGA

Polilaktik-ko-glikolik asit, laktik asit ve glikolik asitin birbirlerine ester bağları ile bağlanmaları sonucu oluşan bir kopolimerdir (Şekil 1.6) (Amreddy ve ark., 2017).



Şekil 1.6. PLGA kimyasal yapısı (Koerner ve ark., 2019).

PLGA polimerini meydana getiren polilaktik asitin stereokimyasal açıdan D ve L şeklinde iki şekli bulunmaktadır ve PLGA yapısında bu iki şekil eşit oranda bulunmaktadır (Makadia ve Siegel., 2011). PLGA'nın hidroliz olması sonucunda açığa çıkan laktik asit ve glikolik asit monomerleri insan vücudu için toksik değildir ve bu durum PLGA'nın toksisitesinin minimum seviyede kalmasını temin etmektedir (Şekil 1.7) (Kumari ve ark., 2010).



Şekil 1.7. PLGA hidrolizi (Dinarvand ve ark., 2011).

PLGA farklı fizikokimyasal özellikteki etken maddelerin enkapsülasyonu için en çok tercih edilen biyoparçalanabilir ve biyouyumlu polimerdir. Klor içeren çözücülerin yanısıra aseton ve etil asetat gibi sıklıkla kullanılan çözücülerde de çözünebilmektedir. Camsı geçiş sıcaklığı 37°C'nin üzerinde olması nedeniyle camsı özelliktedir ve sert zincir yapısına sahiptir. PLGA'nın fiziksel özellikleri; saklama koşulları, molekül ağırlığı, laktik asit ve glikolik asit oranı gibi faktörlere göre değişkenlik göstermektedir. Mekanik direnci ise molekül ağırlığı ve polidispersite indeksinden etkilenmektedir. Bu direnci etkileyen diğer etmenler ise kristallik derecesi, hidrolize olma kapasitesi, biyolojik bozunma hızıdır. PLGA'nın bozunma hızını etkileyen faktörleri ise polimer bileşimi, camsı geçiş sıcaklığı, ortalama molekül ağırlığı, yüklenmiş olan etken madde miktarı, matris boyutu ve biçimi, pH ve enzimler olarak sıralamak mümkündür. Örneğin, laktik asit ve glikolik asit oranlarının değişkenlik gösterdiği PLGA polimerler tiplerinin bozunma oranları incelenmiş ve glikolik asit oranı arttıkça bozunma hızının arttığı sonucuna varılmıştır. Başka bir etken olan pH ise güçlü asidik ve güçlü bazik ortamlarda PLGA polimerinin bozunma hızını artırmaktadır. Etken madde içeriği yüksek olan matrislerde nispeten daha yüksek ani salım etkisi tespit edilmiş olmasına karşın belli bir seviyeden sonra etken maddenin fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak etken madde miktarının etkinliği azalmaktadır (Makadia ve Siegel, 2011).

PLGA, FDA tarafından onaylı bir polimerdir. Yapılan araştırmalar, PLGA ile hazırlanan nanopartiküllerin özellikle kanser tedavisinde etkin ilaç taşıyıcı sistemler olduklarını ortaya koymuştur. Paklitaksel, doksorubisin, 5-florourasil, sisplatin gibi antikanser moleküller PLGA ile enkapsüle edilmişler ve yüksek bir tedavi etkinliği göstermişlerdir (Kumari ve ark., 2010). PLGA göstermiş olduğu biyouyumluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve immunojenik olmayan yapısı dolayısıyla antikanser moleküller için uygun bir matris bileşeni olarak değerlendirilmiştir. Artmış geçirgenlik ve alıkonma etkisi sayesinde pasif hedeflendirme yaklaşımı ile, çeşitli ligandlar vasıtasıyla ise aktif hedeflendirme seğeneği açısından hedef tümör dokusunda birikebilme ve böylece sağlıklı dokularda toksisitenin azaltılmasına öncü olabilmektedir (Dinarvand ve ark., 2011).

1.4.1.2. Poloksamer 188

Poloksamer 188 amfifilik özellik gösteren noniyonik triblok bir kopolimerdir (Guler ve ark., 2017). Otuzdan fazla şekli bulunduğu bilinen poloksamerler içerisinde farmasötik uygulamalarda en çok tercih edileni Poloksamer 188'dir (Yan ve ark., 2010). Kapalı formülü $C_6H_{18}O_3$ ve moleköl ağırlığı 162.23 g/mol'dür (PubChem, Poloksamer 188, Erişim: 5 Aralık 2020). FDA tarafından kullanımı onaylanmış Poloksamer 188 ticari olarak Pluronic, Lutrol, Synperonic, Kolliphor isimleriyle de tanınmaktadır. Merkezinde hidrofobik polipropilen oksit zincirinden oluşan bir çekirdek yapı ve etrafında iki hidrofilik polietilen oksit zinciriyle çevrilidir (De Francisco ve ark., 2019; Panda ve ark., 2018). Çeşitli poloksamer türleri kullanılarak hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemler; özellikle tıbbi görüntüleme ve vasküler hastalıkların tedavi seçenekleri gibi birçok biyomedikal alanda kullanım payına sahiptir (Moghimi ve Hunter, 2000). Etken maddelerin biyoyararlanım profillerinin geliştirilmesinde ve nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin oluşturulmasında da etkin bir rolü bulunmaktadır. Poloksamer 188, bir yüzey etken madde olarak yapay kan çözeltisi bileşimlerinde, oküler formölasyonların ve katı dispersiyonların hazırlanmasında öncelikle tercih edilmektedir (De Francisco ve ark., 2019).

Panda ve ark. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada modifiye edilmiş nanoprespitasyon yöntemiyle metformin hidroklorürün PLGA nanokristal formülasyonları hazırlanmış ve farklı derişimlerdeki (% 0,5, % 0,75, % 1) Poloksamer 188'in etkisi araştırılmıştır. %1, % 2 ve % 3 derişimdeki PLGA oranlarına karşılık % 0,5, % 0,75, % 1 oranlarındaki Poloksamer 188 içeren formülasyonlar başarıyla üretilmiştir. Bu araştırmada Poloksamer 188 derişiminin nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı, yüzey morfolojisi, zeta potansiyel değeri ve salım profili üzerine etkinliği tayin edilmiştir. Araştırma sonucunda oluşan nanopartiküller dar bir boyut dağılımı sergilemişler ve Poloksamer 188 derişiminin artmasıyla partikül büyüklükleri ile yüzey yüklerinde düşüş gözlenmiştir. Poloksamer 188 derişimindeki artışın etken madde salımında da matris yapı içerisindeki difüzyon kanallarını artırarak birim zamanda açığa çıkan etken madde miktarını artırdığı sonucuna varılmıştır.

Yan ve ark. (2010) tarafından dosetaksel yüklü PLGA nanopartikülleri emülsiyon-çözücü buharlaştırma tekniği ile hazırlanmış ve Poloksamer 188 derişiminin nanopartikül boyutu, morfolojisi ile kanser hücreleri üzerindeki sitotoksite profili incelenmiştir. Çalışma sonucunda yaklaşık 200 nm civarında bir partikül boyutunun dar bir büyüklük dağılımı ile elde edildiği belirlenmiştir. Sadece PLGA içeren nanopartiküllerin partikül büyüklükleri 274.7 nm olarak tayin edilirken formülasyona Poloksamer 188'in katılması ile partikül büyüklüğünün 217.6 nm'ye indirildiği belirlenmiştir. Poloksamer 188 hidrofilik özelliği sayesinde PLGA matris yapısı içerisinde üretim esnasında gözenekli bir yapı oluşturmuştur. Dosetaksel'e dirençli insan göğüs kanseri hücre hattında (MCF-7 TAX 309) gerçekleştirilen hücre kültürü deneyleri sonucunda tek başına PLGA içeren nanopartikül formülasyonuna kıyasla kanser hücreleri üzerinde daha yüksek bir antiproliferatif etkinlik elde edilmiştir.

1.5. Polimerik Nanopartikülleri Hazırlama Teknikleri

Son yıllarda polimerik nanopartiküllerin hazırlanması için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (Nagavarma ve ark., 2012). Bu yöntemlerin oluşturulmasındaki ana

etkenler daha az organik çözücü kullanma gerekliliği, daha ekonomik düzeyde üretim teknikleri yaratmak, üretim ölçeğini büyütme imkanı sağlayan daha basit üretim prosedürlerine duyulan ihtiyacı ve etken madde yükleme verimliliğini artırmaktır (Reis ve ark., 2006). Polimerik nanopartiküllerin üretimi için kullanılacak yöntem seçilirken etken maddenin fizikokimyasal özellikleri, polimerin türü, üretim ortamı koşulları ve polimerik nanopartiküllerin final kalite özellikleri göz önünde bulundurulmalıdır. Hedeflenen özelliklere sahip polimerik nanopartiküllerin elde edilebilmesi için uygun yöntemin seçimi oldukça kritiktir (Crucho ve Barros, 2017).

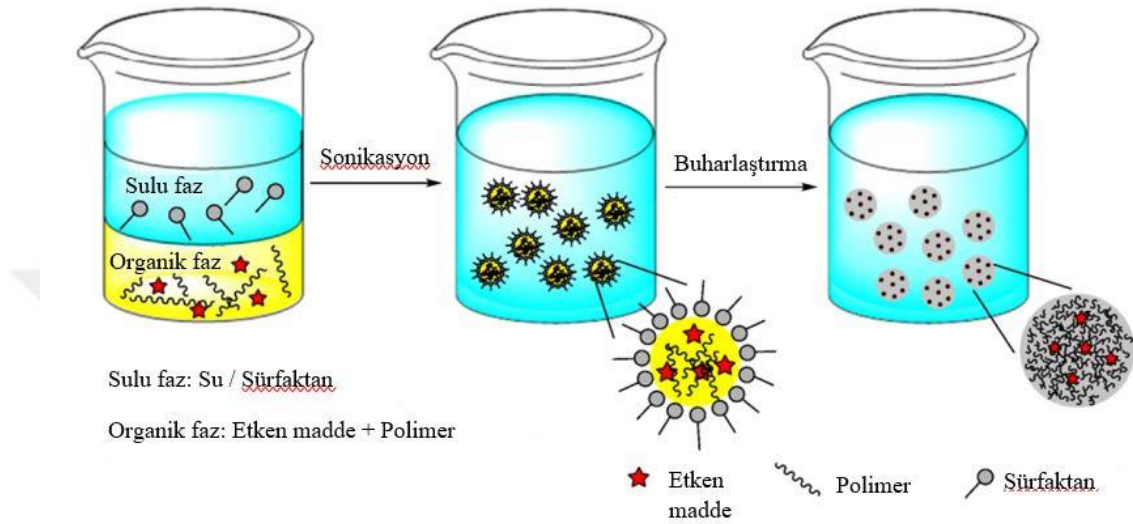
Polimerik nanopartikül hazırlama yöntemleri iki aşamalı ya da tek aşamalı prosedürler olarak sınıflandırılabilir. İki aşamalı prosedürler için öncelikle bir emülsiyon sisteminin hazırlanması gerekmektedir. Nanopartiküllerin oluşumu, prosesin ikinci aşamasında meydana gelmektedir ve kullanılan yönteme adını bu aşama vermektedir. İkinci aşamada polimerin çökmesi, jelleşmesi ya da monomerlerin polimerizasyonu söz konusudur. Tek aşamalı prosedürler de ise nanopartiküllerin oluşmasından önce herhangi bir emülsiyon sistemine gerek kalmadan spontan şekilde polimerin kendiliğinden çökmesi veya makromoleküllerin kendiliğinden birleşmesi söz konusudur (Dinarvand ve ark., 2011; Vauthier ve Bouchemal, 2009).

1.5.1. Emülsiyon-Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Bu yöntem halihazırda var olan polimerlerden nanopartikül oluşturmak için geliştirilen ilk tekniktir. Polimer alanında çalışan bilim insanları tarafından geliştirilen bir yöntem olmasına rağmen asıl gelişimi ilaç üretiminde biyobozunur polimerleri kullanan Farmasötik Teknoloji alanında olmuştur (Rao ve Geckeler., 2011). Farmasötik Teknoloji alanındaki öncü çalışmaları ise Gurny ve arkadaşları gerçekleştirmişlerdir (Vauthier ve Bouchemal, 2009).

Emülsifikasyonun söz konusu olduğu hazırlama yöntemlerinde damlacık oluşumu esastır. Meydana gelen polimerik nanopartiküllerin boyutu ve boyut dağılımı, oluşan

damlacıkların katılaşmasından sonra tayin edilmektedir (Crucho ve Barros, 2017). Bu yöntemin ilk aşamasında polimer çözeltisi sulu bir faz içinde emülsifiye edilmekte ve ikinci aşama da ise polimeri içeren çözücü ortamdan buharlaştırılarak uzaklaştırılırken nano boyutlu küresel şekildeki polimer damlacıkları çökerek nanopartiküller oluşmaktadır (Şekil 1.8) (Reis ve ark., 2006).



Şekil 1.8. Emülsiyon-çözücü buharlaştırma şematik gösterimi (Crucho ve Barros., 2017).

Bu teknikte, öncelikle polimer ve etken madde suyla karışmayan özellikteki uçucu bir organik çözücü içerisinde çözülür (Dinarvand ve ark., 2011). Bu amaçla diklorometan ve kloroform en yaygın kullanılan organik çözücüler olmalarına karşın, sahip oldukları toksisiteyi sebebiyle toksisite profili daha düşük olan etil asetat bugün bu çözücülerin yerini almıştır (Crucho ve Barros, 2017). Polimer ve etken maddeyi içeren çözelti yüzey etken madde içeren sulu faz içerisinde ultrasonik bir cihaz ya da yüksek enerjili homojenizatör kullanılarak emülsifiye edilir ve etken madde polimer matris içinde dağılarak nanopartiküller şeklinde ortamdaki ayrılır (Dinarvand ve ark., 2011). Organik faz ya basınç veya vakum altında ya da manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında sürekli karıştırılarak buharlaştırılır (Reis ve ark., 2006). Katılan nanopartiküller ultrasantrifüjle ayrılarak yüzey etken maddenin fazlası ve yüklenmeyen etken madde ortamdaki uzaklaştırılmak amacıyla yıkanır. Saklama koşullarında polimerik yapının sulu ortamda hidrolize olmaması için nanopartiküller liyofilizasyon işlemine tabi tutularak kuru şekle dönüştürülürler (Dinarvand ve ark., 2011; Rao ve Geckeler, 2011).

Bu yöntemde polimerik nanopartiküllerin partikül büyüklüğü; karıştırma hızı, yüzey etken maddenin çeşidi ve kullanılma oranı, organik ve su fazların viskozitesi ile ortam sıcaklığı ayarlanarak kontrol edilebilmektedir (Reis ve ark., 2006). Uygulanan sonikasyon tekniği, sonikasyonun süresi ve hızı yine partikül büyüklüğü üzerinde etkin olan diğer faktörlerdir. Emülsiyonun hazırlanmasında kullanılan polimer ve çözücü derişimleri, polimerik nanopartiküllerin final kalite özelliklerini etkilemektedir (Rao ve Geckeler, 2011). Bu yöntem basit bir teknik olmasına karşın sadece yağda çözünürlüğü bulunan etken maddelerin enkapsülasyonuna imkan sağlamakta olup zaman alıcı ve agregasyon oluşumuna açık bir tekniktir (Nagavarma ve ark., 2012).

1.5.2. Emülsiyon-Çözücü Difüzyon Yöntemi

Bu yöntem, emülsiyon-çözücü buharlaştırma yönteminin modifiye edilmiş bir şekli olup emülsiyon oluşumu için temel gereklilik kullanılan çözücünün kısmen su ile karışabilir nitelikte olmasıdır (Dinarvand ve ark., 2011; Nagavarma ve ark., 2012). Üretim tekniğinin ilk aşamasında polimer, propilen karbonat gibi su ile kısmen çözünebilir bir çözücü içerisinde çözülür (Reis ve ark., 2006). Elde edilen organik faz, yüzey etken madde içeren sulu bir çözelti içerisinde karıştırılarak emülsifiye edilir (Quintanar-Guerrero, 1998). Su içerisinde yağ tipi emülsiyon elde edildikten sonra ise yüksek hacimde su ile ortam seyreltilir (Dinarvand ve ark., 2011). Bu seyreltme sonucunda dağılmış damlacıklar içerisindeki organik fazın yanı sıra organik çözücü damlacıkları da ortamda dağılır ve bu durum polimerin çökmesine yol açar (Dinarvand ve ark., 2011). Üretim sürecinin son aşamasında ise kullanılan organik çözücü buharlaştırılarak veya süzme yoluyla ortamdaki uzaklaştırılır (şekil 1.9) (Reis ve ark., 2006).



Şekil 1.9. Emülsiyon-çözücü difüzyon tekniği şematik gösterimi (Crucho ve Barros., 2017).

Bu teknikte kullanılabilecek uygun çözücüler arasında benzil alkol, propilen karbonat, etil asetat, izopropil asetat, metil asetat, metil etil keton, benzil alkol, butil laktat ve izovalerik asit bulunmaktadır (Dinarvand ve ark., 2011). Formülasyonda en çok kullanılan yüzey etken maddeler arasında polivinil alkol ve Poloksamer 188 yer almaktadır (Quintanar-Guerrero, 1998). Bu yöntem için öncelikle tercih edilen başlıca polimerler ise PLA, PLGA, PCL ve Eudragit E dir (Vauthier ve Bouchemal, 2009). Bu üretim tekniği özellikle lipofilik yapıdaki etken maddelerin enkapsülasyonunda tercih edilmekte olup, oluşan nanopartiküllerin partikül boyutu üzerinde etkin olan temel parametreler ise suyun organik çözücü ile karışabilirliği, karıştırma hızı, emülsiyona eklenen yüzey etken maddelerin derişimi ve polimer derişimidir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki yüzey etken madde derişimi ve karıştırma hızı nanopartiküllerin partikül boyutunda azalmaya yol açarken polimer derişiminin artması ise partikül boyutunu artırmaktadır (Vauthier ve Bouchemal, 2009).

Emülsiyon-çözücü difüzyon tekniğinin temel avantajları arasında homojenizasyon işlemine gerek duyulmaması, farmasötik olarak kabul edilebilir organik çözücülerin kullanılabilmesi, seriden seriye tekrarlanabilirliğin elde edilmesi, ölçek büyütme kolaylığı ve yüksek oranda enkapsülasyon etkinliğinin temin edilmesi sayılabilmektedir. Emülsifikasyon esnasında suda çözünür özellikteki etken maddenin doymuş su fazına difüzyonu ve dolayısıyla enkapsülasyon etkinliğinin

azalması ise yönteme ait başlıca dezavantajdır (Quintanar-Guerrero, 1998; Reis ve ark., 2006).

1.5.3. Tuzla   kt rme Yöntemi

Nanopartikül  retiminde en çok tercih edilen hazırlama yöntemleri çevreye olduğu kadar fizyolojik sistemler açısından da sakıncalı organik çözücülerin kullanımını gerektirmektedir. Bu olumsuzluğun üstesinden gelinmesi amacıyla ise 1988 yılında Bindschaedler ve arkadaşları tarafından tuzla çöktürme yöntemi geliştirilerek etken maddenin biyobozunur polimerik nanoküreler içine enkapsüle edilmesi temin edilmiş ve bu üretim yöntemi için patent alınmıştır (Quintanar-Guerrero, 1998; Rao ve Geckeler., 2011). Bu teknik prensipte emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemine yakın bir yöntem olmakla birlikte temel farklılığı toksik çözücü kullanımına gerek duyulmamasıdır. Bu husus, bu üretim metodunun da başlıca avantajını oluşturmaktadır (Crucho ve Barros, 2017; Bouchemal, 2009).

Tuz ile çöktürme tekniğinde aseton gibi su ile karışabilen bir çözücü içinde çözünen etken madde ve polimer; magnezyum klorür, kalsiyum klorür veya magnezyum asetat gibi elektrolit yapısındaki veya sükroz gibi elektrolit özellikte olmayan tuz ile çöktürme ajanı ve polivinilpirolidon veya polivinil alkol tarzındaki kolloidal yapılı bir yüzey etken madde içeren sulu faz içerisinde emülsifiye edilir (Crucho ve Barros, 2017; Nagavarma ve ark., 2012). Oluşan su içinde yağ tipi emülsiyon, yeterli hacimde su ile seyreltildiğinde aseton su fazına difüze olmakta ve bu şekilde polimerik damlacıkların çökelmesi ile nanopartikül oluşumu temin edilmektedir (şekil 1.10) (Quintanar-Guerrero, 1998).



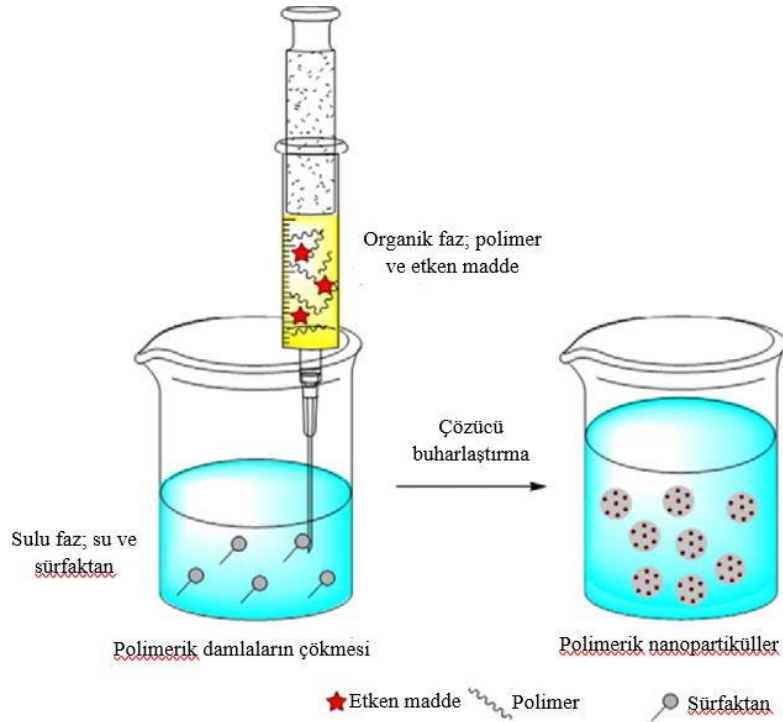
Şekil 1.10. Tuzla çöktürme tekniğinin şematik gösterimi (Crucho ve Barros., 2017).

Bu yöntem yüksek oranda enkapsülasyon etkinliği temin edilebilmesi ve prosesin kolaylıkla ölçeklendirilebilmesi gibi avantajlara sahiptir (Quintanar-Guerrero, 1998). Üretim esnasında sıcaklık uygulaması gerekmediğinden ısıya duyarlı lipofilik yapılu etken maddelerin nanopartiküllerinin hazırlanması amacıyla tercih edilen bir hazırlama yöntemidir. Ancak özellikle lipofilik yapıdaki terapötik ajanların enkapsülasyonuna imkan sağlaması ve tuz ile çöktürme ajanının fazlasının ortamdan yıkanarak uzaklaştırılması gerekliliği yöntemin en temel dezavantajlarını oluşturmaktadır (Nagavarma ve ark., 2012).

1.5.4. Nanoprespitasyon Tekniği

Çözücü deplasman tekniği olarak da adlandırılan bu yöntem ilk olarak Fessi ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş ve patentlenmiştir (Crucho ve Barros, 2017; Quintanar-Guerrero, 1998). Bu teknikteki temel prensip organik çözücünün lipofilik bir çözeltiden sulu faza yer değiştirmesi sonrası polimerin ara yüzeyde çökmesidir. Polimer, etken madde ve lipofilik yapılu bir yüzey etken madde, aseton veya etanol gibi yarı polar suyla karışabilen bir çözücü içerisinde çözündürülür. Oluşan organik faz manyetik karıştırma ile polivinil alkol veya Poloksamer 188 gibi bir yüzey etken madde içeren sulu faza eklenir ve bu işlem tek seferde aşamalı olarak damla damla ya da enjeksiyon ile gerçekleştirilir (Crucho ve Barros, 2017).

Nanopartiküllerin oluşum mekanizması manyetik karıştırıcıda uygulanan hızlı karıştırma işleminde çözücünün yer değiştirmesi anında meydana gelen ara yüzey geriliminin düşmesine dayanmaktadır. Çözücüler arasında karşılıklı karışabilirlik düzeyi ile bağlantılı olarak nano boyuttaki çözücü damlacıkları arayüzden kopar. Bu damlacıklar, organik çözücünün su fazına difüzyonu ve polimerik damlacıkların çökmesi gerçekleşene kadar yüzey etken madde tarafından hızla stabilize edilir. Davies ve Rideal arayüzey geriliminin düşmesi esnasında yağ fazının hızlı ve düzensiz titreşimler geçirdiği ve sürekli çözücü karışım girdaplarının oluşumu ile damlacık oluşumu ve çökmesinin gerçekleştiğini tanımlamaktadırlar. Başka bir deyişle, polimer çözeltisinin sulu faza kendiliğinden ve hızla difüze olması dolayısıyla etken madde ve polimerin su moleküllerinden hemen kaçınmak için anında nano boyutlu damlacıklar şeklini aldığı belirlenmiştir. Bu süreç iki faz arasındaki ara yüzey gerilimindeki azalmanın hızlı difüzyon nedeniyle damlacık yüzey alanını arttırması ve küçük organik çözücü damlacıklarını oluşturan Marangoni etkisi ile yönetilmektedir. Çözücü nano damlacıklardan buharlaşarak ayrılırken polimerik yapı nanopartikül damlacıkları katılarak çökmektedirler (Şekil 1.11) (Quintanar-Guerrero, 1998).



Şekil 1.11. Nanopresipitasyon tekniğinin şematik gösterimi (Crucho ve Barros., 2017).

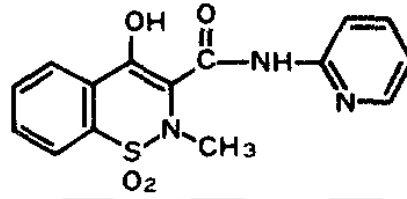
Üretim aşamasında genel olarak organik faz su fazına eklenmektedir ancak aynı prensiple bunun tersi yani su fazın organik faza ilave edilmesi de mümkündür. Bu hazırlama tekniğinde en çok kullanılan çözücü, hızlı buharlaşabilmesi ve suyla karışabilir özellikte olması nedeniyle asetonur ancak etanol, hekzan, metilen klorür veya dioksan da bu amaçla kullanılabilir (Crucho ve Barros, 2017; Rao ve Geckeler, 2011). Etanol veya metanolün aseton ile birlikte kullanıldığı ikili çözücü karışımlarından da bu amaçla faydalanılmaktadır (Crucho ve Barros, 2017). Bu yöntemin etkinliğini belirleyen faktörler arasında organik fazın su fazına ilave edilme hızı ve ilave edilme şekli, sulu fazın karıştırılma hızı, organik ve su fazların birbirine oranları, polimer ile etken maddenin birbirine oranları ve yüzey etken madde derişimi yer almaktadır (Rao ve Geckeler, 2011). Bu yöntemin temel üstünlükleri basitliği ve tekrarlanabilirliğinin yüksek olmasıdır (Crucho ve Barros, 2017). Bu üretim tekniğinde en fazla kullanılan polimerler biyobozunur polyester yapısındaki polimerlerdir. Bu kapsamda özellikle polikaprolakton, polilaktik asit, polilaktik-ko-glikolik asit ile eudragitler ve polialkilsiyanoakrilatdan yararlanılmaktadır (Rao ve Geckeler, 2011).

1.6. Piroksikam

İlk olarak Pfizer ilaç şirketi tarafından geliştirilmiş olan bu etken madde yetmişli yıllarda tıp dünyasında kullanılmaya başlanmıştır (Mihalić ve ark., 1986). Analjezik antipiretik, antienflamatuvar etkilerine sahip olmakla birlikte NSAİİ arasında oksikamlar grubunda yer almaktadır (Brogden ve ark. 1984). Aynı grupta yer aldığı meloksikamla birlikte çeşitli tümör hücre hatlarında deneyler yapılmış ve antitümör aktivitelere yönelik bulgular saptanmıştır (Knottenbelt ve ark., 2006).

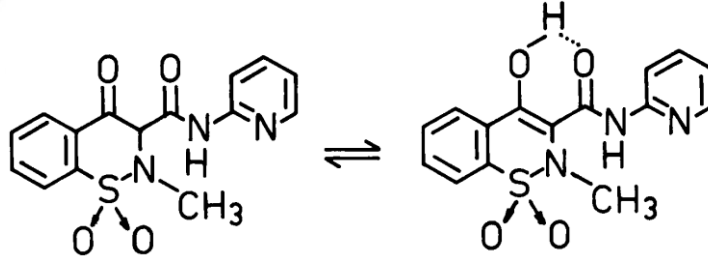
1.6.1. Piroksikamın Fizikokimyasal Özellikleri ve Miktar Tayini Yöntemleri

Kimyasal okunuşu [4-hidroksi-2-metil-N-(2-piridil)-2H-1,2-benzotiyazin-3-karboksamid-1,1-diaoksit] (Şekil 1.12) olan piroksikam p-dikarbonil işlevselliği bulunan nonsteroidal antienflamatuvar bileşiktir (Damiani ve ark., 1998; Lombardino ve Wiseman, 1982).



Şekil 1.12. Piroksikamın kimyasal yapısı (Ishizaki ve ark., 1979).

Piroksikam iki farklı tautomerik şekilde bulunabilmektedir (Şekil 1.13). Kapalı formülü $C_{15}H_{13}N_3O_4S$ şeklinde olup molekül ağırlığı 331,6 Daltondur (Mihalić ve ark., 1986).



Şekil 1.13. Piroksikamın tautomerik şekilleri (Mihalić ve ark., 1986).

Piroksikamın su gibi polar bir çözücü içerisinde çözünürlüğü $10 \mu M$ 'dan küçüktür (Nazar ve ark., 2009). Diizopropil eter ve tolüende kısmen çözünürken sikloheksanda ise çözünürlüğü bulunmamaktadır. Dimetilformamid, dimetilsülfoksit, kloroform, dioksan, aseton ve etil asetat gibi bazı organik çözücülerde çözünür özellikte olup metanol, etanol ve izopropanolde ise çözünürlüğü biraz daha düşüktür (Mihalić ve ark., 1986). Piroksikamın plazma, serum, tampon çözeltileri ve farmasötik preparatlar içerisindeki miktarının tayini için polarografik ve voltametrik teknikler, yüksek performanslı sıvı kromatografisi, ultraviyole spektrofotometri, kapiler bölge elektroforezi gibi yöntemler bildirilmektedir (Damiani ve ark., 1998).

1.6.2. Piroksikamın Farmakolojik Özellikleri

Nonsteroidal antienflamatuvar ilaçların oksikamlar grubunda yer alan piroksikam romatoid artrit, osteoartrit, ankilozan spondilit, kas-iskelet problemleri, spor yaralanmaları ve doğum sonrası ağrıları gibi pek çok hastalığın tedavisinde hızlı ve etkin sonuçlar vermektedir (Damiani ve ark., 1998). Analjezik, antipiretik aktivite gösterdiği gibi diğer nonsteroidal antienflamatuvar ilaçlara benzer şekilde trombositlerin fonksiyonları ve prostaglandinlerin sentezi üzerinde de etkisi söz konusudur (Brogden ve ark., 1984). Gastrointestinal mukoza üzerindeki aktivitesi nedeniyle en bilinen yan etkisi ise ülserdir. Bunların yanı sıra deri döküntüsü, baş ağrısı, baş dönmesi, ödem gibi daha az önemli ve ender yan etkileri de bulunmaktadır (Damiani ve ark., 1998). Farelerde fenilkinona bağlı ağrıyı 320 mg/kg dozluk aspirinin etkisine benzer şekilde 10-32 mg/kg dozda piroksikam önlemiş ve bu etki analjezik aktivitesinin etkinliğini işaret etmiştir. Yine farelere intramüsküler enjeksiyonla uygulanan *Escherichia coli* lipopolisakkariti sonucu oluşan piretik etkinin incelendiği bir araştırmada oral yoldan verilen 10 mg/kg doz piroksikam, 56 mg/kg doz aspirinin oluşturduğu antipiretik aktivite profiline eşdeğer bir profil göstermiştir (Damiani ve ark., 1998).

1.6.3. Piroksikamın Farmakokinetik Özellikleri ve Biyoyararlanımı

Piroksikamın farmasötik ve farmakokinetik profilini sahip olduğu kimyasal gruplar belirlemektedir. Yapısında bulunan enolik kısım piroksikamın pKa değerini düşürdüğünden molekülün iyonlaşma miktarı artmaktadır. Böylelikle etken maddenin aktivitesi uzamaktadır. Ayrıca bu enolik yapı piroksikamın etki mekanizması olduğu düşünülen prostaglandin biyosentetaz inhibisyonu için de gereklidir. Bu aktivitesinden N-metil grubu da pay sahibidir. Sahip olduğu sülfoksit grubu sayesinde hidrofobik özellik göstermektedir. Lipofilik özelliğini artıran bu özellik, piroksikamın kan-bağırsak bariyerini aşarak emilimini ise kolaylaştırmaktadır. Lipofilik özelliğe katkıda bulunarak asiditesini de artıran heterosiklik yan zincirler de hidroksilasyon hızını düşürerek plazma yarı ömrünü

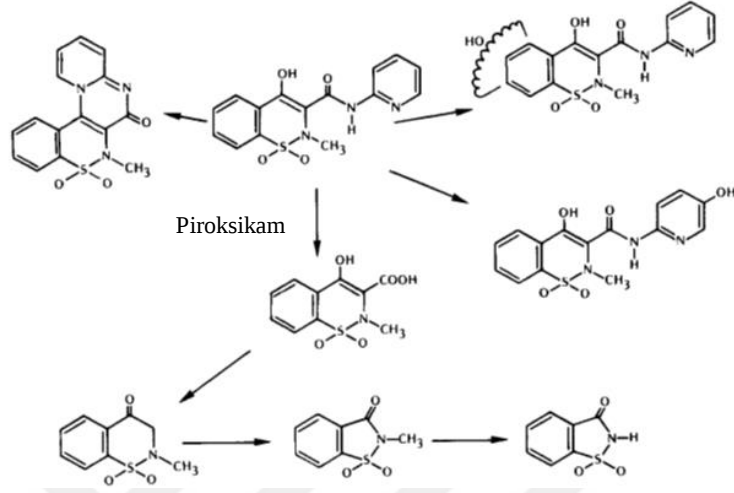
uzatmaktadır (Mihalić ve ark., 1986). Ishizaki ve ark. (1979) tarafından tamamı erkek üniversite öğrencilerinden oluşan 22 kişilik bir ekip ile gerçekleştirilen piroksikamın farmakokinetiğine yönelik bir araştırmada, plazma yarı ömrü net bir şekilde belirlenmeye çalışılmıştır. Oral yoldan uygulanan piroksikamın zamana bağlı plazma derişimleri incelenmiş ve genel yarı ömür süresi 37, 5 saat olarak tayin edilmiştir.

Sağlıklı ve romatizmal hastalıklara sahip deneklerde yapılan çalışmalarda ise tek ve tekrarlayan dozlar şeklindeki uygulama sonucu ortaya çıkan farmakokinetik profili değerlendirilmiştir. Bu çalışmalara dayanılarak piroksikamın farmakokinetik profilinin doğrusal olduğu sonucuna varılmıştır. Plazma derişim-zaman eğrisi altında kalan alan (AUC) doza bağımlıdır. Maksimum plazma derişimine 2 saatte ulaşmakta ve kandaki stabil denge derişiminin oluşumu 7 ile 12 gün arasında değişmektedir. İnsanda oral uygulamadan sonra görünür dağılma hacmi yaklaşık 0,14 l/kg'dır ve bu değer de 70 kg ağırlığında bir insan için dağılım hacminin yaklaşık olarak 10 l olduğunu göstermektedir (Brogden ve ark., 1984).

1.6.4. Piroksikamın Metabolizması ve Eliminasyonu

Piroksikamın insanlarda uğramış olduğu metabolik yollar 5'-piridin halka hidroksilasyonu, glukuronidasyon, siklodehidrasyon, N-dealkilasyon gibi yollardır. Oluşan metabolitlerin temel metaboliti oluşturması sıçanlarda, köpeklerde ve insanlarda farklılık göstermektedir. Ana metabolit köpeklerde siklodehidre edilmiş şekli olurken (A), sıçanlarda para konumundaki piridil halkasının hidroksile halidir (B). İnsanlarda ise ana metabolit sıçanlardaki gibi piridil halkasının hidroksile hali olabildiği gibi glukuronik asitle konjuge yapısı veya serbest şekli de olabilmektedir. Bu metabolitler piroksikamın tek başına gösterdiği antienflamatuvar aktiviteye sahip olmayıp, prostaglandin sentetazı inhibe etmede de neredeyse 1000 kat daha az etkilidir. Piroksikam için tanımlanmış metabolik yollar Şekil 1.14'de gösterildiği gibidir (Mihalić ve ark., 1986). Piroksikamın tek oral dozunun %10'u idrarla değişmeden atılırken Brogden ve ark. (1984)'nın yapmış olduğu daha yeni çalışmalar

sonucunda %2 ile %5'inin değişmeden atıldığı belirlenmiştir. Toplam vucut klirensi 0,13-0,15 l/s iken renal klirensi vucut klirensinin % 10'u dizeyindedir (Broden ve ark., 1984).



řekil 1.14. Piroksikam metabolizması (Mihalić ve ark., 1986).

1.6.5. Piroksikamın Antikanser Etkinliği

Prostaglandin biyosentezinin engellenmesi hayvanlarda kanser oluşumunun önüne gećmektedir. Tek başına piroksikamın sıćanlarda kullanımı ile bağırsak kanserinin inhibe edildiği belirtilmiştir (Nigro ve ark., 1986). Knottenbelt ve ark., (2006) yaptıkları bir çalışmada piroksikam ve meloksikamın köpeklerdeki osteosarkom, lenfoma, meme karsinomu hücre hatlarında antiproliferasyon ve apoptoz inhibisyonuna etkilerini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmayla incelendikleri tümör hücre hattı çeşidine göre farklı antitümör aktiviteler tespit etseler de onerilen dozlarının üzerinde kullanılmaları sonucunda ciddi oranda proliferasyon inhibisyonu ve apoptoz indüksiyonu gözlemlemişlerdir. Li ve ark. tarafından 2006 yılında piroksikam benzeri bir oksikam grubu etken madde olan meloksikamın insan HepG2 hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkinliği irdelenmiş ve hücre proliferasyonu MTT testi ile analiz edilmiştir. Sonuç olarak meloksikamın bu hücre hattında proliferasyonu, doza ve zaman bağlı şekilde inhibe ettiği, hücre döngüsünü

durdurduğu ve HepG2 hücrelerinin apoptozunu da indüklediği belirlenmiştir (Li ve ark., 2006).

Bu tezin amacı, hepatosellüler karsinom tedavisinde mevcut tedavi rejimine alternatif olarak  mit vaad eden kemopreventif bir etken madde olan piroksikamın bu amaçla ilk defa polimerik nanopartiküler ilaç taşıyıcı sisteminin geliştirilmesi ve HepG2 insan karaciğer kanseri hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkinliğinin tayin edilmesidir. Bu kapsamda 3^2 faktöriyel deney tasarımı kullanılarak hazırlanan polimerik nanopartikül formülasyonlarının in-vitro özelliklerinin belirlenmesi amacıyla enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı, yüzey yükü, morfolojik özellikleri ve in-vitro etken madde çıkış tayini gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan polimerik nanopartikül formülasyonlarında gerçekleştirilen 3^2 faktöriyel deney tasarımı kapsamında yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonrasında belirlenen optimum piroksikam yüklü polimerik nanopartikül formülasyonu üzerinde ise başta etken madde-yardımcı madde etkileşimleri, etken maddenin polimerik matris yapısı içindeki fiziksel durumunun tespiti, stabilite çalışmalarının yanısıra, antiproliferatif etkinliğinin belirlenebilmesi amacıyla hücre kültürü çalışmaları da gerçekleştirilmiştir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereçler

Tez çalışması kapsamında ön formülasyon çalışmaları ve yapılan literatür araştırmaları ışığında hepatoselüler karsinom tedavisine yönelik antiproliferatif etkisi araştırılacak piroksikamı içeren polimerik nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem formülasyonlarının oluşturulabilemesi için kullanılan tüm gereçler ve temin edildikleri kurum, firma, yer ile marka bilgileri Bölüm 2.1.1 ve Bölüm 2.1.2’ de verilmiştir.

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Piroksikam	Abdi İbrahim İlaç San. ve Tic. A.Ş., Türkiye
PLGA (50:50) (MA:40-75 kDa)	Sigma-Aldrich, Almanya
Poloksamer 188	Fluka, Almanya
PVA (MA.9-10 kDa)	Sigma-Aldrich, Almanya
Vitamin E TPGS	Eastman, ABD
Aseton	Merck, Almanya
Asetonitril	Sigma-Aldrich, Almanya
Diyaliz Membran	Sigma-Aldrich, Almanya
Disodyum Hidrojen Fosfat	Merck, Almanya
Potasyum Dihidrojen Fosfat	Merck, Almanya
Sodyum Klorür	Merck, Almanya
Sodyum Hidroksit	Merck, Almanya
Dimetil Sülfoksit	Sigma-Aldrich, Almanya
HepG2 Hücre Hattı	ATCC, Almanya
MTT	Sigma-Aldrich, ABD
DMEM Besiyeri	Sigma-Aldrich, Almanya
Tripsin/EDTA Çözeltisi	Lonza, İsviçre

FBS	Sigma-Aldrich, ABD
Penisilin-Streptomisin	Sigma-Aldrich, ABD
Tripan Mavisi	Bio-Rad California, ABD

2.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler

Partikül Büyüklüğü Tayin Cihazı	ZetaSizer Nano ZS, Malvern Inst. Ltd., İngiltere
UV Spektrofotometre	Shimadzu UV-1601, Japonya
Hassas Terazı	Sartorius BL 210S, Almanya
Yüksek Devirli Santrifüj	Sigma 3K15, Almanya
Çalkalayıcı İnkübatör	Jeio Tech SI-300, Jeio Tech Co. Ltd., Kore
Liyofilizatör	Christ Gamma 2-16 LSC, Almanya
pH Metre	Mettler Toledo S-20K, İsviçre
Manyetik Karıştırıcı	Stuart SB 162-3, İngiltere
Ultrasonik Banyo	Ultrasonic LC30, Almanya
Ultrasonik Prob	Bandelin Sonoplus HD 2070, Almanya
İklim Dolabı	Nüve, Türkiye
Taramalı Elektron Mikroskobu	FEI Nova NanoSem 430, Japonya
Diferansiyel Tarama Kalorimetresi	Shimadzu DSC-60, Japonya
FTIR Spektrofotometre	Agilent Cary 630, Santa Clara, USA
UV Spektrofotometre	Thermo Scientific, Multiscan Go Microplate, Almanya
Hücre Kültürü Kabini	Sanyo, Almanya
Hücre Sayım Cihazı	TC20, Bio-Rad California, USA
Santrifüj	Sigma-Aldrich USA
Etüv	Thermo Scientific, USA
Vorteks	Holten, Almanya

2.2. Yöntem

2.2.1. Etken Maddenin Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.1.1. Etken Maddenin Fourier Transform Infrared (FTIR) Spektroskopisi ile Analizi

Hazırlanan nanopartikül formülasyonu içerisinde etken maddenin varlığının saptanabilmesi, sahip olduğu fonksiyonel gruplarıyla gösterdiği kendine has emilim bantları sayesinde gözlemlenmesi ve oluşabilecek herhangi bir polimer etken madde etkileşiminin belirlenebilmesi için fourier transform infrared spektroskopisi kullanılmıştır. Bu teknik diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) ile elde edilen sonuçlara da katkıda bulunmuştur (Şengel-Türk, 2009). Bu çalışmada kullanılan hesaplı miktar piroksikam FTIR cihazının ilgili bölümüne yerleştirilmiş ve 650-4000 cm^{-1} aralığında tarama yapılmıştır.

2.2.1.2. Etken Maddenin Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC) Analizi

Bu analiz etken maddenin termal özellik ve davranışlarının saptanması için gerçekleştirilmektedir (Şengel-Türk, 2009). Çalışmamızda kullandığımız etken madde piroksikamdan tartılan 2 mg cihaza yerleştirmek üzere kapaklı alüminyum pana konulmuştur. Analiz sırasındaki ısıma işleminin yol açabileceği kapak atma durumundan sakınmak amacıyla kapak üzerinde oldukça küçük boyutlu delikler açılmıştır. Sıkı bir şekilde kapak kapatıldıktan sonra pres uygulanan pan cihaza yerleştirilmiştir. 20-250°C sıcaklıkta 10°C/dak hız ayarlarında termogram alınmıştır.

2.2.1.3. Etken Maddenin UV Spektrumunun İncelenmesi

Piroksikamın belirlenen ortamlar olan asetonitril ve pH 7,4 fosfat tamponu (PBS) çözeltisinde absorbanı verdiği maksimum dalga boyunun (λ_{max}) belirlenmesi amacıyla 0,2 mg/mL derişimde çözeltileri hazırlanmış ve 200-400 nm dalga boyu aralığında UV cihazında spektrumları çizdirilmiştir.

pH 7,4 Fosfat Tamponu (Avrupa Farmakopesi (EP) 7.0, 2011, s.: 492):

Disodyum hidrojen fosfat	2,38 g
Potasyum dihidrojen fosfat	0,19 g
Sodyum klorür	8,00 g
Distile su	1000 mL

Hazırlanışı: Tüm maddeler belirtilen miktarlarda tartılarak distile su içinde çözünmüş ve bildirilen hacme distile su ile tamamlanmıştır. Etken maddenin çözünme hızı ortamındaki ıslanabilirliğini temin etmek amacıyla tampon ortamına % 0,05 oranında Tween 20 ilave edilmiştir.

2.2.2. Etken Maddenin Kalibrasyonu ve Analitik Validasyon

Piroksikamın polimerik nanopartiküllere ne kadar yüklendiğinin ölçülebilmesi için asetonitril ortamında ve çözünme hızı ortamında çözünen piroksikam yüzdesinin tespit edilmesi amacıyla pH 7,4 fosfat tamponu çözeltisinde çözeltileri hazırlanmıştır. Bu bağlamda hem asetonitril ortamı hem de pH 7,4 fosfat tamponu çözeltilerinin analitik validasyonu yapılmıştır.

2.2.2.1. Etken Maddenin Kalibrasyon Doğrularının ve Grafiklerinin Belirlenmesi

Piroksikamın asetonitril ve pH 7,4 tampon ortamlarında hazırlanan stok çözeltileri kullanılarak gerekli ve uygun seyreltmelerle farklı derişimdeki çözeltileri hazırlanmıştır. 0,005 g etken madde hassas terazide tartılmıştır. Balonjojeye aktarılıp ve 25 mL'ye asetonitril veya pH 7,4 fosfat tamponu çözeltisi ile tamamlanmıştır. Hazırlanan bu stok çözeltiden hareketle derişimleri düşükten yükseğe doğru bir dizi dilüsyon hazırlanmış ve bu dilüsyonların absorbansları tayin edilen $\lambda_{\max}$ değerinde okunmuştur. Her bir dilüsyona karşılık gelen absorbans değerleri (y) çözeltilerin derişim (x) değerlerine karşı grafiğe geçirilerek Microsoft Excel programı vasıtasıyla kalibrasyon denklemi elde edilmiştir.

2.2.2.2 Etken Maddenin UV Spektrofotometrik Yöntemle Kalibrasyonuna Yönelik Analitik Validasyon Çalışmaları

2.2.2.2.1 Seçicilik

Seçicilik kullanılan analitik metodun analizi yapılan maddeyi, incelenen numunede yer alan ya da alabilecek diğer bileşenlerin varlığında da saptayabilme gücünü ifade eden validasyon parametresidir (Saudagar ve Thete, 2018). Bu amaçla etken madde içermeyen numuneler ve tüm yardımcı maddeleri de içeren nanopartikül formülasyonları nanopirespitasyon tekniği ile hazırlanmış ve asetonitril ortamında nanopartikül yapısının parçalanması ile çözeltileri elde edilmiştir. Bu çözeltilerin spektrumları, UV spektrofotometresinde 200-400 nm dalga boylarında alınarak etken maddenin spektrumu ile kıyaslanmış ve formülasyon bileşenleri ile etken madde arasında herhangi bir girişim olup olmadığı tespit edilmiştir.

2.2.2.2.2. Doğrusallık Aralığı

Bu parametre incelenen örnekte yer alan etken madde derişimi ve deney sonuçları arasındaki orantıyı gösterir. Seçilen bir aralıkta numudeki etken madde miktarı ve elde edilen cevap arasındaki ilişkiyi saptamak amacıyla lineer regresyon analizi yapılır. Doğrusallık aralığı; araştırılan etken maddenin bulunduğu alt ve üst sınırlar içerisindeki miktarının kesinlik, doğruluk ve doğrusallık bakımından incelendiği aralıktır (Şengel-Türk, 2009).

Bu parametrenin tayininde seçilen her iki ortam için de öncelikle etken maddenin 0,2 mg/mL derişimde stok çözeltileri hazırlanmış ve bunlardan hareketle bir dizi farklı derişimde dilüsyonları elde edilmiştir. Her bir ortam için belirlenen $\lambda_{\max}$ değerinde dilüsyonların absorbansları tayin edildikten sonra Instant Paket Programı kullanılarak regresyon doğru denklemleri ile lineer regresyon kareler toplamı, ortalamanın artık kareler toplamı ve artık kareler toplamı parametreleri belirlenmiştir.

2.2.2.2.3. Doğruluk

Bu parametre elde edilen deneysel sonuçların gerçek değerlere ne oranda yaklaşıldığı hakkında bilgi verir. Seçilen analitik yöntemin hatasızlığının ölçüsüdür (Şengel-Türk, 2009). Birbirinden bağımsız hazırlanan stok çözeltilerinden düşük, orta ve yüksek derişimde farklı farklı dilüsyonlar hazırlanmış ve UV Spektrofotometre cihazında belirlenen dalga boyunda her dilüsyonun altı kez absorbansları ölçülmüştür. Her dilüsyonun kendi içinde ölçülen absorbans değerlerinin ortalaması ve bilinen derişim değerleri kullanılarak teorik derişim değerleri elde edilmiş ve standart sapma, % geri kazanım ve % bağıl standart sapma verilerine ulaşılmıştır. ICH Q2 (R1) kılavuzu doğrultusunda kullanılan yöntemin doğruluk ölçüsünün tespiti için çıkan sonuçların % 2 nin altında olması gerekmektedir.

2.2.2.2.4. Kesinlik

Birbiri ardına yapılan ölçümler arasındaki benzerliği ifade eder. % bağıl standart sapma ve standart sapma katsayılarıyla değerlendirilir (Şengel-Türk, 2009). Bu çalışmada kesinliğin iki alt ölçütü olan tekrarlanabilirlik ve orta kesinlik çalışılmıştır.

2.2.2.2.4.1. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik parametresi için aynı analist tarafından değişmeyen çalışma koşulları altında asetonitril ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamlarından elde edilen stok çözeltiden hareketle düşük, orta ve yüksek derişimlerde etken maddenin dilüsyonları hazırlanmış ve bu çözeltilerin emilim değerleri aynı gün içerisinde 6 defa ölçülmüştür.

2.2.2.2.4.2. Orta Kesinlik

Orta kesinlik için aynı analist tarafından değişmeyen çalışma koşulları altında etken maddenin stok çözeltisinden hareketle hazırlanan düşük, orta ve yüksek derişimlerdeki dilüsyonların absorbans değerleri peşpeşe gelen farklı günlerde 6 kez ölçülmüş ve bu ölçümlerden hesaplanan % bağıl standart sapma değerlerinin %2'den düşük olma durumuna göre elde edilen sonuçlar yorumlanmıştır.

2.2.2.2.5. Teşhis Sınırı (LOD)

Teşhis sınırının belirlenebilmesi amacıyla etken maddenin 3 farklı stok çözeltisinden hareketle edile edilen kalibrasyon doğrularının kesişim değerlerinin standart sapması hesaplanmış ve kalibrasyon doğrusunun eğimine oranlanarak 3,3 çarpanıyla LOD değerine ulaşılmıştır.

2.2.2.2.6. Tayin Sınırı (LOQ)

Tayin sınırının belirlenebilmesi amacıyla etken maddenin 3 farklı stok çözeltisinden hareketle edile edilen kalibrasyon doğrularının kesişim değerlerinin standart sapması hesaplanmış ve kalibrasyon doğrusunun eğimine oranlanarak 10 çarpanıyla LOQ değeri belirlenmiştir.

2.2.3. Polimerik Nanopartikül Formülasyon Çalışmaları

2.2.3.1. Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

Yapılan literatür araştırmaları ve ön hazırlık çalışmalarından sonra nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması amacıyla nanoprespitasyon tekniğinin kullanılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla önce belirli bir miktar piroksikam ve PLGA hassas terazide tartılmış ve aseton içerisinde çözündürülmüştür. Elde edilen bu organik faz sabit hızda manyetik karıştırıcı üzerinde belirli miktarda yüzey aktif madde içeren sulu faza damla damla ilave edilmiştir. Elde edilen dispersiyon 24 saat manyetik karıştırıcı üzerinde sabit hızda karıştırılarak asetonun uzaklaştırılması sağlanmıştır. Oluşan süspande nanopartiküller 60 dakika süre ile 56.000 x g hızda santirfüjlenmiş ve oluşan nanopartikül çökeleği iki kez saf su ile yıkandıktan sonra 48 saat süreyle liyofilize edilerek kuru toz halde saklanmıştır (Şengel-Türk ve ark., 2017). Gerçekleştirilen formülasyon geliştirme çalışmalarına ait formülasyon bileşenleri Çizelge 2.1’de sunulmuştur.

Çizelge 2.1. Nanoprespitasyon tekniği kullanılarak hazırlanan formülasyon denemeleri.

Formülasyon bileşen miktarları	D1*	D2	D3
Piroksikam (mg)	10	10	10
PLGA (mg)	200	200	200
Aseton (mL)	10	10	10
Poloksamer 188 (%)	-	-	0,5
Vitamin E TPGS (%)	0,1	-	-
PVA (9-10 kDa) (%)	-	3	-
Distile Su (mL)	30	30	30

*Nanopartikül oluşumu temin edilememiştir.

Gerçekleştirilen formülasyon geliştirme çalışmaları kapsamında partiküllerin enkapsülasyon etkinlikleri ve partikül büyüklükleri kıyaslanmış ve nanoprespitasyon yöntemi ile polimerik nanopartikül üretimi için en uygun yüzey aktif maddenin Poloksamer 188 olduğu belirlenerek, formülasyon içeriklerinin bu doğrultuda tasarlanmasına karar verilmiştir.

2.2.3.2. Nanopartikül Formülasyonlarının Optimizasyonu

Piroksikam içeren polimerik nanopartikül formülasyonlarının optimizasyonu için 3^2 faktöriyel deney tasarımı kullanılmıştır. Böylelikle üç seviyede iki faktörlü tasarım ile piroksikam yüklü polimerik nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması planlanmıştır. Çalışmamızda etkinliği incelenecek bağımsız faktörler polimer olarak kullanılan PLGA miktarları (50 mg, 100 mg, 200 mg) ve yüzey aktif madde olarak kullanılan Poloksamer 188 derişimleri (%1, %2, %3) şeklinde belirlenmiştir. Bağımlı değişkenler olarak ise yükleme etkinliği, partikül büyüklüğü ve yüzey yükünün irdelenmesine karar verilmiştir. İki bağımsız değişkenin üç bağımlı değişken üzerindeki etkisi -1 düşük seviye, 0 orta seviye ve +1 yüksek seviye derecelerinde değerlendirmiş ve bu etkinliğin tayin edilebilmesi amacıyla Design Expert® 6.0.8 (Stat-Easy Inc., ABD) bilgisayar programı kullanılmıştır. Çizelge 2.2 deney tasarımı kapsamında incelenecek bağımsız değişkenleri ve düzeylerini gösterirken Çizelge 2.3'te ise deney tasarımı kapsamında hazırlanan formülasyon içerikleri yer almaktadır.

Çizelge 2.2. Deney tasarımı kapsamında incelenecek bağımsız değişkenleri ve düzeyleri.

Faktör	Düzey		
	Düşük Seviye (-1)	Orta Seviye (0)	Yüksek Seviye (+1)
PLGA Miktarı (mg) (X1)	50	100	200
Poloxamer 188 Derişimi (%) (X2)	1	2	3

Çizelge 2.3. Deney tasarımı kapsamında hazırlanan formülasyon içerikleri.

Formülasyon Kodu	PLGA Miktarı (X1) (mg)	Poloxamer 188 Derişimi (X2) (%)
F1	50	1
F2	50	2
F3	50	3
F4	100	1
F5	100	2
F6	100	3
F7	200	1
F8	200	2
F9	200	3
Merkez noktası tekrarları		
F10	100	2
F11	100	2
F12	100	2
F13	100	2

2.2.3.3. Nanopartikül Formülasyonları Üzerinde Yapılan Kontroller

2.2.3.3.1. Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliğinin Tayini

Hazırlanan polimerik nanopartikül formülasyonlarına yüklenen piroksikam miktarının saptanması için ultrasonikasyon tekniği kullanılmıştır. Belirli oranda kuru toz haldeki nanopartikülün asetonitril ortamı içerisinde çözünmesi sağlanmış ve 10 dakika süre ile %100 çıkış enerjisinde ultrasonikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen çözelti uygun oranda seyreltilerek polimerik nanopartiküllere yüklenmiş piroksikam miktarı 325 nm dalga boyunda UV-Spektrofotometre kullanılarak saptanmıştır (n=3). Polimerik nanopartiküllere yüklenen piroksikamın enkapsülasyon etkinliği Eşitlik 1, Eşitlik 2 ve Eşitlik 3’de sunulan formüller kullanılarak hesaplanmıştır (Liu ve ark., 2019; Şengel-Türk ve ark., 2017).

% Piroksikam Yükleme Kapasitesi = (Nanopartikül içerisindeki piroksikam miktarı/Nanopartikül miktarı) X 100 (Eşitlik 1)

% Teorik Piroksikam Miktarı = (Dispers fazdaki piroksikam miktarı/ Dispers fazdaki katı madde miktarı) X 100 (Eşitlik 2)

% İşlem Etkinliği = (% Piroksikam yükleme kapasitesi/%Teorik piroksikam miktarı) X 100 (Eşitlik 3)

2.2.3.3.2. Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Polidispersite İndeksi (PDI) Tayini

Nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, hücre içine alım esnasında önemli olmakla birlikte nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin oluşturduğu biyolojik yanıtı belirleyici özelliklerinden birisidir (Danaei ve ark., 2018). Bu amaçla hazırlanan polimerik nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklükleri ve boyut homojenliğini değerlendirebilmek adına polidispersite indeksi değerleri tayin edilmiştir. Bu analiz için belirli bir miktar kuru toz şeklindeki nanopartikül formülasyonu 30 mL distile su içinde disperse edilerek ultrasonik banyoda 20 dakika süreyle sonike edilmiştir. Elde edilen örneklerin boyut analizleri için foton korelasyon spektroskopisi cihazı (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Inst., İngiltere) kullanılmış ve hazırlanan tüm polimerik nanopartikül formülasyonları için peşpeşe üç ölçüm yapılarak analiz gerçekleştirilmiştir.

2.2.3.3.3. Nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Analizi

Zeta potansiyel değeri, nanopartiküllerin yüzey yükü ve stabiliteğini tayin etmek negatif yüklü hücre zarı ile etkileşimini değerlendirebilmek için önemli bir parametredir. İlaçlar ve hücrel yüzeyler arasındaki elektrostatik etkileşim hücrel alımı da etkileyeceğinden biyoyararlanımı da belirlemektedir (Zhang ve ark., 2008). Bu nedenle hazırlanan polimerik nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyel değerlerini tayin etmek için Zetasizer Nano Series (Nano-ZS) (Malvern Inst., İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Bölüm 2.2.3.3.2’de nanopartiküllerin partikül boyutu analizine yönelik olarak belirtilen şekilde hazırlanan örnekler zeta potansiyel ölçüm kuvetine konulmuş ve oda sıcaklığında her formülasyonun zeta potansiyel değeri tayin edilmiştir (n=3).

2.2.3.3.4. İn Vitro Etken Madde Açığa Çıkış Hızı Tayini

Elde edilen piroksikam yüklü polimerik nanopartikül formülasyonlarından piroksikamın açığa çıkış hızı ve profilini belirleyebilmek için diyaliz membran yöntemi kullanılmıştır. Çözünme hızı ortamı olarak pH 7,4 fosfat tamponu (PBS) ortamının kullanılmasına karar verilmiştir (Huang ve ark., 2017). Belirli miktarda etken madde içeren liyofilize şekildeki polimerik nanopartiküller 1 mL ultra saf su içerisinde disperse edildikten sonra moleküler büyüklüğü 10-12 kDa olan selüloz asetat diyaliz membranların içerisine yerleştirilmiş ve membranın her iki ucu klipslenmiştir. Hazırlanan membranlar 100 mL 37°C sıcaklıkta pH 7,4 fosfat tamponu ortamına konulmuş ve 50 rpm dönüş hızında çalıştırılan inkübatörlü çalkalayıcıya yerleştirilerek belirlenen sürelerde ortamdan 5 mL örnek çekilmiştir. Çekilen ortam kadar tekrar pH 7,4 fosfat tamponu ortama ilave edilerek çözünme hızı ortam hacminin sabit kalması temin edilmiştir. Alınan örneklerdeki açığa çıkan piroksikamın absorban değeri UV-Spektrofotometrede 354 nm dalga boyunda tayin edilmiştir (n=3).

2.2.3.3.5. Açığa Çıkan Etken Madde Miktarının Tespiti

3^2 faktöriyel deney tasarımı kapsamında hazırlanan piroksikam yüklü polimerik nanopartikül formülasyonlarının her bir zaman noktasında açığa çıkan etken madde miktarları tayin edildikten sonra bu değerler cevap değişkeni olarak programa girilmiş ve belirlenen optimum formülasyonun deneysel çözünme hızı verilerine karşılık program tarafından tahmini çıktı verileri oluşturulmuştur. Bu şekilde sistemin tahmin yeteneği, deneysel veriler ile programdan gelen tahmini veriler arasındaki korelasyon ve benzerlik düzeyi açısından iki eş karşılaştırma yaklaşımı ile belirlenmiştir.

Çözünme hızı profillerinin karşılaştırılması amacıyla Moore ve Flanner tarafından geliştirilen iki eş karşılaştırma yaklaşımı model bağımsız bir yöntem olup f_1 fark ve f_2 benzerlik testlerini içermektedir. Bu her iki testte çözünme hızı profillerinin karşılaştırılması amacıyla FDA tarafından önerilen eşitliklerdir (Moore ve Flanner, 1996). f_1 fark eşitliği, her zaman noktası için referans ve teste ait ortalama değerler arasındaki farkların toplamı olarak tanımlanır ve referanstan her zaman noktasında açığa çıkan ortalama miktarın toplamıdır. Eşitlik 4'te görüldüğü gibi f_1 fark faktörü iki çözünme hızı profili arasındaki hatayı yüzde cinsinden yaklaşık olarak vermektedir.

$$f_1 = \left\{ \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \right\} \times 100$$

(Eşitlik 4)

f_2 benzerlik eşitliği ise referans ve teste ait değerler arasındaki hata farklarının kareler toplamının logaritmik dönüşümü ile tanımlanmaktadır. Çözünme hızı profillerinin benzerlik düzeyinin belirlenmesi için f_2 değerinin hesaplanmasında Eşitlik 5'ten faydalanılmaktadır.

$$f_2 = 50 \log_{10} \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n w_i (R_i - T_i)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\} \quad (\text{Eşitlik 5})$$

Bu eşitliklerde;

R_t: Referansın t anında çözünen etken madde yüzdesi

T_t: Testin t anında çözünen etken madde yüzdesi

n: Çözünme hızı deneyi esnasında alınan numune sayısı'ni ifade etmektedir.

Çözünme hızı profillerinin değerlendirmesinde profillerin benzer kabul edilebilmesi için *f1* değerinin 0-15 arasında, *f2* değerinin ise 50-100 arasında olması gerekmektedir. Referans ve testte ait çözünme hızı profilleri aynı olduğunda *f2* değeri 100 olup, % hata ise sıfırdır (Eryol ve Öner, 2005).

2.2.3.3.6. Nanopartiküllerin DSC Analizi

Nanoprespitasyon tekniği ile hazırlanan polimerik nanopartikül formülasyonları arasından 3² faktöriyel deney tasarımı sonucunda belirlenen optimum formülasyon üzerinde DSC analizi gerçekleştirilmiştir. Etken maddenin polimerik matriks yapısı içerisindeki fiziksel durumunu belirlemek ve formülasyon bileşenleri ile etken madde arasındaki olası etkileşimleri saptayabilmek üzere etken madde içermeyen boş nanopartiküllerin de DSC termogramları Bölüm 2.2.1.2'de belirtilen koşullar altında tayin edilmiştir.

2.2.3.3.7. Nanopartiküllerin FTIR Analizi

Deney tasarımı kapsamında saptanan optimum nanopartikül formülasyonunun piroksikam içeren ve içermeyen şeklinin FTIR spektrumları 650-4000 cm⁻¹ bant aralığında alınmıştır.

2.2.3.3.8. Nanopartiküllerin Morfolojik Özellikleri

Nanopartiküllerin morfolojileri hücre içine alınmaları, dolaşımda kalma süreleri açısından önemlidir (Salatin ve ark., 2015). Bu sebeple nanoprespitasyon tekniği ile oluşturulan piroksikam yüklü optimum nanopartikül formülasyonunun şekil ve yüzey özelliklerini tespit edebilmek için Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) cihazı kullanılmıştır. Liyofilizasyondan sonra kuru toz halde elde edilen nanopartiküller örnek tutucuya bir bant üzerine yayılarak tutturulmuş ve nanopartikül yüzeyi altın ile kaplanmıştır. Bu şekilde nanopartiküllerin SEM mikrogramları çekilmiştir.

2.2.3.3.9. Stabilite Çalışmaları

Belirlenen optimum formülasyonun liyofilize edildikten sonra final kalite özelliklerinin takip edilmesi açısından saklama sıcaklığı olarak belirlenen 4 °C’de 6 ay süre boyunca stabilite takibi yapılmıştır. Bu amaçla liyofilize şeklindeki polimerik nanopartikül formülasyonunun üçüncü ve altıncı ayda enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü ve dağılımı ile zeta potansiyel değerleri tayin edilmiştir (n=3). Ayrıca liyofilize şeklindeki optimum formülasyonun dağılılabirliğinin tespiti açısından gerçekleştirilen redispersibilite indeksi tayinine yönelik olarak üretim prosesi esnasında santrifüj işleminden önce dispersiyon ortamından alınan bir miktar nanopartikül dispersiyonu distile su içinde disperse edilmiş ve partikül boyutu belirlenmiştir. Liyofilizasyon işlemini takiben aynı ortamda disperse edilen formülasyon tekrar partikül büyüklüğü açısından değerlendirilmiş ve redispersibilite indeksi değeri aşağıdaki sunulan Eşitlik 6 kullanılarak tespit edilmiştir. Aynı üretimlere ait liyofilize optimum formülasyon stabilite takibinin gerçekleştirildiği üç ve altı aylık dönemler sonunda da yine aynı dispersiyon ortamında redisperse edilmiş ve partikül boyutu tayinin gerçekleştirilmiştir.

$$\text{Redisperse edilmiş liyofilize nanopartiküllerin ortalama partikül boyutu} \\ \text{Redispersibilite indeksi} = \frac{\text{Orjinal nanopartikülleri ortalama partikül boyutu}}{\text{Orjinal nanopartikülleri ortalama partikül boyutu}}$$

(Eşitlik 6)

2.2.3.4. Nanopartiküllerin Antiproliferatif Aktivitelerinin Tayini

2.2.3.4.1. Test Maddesi

Saf piroksikam %10 DMSO içerisinde çözülerek, piroksikam yüklü optimum nanopartikül formülasyonu ise pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde dispese edilerek dilüsyonlar hazırlanmıştır ve hazırlanan bu dilüsyonlar +4 °C’ de muhafaza edilmiştir. DMSO son derişimi<%0.01 olacak şekilde dilüsyonlar hazırlanmıştır.

2.2.3.4.2. Hücre Kültürü

37°C, % 5 CO₂ içeren etüvde, 25 cm²’lik flaskların içinde % 1 penisilin streptomisin karışımı ile % 10 FBS içeren DMEM besiyerinde HepG2 hücreleri inkübe edilmiştir. Hücreler istenilen yoğunluğa ulaştığında 10 µL Tripan mavisi kullanılarak canlı hücre sayısı hücre sayımı cihazı ile hesaplanmıştır. 5x10⁴ hücre/mL olacak şekilde elde edilen hücre süspansiyonu, plakların her bir kuyucuğuna ekilmiş ve etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

2.2.3.4.3. Hücre Canlılık Testi

Hücreler etüvde iken uygun derişimdeki saf piroksikam çözeltisi ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamında disperse edilmiş şekilde piroksikam yüklü olan ve olmayan optimum nanopartikül dispersiyonları hazırlanmış ve 0,22 µm’lik steril

filtrelerden geçirilerek filtrasyon tekniği ile steril hale getirilmişlerdir. 24 saatlik inkübasyondan sonra etüvden çıkarılan plakların kuyucuklarına son derişimleri 10-1000 μM aralığında olacak şekilde 20 μL nanopartikül dispersiyonu veya saf molekül çözeltisi uygulanmıştır. 48 saatlik inkübasyondan sonra inkübatörden alınan plaklara MTT testi uygulanmış ve plaklar yeniden iki saat boyunca etüvde inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda plaklarda yer alan MTT solüsyonu geri alınmış ve ortama 100 μL DMSO çözeltisi eklenerek 540 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında absorbans ölçümü yapılmıştır. Hücre canlılığı analizleri plak içerisinde dört tekrarlı olarak ve iki paralel şeklinde çalışılmış ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde ifade edilmiştir.

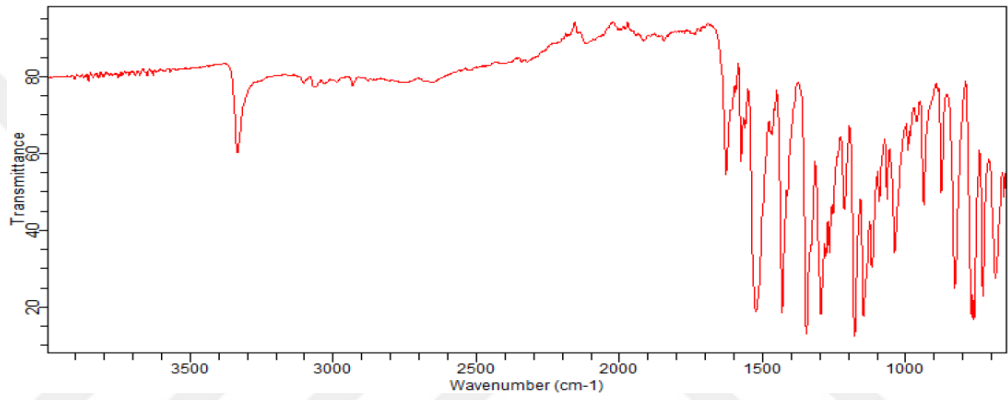


3. BULGULAR

3.1. Etken Maddenin Özelliklerinin Belirlenmesi

3.1.1. Etken Maddenin FTIR Spektroskopisi ile Analizi Bulguları

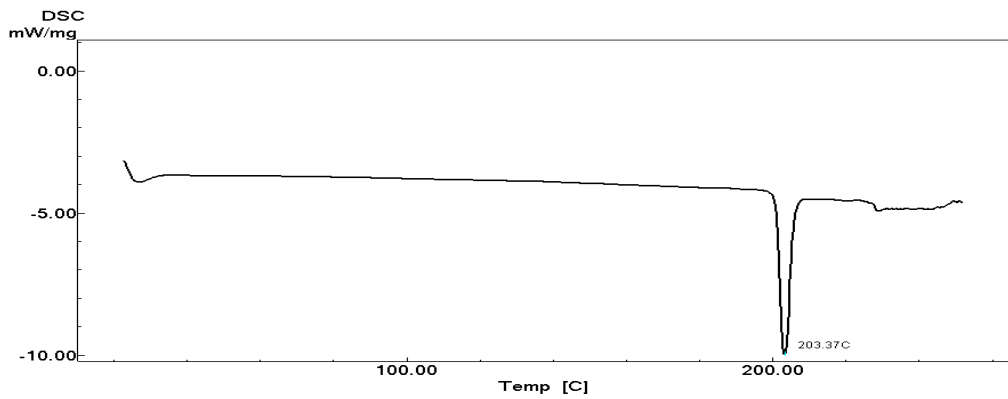
Piroksikamın FTIR spektroskopisi ile analizine ait elde edilen bulgu Şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1. Piroksikamın FTIR spektrumu.

3.1.2. Etken Maddenin DSC Analizi Bulguları

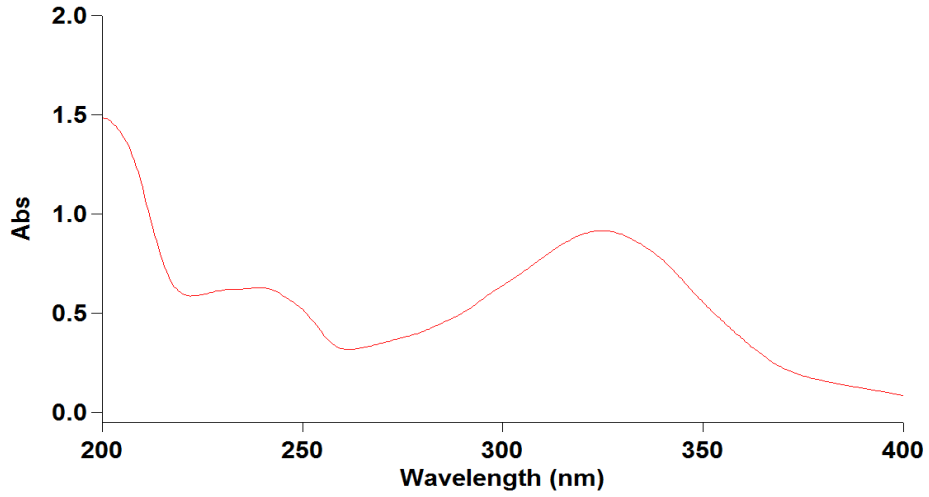
Piroksikamın termal davranışını saptamak amacıyla yapılan DSC analizi sonucu elde edilen termogramı Şekil 3.2’de görülmektedir.



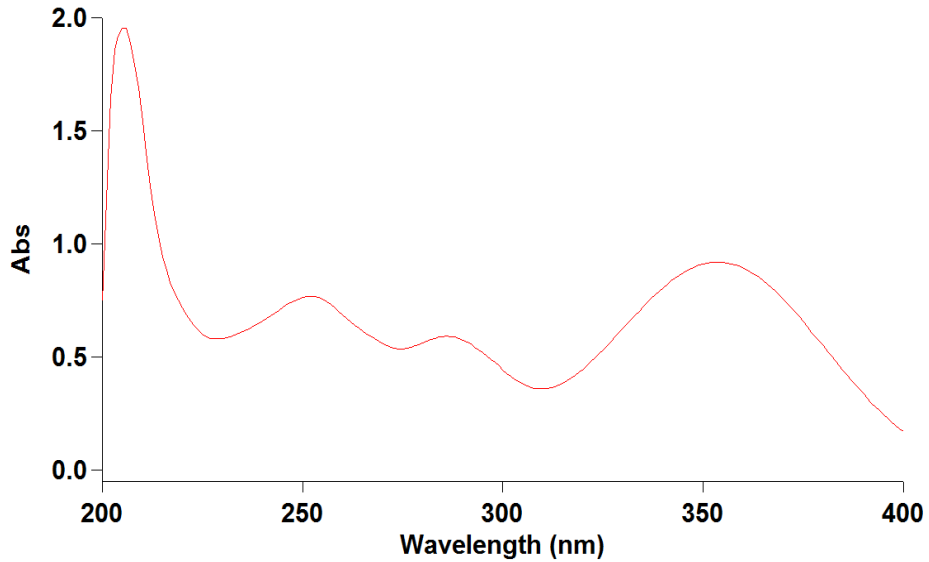
Şekil 3.2. Piroksikamın DSC termogramı.

3.1.3. Etken Maddenin UV Spektrum Bulguları

Piroksikamın asetonitril ve pH 7,4 fosfat tampon ortamlarında UV spektrumları incelenmiş ve Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'te gösterilmiştir. Yapılan analizlerde piroksikamın ilgili ortamlarda absorbans gösterdiği maksimum dalga boyları Çizelge 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.3. Piroksikamın asetonitril ortamındaki UV spektrumu.



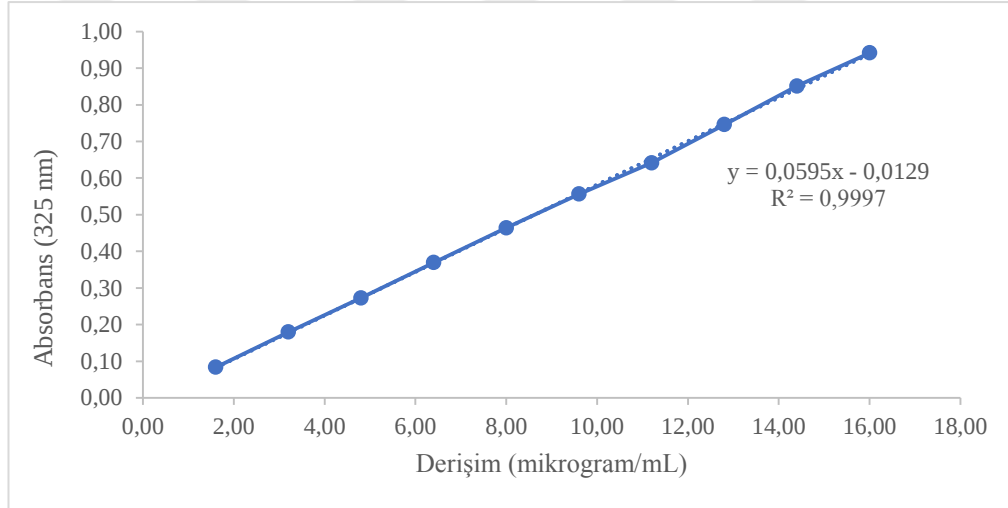
Şekil 3.4. Piroksikamın pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki UV spektrumu.

Çizelge 3.1. Piroksikamın asetonitril ve pH 7,4 tamponunda gösterdiği maksimum dalga boyları.

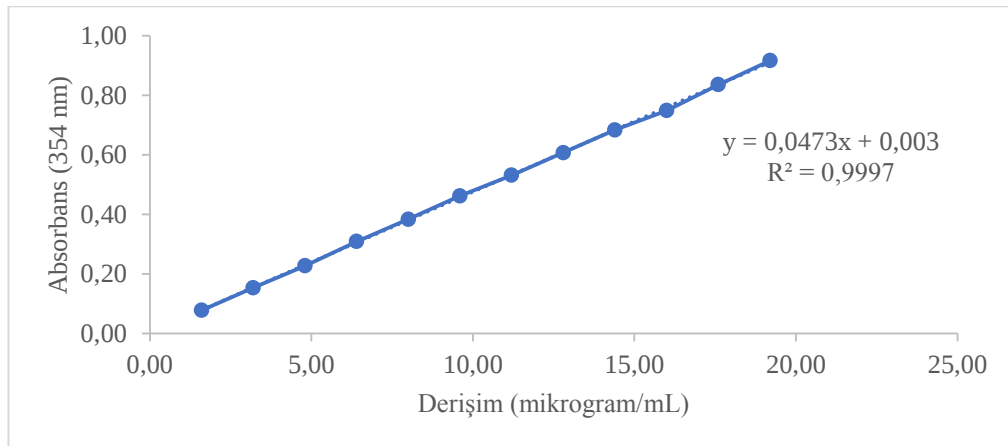
Ortam	Asetonitril	pH 7.4
$\lambda_{\max}$	325.0 nm	354.0 nm

3.2. Etken Maddenin Belirlenen Kalibrasyon Doğruları ve Grafikleri Bulguları

Piroksikamın çalışılan asetonitril ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamlarındaki standart doğruları Şekil 3.5 ve Şekil 3.6’da, Instat paket programı kullanılarak elde edilen kalibrasyon verileri Çizelge 3.2’de verilmiştir.



Şekil 3.5. Piroksikamın asetonitril ortamındaki kalibrasyon doğrusu.



Şekil 3.6. Piroksikamın pH 7,4 fosfat tampon ortamındaki kalibrasyon doğrusu.

Çizelge 3.2. Piroksikamın asetonitril ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamlarında elde edilen kalibrasyon verileri.

Ortam	Eğim $\pm$ GS (m)	Kesişim $\pm$ GS (n)	r^*	r^{2**}
Asetonitril	0,0595	0,0129	0,9999	0,9997
Tampon ortamı	0,0473	0,0030	0,9999	0,9997

*korelasyon katsayısı

**determinasyon katsayısı

3.3. Etken Maddenin UV Spektrofotometrik Yöntemle Belirlenen Kalibrasyonuna Yönelik Analitik Validasyon Bulguları

3.3.1. Seçicilik

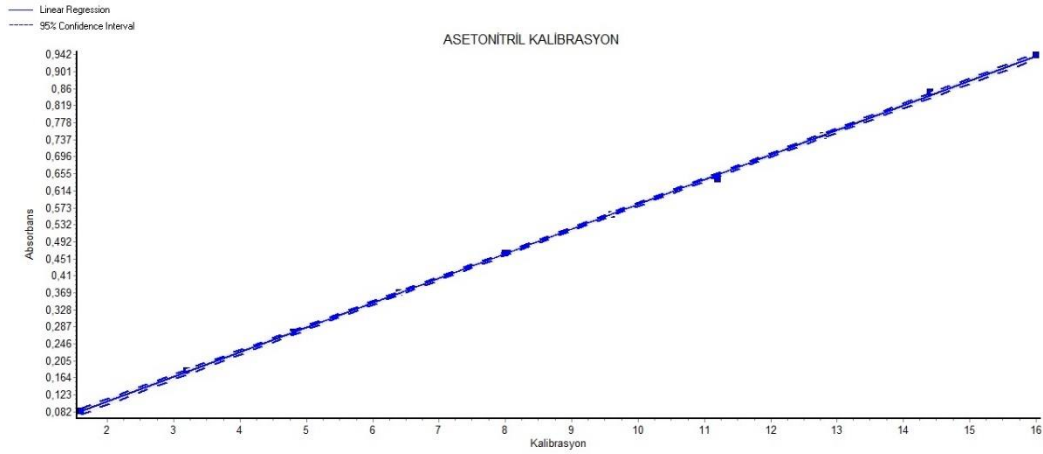
Formülasyonda bulunan yardımcı maddelerin formülasyonda yer alan miktarlarında çözeltileri ayrıca hazırlanmış ve piroksikam bulunmayan nanopartikül formülasyonları da hazırlanarak 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumları incelenmiştir. Sonuçlar piroksikama ait UV spektrumuyla kıyaslanmıştır. Yardımcı maddeler bu spektrum aralığında belirgin pik göstermemiş ve çalışmalarımızda kullanılacak olan analitik yöntemin piroksikama seçici olduğu saptanmıştır.

3.3.2. Doğrusallık Aralığı

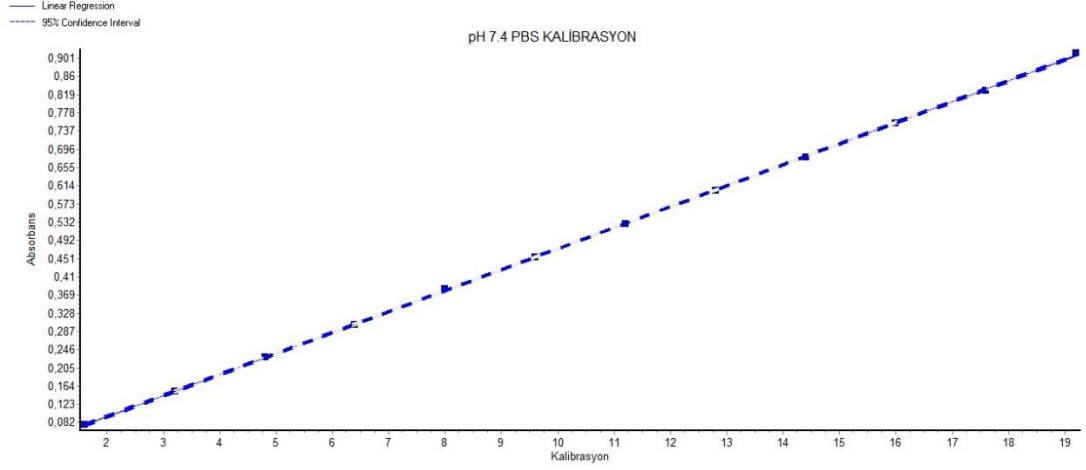
Bu validasyon parametresine yönelik olarak Instat paket programı kullanılmış ve Şekil 3.7 ve Şekil 3.8’ deki grafikler bu programla çizilmiştir. Asetonitril ile pH 7,4 fosfat tamponu ortamları için hesaplanan veriler Çizelge 3.3’te yer almaktadır.

Çizelge 3.3. Doğrusallık aralığının saptanmasında asetonitril ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamlarına ait veriler.

Ortam		Asetonitril Ortamı	Tampon Ortamı
Eğim		0,0595	0,0473
Eğimin Güven Sınırları (%95)	Alt Sınır	0,0586	0,0468
	Üst Sınır	0,0603	0,0475
Kesişim (n)		- 0,0129	0,0030
Kesişimin Güven Sınırları (%95)	Alt Sınır	- 0,0211	-0,0028
	Üst Sınır	- 0,0042	0,0046
r^2		0,9997	0,9997
Sy.x		0,0053	0,0027
Lineer Regresyon Kareler Toplamı		0,7462	0,8160
Artık Kareler Toplamı		0,0002	$7,291 \times 10^{-5}$
Ortalamanın Artık Kareler Toplamı		$2,875 \times 10^{-5}$	$7,291 \times 10^{-6}$



Şekil 3.7. Asetonitril ortamı için Instant paket programı ile çizilen lineer regresyon grafiği.



Şekil 3.8. pH 7,4 ortamı için Instant paket programı ile çizilen lineer regresyon grafiği.

3.3.3. Doğruluk

Tüm çalışma boyunca kullanılacak asetonitril ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamları için hesaplanan % geri elde değerleri ile ortalamaları, % bağıl standart sapma ve standart sapma değerleri Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5’de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Doğruluğun saptanmasında asetonitril ortamına ait veriler.

Düşük Derişim (1.6 µg/mL)			Orta Derişim (8.0 µg/mL)			Yüksek Derişim (16 µg/mL)		
A*	C** (µg/mL)	% Geri Elde	A*	C** (µg/mL)	% Geri Elde	A*	C** (µg/mL)	% Geri Elde
0.080	1.561	97.58	0.460	7.948	99.35	0.923	15.729	98.31
0.083	1.612	100.74	0.459	7.931	99.14	0.926	15.780	98.62
0.081	1.578	98.63	0.457	7.897	98.72	0.925	15.763	98.52
0.079	1.545	96.53	0.453	7.830	97.88	0.931	15.864	99.15
0.080	1.561	97.58	0.454	7.847	98.09	0.928	15.813	98.83
0.079	1.545	96.53	0.456	7.881	98.51	0.930	15.847	99.04
Ortalama % Geri Elde		97.93	Ortalama % Geri Elde		98.61	Ortalama % Geri Elde		98.75
Standart Sapma		1.581	Standart Sapma		0.575	Standart Sapma		0.321
% Bağıl Standart Sapma		1.615	% Bağıl Standart Sapma		0.583	% Bağıl Standart Sapma		0.325

Çizelge 3.5. Doğruluğun saptanmasında pH 7,4 fosfat tamponu ortamına ait veriler.

Düşük Derişim (1.6 µg/mL)			Orta Derişim (9.6 µg/mL)			Yüksek Derişim (19.2 µg/mL)		
A*	C** (µg/mL)	% Geri Elde	A*	C** (µg/mL)	% Geri Elde	A*	C** (µg/mL)	% Geri Elde
0.075	1.576	98.52	0.451	9.428	98.21	0.910	19.153	99.75
0.074	1.555	97.19	0.450	9.407	97.99	0.909	19.131	99.64
0.074	1.555	97.19	0.446	9.322	97.10	0.907	19.089	99.42
0.076	1.597	99.84	0.449	9.386	97.77	0.909	19.131	99.64
0.075	1.576	98.52	0.450	9.407	97.99	0.907	19.089	99.42
0.076	1.597	99.84	0.447	9.343	97.33	0.906	19.068	99.31
Ortalama % Geri Elde		98.52	Ortalama % Geri Elde		97.73	Ortalama % Geri Elde		99.53
Standart Sapma		1.184	Standart Sapma		0.428	Standart Sapma		0.171
% Bağlı Standart Sapma		1.202	% Bağlı Standart Sapma		0.438	% Bağlı Standart Sapma		0.172

3.3.4. Kesinlik

Çalışılan analitik yöntemin kesinliğinin belirlenmesinde kullanılmak üzere piroksikamın asetonitril ve tampon ortamlarında tekrarlanabilirlik ve orta kesinlik parametreleri incelenmiştir.

3.3.4.1. Tekrarlanabilirlik

Piroksikamın asetonitril ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamlarında tekrarlanabilirlik parametresi belirlenirken her iki ortamda da etken maddenin düşük, orta ve yüksek derişim olacak şekilde üç farklı çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin absorbans değerleri altı kez ölçülmüş ve bu ölçümlere karşılık ortalama derişim, % bağlı standart sapma ve standart sapma değerleri hesaplanarak Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7’de sunulmuştur.

Çizelge 3.6. Asetonitril ortamında tekrarlanabilirlik parametresi için elde edilen veriler.

Ortam: Asetonitril					
Düşük Derişim (1,6 µg/mL)		Orta Derişim (8,0 µg/mL)		Yüksek Derişim (16 µg/mL)	
Absorbans Değerleri	Derişim (µg/mL)	Absorbans Değerleri	Derişim (µg/mL)	Absorbans Değerleri	Derişim (µg/mL)
0,077	1,511	0,467	8,066	0,941	16,032
0,080	1,561	0,470	8,116	0,938	15,982
0,080	1,561	0,472	8,133	0,937	15,965
0,078	1,528	0,469	8,099	0,940	16,015
0,078	1,528	0,468	8,082	0,940	16,015
0,079	1,545	0,468	8,082	0,939	15,998
Ortalama	1,539		8,096		16,001
Standart Sapma	0,020		0,025		0,025
% Bağlı Standart Sapma	1,299		0,309		0,156

Çizelge 3.7. pH 7,4 fosfat tamponu ortamında tekrarlanabilirlik parametresi için elde edilen veriler.

Ortam: pH 7,4 fosfat tamponu					
Düşük Derişim (1,6 µg/mL)		Orta Derişim (9,6 µg/mL)		Yüksek Derişim (19,2 µg/mL)	
Absorbans Değerleri	Derişim (µg/mL)	Absorbans Değerleri	Derişim (µg/mL)	Absorbans Değerleri	Derişim (µg/mL)
0,080	1,682	0,449	9,500	0,916	19,394
0,081	1,703	0,463	9,796	0,928	19,648
0,081	1,703	0,466	9,860	0,932	19,733
0,080	1,682	0,469	9,923	0,929	19,669
0,081	1,703	0,465	9,838	0,932	19,7333
0,081	1,703	0,465	9,838	0,929	19,669
Ortalama	1,696		9,793		19,641
Standart Sapma	0,010		0,149		0,126
% Bağlı Standart Sapma	0,642		1,525		0,642

3.3.4.2. Orta Kesinlik

Piroksikamın asetonitril ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamlarında orta kesinlik parametresi belirlenirken her iki ortamda da etken maddenin düşük, orta ve yüksek derişim olacak şekilde üç farklı çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin absorbans değerleri farklı günlerde altı kez ölçülmüş ve bu ölçümlere karşılık ortalama derişim, % bağıl standart sapma ve standart sapma katsayıları hesaplanarak Çizelge 3.8 ve Çizelge 3.9’da sunulmuştur.

Çizelge 3.8. Asetonitril ortamında orta kesinlik parametresi için elde edilen veriler.

	Düşük Derişim (1,6 µg/mL)			Orta Derişim (8,0 µg/mL)			Yüksek Derişim (16 µg/mL)		
Günler	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1.ölçüm	1,611	1,510	1,577	8,076	8,126	7,975	16,140	15,668	15,820
2.ölçüm	1,628	1,561	1,561	8,160	8,295	8,076	16,157	15,769	15,837
3.ölçüm	1,645	1,561	1,577	8,210	8,311	8,076	16,157	15,769	15,870
4.ölçüm	1,645	1,561	1,561	8,244	8,345	8,126	16,157	15,820	1,820
5.ölçüm	1,662	1,544	1,561	8,227	8,261	8,109	16,173	15,803	15,854
6.ölçüm	1,662	1,527	1,561	8,244	8,194	8,109	16,173	15,837	15,854
Ortalama	1,642	1,544	1,566	8,194	8,255	8,079	16,159	15,778	15,842
Standart Sapma (±)	0,020	0,021	0,009	0,066	0,082	0,055	0,013	0,060	0,020
% Bağıl Standart Sapma	1,218	1,360	0,575	0,805	0,993	0,681	0,805	0,380	0,126

Çizelge 3.9. pH 7,4 fosfat tamponu ortamında orta kesinlik parametresi için elde edilen veriler.

	Düşük Derişim (1,6 µg/mL)			Orta Derişim (9,6 µg/mL)			Yüksek Derişim (19,2 µg/mL)		
Günler	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1.ölçüm	1,588	1,588	1,567	9,669	9,415	9,478	18,885	19,161	18,991
2.ölçüm	1,594	1,540	1,567	9,923	9,478	9,394	19,161	19,203	19,012
3.ölçüm	1,594	1,567	1,594	9,902	9,372	9,457	19,182	19,139	19,033
4.ölçüm	1,567	1,540	1,588	9,881	9,521	9,457	19,266	19,139	18,991
5.ölçüm	1,588	1,567	1,567	9,966	9,478	9,500	19,203	19,161	19,076
6.ölçüm	1,567	1,567	1,588	9,944	9,457	9,415	19,203	19,161	19,097
Ortalama	1,583	1,561	1,579	9,881	9,454	9,450	19,150	19,160	19,033
Standart Sapma (±)	0,013	0,019	0,013	0,108	0,052	0,039	0,134	0,023	0,044
% Bağıl Standart Sapma	0,821	1,217	0,823	1,093	0,556	0,417	0,702	0,121	0,233

3.3.5. Teşhis Sınırı (LOD)

Piroksikamın asetonitril ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamlarında hesaplanan LOD verileri Çizelge 3.10’da verilmiştir.

Çizelge 3.10. Piroksikamın asetonitril ve tampon ortamlarındaki LOD değerleri.

Ortam	LOD Değeri (µg/mL)
Asetonitril	0,238
pH 7,4	0,171

3.3.6. Tayin Sınırı (LOQ)

Piroksikamın asetonitril ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamlarında hesaplanan LOQ değerleri Çizelge 3.11’de verilmiştir.

Çizelge 3.11. Piroksikamın asetonitril ve tampon ortamlarındaki LOQ değerleri.

Ortam	LOQ Değeri (µg/mL)
Asetonitril	0,723
pH 7,4	0,519

3.4. Polimerik Nanopartikül Formülasyon Çalışmaları Bulguları

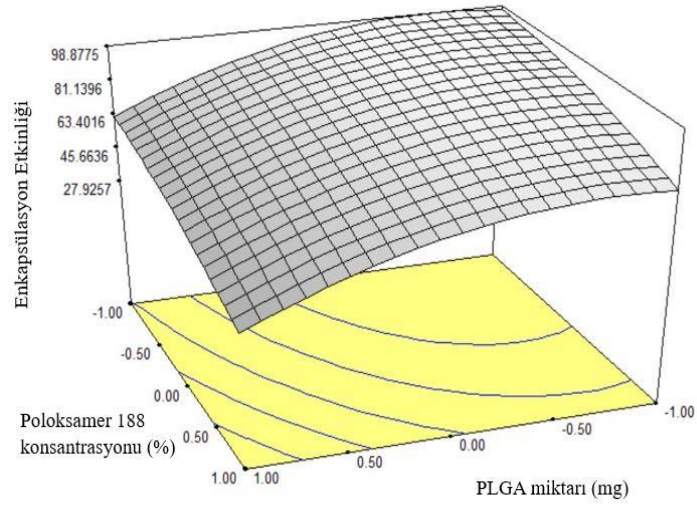
3.4.1. Nanopartikül Formülasyonlarının 3² Faktöriyel Deney Tasarımı ile Optimizasyon Bulguları

Piroksikam içeren polimerik nanopartikül formülasyonlarının optimizasyonu için 3² faktöriyel deney tasarımı kullanılmıştır. Bu tasarım için gereken bağımlı ve bağımsız değişkenler belirlenmiş olup Çizelge 2.2’de yer verilmiştir. Bu bölümde de belirtildiği gibi tüm nanopartikül formülasyonları için cevap değişkeni olarak belirlenen enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel analizleri her formülasyon için üç ölçüm olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cevap değişkenlerine ait bulgular Çizelge 3.12’de verilmektedir.

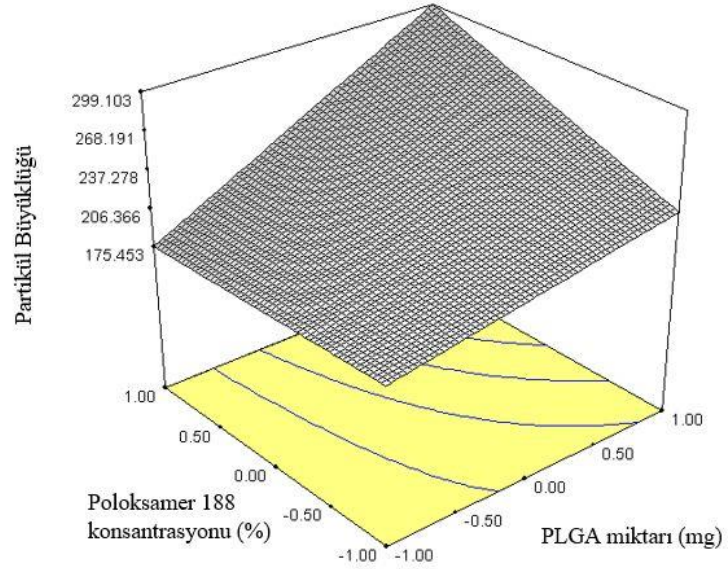
Çizelge 3.12. Nanopartikül formülasyonlarının 3² faktöriyel deney tasarımı ile elde edilen cevap değişkenlerine ait bulgular.

Formülasyon Kodu	Enkapsülasyon Etkinliği (% ± SS)	Partikül Büyüklüğü (nm± SS)	Zeta Potansiyel (mV± SS)
F1	98,88 ± 0,87	184,6 ± 0,92	-31,8 ± 0,81
F2	83,56 ± 1,18	187,3 ± 0,64	-23,0 ± 0,44
F3	71,37 ± 1,20	190,5 ± 0,70	-20,6 ± 0,76
F4	89,88 ± 0,96	204,6 ± 1,26	-25,8 ± 0,87
F5	84,00 ± 1,51	211,3 ± 0,35	-24,3 ± 0,53
F6	58,72 ± 2,14	217,4 ± 0,56	-22,4 ± 0,40
F7	64,17 ± 3,42	232,8 ± 0,65	-32,1 ± 6,35
F8	46,29 ± 3,42	250,1 ± 1,86	-20,2 ± 0,70
F9	29,65 ± 1,65	323,4 ± 2,26	-9,3 ± 0,08

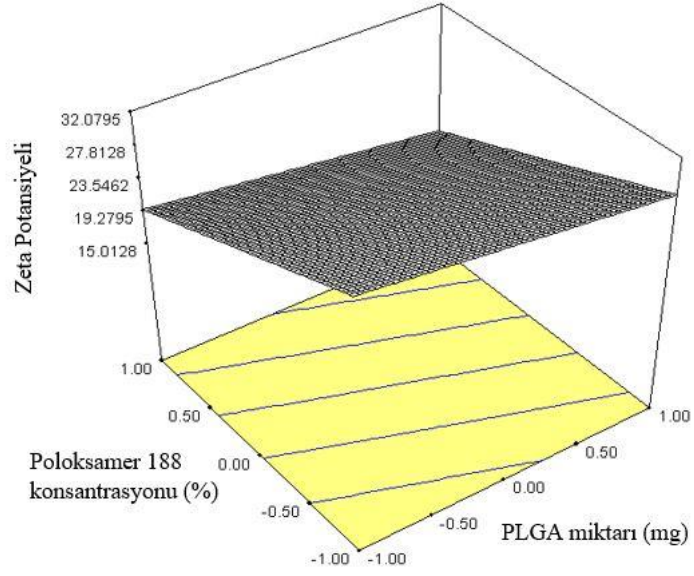
Bağımlı değişkenler enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü ve yüzey yükü üzerine bağımsız değişkenler PLGA miktarı ve Poloksamer 188 yüzdesinin etkisini gösteren yüzey cevap grafikleri Şekil 3.9, Şekil 3.10 ve Şekil 3.11’de görüldüğü gibi elde edilmiştir. Design Expert® 6.0.8 bilgisayar programı kullanılarak elde edilen tasarım sonuçları Şekil 3.12’de yer almaktadır.



Şekil 3.9. PLGA miktarı ve Poloksamer 188 derişiminin piroksikam nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisini gösteren yüzey cevap grafiğı.



Şekil 3.10. PLGA miktarı ve Poloksamer 188 derişiminin piroksikam nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü üzerine etkisini gösteren yüzey cevap grafiğı.



Şekil 3.11. PLGA miktarı ve Poloksamer 188 derişiminin piroksikam nanopartiküllerinin zeta potansiyeli üzerine etkisini gösteren yüzey cevap grafiğı.

3^2 faktöriyel deney tasarımı kapsamında incelenen cevap değışkenlerinin bağımsız değışkenlerle olan matematiksel ilişkilerini ifade eden doğru denklemlerine ait katsayılar ve istatistiksel veriler Çizelge 3.13’de sunulmaktadır.

Çizelge 3.13. Polimerik nanopartiküllerin özellik parametrelerine uygulanan program analizi sonucunda elde edilen doğru denklemlerine ait katsayılar ve istatistiksel veriler.

Cevap Değişkenleri	Doğru denklemi katsayıları		P değeri	İstatistiksel veriler		
	Faktör	Katsayı		F değeri	P değeri	r ²
Enkapsülasyon Etkinliği	Sabit	+ 82,50		77,42	< 0,0001	%98,22
	X1	- 18,95	< 0,0001			
	X2	- 15,53	< 0,0001			
	X1 ²	- 13,86	0,0003			
	X2 ²	- 4,48	0,0641			
	X1X2	- 1,75	0,3357			
Partikül Büyüklüğü	Kesişim	+ 219,06		22,13	0,0002	%88,06
	X1	+ 40,65	< 0,0001			
	X2	+ 18,22	0,0126			
	X1X2	+ 21,18	0,0163			
Zeta Potansiyel	Kesişim	+ 23,55		12,26	0,0020	%71,03
	X1	- 2,30	0,1173			
	X2	- 6,23	0,0009			

F: Modele uyumu ifade eden değer;

P: İstatistiksel açıdan farkı ifade eden değer (P değeri <0.05 olan faktörler istatistiksel olarak anlamlıdır);

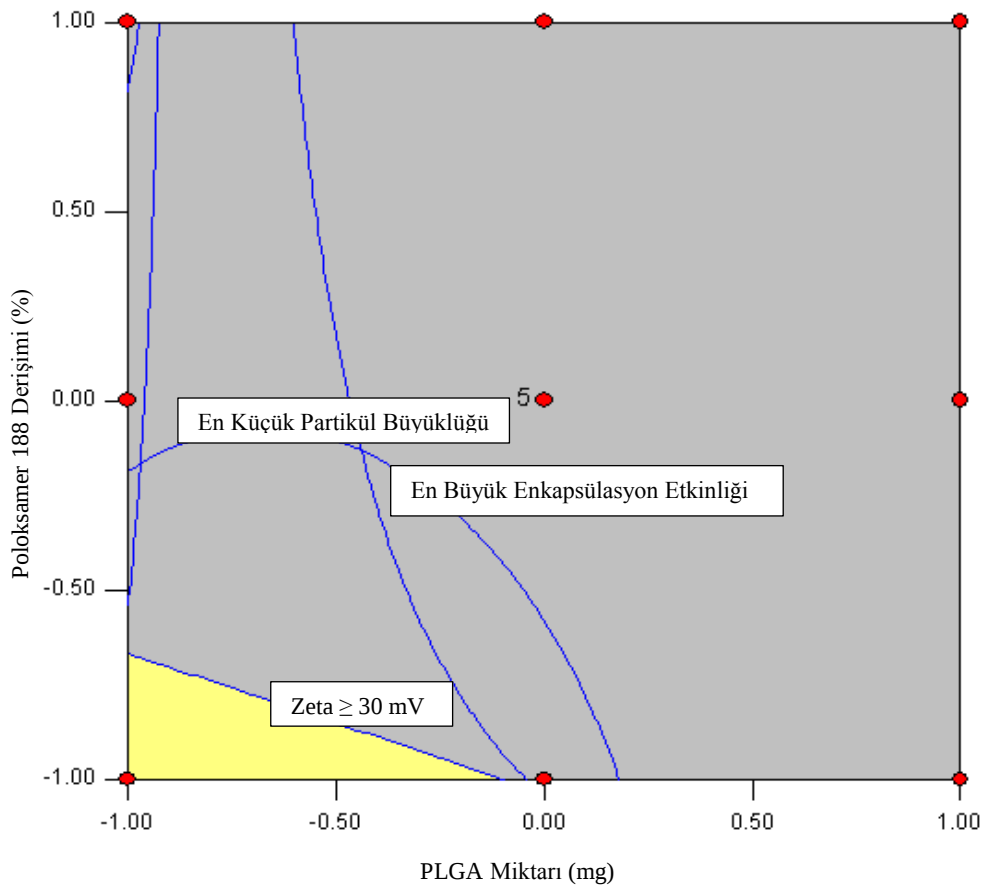
r²: Determinasyon katsayısı

Enkapsülasyon Etkinliği = + 82,50 - 18,95X1 - 15,53X2 - 13,86X1² - 4,48X2² - 1,75X1.X2

Partikül Büyüklüğü = + 219,06 + 40,65X1 + 18,22X2

Zeta Potansiyel = + 23,55 - 2,30X1 - 6,23X2

Bağımsız değişkenlerin, cevap değişkenleri üzerine olan etkilerini belirlemek için kurulan matematiksel eşitlikler ve modeller elde edildikten sonra hedeflenen cevap değişkenleri olarak en yüksek enkapsülasyon etkinliği, en düşük partikül büyüklüğü ve ≥ 30 mV zeta potansiyel değerlerine sahip formülasyonu gösteren kontur grafiği çizilmiştir. Şekil 3.10'da optimum formülasyonu gösteren kontur grafiği görülmektedir. Optimum formülasyonun belirlenmesinde incelenen her iki bağımsız faktörün cevap değişkenleri üzerine olan etkinliğini ifade eden bu grafiğin yanısıra hedeflenen cevap değişkenlerine sahip öngörülen optimum formülasyonun tespiti için “*Arzulanabilirlik Fonksiyonu (desirability function) (d)*” yönteminden de yararlanılmıştır (Yerlikaya ve ark., 2013; Pal ve Gauri, 2018; Şengel-Türk ve ark., 2021). Deney tasarımı kapsamında belirlenen hedef cevap değişkenlerine yönelik etkinliği irdelenen bağımsız değişkenler bazında elde edilen “d” değeri 0,99 olarak tayin edilmiştir.



Şekil 3.12. Optimum formülasyonu gösteren kontur grafiği. Sarı bölge hedeflenen cevap değişkenlerine ulaşmak için çalışılması gereken bağımsız değişken düzeylerini yani optimum formülasyonu tanımlamaktadır.

3.4.2. Nanopartiküllerin PDI Tayinine Ait Bulgular

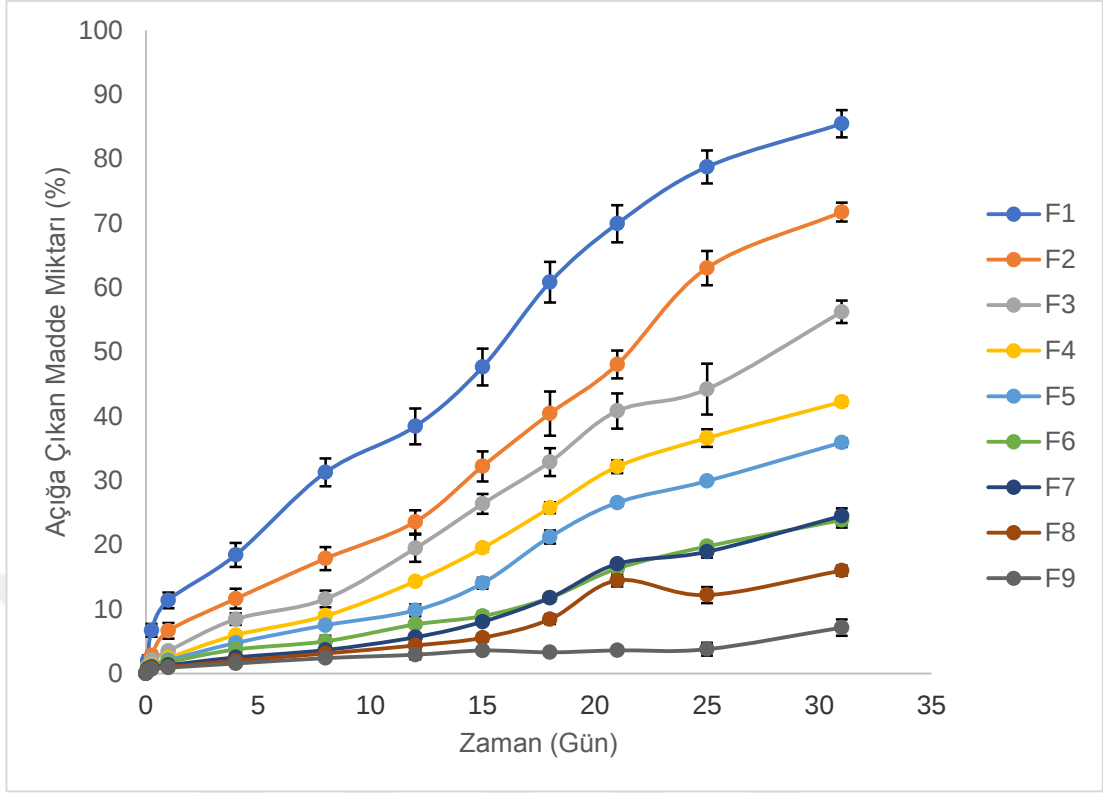
Bölüm 2.2.3.3.2’de belirtildiği gibi hazırlanan tüm nanopartikül formülasyonları için polidispersite indeksi tayini yapılmıştır. Gerçekleştirilen analiz sonucunda elde edilen PDI değerleri Çizelge 3.14’de sunulmaktadır.

Çizelge 3.14. Nanopartikül formülasyonlarının PDI verileri.

Formülasyon Kodu	PDI (Ortalama $\pm$ SS)
F1	0,051 $\pm$ 0,013
F2	0,098 $\pm$ 0,006
F3	0,062 $\pm$ 0,011
F4	0,088 $\pm$ 0,008
F5	0,097 $\pm$ 0,005
F6	0,082 $\pm$ 0,027
F7	0,075 $\pm$ 0,026
F8	0,098 $\pm$ 0,011
F9	0,249 $\pm$ 0,006

3.4.3. İn Vitro Etken Madde Açığa Çıkış Hızı Tayini Bulguları

Bölüm 2.2.3.1’de belirtildiği gibi hazırlanan piroksikam yüklü dokuz nanopartikül formülasyonunun zamana bağlı etken madde açığa çıkış hızı tayinine yönelik bulgular Şekil 3.11’de verilmiştir.



Şekil 3.13. İn vitro etken madde açığa çıkış hızı profilleri.

3.4.4. Açığa Çıkan Etken Madde Miktarının Bulguları

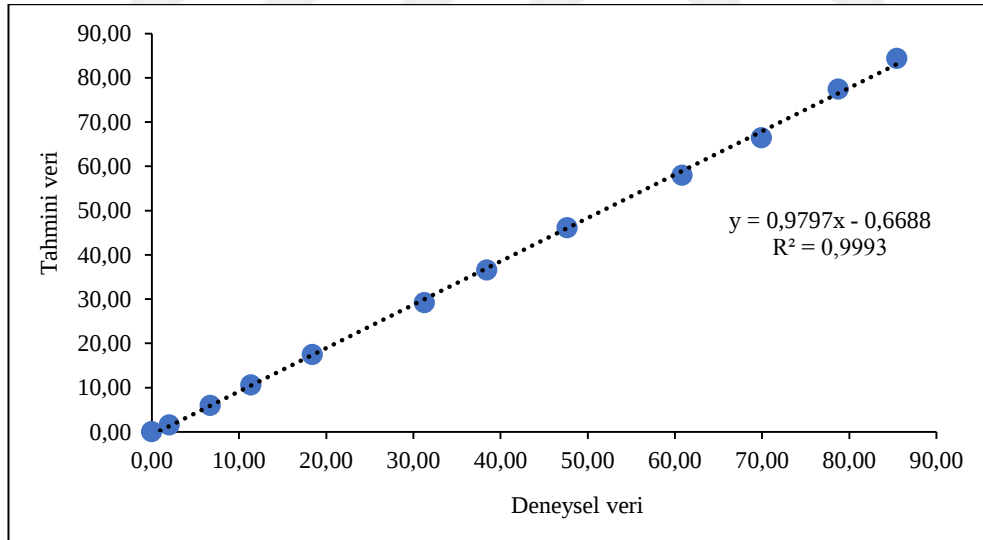
Bu kapsamda programa girilen bağımsız değişkenlerin düzeyleri ile her bir formülasyon için tayin edilen açığa çıkan etken madde miktarları Çizelge 3.15'te sunulmuştur. Bölüm 3.4.1'de belirtildiği şekilde F1 kodlu optimum formülasyonun deneysel çözünme hızı verilerine karşılık program tarafından oluşturulan tahmini çıktı verileri Çizelge 3.16'da, tahmini ve deneysel çözünme hızı verilerine ait korelasyon grafiği Şekil 3.14'te, deneysel ve tahmini çözünme hızı profilleri Şekil 3.15'te ve *f1* fark ve *f2* benzerlik test sonuçları ise Çizelge 3.17'de sunulmuştur.

Çizelge 3.15. Programa girilen bağımsız değişkenlerin düzeyleri ile her bir formülasyon için tayin edilen açığa çıkan etken madde miktarları.

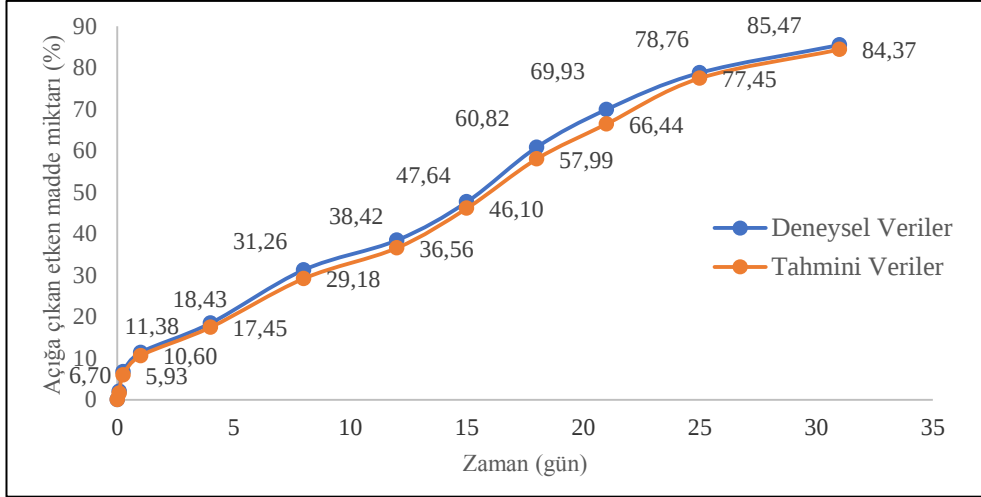
Formül no	Bağımsız değişkenler		Açığa çıkan etken madde miktarları (%)										
	X1(mg)	X2(%)	2. saat	6. saat	1. gün	4. gün	8. gün	12. gün	15. gün	18.gün	21. gün	25. gün	31. gün
F1	50	1	2,00±0,81	6,70±0,99	11,38±1,22	18,43±1,87	31,26±2,17	38,42±2,79	47,64±2,87	60,82±3,16	69,93±2,89	78,76±2,58	85,47±2,12
F2	50	2	1,11±0,10	2,79±0,68	6,62±1,22	11,62±1,54	17,86±1,80	23,57±1,82	32,20±2,34	40,41±3,42	48,05±2,15	63,03±2,66	71,74±1,46
F3	50	3	1,06±0,04	2,10±0,21	3,51±0,49	8,43±0,90	11,57±1,28	19,46±2,11	26,37±1,56	32,88±2,17	40,80±2,73	44,20±3,95	56,21±1,74
F4	100	1	0,96±0,06	1,34±0,08	2,40±0,27	5,95±0,41	8,95±0,26	14,32±0,39	19,51±0,56	25,75±0,84	32,15±1,01	36,61±1,37	42,23±0,60
F5	100	2	0,85±0,06	1,17±0,14	2,05±0,12	4,74±0,65	7,49±0,38	9,82±0,91	14,03±0,84	21,22±1,01	26,56±0,55	29,92±0,25	35,91±0,67
F6	100	3	0,81±0,04	1,10±0,07	1,76±0,10	3,73±0,29	5,00±0,79	7,61±0,31	8,92±0,24	11,76±0,57	16,30±1,06	19,75±0,91	23,86±1,36
F7	200	1	0,67±0,05	0,96±0,06	1,29±0,15	2,50±0,45	3,64±0,88	5,63±0,42	8,05±0,67	11,75±0,51	17,03±0,33	18,92±0,71	24,50±1,18
F8	200	2	0,52±0,09	0,83±0,12	1,03±0,08	1,96±0,22	3,11±0,52	4,35±0,46	5,55±0,60	8,42±0,73	14,46±0,95	12,19±1,26	15,99±0,78
F9	200	3	0,38±0,08	0,64±0,13	0,90±0,12	1,54±0,22	2,38±0,38	2,91±0,68	3,57±0,37	3,28±0,20	3,59±0,31	3,77±0,98	7,13±

Çizelge 3.16. Optimum formülasyona ait deneysel çözünme hızı verilerine karşılık program tarafından oluşturulan tahmini çözünme hızı çıktı verileri.

Zaman (saat / gün)	Deneysel olarak açığa çıkan etken madde miktarı (%)	Tahmini olarak açığa çıkan etken madde miktarı (%)
2. saat	2,00 ± 0,81	1,57
6. saat	6,70 ± 0,99	5,93
1. gün	11,38 ± 1,22	10,60
4. gün	18,43 ± 1,87	17,45
8. gün	31,26 ± 2,17	29,18
12. gün	38,42 ± 2,79	36,56
15. gün	47,64 ± 2,87	46,10
18. gün	60,82 ± 3,16	57,99
21. gün	69,93 ± 2,89	66,44
25. gün	78,76 ± 2,58	77,45
31. gün	85,47 ± 2,12	84,37



Şekil 3.14. Optimum formülasyonun tahmini ve deneysel çözünme hızı verilerine ait korelasyon grafiği.



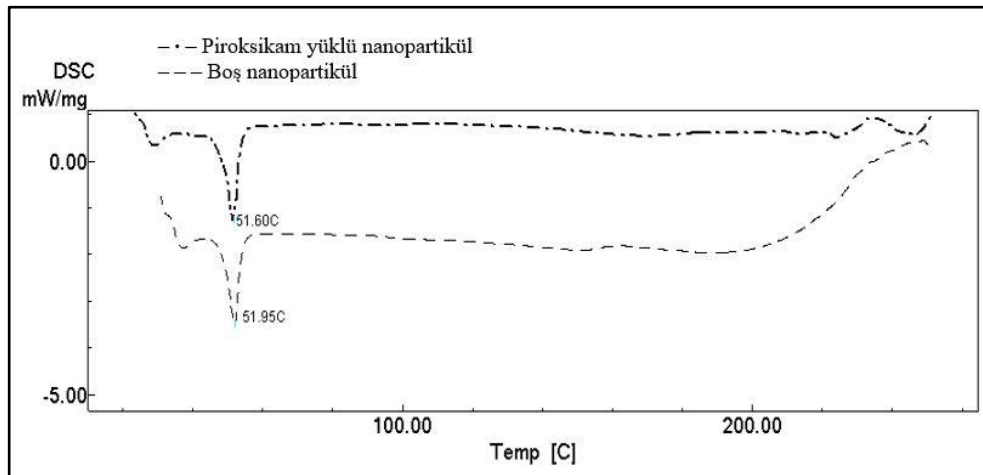
Şekil 3.15. Optimum formülasyonun deneysel ve tahmini çözünme hızı profilleri.

Çizelge 3.17. Optimum formülasyonun $f1$ fark ve $f2$ benzerlik testi sonuçları.

Uygulanan test	Sayısal değer
$f1$ fark testi	3,81
$f2$ benzerlik testi	84,32

3.4.5. Optimum Formülasyonun DSC Analizi Bulguları

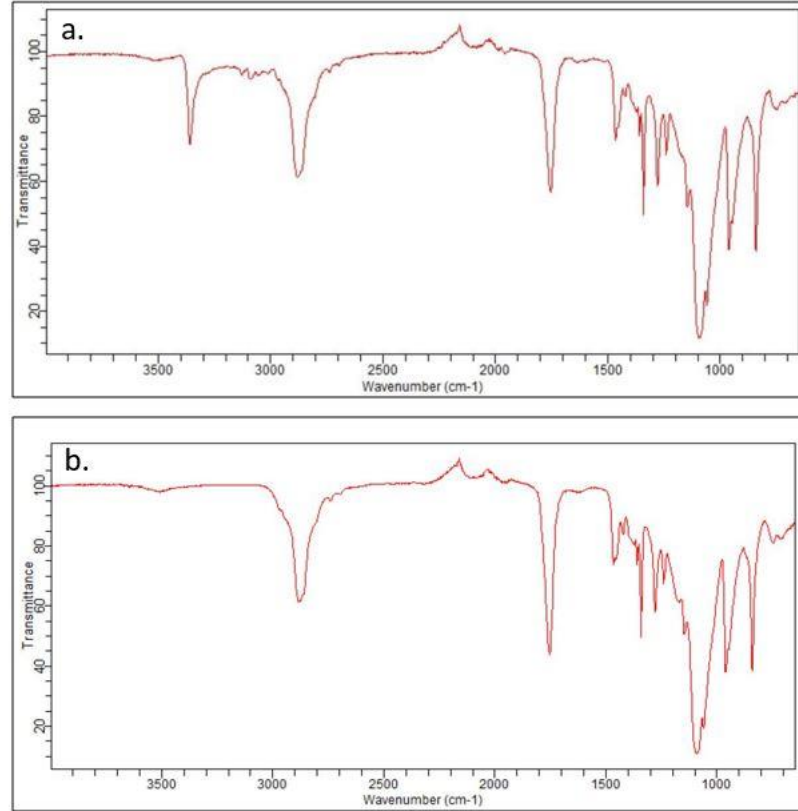
Optimum formülasyonda yer alan piroksikam yüklü nanopartiküllerin ve boş nanopartiküllerin DSC termogramı Şekil 3.16’da görüldüğü gibi elde edilmiştir.



Şekil 3.16. Optimum formülasyonda yer alan piroksikam yüklü nanopartiküllerin ve boş nanopartiküllerin DSC termogramı.

3.4.6. Optimum Formülasyonun FTIR Analizi Bulguları

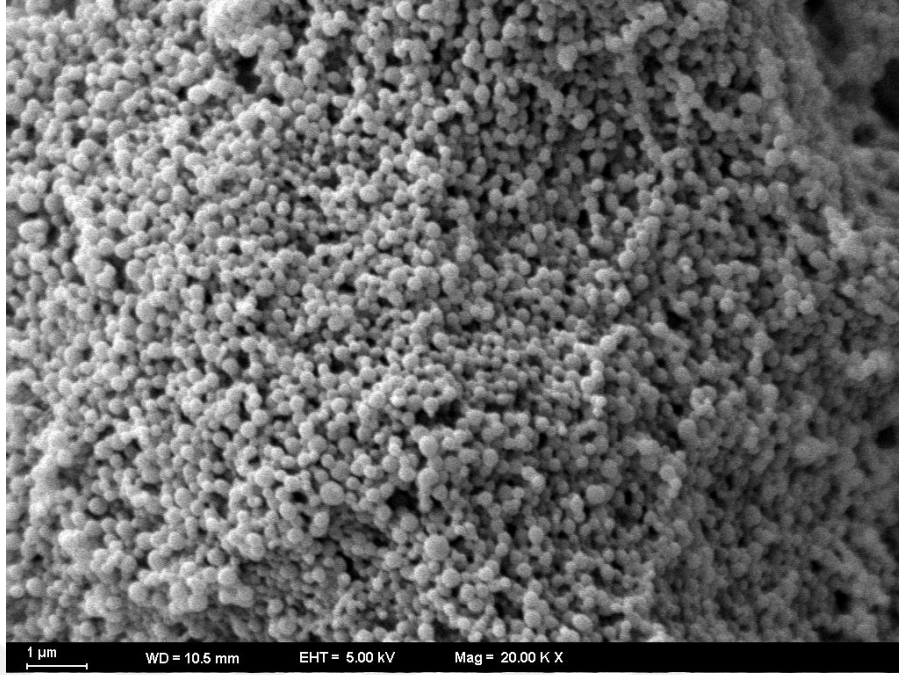
Optimum nanopartikül formülasyonunun FTIR analizi sonucu elde edilen bulgularına yönelik grafik Şekil 3.17’deki gibi elde edilmiştir.



Şekil 3.17. a. Piroksikam yüklü optimum nanopartikül formülasyonunun FTIR spektrumu; **b.** Piroksikam içermeyen boş optimum nanopartikül formülasyonunun FTIR sepktrumu.

3.4.7. Nanopartiküllerin Morfolojik Özellikleri Bulguları

Nanoprespitasyon tekniği kullanılarak oluşturulan piroksikam yüklü optimum nanopartikül formülasyonunun taramalı elektron mikroskopisi kullanılarak elde edilen görüntüleri Şekil 3.18’de görüldüğü şekilde elde edilmiştir.



Şekil 3.18. Nanopartiküllerin morfolojik görünümü.

3.4.8. Stabilité Çalışmaları Bulguları

Bölüm 2.2.3.3.9’da açıklanan şekilde gerçekleştirilen stabilite çalışmaları kapsamında elde edilen bulgulardan optimum formülasyona ait enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı ile zeta potansiyel değerleri Çizelge 3.18’de, redispersibilite indeksine ait bulgular ise Çizelge 3.19’da sunulmuştur.

Çizelge 3.18. Optimum formülasyonun 4°C sıcaklık değerindeki 6 aylık stabilite verileri.

Zaman	Enkapsülasyon Etkinliği (% ± SS)	Partikül Büyüklüğü (nm± SS)	PDI (Ortalama ± SS)	Zeta Potansiyel (mV± SS)
Başlangıç	98,88 ± 0,87	184,6 ± 0,92	0,051 ± 0,013	-31,8 ± 0,81
3. ay	98,76 ± 0,71	185,7 ± 1,15	0,057 ± 0,025	-32,2 ± 1,09
6. ay	98,47 ± 0,65	187,1 ± 1,47	0,047 ± 0,033	-32,7 ± 1,27

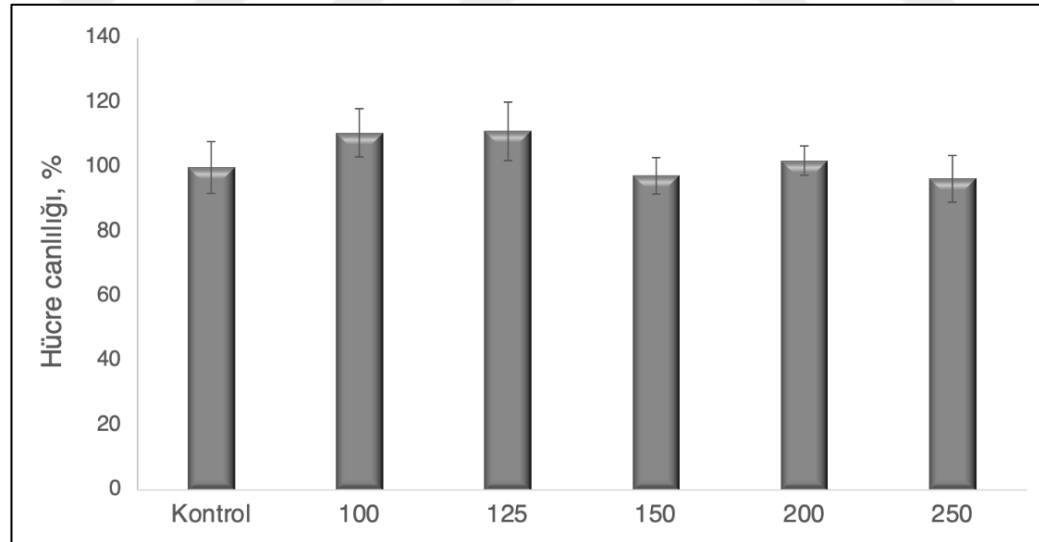
Çizelge 3.19. Optimum formülasyonun liyofilizasyon işlemi sonrasında ve 3 ile 6 aylık stabilite dönemleri sonrasında tayin edilen redispersibilite indeksi değerleri.

Zaman	Redispersibilite indeksi
Üretimde liyofilizasyon işlemi sonrasında	1,0044
3. ay stabilite dönemi	1,0103
6. ay stabilite dönemi	1,0179

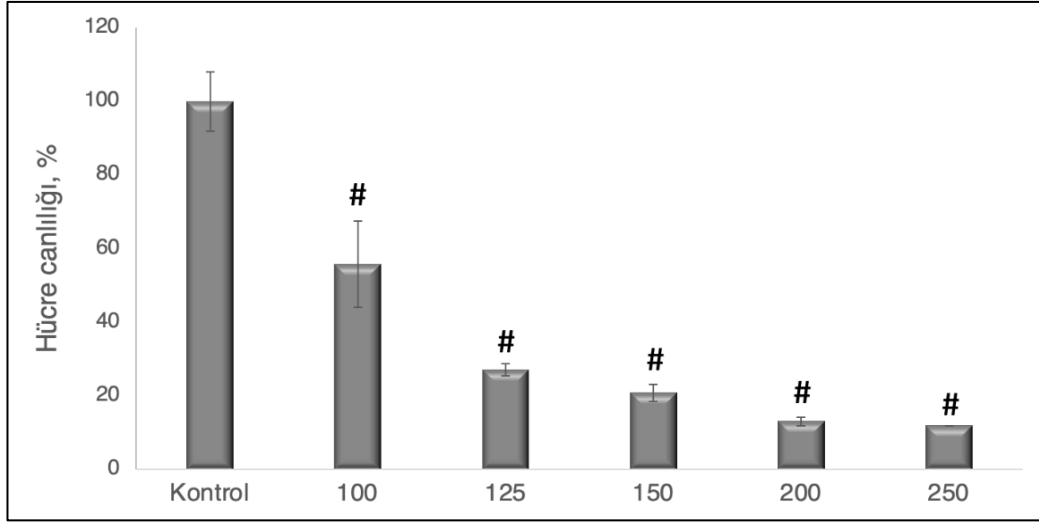
3.4.9. Piroksikam Yüklü Nanopartiküllerin Antiproliferatif Etkinlik

Bulguları

Bölüm 2.2.3.4’te belirtilen doğrultuda gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmaları sonucunda 100-250 μ M derişim aralığında saf piroksikamın ve piroksikam yüklü optimum nanopartikül formülasyonunun HepG2 insan karaciğer kanseri hücre hattı üzerindeki canlılığı Şekil 3.19 ve Şekil 3.18’de 48. saat üzerinden sunulmuştur.



Şekil 3.19. Saf piroksikamın 48 saat inkübasyon sonrası HepG2 hücre canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 3.20. Piroksikam yüklü optimum nanopartikül formülasyonunun 48 saat inkübasyon sonrası HepG2 hücre canlılığı üzerine etkisi (*, $p < 0,0001$, kontrole göre anlamlılık).

4. TARTIŞMA

4.1. Etken Maddenin Özelliklerinin Belirlenmesine Yönelik Bulguların Değerlendirilmesi

Hepatoselüler karsinom tedavisine yönelik antiproliferatif aktivite tespiti amacıyla yapılan deneylerde kullanılmak üzere temin edilen piroksikamın özelliklerini teyit etmek üzere FTIR analizi, DSC analizi, UV Spektrum analizi gerçekleştirilmiştir. Bu bölümde analizlerin sonuçları değerlendirilmiş ve bu değerlendirmeler sonucu verilen kararlar ilgili bölüm sonlarında belirtilmiştir.

4.1.1. Etken Maddenin FTIR Analizi Bulgularının Değerlendirilmesi

Yapılan çalışmalarda saf piroksikamın Şekil 3.1’de yer alan FTIR spektrumu incelendiğinde piroksikama ait temel belirleyici kimyasal grubun N-H gerilimi olduğu, bu gerilimin dışında ise deformasyon titreşimleri olarak tanımlanan SO₂, C-S, C-H kimyasal gruplarının da spektrumda yer aldığı belirlenmiştir (Nikolić ve ark., 2014; Panzade ve ark., 2017). Tez çalışmamızda elde edilen piroksikamın FTIR spektrumunda, piroksikamın kimyasal yapısında bulunan en özellikli grup olan N-H gerilimi 3334 cm⁻¹’de tayin edilirken; SO₂ gerilimi 1146 cm⁻¹’de, C-S gerilimi 685 cm⁻¹’de ve C-H gerilimine ait emilim bantlarının ise 660-900 cm⁻¹ gözlemlendiği belirlenmiştir. Elde edilen bu bulgular, piroksikam ile yapılan çalışmalarda gözlemlenen belirleyici emilim bantları ile örtüşmektedir (Nikolić ve ark., 2014; Panzade ve ark., 2017).

4.1.2. Etken Maddenin DSC Analizi Bulgularının Değerlendirilmesi

Tez çalışmamızda piroksikamın Şekil 3.2’de yer alan DSC termogramı incelendiğinde 203,37 °C’de keskin yapıda endotermik bir pik gözlenmektedir. Elde edilen bu pik piroksikamın erime derecesini gösterirken pikin keskin şekli ise piroksikamın kristal yapıda olduğunu işaret etmektedir. Elde edilen bu bulgu piroksikamın DSC analizine yönelik literatür bilgileri ile uyumlu bulunmuştur (Panzade ve ark., 2017).

4.1.3. Etken Maddenin UV Spektrumunun Değerlendirilmesi

Bu çalışmada piroksikamın miktar tayini yöntemi olarak UV spektrofotometri yönteminin kullanılmıştır. Bu yöntemin, piroksikamın çeşitli dozaj şekilleri ve ilaç taşıyıcı sistemlerde yer alan miktarının belirlenebilmesi amacıyla kullanımına yönelik çok sayıda çalışma literatürde bulunmaktadır (Gholivand ve ark., 2014; Kormosh ve ark., 2011). Piroksikamın asetonitril ve pH 7,4 tampon ortamlarından alınan spektrumları ve kalibrasyon doğru denklemleri Şekil 3.5 ve Şekil 3.6’da verilmiş olup asetonitril ortamında verdiği maksimum absorbands dalga boyu 325 nm, pH 7,4 tampon ortamında verdiği maksimum absorbands dalga boyu ise 354 nm olarak tespit edilmiştir.

4.2. Seçilen Analitik Yöntemin Validasyon Bulgularının Değerlendirilmesi

Tez çalışması boyunca seçilen analitik yöntemin validasyonunun tespit ve tayini için seçicilik, doğruluk, doğrusallık aralığı, kesinlik (tekrarlanabilirlik ve orta kesinlik parametreleri üzerinden), teşhis sınırı ile tayin sınırı parametreleri araştırılmıştır. Seçicilik sonuçları değerlendirilecek olduğunda geliştirilen miktar tayini yönteminin piroksikama özgün olup olmadığının tespiti için ilgili ortamlarda etken madde pikinin bulunduğu absorpsiyon bölgesinde başka herhangi bir pikin

bulunmadığı belirlenmiş ve dolayısıyla seçilen miktar tayini yönteminin piroksikama özgün olduğu sonucuna varılmıştır.

Tez çalışmamızda doğrusallık aralığı parametresine yönelik olarak çalışılan her iki ortam için de elde edilen r^2 değerleri 1'e yakın tespit edilmiştir. Aynı şekilde $Sy.x$ değerleri ise asetonytril için 0,0053; pH 7,4 tampon ortamı için 0,0027 şeklinde oldukça düşük düzeyde hesaplanmıştır. r^2 değerlerinin yüksek, $Sy.x$ değerlerinin ise düşük olması her iki ortam için elde edilen kalibrasyon verilerinin bu parametreyi kanıtladığını göstermektedir.

Doğruluk parametresinin belirlenebilmesine yönelik yapılan deneyler sonucu elde edilen bulgular Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5'de verilmiştir. Asetonytril ve pH 7,4 tampon ortamı için % geri elde değerlerine ait % bağıl standart sapma sonuçlarının % 2'den küçük olması bu parametrenin ispatlandığını göstermektedir.

Seçilen miktar tayini yönteminin analitik validasyonunda kesinlik parametresinin tespitine yönelik olarak asetonytril ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamları için yapılan tekrarlanabilirlik çalışmalarının sonuçları Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7'de verilmiştir. Seçilen analitik yöntemin kesinliğinin tespitine yönelik asetonytril ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamları için yapılan orta kesinlik çalışmalarının sonuçları ise sırasıyla Çizelge 3.8 ve Çizelge 3.9'da sunulmuştur. Her iki çalışmada da elde edilen % bağıl standart sapma katsayılarının % 2'den düşük çıkması bu parametrelerin sağlandığını kanıtlamaktadır.

Seçilen miktar tayini yönteminin analitik validasyon çalışmaları kapsamında LOD değerlerinin tespitine yönelik yapılan çalışmalar sonucu elde edilen bulgular asetonytril ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamları için Çizelge 3.10'da, LOQ değerlerinin tespitine yönelik elde edilen bulgular ise Çizelge 3.11'de sunulmuştur. Piroksikamın asetonytril ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamı için LOD değerleri sırasıyla 0.238 µg/mL ve 0.171 µg/mL olarak saptanırken LOQ değerleri ise 0.723 µg/mL ve 0.519 µg/mL olarak belirlenmiştir.

4.3. Nanopartikül Formülasyonlarının 3² Faktöriyel Deney Tasarımı ile Optimizasyon ve Özellik Bulgularının Değerlendirilmesi

4.3.1. Optimizasyon Bulgularının Değerlendirilmesi

Bu tez çalışmasında, 3² faktöriyel deney tasarımı kapsamında piroksikam yüklü polimerik nanopartikül formülasyonlarının kritik final özellikleri olan enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü ve yüzey yükü üzerine bağımsız değişkenler olarak belirlenen PLGA miktarı (X_1) ve Poloksamer 188 derişiminin (X_2) etkinliğinin irdelenmesi amaçlanmıştır. Belirlenen bağımsız değişkenler -1 düşük seviye, 0 orta seviye ve +1 yüksek seviye derecelerinde değerlendirilmiş ve bu doğrultuda PLGA polimeri 50 mg, 100 mg ve 200 mg'lık miktar seviyesinde ve Poloksamer 188 ise % 1, % 2 ve % 3 derişim düzeyinde kullanılmıştır.

Hazırlanan polimerik nanopartikül formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliği değerleri incelenen PLGA miktarı (X_1) ve Poloksamer 188 derişimi (X_2) bağımsız değişkenlerinin etkinliği açısından irdelendiğinde, her iki bağımsız değişkenin de enkapsülasyon etkinliği cevap değişkeni üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde etkin olduğu (Çizelge 3.13, $P<0,0001$) ve her iki bağımsız değişkenin düzeyi artıkça nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliğinin azaldığı belirlenmiştir (Çizelge 3.13). Bu cevap değişkenine göre oluşturulan matematiksel eşitlik modeline ait P değerinin $<0,0001$ ($P<0,05$) oluşu da formüller arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların elde edildiğini göstermektedir (Çizelge 3.13). Modele ait doğru denklemi katsayıları önünde yer alan + ve – işaretler, her bir faktörün pozitif veya negatif etkinliğini ifade etmektedir (Amasya ve ark., 2020). Bu kapsamda incelenen her iki bağımsız parametrenin de (X_1 ve X_2) nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinlikleri üzerinde genel olarak negatif bir etkinliği olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.13). Bir diğer değişle X_1 ve X_2 değerleri arttıkça, nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği değerleri azalmakta ve bu azalış formülasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde gerçekleşmektedir. Çizelge 3.13'de sunulan istatistiksel veriler, enkapsülasyon etkinliği cevap değişkeni açısından yorumlandığında program

tarafından cevap değişkenine yönelik geliştirilen matematiksel eşitlik modeline uyumun bir göstergesi olan F değerinin 77,42 olarak tayin edildiği belirlenmiştir. Bu cevap değişkeni için elde edilen F değeri, F testine ait istatistiksel tabloda % 5 kritik seviyesinde tek taraflı açıdan serbestlik dereceleri baz alınarak belirlenen tablo F değeri ile kıyaslandığında oldukça büyük bir değerdir ($F_{\text{tablo}}=4.46$) (Gündüz, 1998, sf.: 42). Piroksikam yüklü polimerik nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği cevap değişkeni için geliştirilen modelin F değerinin (Çizelge 3.13, $F=77,42$), F_{tablo} ($F_{\text{tablo}}=4.46$) değerinden büyük olması, elde edilen sonuçların yüksek oranda farklılığını ifade etmektedir. Yine Çizelge 3.13’de yer alan ve geliştirilen modelin determinasyon katsayısını ifade eden r^2 değeri ise % 98,22 olarak hesaplanmıştır. r^2 değerinin 1’e yakınlığı geliştirilen modelin doğruluğunun ve uygunluğunun bir göstergesidir (Şengel-Türk ve ark., 2021).

Gerçekleştirilen 3^2 faktöriyel tasarım kapsamında verilerin istatistiksel açıdan değerlendirilmesinin yanı sıra cevap yüzey metodolojisi yaklaşımı da optimum formülasyonun belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Bu yaklaşım bir değişkende meydana gelen değişimin hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının incelenen bağımlı değişkenlerin üzerinde nasıl bir etkinliğe sahip olduğunu görsel olarak sunmakta ve etkinliğin anlaşılmasına yardımcı olmaktadır (Amasya ve ark., 2020). Bu kapsamda tezimizde incelenen bağımsız değişkenler olan PLGA miktarı (X_1) ve Poloksamer 188 derişiminin (X_2) piroksikam yüklü polimerik nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği cevap değişkeni üzerine olan etkisi Şekil 3.9’da görülmektedir. Elde edilen grafik değerlendirildiğinde en yüksek yükleme etkinliğinin her iki bağımsız değişkenin de -1.00 seviyesi ile -0.50 seviyesi aralığında gerçekleştiği görülmektedir. Deney tasarımında bu konfigürasyona sahip olan formülasyon ise F1 kodlu formülasyondur. Piroksikam yüklü nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği değerlerinin PLGA miktarı ve Poloksamer 188 derişimi artıkça azalmasının temel nedeninin, hidrofobik özellikte bir molekül olan piroksikamın, çözündüğü ortam olan organik faz içinde kalma eğilimindeyken, dış su fazında artan Poloksamer 188 derişimine bağlı olarak bulunduğu iç organik fazdan dış su fazına difüze olmaya başlaması ve dolayısıyla sulu fazda miseller olarak çözünür hale gelmesi sonucunda nanodamlacıkların katılaşması esnasında

piroksikamın dış su fazına kaçması olduğu düşünülmektedir. Piroksikam 188 derişiminin artması ile elde edilen nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliklerinde gözlemlenen bu azalma, ulaşılan literatür verileri ile de desteklemektedir (Sharma ve ark., 2015).

Hazırlanan piroksikam yüklü polimerik nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklükleri üzerine, incelenen PLGA miktarı (X1) ve Poloksamer 188 derişimi (X2) bağımsız değişkenlerinin etkinliği incelendiğinde, incelenen her üç seviyedeki PLGA miktarı (50 mg, 100 mg ve 200 mg) ve Poloksamer 188 derişimi (% 1, % 2 ve % 3) düzeyinde de, polimer miktarı ($P < 0,0001$, Çizelge 3.13) ve yüzey etken madde derişimi ($P=0,0126$, Çizelge 3.13) artışına bağlı olarak partikül büyüklüklerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar elde edilmiştir ($P < 0,05$, Çizelge 3.13). Modelin F değeri ($F=22,13$, Çizelge 3.13), Ftablo değerinden ($F_{tablo}=4,46$) büyük bulunmuş, determinasyon katsayısı ise % 88,06 olarak hesaplanmıştır. Bu durum elde edilen partikül büyüklük verileri üzerinden geliştirilen matematiksel eşitlik modelinin yüksek derecede uygun ve doğru olduğu sonucunu göstermiştir. Şekil 3.10'da sunulan, nanopartiküllerin sahip oldukları partikül büyüklüğü cevap değişkeni üzerine, incelenen bağımsız değişkenlerin etkilerinin gözlemlendiği yüzey cevap grafiği incelendiğinde ise en küçük partikül boyutunun PLGA miktarının ve Poloksamer 188 derişiminin en düşük olduğu formülasyon olan F1 kodlu formülasyonda tespit edildiği görülmektedir. Nanopartikül oluşumu esnasında hem polimer miktarının hem de yüzey etken madde miktarının artmasına bağlı olarak organik fazın viskozitesi artmakta ve bu durumda emülsifikasyon sırasında dış su faz içinde daha zor disperse olan daha viskoz bir organik faz oluşumuna yol açmaktadır (Şengel-Türk, 2009). PLGA miktarı ve Polokamer 188 derişiminde meydana gelen artışa bağlı olarak nanaopartiküllerin partikül boyutlarında gözlemlenen istatistiksel olarak anlamlı artışın bu sebeple gözlemlendiği düşünülmektedir.

Tezimiz kapsamında PLGA miktarı (X1) ve Poloksamer 188 derişimi (X2) bağımsız değişkenlerinin etkisinin incelendiği bir diğer parametre ise nanopartiküllerin yüzey yükleri olmuştur. Bu açıdan elde edilen sonuçlar irdelendiğinde, her iki bağımsız değişkenin artışı sonucunda nanopartiküllerin zeta

potansiyel değerlerinin azaldığı, ancak bu azalışın PLGA miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde gerçekleşmediği ($P = 0,11731$, Çizelge 3.13), Poloksamer 188 derişimi açısından ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde gözlemlendiği ($P = 0,0009$, Çizelge 3.13) belirlenmiştir. Nanopartikül yüzeyinde yer alan Poloksamer 188'e ait iyonize karboksil gruplarının varlığından dolayı nanopartikül formülasyonlarının tamamında zeta potansiyel değerleri negatif olarak elde edilmiştir (Çizelge 3.12). Elde edilen zeta potansiyel değerleri üzerinden geliştirilen matematiksel modelin F değeri 12,26 ve doğru denkleminin r^2 değeri ise % 71,03 olarak hesaplanmıştır. Bu veriler elde edilen zeta potansiyel değerlerinin üzerinden geliştirilen matematiksel eşitlik modelinin yeterli uygunluğa sahip olduğunu ifade etmektedir. Şekil 3.11'de görülen yüzey yükü bağımlı değişkeni üzerine PLGA miktarı (X1) ve Poloksamer 188 derişimi (X2) bağımsız değişkenlerinin etkinliği irdelendiğinde ise istatistiksel olarak anlamlı düzeydeki en yüksek zeta potansiyel değerinin her iki bağımsız değişkeninde -1.00 seviyelerinde ortaya çıktığı belirlenmiştir.

4.3.2. Nanopartiküllerin PDI Tayinine Yönelik Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi

Çizelge 3.14'de belirlenen bağımlı ve bağımsız değişkenler düzeylerinde hazırlanan tüm nanopartikül formülasyonlarının sahip olduğu PDI değerleri yer almaktadır. PDI, nanopartiküllerin partikül büyüklüğü dağılımının ifadesidir. Tezimiz kapsamında geliştirilen piroksikam yüklü polimerik nanopartikül formülasyonlarının PDI değerleri 0,051 – 0,249 aralığında elde edilmiştir. Bu açıdan elde edilen tüm nanopartikül formülasyonları dar bir partikül büyüklüğü dağılımı göstermektedirler (PDI değeri $< 0,3$, Çizelge 3.14).

4.3.3. İn Vitro Etken Madde Açığa Çıkış Hızı Tayini Bulgularının Değerlendirilmesi

Şekil 3.13'te görülen piroksikam yüklü nanopartikül formülasyonlarının yaklaşık bir ay boyunca sürdürülen çözünme hızı profilleri incelendiğinde seçilen bağımsız değişkenler olan PLGA miktarı ve Poloksamer 188 derişimi artıkça nanopartikül formülasyonlarından piroksikamın salım hızının anlamlı düzeyde azaldığı gözlenmiştir ($P<0,05$). Elde edilen bu çözünme hızı profillerinin, nanopartiküllerin sahip oldukları partikül büyüklükleri ile uyumlu oldukları belirlenmiştir. Nanopartiküllerin partikül boyutlarının artmasına bağlı olarak partiküllerin sahip oldukları yüzey alanlarının azalmasından dolayı birim zamanda aşığa çıkan etken madde miktarları azalmış ve partikül boyutu daha büyük olan nanopartiküllerden daha yavaş bir etken madde salımının gözleendiğı belirlenmiştir (Şengel-Türk, 2009).

4.3.4. Optimum Nanopartikül Formülasyonun Belirlenmesine Yönelik Bulgularının Değerlendirilmesi

Gerçekleştirilen 3^2 faktöriyel deney tasarımı kapsamında belirlenen bağımsız değişkenler olan PLGA miktarı ve Poloksamer 188 derişiminin, nanopartiküllerin kritik kalite özellikleri arasında yer alan cevap değişkenleri olan enkapsülasyon etkinliği, partikül boyutu ve zeta potansiyel değerleri üzerine olan etkinlikleri bir arada irdelendiğinde Şekil 3.12'de verilen kontür grafiğı elde edilmiştir. Bu grafikte, belirlenen tasarım alanında hedeflenen cevap değişkenlerine sahip optimum nanopartikül formülasyonun elde edilmesi için çalışılması gereken bağımsız değişken düzeylerini sarı ile görülen bölge tanımlamaktadır. Grafikte gözlemlenen bu sarı bölgenin, hedef cevap değişkenlerine ne düzeyde uygun olduğunu tanımlayan “d” değeri ise 0,99 olarak elde edilmiştir. “d” değerinin “1” değerine yakın olması hedeflenen cevap değişkenlerine yaklaşıldığını ifade ederken “1” değerinden uzaklaşan ve “0” değerine yakınlaşan “d” değerleri ise hedeflenen cevap değişkenlerinden uzaklaşıldığını ifade etmektedir. Bu doğrultuda gerçekleştirilen deney tasarımı sonucunda en düşük PLGA miktarı (50 mg) ve Poloksamer 188

derişimi (%1) konfigürasyonuna sahip F1 formülasyonu ile hedef cevap değişkenleri olarak belirlenen en yüksek enkapsülasyon etkinliği, en düşük partikül büyüklüğü ve ± 30 mV değerin üzerindeki yüzey yükü değerlerine 0,99 oranında yaklaşıldığı saptanmıştır. Bu şekilde 3^2 faktöriyel tasarım kullanılarak hazırlanan çeşitli piroksikam yüklü polimerik nanopartikül formülasyonları arasında optimum formülasyon olarak belirlenen F1 kodlu nanopartikül formülasyonunun bundan sonraki analizlere ve hücre kültürü çalışmalarına taşınmasına karar verilmiştir.

4.3.5. Açığa Çıkan Etken Madde Miktarının Tahmini Bulguların Değerlendirilmesi

3^2 faktöriyel deney tasarımı kapsamında hazırlanan piroksikam yüklü polimerik nanopartikül formülasyonlarının programa girilen bağımsız değişken düzeyleri bazında her bir zaman noktası için tayin edilen açığa çıkan etken madde miktarları Çizelge 3.15'te sunulmuştur. Formülasyon optimizasyon çalışmaları sonucunda oluşturulan modelin, tahmin yeteneğinin belirlenmesi amacıyla Çizelge 3.16'da , Şekil 3.15'te ise çözünme hızı grafiği şeklinde verilen, optimum formülasyonun her bir zaman noktası için deneysel çözünme hızı verilerine karşılık program tarafından oluşturulan tahmini çıktı verileri arasındaki ilişki hem korelasyon grafiği ve determinasyon katsayısı (Şekil 3.14) yaklaşımıyla hem de çözünme hızı profili benzerlik düzeyi açısından $f1$ fark ve $f2$ benzerlik testleri ile (Çizelge 3.17) irdelenmiştir. Bu doğrultuda optimum formülasyon için deneysel çözünme hızı verileri ile sistemin oluşturduğu tahmini çözünme hızı verileri arasındaki tüm zaman noktaları bazında elde edilen korelasyon grafiğine yönelik determinasyon katsayısı 0,9993 olarak belirlenmiştir. Determinasyon katsayısının 1,00 değerine yakın olarak tayin edilmesi, tahmini çıktı değerleri ile deneysel veriler arasındaki korelasyonun yüksekliğinin bir göstergesi olarak kabul edilmiştir (Şekil 3.14). Benzer şekilde, optimum formülasyona ait deneysel çözünme hızı profili ile programın tahmin ettiği çözünme hızı profili arasındaki benzerlik düzeyine yönelik olarak $f2$ değeri 84,32; $f1$ değeri ise 3,81 olarak hesaplanmıştır. $f2$ değerinin sayısal veri olarak 50'den büyük olması; $f1$ değerinin ise 0 değerine yakın tespit edilmesi, optimum formülasyon için

deneysel çözünme hızı profili ile tahmini çözünme hızı profillerinin benzer olduğunu kanıtlamaktadır. Bu durum sistemin tasarım alanı içerisinde belirlenecek olması şartıyla daha önce çalışılmamış her bir bağımsız değişken düzeyinde hazırlanması planlanan nanopartikül formülasyonlarına ait çözünme hızı profillerini ne düzeyde benzer olarak tahmin edebileceğini ortaya koymaktadır.

4.3.6. Optimum Nanopartikül Formülasyonunun DSC Analizi Bulgularının Değerlendirilmesi

Tez çalışmamız kapsamında polimerik nanopartiküllerin formülasyon içeriğinde yer alan yardımcı maddeler ile piroksikam arasındaki olası etkileşimleri tayin etmek ve piroksikamın polimerik matriks yapı içerisindeki fiziksel durumunu belirlemek amacıyla DSC analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.16'da sunulan piroksikam yüklü optimum formülasyon ve optimum formülasyonun piroksikam içermeyen şekline ait DSC termogramları incelendiğinde, Şekil 3.2'de yer alan saf piroksikama ait DSC termogramında gözlemlenen 203,37°C'deki keskin endotermik pikin piroksikam yüklü optimum formülasyonda gözlenmediği belirlenmiştir. Bu durum kristal yapılu piroksikamın, polimerik matris yapısı içerisinde amorf yapıya dönüşmesinden kaynaklanmaktadır (Ordu ve Özdemir., 1986; Şengel-Türk ve ark., 2009). Şekil 3.16'da sunulan termogramlarda PLGA polimerine ait camsı geçiş sıcaklığı (Tg) değerleri, piroksikam içermeyen boş nanopartiküller için 51,95°C'de gözlemlenirken piroksikam içeren nanopartikül formülasyonu için ise 51,60°C'de tespit edilmiştir. PLGA polimerine yönelik benzer Tg değerleri farklı literatürlerde de sunulmuştur (Şengel-Türk ve ark., 2009; Türk ve ark., 2014).

4.3.7. Optimum Nanopartikül Formülasyonunun FTIR Analizi Bulgularının Değerlendirilmesi

Tez çalışmamızda, Şekil 3.1’de sunulan saf piroksikama ait FTIR spektrumunda gözlemlenen ve Nikolić ve ark. (2014) ile Panzade ve ark. (2017) tarafından gerçekleştirilen araştırmalarda da benzer bulunan en temel belirleyici emilim bandının 3334 cm^{-1} ’de görülen N-H gerilimi olduğu belirlenmiştir. Saf piroksikamın FTIR spekturumunda 1146 cm^{-1} ’de görülen SO_2 gerilimi, 685 cm^{-1} ’de gözlemlenen C-S gerilimi ve $660\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ aralığında gözlenen C-H gerilimlerinin ise deformasyon titreşimleri olduğu literatürlerde tanımlanmıştır (Nikolić ve ark., 2014; Panzade ve ark., 2017). Şekil 3.17.a’da yer alan piroksikam yüklü optimum nanopartikül formülasyonuna ait FTIR spektrumu, piroksikam molekülünün belirleyici kimyasal gruplarını ifade eden absorpsiyon bantları açısından incelendiğinde ise tanımlanan en temel kimyasal grup olan N-H geriliminin 3342 cm^{-1} ’de gözlemlendiği belirlenmiştir. SO_2 geriliminin yine 1146 cm^{-1} ’de ve $660\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ aralığında ise piroksikamın kimyasal yapısına özgü aromatik C-H yapılarını tanımlayan özel deformasyon titreşimlerinin gözlemlendiği tayin edilmiştir. Şekil 3.17.b’de yer alan piroksikam içermeyen optimum formülasyona ait FTIR spekturumunda ise piroksikamın kimyasal yapısına ait en temel özel absorpsiyon bandı olan N-H grubunun gözlenmemesi polimerik nanopartikül yapısındaki piroksikamın varlığını kanıtlamaktadır. PLGA polimerinin FTIR spekturumundaki absorpsiyon bantları incelendiğinde ise piroksikam içeren ve içermeyen optimum nanopartikül formülasyonlarında sırasıyla 2879 cm^{-1} ’de ve 2881 cm^{-1} ’de C-H gerilimlerinin, her iki formülasyonda da 1753 cm^{-1} ’de karbonil (C=O) geriliminin yer aldığı belirlenmiştir. PLGA polimeri için elde edilen bu absorpsiyon bantları, bu polimer ile yapılan çalışmalar ile de uyumlu bulunmuştur (Şengel-Türk, 2009)

4.3.8. Optimum Nanopartikül Formülasyonunun Morfolojik Özellik Bulgularının Değerlendirilmesi

Tez çalışmamız kapsamında belirlenen piroksikam yüklü optimum formülasyon olan F1 kodlu polimerik nanopartikül formülasyonuna ait SEM mikrografları Şekil 3.18’de verilmiştir. Bu mikrograflarda da görüldüğü gibi piroksikam yüklü nanopartiküller son derece küresel şekilli elde edilmiş olup tayin edilen PDI değerlerini destekler nitelikte dar bir partikül büyüklüğü dağılımına sahiptirler.

4.3.9. Optimum Nanopartikül Formülasyonun Stabilité Çalışması Bulgularının Değerlendirilmesi

Piroksikam yüklü optimum polimerik nanopartikül formülasyonunun 4°C sıcaklık değerindeki 6 aylık stabilité verileri Çizelge 3.18’de sunulmuş olup bu veriler incelendiğinde, belirtilen süreçte nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri yönünden istatistiksel açıdan anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir ($P>0,05$). Bu sonuç, belirlenen saklama koşullarının geliştirilen nanopartikül formülasyonu için uygun olduğu ve nanopartiküllerin stabilitesinin korunduğunu ifade etmektedir. Optimum formülasyonun liyofilizasyon işlemi sonrasında ve 3 ile 6 aylık stabilité dönemleri sonrasında tayin edilen redispersibilite indeksi değerleri ise Çizelge 3.19’da sunulmakta olup, optimum nanopartikül formülasyonu için hesaplanan redispersibilite değerlerinin 1,00 değerine yakın olması formülasyonların yeniden disperse olma özelliğinin son derece iyi düzeyde olduğunu kanıtlamaktadır (Şengel-Türk., 2009).

4.3.10. Nanopartiküllerin Antiproliferatif Aktivite Tayini Bulgularının Değerlendirilmesi

Tez çalışmamızda saf piroksikamın ve piroksikam yüklü optimum formülasyon olarak belirlenen F1 kodlu formülasyonun HepG2 insan karaciğer kanseri hücrelerine karşı gösterdiği antiproliferatif etkinliğin belirlenmesi amacıyla hücre canlılığı testleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 48 saat boyunca gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmaları sonucunda elde edilen % hücre canlılığı grafikleri saf piroksikam için Şekil 3.19.'da, piroksikam yüklü optimum polimerik nanaopartikül formülasyonu için ise Şekil 3.20'de sunulmuştur. ISO 10993-5 Medikal ürünlerin biyolojik değerlendirmesi/Bölüm 5'e göre in vitro sitotoksikite testleri kapsamında hücre proliferasyon deneylerinde geliştirilen ürünlerin sitotoksik etkisinin nicel bir değerlendirmesi yapıldığında, hücre canlılığında en az %30'dan fazla bir azalma sitotoksik etki olarak kabul edilmektedir. Bu bağlamda HepG2 insan karaciğer kanseri hücre hattı üzerinde piroksikam içermeyen boş nanopartikül formülasyonları hiçbir sitotoksik etki göstermemişken benzer durum Şekil 3.19'da sunulan saf piroksikam için de geçerlidir. Şekil 3.20'de sunulan piroksikam yüklü optimum polimerik nanopartikül formülasyonunun HepG2 insan karaciğer kanseri hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkinliği irdelendiğinde incelenen tüm derişim düzeylerinde 48 saat sonunda hücre canlılıkları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. En yüksek doz olan 250 µM derişimde hücre canlılığı % 11 düzeyinde tespit edilmiştir. Bu durum, HepG2 insan karaciğer kanseri hücreleri üzerinde piroksikam yüklü optimum polimerik nanopartikül formülasyonunun saf piroksikama kıyasla oldukça yüksek seviyede antiproliferatif etkinliğe sahip olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında hepatosellüler karsinom tedavisinde kullanılmak amacıyla antikanser etkinliği yapılan epidemiyolojik ve çeşitli klinik çalışmalar ile kanıtlanmış bir oksikam grubu NSAİİ ajan olan piroksikamın polimerik nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerinin 3^2 faktöriyel deney tasarımı kapsamında tasarlanması ve geliştirilmesi hedeflenmiştir. Hazırlanan piroksikam yüklü polimerik nanopartiküler sistemlerin kritik final özellikleri olan enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü ve yüzey yükü üzerine belirlenen iki bağımsız değişken olan PLGA miktarı ve Poloksamer 188 derişiminin etkisi incelenmiş ve elde edilen optimum piroksikam yüklü polimerik nanopartikül formülasyonunun HepG2 insan karaciğer kanseri hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkinliği tayin edilmiştir. Bu doğrultuda aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

- Piroksikam yüklü polimerik nanopartikül formülasyonlarının tasarımında bağımsız değişkenler olarak belirlenen PLGA miktarının ve Poloksamer 188 derişiminin polimerik nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği üzerinde negatif yönde bir etkinliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Hazırlanan piroksikam yüklü polimerik nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinlikleri % 98,88 ile % 29,65 aralığında tespit edilmiştir.
- Bağımsız değişkenler olan PLGA miktarı ile Poloksamer 188 derişimi polimerik nanopartiküllerin partikül büyüklükleri üzerinde pozitif bir etki göstermiştir ve nanopartiküllerin partikül boyutları 184,6 nm – 323,4 nm aralığında belirlenmiştir. Geliştirilen polimerik nanopartiküllerin partikül büyüklüğü dağılımını ifade eden PDI değerleri ise 0,3 değerinden küçük tayin edilmiş ve bu doğrultuda homojen bir partikül büyüklük dağılımının elde edildiği belirlenmiştir.
- Polimerik nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri üzerine iki bağımsız değişkenin etkisi incelendiğinde ise her iki bağımsız değişkenin artışı sonucunda nanopartiküllerin zeta potansiyel değerlerinin azaldığı, ancak bu azalışın PLGA miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde

gerçekleşmediği, Poloksamer 188 derişimi açısından ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde gözleendiği belirlenmiştir.

- Optimum piroksikam yüklü polimerik nanopartikül formülasyonunun belirlenebilmesi için hedeflenen cevap değişkenleri olarak en yüksek enkapsülasyon etkinliği, en düşük partikül boyutu ve 30 mV değerinden yüksek zeta potansiyel değeri belirlenmiştir. Gerçekleştirilen deney tasarımı ve optimizasyon çalışması doğrultusunda en düşük PLGA miktarı ve Poloksamer 188 derişimi konfigürasyonuna sahip F1 kodlu polimerik nanaopartikül formülasyonu ile hedef cevap değişkenlerine 0,99 oranında yaklaşıldığı saptanmıştır.
- Formülasyon optimizasyon çalışmaları sonucunda oluşturulan modelin, tahmin yeteneğinin belirlenmesi amacıyla belirlenen optimum formülasyonun her bir zaman noktası için deneysel çözünme hızı verilerine karşılık program tarafından oluşturulan tahmini çıktı verileri arasındaki ilişki, in vitro çözünme hızı profili benzerlik düzeyi ile değerlendirilmiş ve bu kapsamda f_1 fark testi 3,81; f_2 benzerlik testi 84, 32 olarak elde edilerek optimum formülasyon için deneysel çözünme hızı profili ile tahmini çözünme hızı profillerinin benzer olduğu belirlenmiştir.
- Piroksikam yüklü optimum polimerik nanopartikül formülasyonun 4°C sıcaklıkta altı ay boyunca gerçekleştirilen stabilite çalışmaları sonucunda final ürün özelliklerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır. Bu durum 4°C sıcaklık değerinin, liyofilize formdaki nanopartiküllerin saklanması için uygun bir ortam koşulu olduğunu göstermiştir.
- Geliştirilen piroksikam yüklü optimum polimerik nanaopartikül formülasyonları HepG2 insan karaciğer kanseri hücre hattı üzerinde en yüksek doz olan 250 µM derişimde % 11 düzeyinde bir antiproliferatif etkinlik ortaya koyarken saf piroksikam ise incelenen 100-250 µM derişim aralığında hücreler üzerinde hiçbir sitotoksik etkinlik göstermemiştir.

Sonuç olarak; bu tez çalışmasında, gerçekleştirilen deney tasarımı ile sistemin tasarım alanı içerisinde belirlenecek olması şartıyla daha önce çalışılmamış her bir

bağımsız değişken düzeyinde hazırlanması planlanan nanopartikül formülasyonları için hem incelenen cevap değişkenlerinin olası sonuçlarının hangi seviyede doğru olarak tahmin edilebileceği hem de etken maddenin in vitro çözünme hızı profilinin ne düzeyde benzer olarak elde edebileceği gösterilmiştir.



ÖZET

Hepatosellüler Karsinom Tedavisine Yönelik Antiproliferatif Ajan İçeren Nanopartikül Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve Değerlendirilmesi

Hepatit B ve Hepatit C viral enfeksiyonları, sigara ve alkol tüketimi, siroz gibi başlıca risk faktörlerinin neden olduğu hepatosellüler karsinom, mortalite oranları göz önünde bulundurulduğunda dünya çapında üçüncü sırada yer almaktadır. Tedavi seçenekleri arasında cerrahi yöntemler, karaciğer nakli, kemoterapi yer alsa da mevcut tedavilerin malignite ve metastazları önlemede yetersiz kalması alternatif tedavi platformu arayışını doğurmuştur. Bu amaçla bu tez çalışmasında hepatosellüler karsinom tedavi seçeneklerine alternatif olarak antikanser etkinlik gösteren piroksikamın polimerik nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemi geliştirilmiş ve HepG2 insan karaciğer kanseri hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkinliği tayin edilmiştir. Bu kapsamda 3^2 faktöriyel deney tasarımı kullanılarak polimerik nanopartikül formülasyonları hazırlanmış ve enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi, zeta potansiyeli, morfolojik özellikleri, etken madde-yardımcı madde etkileşimleri, in vitro etken madde açığa çıkış hızı tayini, stabilite ve sitotoksosite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 3^2 faktöriyel deney tasarımı sonucu yapılan istatistiksel değerlendirmeler ile belirlenen optimum piroksikam yüklü nanopartikül formülasyonunun saf moleküle oranla HepG2 hücre canlılığı üzerinde anlamlı derecede antiproliferatif etkinliğe sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: 3^2 Faktöriyel Deney Tasarımı, HepG2 insan karaciğer kanseri hücre hattı, Piroksikam, PLGA, Poloksamer 188.

SUMMARY

Development and Evaluation of Nanoparticle Formulations Containing Antiproliferative Agent for Hepatocellular Carcinoma Treatment

When the mortality rates of hepatocellular carcinoma caused by major risk factors such as Hepatitis C and Hepatitis B viral infections, smoking and alcohol consumptions and cirrhosis are considered, it ranks third in the world. Although surgical methods, liver transplation and chemotherapy are among the treatment strategies, the inadequacy of current treatment to prevent malignancy and metastases has led to the search for an alternative treatment platform. For this purpose, in this thesis, polymeric nanoparticulate drug delivery system of piroxicam which has antienflammatory activity as an alternative to hepatocellular carcinoma treatment strategies, was developed and its antiproliferative effectiveness on HepG2 human liver cancer cell line was determined. In this context, polymeric nanoparticle formulations were prepared using 3^2 factorial experimental design and encapsulation efficiency, particle size and polydispersity index, zeta potential, morphological properties, active substance-excipient interactions, in vitro drug release rate, stability and cytotoxicity studies were carried out. It was concluded that the optimum piroxicam loaded nanoparticle formulation, which was determined by the statistical evaluations made as a result of 3^2 factorial experimental design, has a significant antiproliferative activity on HepG2 cell viability compared to the pure molecule.

Keywords: 3^2 Factorial Experimental Design, HepG2, Piroxicam, PLGA, Poloxamer 188.

KAYNAKLAR

- ABRIATA JP, TURATTI RC, LUIZ MT, RASPANTINI GL, TOFANI LB, DO AMARAL R, SWIECH K, MARCATO PD, MARCHETTI JM (2019). Development, characterization and biological in vitro assays of paclitaxel-loaded PCL polymeric nanoparticles. *Mat Sci Eng C*, **96**: 347–355.
- AHMAD N, ALAM MA, AHMAD R, NAQVI AA, AHMAD FJ (2018). Preparation and characterization of surface-modified PLGA-polymeric nanoparticles used to target treatment of intestinal cancer. *Artificial Cells Nanomed Biotech*, **46**(2): 432–446.
- AHMADIAN E, DIZAJ SM, RAHIMPOUR E, HASANZADEH A, EFTEKHARI A, HOSAIN ZADEGAN H, HALAJZADEH J, AHMADIAN H (2018). Effect of silver nanoparticles in the induction of apoptosis on human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line. *Mat Sci Eng C*, **93**: 465–471.
- AL-SHAKARCHI W, ALSURAIIFI A, ABED M, ABDULLAH M, RICHARDSON A, CURTIS A, HOSKINS C (2018). Combined effect of anticancer agents and cytochrome C decorated hybrid nanoparticles for liver cancer therapy. *Pharmaceutics*, **10**(2): 48.
- AMASYA G., INAL O., SENDEL-TURK CT (2020). SLN enriched hydrogels for dermal application: Full factorial design study to estimate the relationship between composition and mechanical properties. *Chem Phy Lipids*, **228**: 104889.
- AMREDDY N, BABU A, MURALIDHARAN R, MUNSHI A, RAMESH R (2017). Polymeric Nanoparticle-Mediated Gene Delivery for Lung Cancer Treatment. *Topics Curr Chem*, **375**(2): 35.
- ANDERSON KE, JOHNSON TW, LAZOVICH D, FOLSOM AR (2002). Association between nonsteroidal anti-inflammatory drug use and the incidence of pancreatic cancer. *J Nat Cancer Inst*, **94**(15): 1168–1171.
- BALOGH J, VICTOR D, ASHAM EH, BURROUGHS SG, BOKTOUR M, SAHARIA A, LI X, GHOBRIAL RM, MONSOUR JR (2016). Hepatocellular carcinoma: a review. *J Hepatocellular Carcinoma*, **3**: 41–53.
- BREUHAHN K, GORES G, SCHIRMACHER P (2011). Strategies for hepatocellular carcinoma therapy and diagnostics: lessons learned from high throughput and profiling approaches. *Hepatology*, **53**(6): 2112–2121.
- BROGDEN RN., HEEL RC., SPEIGHT TM., AVERY GS. (1984). Piroxicam. *Drugs*, **28**(4): 292–323

- BRUIX J, SHERMAN M (2011). Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*, **53**(3): 1020–1022.
- CERVELLO M, MONTALTO G (2006). Cyclooxygenases in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroentero*, **12**(32): 5113–5121.
- CHANG JE, YOON IS, SUN PL, YI E, JHEON S, SHIM CK (2014). Anticancer efficacy of photodynamic therapy with hematoporphyrin-modified, doxorubicin-loaded nanoparticles in liver cancer. *J Photochem Photobio B Biol*, **140**: 49–56.
- CHU Q, XU H, GAO M, GUAN X, LIU H, DENG S, HUO X, LIU K, TIAN Y, MA X (2016). Liver-targeting Resibufogenin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid)-D- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate nanoparticles for liver cancer therapy. *Int J Nanomed*, **11**: 449.
- CHUGH H, SOOD D, CHANDRA I, TOMAR V, DHAWAN G, CHANDRA R (2018). Role of gold and silver nanoparticles in cancer nano-medicine. *Art Cells Nanomed Biotechnol*, **46**: 1210–1220.
- CONTRERAS-CÁCERES R, CABEZA L, PERAZZOLI G, DIAZ A, LÓPEZ-ROMERO JM, MELGUIZO C, PRADOS J (2019). Electrospun Nanofibers: Recent Applications in Drug Delivery and Cancer Therapy. *Nanomaterials*, **9**(4): 656.
- CORN, PG, EL-DEIRY, WS (2002). Derangement of growth and differentiation control in oncogenesis. *BioEssays: News Rev Mol Cellular Dev Biology*, **24**(1): 83–90.
- CRUCHO C, BARROS MT (2017). Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Mat Sci Eng C*, **80**: 771–784.
- DAMIANI PC, BEARZOTTI M, CABEZÓN M, OLIVIERI AC (1998). Spectrofluometric determination of piroxicam. *J Pharm Biomed Analy*, **17**(2): 233-236.
- DANAEI M, DEHGHANKHOLD M, ATAEI S, HASANZADEH DAVARANI F, JAVANMARD R, DOKHANI A, KHORASANI S, MOZAFARI MR (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, **10**(2): 57.
- DE FRANCISCO LMB, ROSSETO HC, DE TOLEDO LDAS, DOS SANTOS RS, DE SOUZA FERREIRA SB, BRUSCHI ML (2019). Organogel composed of poloxamer 188 and passion fruit oil: Sol-gel transition, rheology, and mechanical properties. *J Mol Liquids*, **289**: 111170.
- DENDA A, ENDOH T, KITAYAMA W, TANG Q, NOGUCHI O, KOBAYASHI Y, AKAI H, OKAJIMA E, TSUJIUCHI T, TSUTSUMI M, NAKAE D, KONISHI Y (1997). Inhibition by piroxicam of oxidative DNA damage, liver cirrhosis and development of enzyme-altered nodules caused by a choline-deficient, L-amino acid-defined diet in rats. *Carcinogenesis*, **18**(10): 1921–1930.

- DERMAN S., KIZILBEY K., AKDESTE ZM (2013). Polymeric nanoparticles. *J Eng Nat Sci*, **31**(1): 107-120.
- DINARVAND R, SEPEHRI N, MANOOCHEHRI S, ROUHANI H, ATYABI F (2011). Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *Int J Nanomed*, **6**: 877–895.
- DSÖ, Dünya Sağlık Örgütü. ‘Cancer’. [www.who.int]. Erişim: 22/11/2020.
- EL-HAMIDY SM (2020). Nanomedicine as an Emerging Treatment Approach for Many Cancers: an Updated Review. *Int J Pharm Res*, **12**(3): 705-712.
- EL-SERAG HB, KANWAL F (2014). Epidemiology of hepatocellular carcinoma in the United States: where are we? Where do we go? *Hepatology*, **60**(5): 1767–1775.
- ERYOL C, ÖNER L (2005). Çözünme Profili Karşılaştırma Yöntemleri. *TÜFTAD Haberler*, **12**(1): 3-11.
- FLORES A, MARRERO JA (2014). Emerging trends in hepatocellular carcinoma: focus on diagnosis and therapeutics. *Clin Med Insights Oncol*, **8**: 71–76.
- FOROUD N, ARDJMAND M, HEIDARINASAB A, AKBARZADEH A (2018). Delivery of cisplatin by folic acid-targeted liposomal nanoparticles into liver cancer cell line. *Int J Polym Mat Polym Biomat*, **67**(14): 865-872.
- GCO, Global Cancer Observatory. ‘Cancer Today’. [https://gco.iarc.fr/] Erişim: 30/11/2020.
- GUNAYDIN C, BILGE, SS (2018). Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs at the molecular level. *Eur J Med*, **50**(2): 116.
- GULER N, ABRO S, EMANUELE M, IQBAL O, HOPPENSTEADT D, FAREED J (2017). The Protective Effect of Poloxamer-188 on Platelet Functions. Clinical and applied thrombosis/hemostasis. *Int Aca Clin App Thrombosis/Hemostasis*, **23**(8): 987–991.
- GOLDMAN AP, WILLIAMS CS, SHENG H, LAMPS LW, WILLIAMS VP, PAIRET M, DUBOIS RN (1998). Meloxicam inhibits the growth of colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*, **19**(12): 2195-2199.
- GOMAA AI, KHAN SA, TOLEDANO MB, WAKED I, TAYLOR-ROBINSON SD (2008). Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis. *World J Gastroenterol*, **14**(27): 4300–4308.
- GOYAL R, KUMAR S (2014). Nanotechnology: A novel approach towards cancer treatment. *J Innovative Biol June*, **1**(2): 084-096.

- GÜNDÜZ, T (1998). Kimyacılar için İstatistik (1. Basım). Ankara: Gazi Kitabevi.
- HATZARAS I, BISCHOF DA, FAHY B, COSGROVE D, PAWLIK TM (2014). Treatment options and surveillance strategies after therapy for hepatocellular carcinoma. *Annals Surgical Oncol*, **21**(3): 758–766.
- HAWK ET, VINER JL, DANNENBERG A, DUBOIS RN (2002). COX-2 in cancer--a player that's defining the rules. *J National Cancer Inst*, **94**(8): 545–546.
- HIDALGO-ESTÉVEZ AM, STAMATAKIS K, JIMÉNEZ-MARTINEZ M, LÓPEZ-PÉREZ R, FRESNO M (2020). Cyclooxygenase 2-Regulated Genes an Alternative Avenue to the Development of New Therapeutic Drugs for Colorectal Cancer. *Frontiers Pharmacol*, **11**: 533.
- HUANG C, LI NM, GAO P, YANG S, NING Q, HUANG W, LI ZP, YE PJ, XIANG L, HE DX, TAN XW, YU CY (2017). In vitro and in vivo evaluation of macromolecular prodrug GC-FUA based nanoparticle for hepatocellular carcinoma chemotherapy. *Drug Delivery*, **24**(1): 459-466.
- IARC, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı. ‘Cancer’. [<https://www.iarc.who.int/>] Erişim: 15/10/2020.
- ISHIZAKI T, NOMURA T, ABE T (1979) Pharmacokinetics of piroxicam, a new nonsteroidal anti-inflammatory agent, under fasting and postprandial states in man. *J Pharmaco Biopharm*, **7**(4): 369-381.
- JANEVSKA D, CHALOSKA-IVANOVA V, JANEVSKI V (2015). Hepatocellular carcinoma: risk factors, diagnosis and treatment. *Macedonian J Med Sci*, **3**(4): 732.
- JIN C, YANG Z, YANG J, LI H, HE Y, AN J, BAI L, DOU K (2014). Paclitaxel-loaded nanoparticles decorated with anti-CD133 antibody: a targeted therapy for liver cancer stem cells. *J Nanoparticle Research*, **16**(1): 1-15.
- KADIAN R (2018). Nanoparticles: A promising drug delivery approach. *Asian J Pharm Clin Res*, **11**(1): 30-35.
- KANDASAMY G, SUDAME A, MAITY D, SONI S, SUSHMITA K, VEERAPU NS, TOMY CV (2019). Multifunctional magnetic-polymeric nanoparticles based ferrofluids for multi-modal in vitro cancer treatment using thermotherapy and chemotherapy. *J Molecular Liquids*, **293**: 111549.
- KAHAN BC (2013). Bias in randomised factorial trials. *Stat Med*, **32**: 4540–4549.
- KAPOOR V, SINGH AK, DEY S, SHARMA SC, DAS SN (2010). Circulating cyclooxygenase-2 in patients with tobacco-related intraoral squamous cell carcinoma and evaluation of its peptide inhibitors as potential antitumor agent. *J Cancer Research Clin Oncol*, **136**(12): 1795–1804.

- KOERNER J., HORVATH D., GROETTRUP M (2019). Harnessing Dendritic Cells for Poly (D, L-lactide-co-glycolide) Microspheres (PLGA MS)—Mediated Anti-tumor Therapy. *Frontiers in Immunology*, **10**: 707.
- KUMARI A, YADAV SK, YADAV SC (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **75**(1): 1–18.
- KUMARI P, GHOSH B, BISWAS S (2016). Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. *J Drug Target*, **24**(3): 179–191.
- KUMAR V, BHATT PC, RAHMAN M, KAITHWAS G, CHOUDHRY H, AL-ABBASI FA, ANWAR F, VERMA A (2017). Fabrication, optimization, and characterization of umbelliferone β -D-galactopyranoside-loaded PLGA nanoparticles in treatment of hepatocellular carcinoma: in vitro and in vivo studies. *Int J Nanomed*, **12**: 6747–6758.
- LEAHY KM, ORNBERG RL, WANG Y, ZWEIFEL BS, KOKI AT, MASFERRER JL (2002). Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. *Cancer Research*, **62**(3): 625–631.
- LI J, CHEN X, DONG X, XU Z, JIANG H, SUN X (2006). Specific COX-2 inhibitor, meloxicam, suppresses proliferation and induces apoptosis in human HepG2 hepatocellular carcinoma cells. *J Gastroenterol Hepatol*, **21**(12): 1814–1820.
- LI M, ZHANG W, WANG B, GAO Y, SONG Z, ZHENG QC (2016). Ligand-based targeted therapy: a novel strategy for hepatocellular carcinoma. *Int J Nanomed*, **11**: 5645–5669.
- LI YJ, DONG M, KONG FM, ZHOU JP (2015). Folate-decorated anticancer drug and magnetic nanoparticles encapsulated polymeric carrier for liver cancer therapeutics. *Int J Pharm*, **489**(1-2): 83–90.
- LI W, XU RJ, LIN ZY, ZHUO GC, ZHANG HH (2009). Effects of a cyclooxygenase-1-selective inhibitor in a mouse model of ovarian cancer, administered alone or in combination with ibuprofen, a nonselective cyclooxygenase inhibitor. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, **26**(2): 170–177.
- LIECHTY WB, PEPPAS NA (2012). Expert opinion: Responsive polymer nanoparticles in cancer therapy. *Eur J Pharm Biopharm*, **80**(2): 241–246.
- LIU L, DAI H, WU Y, LI B, YI J, XU C, WU X (2019). In vitro and in vivo mechanism of hepatocellular carcinoma inhibition by β -TCP nanoparticles. *Int J Nanomed*, **14**: 3491–3502.
- LIU Y, ZONG Y, YANG Z, LUO M, LI G, YINGSA W, CAO Y, XIAO M, KONG T, HE J, LIU X, LEI J (2019). Dual-targeted controlled delivery based on folic acid modified pectin-based nanoparticles for combination therapy of liver cancer. *ACS Sustainable Chem Eng*, **7**(3): 3614–3623.

- LOMBARDINO JG, WISEMAN EH (1982). Piroxicam and other anti- inflammatory oxicams. *Med Research Rev*, **2**(2): 127-152.
- MANDAL D, SHAW TK, DEY G, PAL MM, MUKHERJEE B, BANDYOPADHYAY AK, MANDAL M (2018). Preferential hepatic uptake of paclitaxel-loaded poly-(d-l-lactide-co-glycolide) nanoparticles- A possibility for hepatic drug targeting: Pharmacokinetics and biodistribution. *Int Bio Macromol*, **112**: 818–830.
- MAKADIA HK, SIEGEL, SJ (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, **3**(3): 1377–1397.
- MARRERO JA, KULIK LM, SIRLIN CB, ZHU AX, FINN RS, ABECASSIS MM, ROBERTS LR, HEIMBACH JK (2018). Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*, **68**(2): 723–750.
- MASOOD F (2016). Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. *Mat Sci Eng C*, **60**: 569–578.
- MIHALIĆ M, HOFMAN H, KUFTINEC J, KRILE B, ČAPLAR V, KAJFEŽ F, BLAŽEVIĆ N (1986). Piroxicam. *Analy Prof Drug Sub*, **15**: 509-531.
- MOGHIMI SM, HUNTER AC (2000). Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. *Trends Biotechnol*, **18**(10): 412–420.
- MOORE JW., FLANNER HH (1996). Mathematical comparison of dissolution profiles. *Pharm Technol*, **20**(6): 64-75.
- NAGAVARMA BVN, YADAV HK, AYAZ AVLS., VASUDHA LS, SHIVAKUMAR HG (2012). Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles-a review. *Asian J Pharm Clin Res*, **5**(3): 16-23.
- NAZAR MF, KHAN AM, SHAH SS (2009). Microemulsion system with improved loading of piroxicam: a study of microstructure. *AAPS PharmSciTech*, **10**(4): 1286–1294.
- NIGRO ND, BULL AW, BOYD ME (1986). Inhibition of intestinal carcinogenesis in rats: effect of difluoromethylornithine with piroxicam or fish oil. *J Nat Cancer Inst*, **77**(6): 1309-1313.
- ORDU Ş., ÖZDEMİR N., Furosemidin Çözünme Hızının PVP ile Katı Dispersiyonları Hazırlanarak Artırılması. Ankara Univ. Ecz. Fak. Meç., **25**(2):73-80,1996.
- OYLAR Ö, TEKİN İ (2011). Kanserin teşhis ve tedavisinde nanoteknolojinin önemi. *Uludağ Üni Müh-Mim Fak Der*, **16**(1): 147-154.

- PANDA BP, KRISHNAMOORTHY R, SHIVASHEKAREGOWDA NKH, PATNAIK S (2018). Influence of Poloxamer– 188 on design and development of second generation PLGA Nanocrystals of Metformin Hydrochloride. *Nano Biomed Eng*, **10**(4): 334-343.
- PAL S, GAURI SK (2018). A desirability functions-based approach for simultaneous optimization of quantitative and ordinal response variables in industrial processes. *Int J Engineer Sci Technol*, **10**(1): 76–87.
- POOJARI R, SRIVASTAVA R, PANDA D (2015). Nanomechanics of Fosbretabulin A4 polymeric nanoparticles in liver cancer cells. In 2015 IEEE 15th International Conference on Nanotechnology (IEEE-NANO) pp. 1406-1409
- PUBCHEM, ‘Poloksamer 188’. [<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Poloxamer-188>]. Erişim: 5/12/2020.
- QUINTANAR-GUERRERO D, ALLÉMAN E, FESSI H, DOELKER E (1998). Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev Ind Pharm*, **24**(12): 1113–1128.
- RAJESHKUMAR S (2016). Anticancer activity of eco-friendly gold nanoparticles against lung and liver cancer cells. *J Gen Eng Biotechnol*, **14**(1): 195–202.
- RAO JP, GECKELER KE (2011). Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. *Prog Poly Sci*, **36**(7): 887-913.
- REIS CP, NEUFELD RJ, RIBEIRO AJ, VEIGA F (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*, **2**(1): 8–21.
- SALATIN S, MALEKI DIZAJ S, YARI KHOSROUSHAH A (2015). Effect of the surface modification, size, and shape on cellular uptake of nanoparticles. *Cell Bio Int*, **39**(8): 881-890.
- SAUDAGAR RB, THETE PG (2018). Bioanalytical method validation: a concise review. *Asian J Res Pharm Sci*, **8**(2): 107-114.
- SCHMIDT BR, GLICKMAN NW, DENICOLA DB, DE GORTARI AE, KNAPP DW (2001). Evaluation of piroxicam for the treatment of oral squamous cell carcinoma in dogs. *J Americ Vet Med Assoc*, **218**(11): 1783–1786.
- SCHNEIDER C, POZZI A (2011). Cyclooxygenases and lipoxygenases in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, **30**(3-4): 277–294.
- SHARMA N, MADAN P, SENSHANG L (2016). Effect of process and formulation variables on the preparation of parenteral paclitaxel-loaded biodegradable polymeric nanoparticles: A co-surfactant study. *Asian J Pharm Sci*, **11**(3): 404-416.

- SHIFF SJ, SHIVAPRASAD P, SANTINI DL (2003). Cyclooxygenase inhibitors: drugs for cancer prevention. *Current Opinion Pharmacol*, **3**(4): 352–361.
- SHOSHAN MS, VONDERACH T, HATTENDORF B, WENNEMERS H. (2019). Peptide-Coated Platinum Nanoparticles with Selective Toxicity against Liver Cancer Cells. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, **58**(15): 4901–4905.
- SOUTO EB (2011). Lipid Nanocarriers in Cancer Diagnosis and Therapy, s: 30-31.
- STYLIANOPOULOS T, JAIN RK (2015). Design considerations for nanotherapeutics in oncology. *Nanomedicine*, **11**(8): 1893–1907.
- SUBONGKOT S, FRAME D, LESLIE W, DRAJER D (2003). Selective cyclooxygenase-2 inhibition: a target in cancer prevention and treatment. *Pharmacotherapy*, **23**(1): 9–28.
- ŞENGEL-TURK CT, HASCICEK C, GÖNÜL N (2009). Evaluation of drug-polymer interaction in polymeric microspheres containing diltiazem hydrochloride. *J Thermal Analysis Calorimetry*, **95**(3): 865-869.
- ŞENGEL-TURK CT (2009). Kolona Hedeflendirilmek Üzere Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve Değerlendirilmesi Doktora Tezi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi: Ankara.
- ŞENGEL-TURK CT., HASCICEK C., BAKAR F., SIMSEK, E (2017). Comparative evaluation of nimesulide-loaded nanoparticles for anticancer activity against breast cancer cells. *AAPS PharmSciTech*, **18**(2): 393-403.
- ŞENGEL-TURK, C.T., OZMEN, N., BAKAR-ATES, F (2021). Design, Characterization and Evaluation of Cucurbitacin B Loaded Core-Shell Type Hybrid Nano-Sized Particles Using DoE Approach. *Poly Bulletin*, **78**: 3327-3351.
- TAGHIZADEH S, ALIMARDANI V, ROUDBALI PL, GHASEMI Y, KAVIANI E (2019). Gold nanoparticles application in liver cancer. *Photodiag Photodyn Ther*, **25**: 389–400.
- THOMAS GJ, MORTON CA (2017). Cyclooxygenase in Cancer Prevention and Treatments for Actinic Keratosis. *Dermatol Ther*, **7**(1): 21–29.
- TURK CTS, OZ UC, SERIM, TM, HASCICEK C (2014). Formulation and Optimization of Nonionic Surfactants Emulsified Nimesulide-Loaded PLGA-Based Nanoparticles by Design of Experiments. *AAPS PharmSciTech*, **15**(1): 161-176.
- VAUTHIER C, BOUCHEMAL K (2009). Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharm Res*, **26**(5): 1025–1058.

- VERSLYPE C, ROSMORDUC O, ROUGIER P, ESMO GUIDELINES WORKING GROUP (2012). Hepatocellular carcinoma: ESMO-ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, **7**: 41-48.
- VILLANUEVA A, HERNANDEZ-GEA V, LLOVET JM (2013). Medical therapies for hepatocellular carcinoma: a critical view of the evidence. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, **10**(1): 34-42.
- WANG K, ZHU X, YU E, DESAI P, WANG H, ZHANG CL, HU J (2020). Therapeutic Nanomaterials for Neurological Diseases and Cancer Therapy. *J Nanomed*, **Volume 2020**: Article ID 2047379.
- WIKI, Vikipedi. 'PLGA'. [<https://en.wikipedia.org/wiki/PLGA>]. Erişim: 8/04/2021.
- WU C, GAO Y, LIU Y, XU X (2018). Pure paclitaxel nanoparticles: preparation, characterization, and antitumor effect for human liver cancer SMMC-7721 cells. *Int J Nanomed*, **13**: 6189-6198.
- XIA Q, LI L, ZHAO L (2017). Silica nanoparticle-based dual-responsive nanoprodrug system for liver cancer therapy. *Exp Therap Med*, **14**(3): 2071-2077.
- YAN F, ZHANG C, ZHENG Y, MEI L, TANG L, SONG C, SUN H, HUANG L (2010). The effect of poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity. *Nanomedicine*, **6**(1): 170-178.
- YERLIKAYA F, OZGEN A, VURAL I, GUVEN O, KARAAGAOGLU E, KHAN MA, CAPAN Y (2013). Development and evaluation of paclitaxel nanoparticles using a quality-by-design approach. *J Pharm Sci*, **102**: 3748-3761.
- YOKUS B, ÜLKER DÜ (2012). Kanser biyokimyası. *Dicle Üni Vet Fak Der*, **1**(2): 7-18.
- ZAMBONI CG, KOZIELSKI KL, VAUGHAN HJ, NAKATA MM, KIM J, HIGGINS LJ, POMPER MG, GREEN JJ (2017). Polymeric nanoparticles as cancer-specific DNA delivery vectors to human hepatocellular carcinoma. *J Cont Release*, **263**: 18-28.
- ZHANG X, NG HLH, LU A, LIN C, ZHOU L, LIN G, ZHANG H (2016). Drug delivery system targeting advanced hepatocellular carcinoma: Current and future. *Nanomedicine*, **12**(4): 853-869.
- ZHANG Y, YANG M, PORTNEY NG, CUI D, BUDAK G, OZBAY E, OZKAN M, OZKAN CS (2008). Zeta potential: a surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells. *Biomedical Microdevices*, **10**(2): 321-328.