



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**KAN-BEYİN BARIYERİNDEN ETKEN MADDE
GEÇİŞİNİN ARTIRILMASINA YÖNELİK İLAÇ TAŞIYICI
SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Berrin KÜÇÜKTÜRKMEN

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman BOZKIR**

2014- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KAN-BEYİN BARIYERİNDEN ETKEN MADDE
GEÇİŞİNİN ARTIRILMASINA YÖNELİK İLAÇ TAŞIYICI
SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Berrin KÜÇÜKTÜRKMEN

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Asuman BOZKIR

**Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü
tarafından 12B3336004 proje numarası ile desteklenmiştir.**

2014- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Teknoloji Doktora Programı

çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 11/ 09/ 2014

Kabul ve Onay


Prof. Dr. Nurtan ÖZDEMİR
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Orhan ADALI
Orta Doğu Teknik Üniversitesi


Prof. Dr. Asuman BOZKIR
Ankara Üniversitesi


Prof. Dr. Zelihağöl DEĞİM
Gazi Üniversitesi


Doç. Dr. Canan HASÇİÇEK
Ankara Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	ix
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xi
Çizelgeler	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Kan Beyin Bariyeri	3
1.1.1. Kan Beyin Bariyerinden Geçiş Mekanizmaları	5
1.1.2. Kan Beyin Bariyerinden Geçiş Artırmaya Yönelik Stratejiler	8
1.2. Kan Beyin Bariyerinden Etkin Madde Geçişini Artırmaya Yönelik Kullanılan İlaç Taşıyıcı Sistemler	12
1.2.1. Nanopartiküller	13
1.2.1.1. Katı Lipid Nanopartiküller	16
1.2.1.2. Polimerik Nanopartiküller	21
1.2.1.3. Polimer-Lipid Hibrit Nanopartiküller	24
1.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	26
1.3.1. Partikül Boyutu, Polidispersite İndeks ve Zeta Potansiyeli	26
1.3.2. Etkin Madde Yükleme Kapasitesi	27
1.3.3. İn Vitro Salım	28
1.3.3.1. İn Vitro Salım Kinetikleri	28
1.3.4. Morfolojik Özellikler	31
1.3.5. Termal Özellikler	32
1.3.6. Sterilizasyon	32
1.4. MikroRNA'lar, Antisens Oligonükleotidler ve Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemlerin Önemi	34
1.4.1. MiR-21 Antisens Oligonükleotidi	37
1.5. Pemetrekset Disodyum (Pemetrekset)	38
2. GEREÇ VE YÖNTEM	45
2.1. Gereçler	45
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler	45
2.1.2. Kullanılan Cihazlar	47
2.2. Pemetreksetin HPLC ile Miktar Tayinine Yönelik Yapılan Çalışmalar	48
2.2.1. Ultraviyole (UV) Spektrumu	48
2.2.2. pH 7,4 Fosfat-Salin Tampon Çözeltisinin Hazırlanması	48
2.2.3. Pemetreksetin HPLC ile Miktar Tayini	48

2.2.4. Kalibrasyon Doğrusunun Çizilmesi	49
2.2.5. Kullanılan Analitik Yöntemin Validasyonu	49
2.2.5.1. Doğruluk	49
2.2.5.2. Kesinlik	50
2.2.5.3. Seçicilik	51
2.2.5.4. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)	51
2.2.5.5. Doğrusallık	52
2.3. Nanopartikül Formülasyonların Hazırlanması	52
2.3.1. Katı Lipid Nanopartikül (SLN) Formülasyonlarının Hazırlanması	52
2.3.2. Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması	55
2.3.2.1 PLGA ve PEG-PLGA İçeren Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması	55
2.3.2.2. Polimer-Lipid Hibrit Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması	57
2.4. Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu	59
2.4.1. Partikül Boyutu Dağılımı ve Zeta Potansiyeli Ölçümü	59
2.4.2. Formülasyonlara Yüklenen Etkin Madde Miktarının ve Enkapsülasyon Etkinliğinin Tayini	59
2.4.3. MiR-21 Antisens Oligonükleotidi ve Agaro Jel Elektroforez ile Nanopartiküllere Enkapsülasyonunun İncelenmesi	60
2.4.4. <i>In Vitro</i> Salım Çalışmaları	61
2.4.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi	62
2.4.6. Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) Analizi	62
2.4.7. Gama Radyasyon ile Sterilizasyon	63
2.4.8. Stabilité Çalışmaları	63
2.5. Hücre Kültürü Çalışmaları	63
2.5.1. U87MG İnsan Glioblastoma Hücrelerinin Üretilmesi	63
2.5.2. Sitotoksité Çalışmaları	64
2.5.2.1. Pemetreksetin U87MG İnsan Glioblastoma Hücrelerine Sitotoksitesisi	64
2.5.2.2. Formülasyonların U87MG İnsan Glioblastoma Hücrelerine Sitotoksitesisi	64
2.5.3. Hücresel Alım Çalışmaları	65
2.5.4. Hücresel Alımın Konfokal Mikroskop ile Görüntülenmesi	65
2.6. İstatistiksel Analiz	65
3. BULGULAR	66
3.1. Etkin maddenin HPLC Yöntemi ile Miktar Tayinine Ait Bulgular	66
3.1.1. Ultraviyole Spektrumu ve HPLC Kromatogramı	66
3.1.2. Kalibrasyon Doğrusu	66
3.1.3. Pemetreksetin HPLC Yöntemi ile Kalibrasyonunun Validasyonuna Ait Bulgular	67
3.1.3.1. Doğruluk	67
3.1.3.2. Kesinlik	68
3.1.3.3. Seçicilik	71
3.1.3.4. Teşhis ve Tayin Sınırları	71

3.1.3.5. Doğrusallık	71
3.2. SLN Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu	73
3.2.1. Yüksek Basınçlı Homojenizasyon Cihazı ile Yapılan Ön Formülasyon Çalışmaları	73
3.2.2. SLN Formülasyonlarının Hazırlanması, Partikül Boyutu, Zeta Potansiyeli ve Enkapsülasyon Etkinliğinin İncelenmesi	75
3.2.2.1. Farklı Lipidler Kullanılarak Hazırlanan SLN Formülasyonlarına Ait Bulgular	76
3.2.2.2. Lipid Olarak Gliseril Tristearat İçeren S1 Kodlu Formülasyondan Hareketle Hazırlanan SLN Formülasyonlarına Ait Bulgular	77
3.2.2.3. Lipid Olarak Trimristin İçeren S3 Kodlu Formülasyondan Hareketle Hazırlanan SLN Formülasyonlarına Ait Bulgular	78
3.2.3. SLN Formülasyonlarından Etkin Maddenin <i>İn Vitro</i> Salımına Ait Bulgular	79
3.2.3.1. Farklı Lipidler Kullanılarak Hazırlanan SLN Formülasyonlarından Etkin Maddenin <i>İn Vitro</i> Salımı	79
3.2.3.2. Gliseril Tristearat ile Hazırlanan SLN Formülasyonlarından Etkin Maddenin <i>İn Vitro</i> Salımı	80
3.2.3.3. Trimristin ile Hazırlanan SLN Formülasyonlarından Etkin Maddenin <i>İn Vitro</i> Salımı	82
3.2.4 MiR-21 Antisens Oligonükleotidinin S11 Formülasyonuna Yüklenmesi ve Formülasyonun <i>İn Vitro</i> Özellikleri Üzerine Etkisi	83
3.2.5. S11 ve S11A kodlu SLN Formülasyonlarının <i>İn Vitro</i> Salım Kinetiklerinin Belirlenmesi	85
3.2.6. S11 ve S11A Kodlu SLN Formülasyonlarının DSC Analizi	86
3.2.7. SLN Formülasyonlarının TEM Analizi	87
3.2.8. Sterilizasyon Sonrasında S11 ve S11A Kodlu SLN Formülasyonlarının <i>İn Vitro</i> Salımı	88
3.2.9. S11 ve S11A Kodlu SLN Formülasyonlarının Stabilitésine Ait Bulgular	88
3.3. Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu	90
3.3.1. Ön Formülasyon Çalışmaları	90
3.3.2. PEG-PLGA İçeren Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarına Ait Bulgular	95
3.3.2.1. PEG-PLGA İçeren Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması, Partikül Boyutu, Zeta Potansiyeli ve Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi	95
3.3.2.2. PEG-PLGA İçeren Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının <i>İn Vitro</i> Salım Çalışmalarına Ait Bulgular	96
3.3.2.3. MiR-21 Antisens Oligonükleotidinin PEG5 Formülasyonuna Yüklenmesi ve Formülasyonun <i>İn Vitro</i> Özellikleri Üzerine Etkisi	97
3.3.2.4. PEG5 ve PEG5A Formülasyonlarının <i>İn Vitro</i> Salım Kinetiklerinin Belirlenmesi	99
3.3.2.5. PEG5 ve PEG5A Formülasyonlarının DSC Analizi	100

3.3.2.6. PEG-PLGA İçeren Polimerik Nanopartikül Formülasyonunun TEM Analizi	101
3.3.2.7. Sterilizasyon Sonrasında PEG5 ve PEG5A Formülasyonlarının İn Vitro Salımı	102
3.3.2.8. PEG5 ve PEG5A Formülasyonlarının Stabilitesine Ait Bulgular	102
3.3.3. Polimer-Lipid Hibrit Nanopartikül Formülasyonlarına Ait Bulgular	104
3.3.3.1. Polimer-Lipid Hibrit Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması, Partikül Boyutu, Zeta Potansiyeli ve Enkapsülasyon Etkinliğinin İncelenmesi	104
3.3.3.2. Polimer-Lipid Hibrit Nanopartikül Formülasyonlarının İn Vitro Salım Çalışmalarına Ait Bulgular	105
3.3.3.3. MiR-21 Antisens Oligonükleotidinin H3 Formülasyonuna Yüklenmesi ve Formülasyonun İn Vitro Özellikleri Üzerine Etkisi	106
3.3.3.4. H3 ve H3A Formülasyonlarının <i>İn Vitro</i> Salım Kinetiklerinin Belirlenmesi	108
3.3.3.5. H3 ve H3A Formülasyonlarının DSC Analizi	109
3.3.3.6. Polimer-lipid Hibrit Nanopartikül Formülasyonlarının TEM Analizi	110
3.3.3.7. Sterilizasyonun H3 ve H3A Formülasyonlarının <i>İn Vitro</i> Salımına Etkisi	111
3.3.3.8. H3 ve H3A Formülasyonlarının Stabilitesine Ait Bulgular	111
3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları İçin Seçilen Formülasyonlar	113
3.5. Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular	114
3.5.1. Sitotoksosite Çalışmalarına Ait Bulgular	114
3.5.1.1. Pemetreksetin U87MG İnsan Glioblastoma Hücrelerine Sitotoksitesisi	114
3.5.1.2. Formülasyonların U87MG İnsan Glioblastoma Hücrelerine Sitotoksitesisi	115
3.5.2. Hücresel Alımın Belirlenmesine Ait Bulgular	117
3.5.3. Hücresel Alımın Konfokal Mikroskop ile Görüntülenmesine Ait Bulgular	118
4. TARTIŞMA	123
4.1. Pemetreksetin HPLC Yöntemi ile Miktar Tayininin ve Yöntemin Validasyonunun Değerlendirilmesi	123
4.2. SLN Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi	124
4.2.1. Yüksek Basıncılı Homojenizasyon Cihazı ile Yapılan Ön Formülasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi	124
4.2.2. SLN Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve Karakterizasyonunun Değerlendirilmesi	124
4.2.3. SLN Formülasyonlarından Etkin Maddenin İn Vitro Salımının Değerlendirilmesi	126
4.2.4 MiR-21 Antisens Oligonükleotidinin S11 Kodlu SLN Formülasyonuna Yüklenmesi ve Formülasyonun İn Vitro Özellikleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi	128
4.2.5. S11 ve S11A Kodlu SLN Formülasyonlarının İn Vitro Salım Kinetiklerinin Değerlendirilmesi	129

4.2.6. S11 ve S11A Kodlu SLN Formülasyonlarının DSC Analizinin Değerlendirilmesi	130
4.2.7. S11A Kodlu SLN Formülasyonunun TEM Analizinin Değerlendirilmesi	130
4.2.8. Sterilizasyonun S11 ve S11A Formülasyonlarının İn Vitro Salımına Etkisi	130
4.2.9. S11 ve S11A Formülasyonlarının Stabilitésinin Değerlendirilmesi	131
4.3. Polimerik Nanopartikül Formülasyonları Üzerinde Yapılan Ön Formülasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi	131
4.4. PEG-PLGA İçeren Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Değerlendirilmesi	132
4.4.1. PEG-PLGA İçeren Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının İn Vitro Salım Çalışmalarının Değerlendirilmesi	133
4.4.2. MiR-21 Antisens Oligonükleotidinin PEG5 Formülasyonuna Yüklenmesi ve Formülasyonun İn Vitro Özellikleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi	134
4.4.3. PEG5 ve PEG5A Formülasyonlarının İn Vitro Salım Kinetiklerinin Değerlendirilmesi	134
4.4.4. PEG5 ve PEG5A Formülasyonlarının DSC Analizinin Değerlendirilmesi	135
4.4.5. PEG-PLGA Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının TEM Analizinin Değerlendirilmesi	135
4.4.6. Sterilizasyonun PEG5 ve PEG5A Formülasyonlarının <i>İn Vitro</i> Salımına Etkisi	136
4.4.7. PEG5 ve PEG5A Formülasyonlarının Stabilitésinin Değerlendirilmesi	136
4.5. Polimer-Lipid Hibrit Nanopartikül Formülasyonlarının Geliştirilmesine Yönelik Yapılan Çalışmaların Değerlendirilmesi	136
4.5.1 Polimer-Lipid Hibrit Nanopartikül Formülasyonlarının İn Vitro Salım Çalışmalarının Değerlendirilmesi	137
4.5.2. MiR-21 Antisens Oligonükleotidinin H3 Formülasyonuna Yüklenmesi ve Formülasyonun İn Vitro Özellikleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi	138
4.5.3. H3 ve H3A Formülasyonlarının <i>İn Vitro</i> Salım Kinetiklerinin Değerlendirilmesi	138
4.5.4. H3 ve H3A Formülasyonlarının DSC Analizinin Değerlendirilmesi	139
4.5.5. Polimer-Lipid Hibrit Nanopartikül Formülasyonlarının TEM Analizinin Değerlendirilmesi	139
4.5.6. Sterilizasyonun H3 ve H3A Formülasyonlarının İn Vitro Salımına Etkisi	140
4.5.7. H3 ve H3A Polimer Lipid Hibrit Nanopartikül Formülasyonlarının Stabilitésinin Değerlendirilmesi	140
4.6. Hücre Kültürü Çalışmalarının Değerlendirilmesi	141
4.6.1. Sitotoksitesite Çalışmalarının Değerlendirilmesi	141
4.6.1.1. Pemetreksetin U87MG İnsan Glioblastoma Hücrelerine Sitotoksitesitesinin İncelenmesi	141
4.6.1.2. Formülasyonların U87MG İnsan Glioblastoma Hücrelerine Sitotoksitesitesinin İncelenmesi	141
4.6.2. Hücresel Alım Çalışmalarının Değerlendirilmesi	143
4.6.3. Hücresel Alımın Konfokal Mikroskop Görüntüleri ile Değerlendirilmesi	144

5. SONUÇ VE ÖNERİLER	145
ÖZET	149
SUMMARY	150
KAYNAKLAR	151
ÖZGEÇMİŞ	161

ÖNSÖZ

Lisansüstü öğrenimim süresince beni yönlendiren, motive eden, karşılaştığım zorlukların aşılmasında bilgi ve tecrübesiyle bana yardımcı olan saygıdeğer hocam sayın Prof. Dr. Sayın Asuman BOZKIR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Katkılarından dolayı başta tez izleme jürisinde yer alan saygıdeğer hocalarım Prof.Dr. Orhan ADALI ve Prof.Dr. Nurten ÖZDEMİR'e, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Nilüfer TARIMCI'ya ve tez çalışmalarım süresince bana her türlü kolaylığı göstererek laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan ve her konuda yardımcı olan tüm hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Deneysel çalışmalarım süresince her zaman bana düşünce ve önerileriyle yardımcı olan Yard.Doç.Dr. Ogun SAKA, Yard.Doç.Dr. Burcu DEVRİM ve Uzm.Ecz. Umut Can ÖZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Hücre kültürü çalışmalarında bana yardımcı olan ve önemli katkılar sağlayan sayın Şükran YILMAZ ve Taibe ARSOY'a, partikül boyutu cihazını kullanma imkanı sunan sayın Prof.Dr. Nilüfer YÜKSEL ve Dr. Ecz. Zerrin BAYINDIR'a, DSC analizlerimin yapılmasında destek olan Yard.Doç.Dr. Özge İNAL'a, tez çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Yard.Doç.Dr. Ulya BADILLI, Yard.Doç.Dr. Tuba TÜRK, Uzm.Ecz. Aslıhan ALGAN ve tez çalışmam süresince her konuda destek olan arkadaşım Uzm.Ecz. Gülin AMASYA'ya çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında gösterdikleri ilgi ve destekten dolayı çalışma arkadaşlarım Uzm.Ecz. Mert SERİM, Ecz. Tuğba EREN, Ecz. Miray GÖRGÖZ, Ecz. Özge GÜN, Ecz. Sema ARISOY, Ecz. Fatih TURHAN ve Ecz. Doğan ERGİN'e, başta Uzm.Ecz. Julide ERKİN ve Uzm.Ecz. Günseli TILKAN olmak üzere Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nın tüm yüksek lisans ve doktora öğrencilerine teşekkür ederim.

Araştırmalarımızda kullandığımız pemetrekset disodyumu temin eden Koçak Farma İlaç ve Kimya Sanayi A.Ş. firmasına, TEM analizi ve konfokal mikroskop analizlerini yaptığımız ODTÜ merkez laboratuvarına teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca yanımda olan ve gösterdikleri sevgi ve güvenle bana güç veren annem ve babam Hanife-Alibey BAŞARAN'a ve kardeşlerim Berna ve Burka BAŞARAN'a, kayınvalidem ve kayınpederim Ersin-Ömer KÜÇÜKTÜRKMEN'e ve eşim Ulaş KÜÇÜKTÜRKMEN'e tüm kalbimle çok teşekkür ederim.

Son olarak, bu tez çalışmasını 12B3336009 nolu proje olarak destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'ne teşekkür ederim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

ABC	ATP bağlayıcı kaset taşıyıcıları
AÇEM	Açığa çıkan etkin madde miktarı
Anti-miR-21	miR-21 antisens oligonükleotidi
AON	Antisens oligonükleotid
ATCC	American type culture collection
BCRP	Göğüs kanserine dirençli protein
BOS	Beyin omurilik sıvısı
BSA	Bovin serum albumin
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DDAB	Dimetildioktadesilamonyumbromür
DL	Etkin madde yükleme kapasitesi
DOPE	1,2-dioleil-sn-gliserol-3-fosfoetanolamin
DOTAP	1,2-dioleil-3-trimetilamonyum-propan
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetre
EE	Enkapsülasyon etkinliği
FAM	Karboksi-fluorescein
FDA	Amerikan gıda ve ilaç dairesi başkanlığı
GRAS	Genel olarak güvenli kabul edilir statüsü
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
KBB	Kan beyin bariyeri
LOD	Teşhis sınırı
LOQ	Tayin sınırı
MOAT	Multispesifik organik anyon taşıyıcıları
MRP	Çoklu ilaç direnci proteinleri
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difenil tetrazolium bromür
PCL	Polikaprolakton
PEG	Poli(etilen glikol)
Pemetrekset	Pemetrekset disodyum
PF127	Pluronic F127
Pgp	P-glikoprotein
PI	Polidispersite indeks
PLA	Polilaktid
PLGA	Poli(laktid-ko-glikolik asit)
PVA	Polivinil alkol
RES	Retikuloendotelial sistem
SAL	Sterilite güvence sınırı
SLN	Katı lipid nanopartikül
TEM	Geçirimli elektron mikroskopu

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Kan beyin bariyeri ve sıkı kavşakların yapısı (Chou ve Messing, 2008)	3
Şekil 1.2. Kan beyin bariyerinden geçiş mekanizmaları	5
Şekil 1.3. Etkin maddelerin SLN'lere yüklenme şekilleri (Müller ve ark., 2000)	16
Şekil 1.4. Sıcak homojenizasyon yöntemi ile SLN'lerin üretim şeması (Kamboj ve ark., 2010)	18
Şekil 1.5. IKA HPH 2000/04 yüksek basınçlı homojenizasyon cihazı	19
Şekil 1.6. PEG-PLGA nanopartiküllerinin şematik görünümü (Sah ve ark., 2013)	23
Şekil 1.7. Polimer-lipid hibrit nanopartiküllerinin şematik görünümü (Sah ve ark., 2013)	24
Şekil 1.8. Antisens oligonükleotidlerin etki mekanizması. A: Proteinlerin küçük molekülü ilaçlarla translasyondan sonra inhibisyonu, B: Antisens oligonükleotidlerle mRNA'nın translasyondan önce baskılanması (Barar ve Omid, 2012)	35
Şekil 1.9. Pemetreksetin kimyasal yapısı	39
Şekil 2.1. SLN formülasyonlarının hazırlanışının şematik gösterimi	53
Şekil 2.2. Polimerik nanopartikül formülasyonlarının hazırlanışının şematik gösterimi	55
Şekil 2.3. Polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonlarının hazırlanışının şematik gösterimi	58
Şekil 3.1. Pemetreksetin UV spektrumu ve HPLC kromatogramı	66
Şekil 3.2. Pemetreksetin pH 7,4 fosfat-salin tamponundaki kalibrasyon doğrusu	67
Şekil 3.3. Pemetreksetin doğrusallık grafiği	72
Şekil 3.4. Saf etkin madde çözeltisinden, S1 ve S3 formülasyonlarından etkin maddenin <i>in vitro</i> salımı	80
Şekil 3.5. S1 kodlu formülasyondan hareketle surfaktan tipi ve oranı değiştirilerek hazırlanan SLN formülasyonlarının <i>in vitro</i> salım profilleri (S1: %1 Tween 80, S5: %1 PF68, S6: %2 Tween 80)	81

Şekil 3.6. S6 formülasyonundan hareketle hazırlanan S7 ve S8 SLN formülasyonlarında lesitin (S7) ve oleik asit (S8) ilavesinin <i>in vitro</i> salım hızına etkisi	81
Şekil 3.7. S3 kodlu formülasyondan hareketle Tween 80 oranı değiştirilerek hazırlanan S9 kodlu SLN formülasyonunun <i>in vitro</i> salım profili (S3: %1 Tween 80, S9: %2 Tween 80)	82
Şekil 3.8. S9 kodlu SLN formülasyonundan hareketle hazırlanan katyonik SLN'lerin <i>in vitro</i> salım profilleri (S10: %0,1 DDAB, S11: %0,3 DDAB, S12: % 0,5 DDAB, S13: %1 DDAB)	83
Şekil 3.9. Anti-miR-21 ve S11A formülünün agaroz jel elektroforez ile analizi. 1: DNA belirteci (50bp), 2: 0,700 µg/ml anti-miR-21, 3: 0,525µg/ml anti-miR-21, 4: 0,350 µg/ml anti-miR-21, 5: S11A formülasyonuna ait süpernatant, 6,7,8: Disperse S11A formülasyonu (sırasıyla 10, 50, 100 mg), 9: S11A formülasyonu (toz)	84
Şekil 3.10. Anti-miR-21 ilavesinin S11 formülasyonundan etkin maddenin <i>in vitro</i> salımına etkisi	85
Şekil 3.11. SLN formülasyonlarının DSC termogramı. a: pemetrekset; b: anti-miR-21; c: Pemetrekset ve anti-miR-21 içermeyen S11 formülasyonu; d: S11 formülasyonu; e: S11A formülasyonu	87
Şekil 3.12. S11A formülasyonunun TEM görüntüsü	87
Şekil 3.13. Gama radyasyon ile sterilizasyonun SLN formülasyonlarının <i>in vitro</i> salımına etkisi	88
Şekil 3.14. S11 ve S11A formülasyonlarının 3 aylık stabilite süresi sonunda elde edilen DSC termogramı. a: pemetrekset; b: Pemetrekset ve anti-miR-21 içermeyen S11 formülasyonu; c: S11 formülasyonu; d: S11A formülasyonu.	89
Şekil 3.15. PCL ve DDAB ilavesinin PEG-PLGA içeren polimerik nanopartikül formülasyonlarından etkin maddenin <i>in vitro</i> salım hızına etkisi	97
Şekil 3.16. PEG5A formülasyonunun agaroz jel elektroforez ile analizi. 1: DNA belirteci, 2: PEG5A formülasyonuna ait süpernatant, 3: Disperse PEG5A formülasyonu, 4: PEG5A formülasyonu (toz)	98
Şekil 3.17. Anti-miR-21 ilavesinin PEG5 nanopartikül formülasyonunun <i>in vitro</i> salım hızına etkisi	99
Şekil 3.18. PEG-PLGA nanopartiküllerinin DSC termogramı. a: pemetrekset; b: anti-miR-21; c: Etkin madde ve anti-miR-21 içermeyen PEG5 formülasyonu; d: PEG5 formülasyonu; e: PEG5A formülasyonu	101

Şekil 3.19. PEG5A formülasyonuna ait TEM görüntüsü	101
Şekil 3.20. Sterilizasyonun PEG5 ve PEG5A formülasyonundan etkin maddenin <i>in vitro</i> salımına etkisi	102
Şekil 3.21. PEG5 ve PEG5A formülasyonlarının 3 aylık stabilite süresi sonunda elde edilen DSC termogramı. a: pemetrekset; b: pemetrekset ve anti-miR-21 içermeyen PEG5 formülasyonu; c: PEG5 formülasyonu; d: PEG5A formülasyonu	103
Şekil 3.22. Polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonlarından etkin maddenin <i>in vitro</i> salımı	106
Şekil 3.23. H3A formülasyonunun agaroz jel elektroforez ile analizi. 1: DNA belirteci, 2: H3A formülasyonuna ait süpernatant, 3: Disperse H3A formülasyonu, 4: Toz H3A formülasyonu	106
Şekil 3.24. Anti-miR-21 ilavesinin H3 hibrit nanopartikül formülasyonunun <i>in vitro</i> salımına etkisi	108
Şekil 3.25. Polimer - lipid hibrit nanopartiküllerinin DSC termogramı. a: pemetrekset; b: anti-miR-21; c: Pemetrekset ve anti-miR-21 içermeyen H3 formülasyonu; d: H3 formülasyonu e: H3A formülasyonu	110
Şekil 3.26. H3A formülasyonuna ait TEM görüntüsü	110
Şekil 3.27. Sterilizasyonun H3 ve H3A formülasyonundan etkin maddenin <i>in vitro</i> salımına etkisi	111
Şekil 3.28. H3 ve H3A formülasyonlarının 3 aylık stabilite süresi sonunda elde edilen DSC termogramı. a: pemetrekset; b: Pemetrekset ve anti-miR-21 içermeyen H3 formülasyonu; c: H3 formülasyonu d: H3A formülasyonu	112
Şekil 3.29. Hücre kültürü çalışmaları için seçilen formülasyonlar	113
Şekil 3.30. Pemetreksetin U87MG hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi	114
Şekil 3.31. SLN formülasyonlarının U87MG hücre canlılığı üzerine etkisi	115
Şekil 3.32. Pegile polimerik nanopartikül formülasyonlarının U87MG hücre canlılığı üzerine etkisi	116
Şekil 3.33. Polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonlarının U87MG hücre canlılığı üzerine etkisi	116
Şekil 3.34. U87MG hücreleri tarafından pemetreksetin hücresel alımı	117

Şekil 3.35. Anti-miR21' in U87MG hücreleri tarafından alımı (a : DAPI ile boyanmış hücre çekirdekleri (mavi floresan); b: Hücreler tarafından 6-FAM-anti-miR-21'in alımı (yeşil floresan); c: a ve b'nin üst üste çakıştırılması ile elde edilen görüntü) 118

Şekil 3.36. Anti-miR21 içeren S11A formülasyonunun U87MG hücreleri tarafından alımı (a: DAPI ile boyanmış hücre çekirdekleri (mavi floresan); b: Hücreler tarafından 6-FAM-anti-miR-21'in alımı (yeşil floresan); c: a ve b'nin üst üste çakıştırılması ile elde edilen görüntü) 119

Şekil 3.37. Anti-miR21 yüklü PEG5A formülasyonunun U87MG hücreleri tarafından alımı (a: DAPI ile boyanmış hücre çekirdekleri (mavi floresan); b: Hücreler tarafından 6-FAM-anti-miR-21'in alımı (yeşil floresan); c: a ve b'nin üst üste çakıştırılması ile elde edilen görüntü) 120

Şekil 3.38. Anti-miR21 yüklü H3A formülasyonunun U87MG hücreleri tarafından alımı (a: DAPI ile boyanmış hücre çekirdekleri (mavi floresan); b: Hücreler tarafından 6-FAM-anti-miR-21'in alımı (yeşil floresan); c: a ve b'nin üst üste çakıştırılması ile elde edilen görüntü) 121

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Kan beyin bariyerinden geçişi artırmak üzere geliştirilen stratejiler	8
Çizelge 2.1. Pemetreksetin HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar	49
Çizelge 2.2. SLN formülasyonlarının bileşimi	54
Çizelge 2.3. PLGA içeren polimerik nanopartikül formülasyonlarının bileşimi	56
Çizelge 2.4. PEG-PLGA içeren polimerik nanopartikül formülasyonların bileşimi	57
Çizelge 2.5. Polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonlarının bileşimi	58
Çizelge 3.1. Pemetreksetin kalibrasyon doğrusuna ait parametreler	67
Çizelge 3.2. Pemetreksetin miktar tayini yöntemine ait doğruluk bulguları	68
Çizelge 3.3. Pemetreksetin miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirliğine ait bulgular	69
Çizelge 3.4. Pemetreksetin miktar tayini yöntemine ait ara kesinlik bulguları	70
Çizelge 3.5. Pemetreksetin teşhis sınırı ve tayin sınırı değerleri	71
Çizelge 3.6. Pemetreksetin miktar tayini yöntemine ait doğrusallık parametreleri	72
Çizelge 3.7. Cihaz parametrelerinin nanopartikül boyutu ve polidispersite indeks üzerine etkisi	75
Çizelge 3.8. Farklı lipidler kullanılarak hazırlanan SLN formülasyonlarının karakterizasyonu	76
Çizelge 3.9. S1 formülasyonundan hareketle hazırlanan SLN formülasyonları ve karakterizasyonu	77
Çizelge 3.10. S3 formülasyonundan hareketle hazırlanan SLN formülasyonları ve karakterizasyonu	79
Çizelge 3.11. Anti-miR-21 ilavesinin S11 formülasyonunun özelliklerine etkisi	84
Çizelge 3.12. S11 ve S11A formülasyonlarının <i>in vitro</i> salım kinetikleri	86
Çizelge 3.13. S11 ve S11A kodlu SLN formülasyonlarının 3 ay sonunda ölçülen partikül boyutu, polidispersite indeks ve zeta potansiyeli değerleri	89

Çizelge 3.14. Organik çözücü, stabilizör tipi ve sonikasyon süresinin partikül boyutu ve polidispersite indeks üzerine etkisi	90
Çizelge 3.15. P7, P8 ve P9 formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliği	92
Çizelge 3.16. İç faz miktarı ve içeriğinin partikül boyutu ve enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi	92
Çizelge 3.17. Dış faz miktarı ve pH'sının partikül boyutu ve enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi	94
Çizelge 3.18. PEG-PLGA içeren polimerik nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonu	95
Çizelge 3.19. Anti-miR-21 ilavesinin PEG5 formülasyonunun fizikokimyasal özellikleri üzerine etkisi	98
Çizelge 3.20. PEG5 ve PEG5A formülasyonlarının <i>in vitro</i> salım kinetikleri	100
Çizelge 3.21. PEG5 ve PEG5A formülasyonlarının 3 ay sonunda ölçülen partikül boyutu, polidispersite indeks ve zeta potansiyeli değerleri	103
Çizelge 3.22. Polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonları	104
Çizelge 3.23. Anti-miR-21 ilavesinin H3 formülasyonunun fizikokimyasal özellikleri üzerine etkisi	107
Çizelge 3.24. H3 ve H3A formülasyonlarının <i>in vitro</i> salım kinetikleri	109
Çizelge 3.25. H3 ve H3A kodlu formülasyonların 3 ay sonunda ölçülen partikül boyutu, polidispersite indeks ve zeta potansiyeli değerleri	112

1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlayan sistemdeki bozulma sebebiyle hücrelerin kontrolsüz çoğalması, çevre dokulara yayılması ve organlarda metastaz yapmasıyla karakterize olan bir hücreler hastalığıdır. Türkiye’de beyin tümörleri, en sık görülen kanserler arasındadır. Beyin tümörlerinin etiolojisi konusunda kesin bir sonuca ulaşılabilmiş değildir. Travma, hormonal faktörler, çevre ve genetik faktörler önemle üzerinde durulanlardır. Dünya sağlık örgütü gliyomları klinik ve histolojik fenotiplerine dayanarak 4 grupta sınıflandırmıştır. I. ve II. derece gliyomlar düşük seviye, III. derece gliyomlar yüksek seviye ve öldürücü, IV. derece gliyomlar ise glioblastoma multiforme olarak belirtilmiştir (Moore ve Zhang, 2010). I. ve II. derecedeki gliyomlar cerrahi operasyon ve/veya uzun klinik tedavi süreci sonrasında iyileştirilebilmektedir. Yüksek dereceli gliyomlar ise hızlı çoğalma, yayılma, öldürücülüğün artması gibi daha agresif klinik özellikler taşır. Glioblastoma multiforme en sık görülen primer beyin tümörü olup, bilinen en hızlı seyirli ve ölümcül tümörlerdendir. Erkeklerde daha sık görülür. Tanı sonrası ortalama sağkalım bir yıldan azdır ve son 10 yıldır bu sürede önemli bir ilerleme olmamıştır. (Greenlee ve ark., 2000; Buckner, 2003; Costa ve ark., 2013). Beyin tümörlerinde standart tedavi prosedürü cerrahi tedaviye ilaveten radyoterapi ve kemoterapidir (Eroglu ve ark., 2008). IV. derece gliyom olan glioblastoma multiforme ileri derecede fenotipik değişkenlik ve hücre heterojenitesi sergiler. Radyoterapiye daha az duyarlıdır ve kemoterapiye yüksek derecede dirençlidir. Cerrahi operasyon sonrası sıklıkla tümörün tekrarlandığı görülür. Mevcut tedavi stratejileri bu etkili tümörün iyileşmesi için yeterli değildir (Chistiakov ve Chekhonin, 2012).

Beyin tümörlü hastalarda cerrahi girişim, ana tedavi yöntemlerindendir. Çevre dokulara büyük oranda yayılım gösteren ve/veya beyinin hayati bölgelerine yakın olan tümörlerde nörolojik hasara yol açmaksızın tümörün tamamen çıkarılması nadiren mümkün olduğundan, bu vakalarda çoğunlukla kısmi operasyon yapılmaktadır. Radyoterapi lokalizasyon nedeni ile veya operasyon riski gibi tümörün alınamadığı vakalarda, tümöre yönelik primer tedavi yöntemi olarak

kullanıldığı gibi; tümörün kısmen çıkarıldığı olgularda da, adjuvan tedavi olarak uygulanmaktadır.

Beyin tümörlerinde iyi aktiviteye sahip ve sık kullanılan ajanlardan bazıları temozolomid, karmustin, prokarbazin, nitrozüreler, lomustin ve vinkristindir. Hidroksiüre, siklofosfamid, platin analogları, 6-tioguanin ve 5-florourasil daha az sıklıkta kullanılır. Adjuvan olarak genellikle prokarbazin ya da karmustin monoterapisi ya da PCV (prokarbazin, lomustin [CCNU], vinkristin) ile kombinasyon tedavisi uygulanmıştır. Fakat istenilen düzeyde etkinliği olmadığı için rutin tedavide kullanılmaları beklenen ölçüde olmamıştır (Walker ve ark., 1978). Bu nedenle tümör hücrelerine seçiciliği yüksek olan ve tümörü tamamen yok eden yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi önemlidir.

Kan beyin bariyeri (KBB), beyin tümörlerinin kemoterapisinde önemli bir sorun oluşturur. Kan beyin bariyeri, beyinde hemostazi sağlamak üzere, beyni kanda dolaşan zararlı maddelerden ve toksinlerden korurken, gerekli besinlerin geçişine izin veren yarı geçirgen bir sistemdir (Gültürk ve ark., 2007; Gentry ve ark., 1999). Kemoterapi ajanlarının difüzyonu yavaş bir süreç olduğundan, kan beyin bariyeri bozulmuş olsa bile, kemoterapide kullanılan ilaçların çoğu yine de merkezi sinir sisteminde yeterli doku konsantrasyonlarına ulaşamaz.

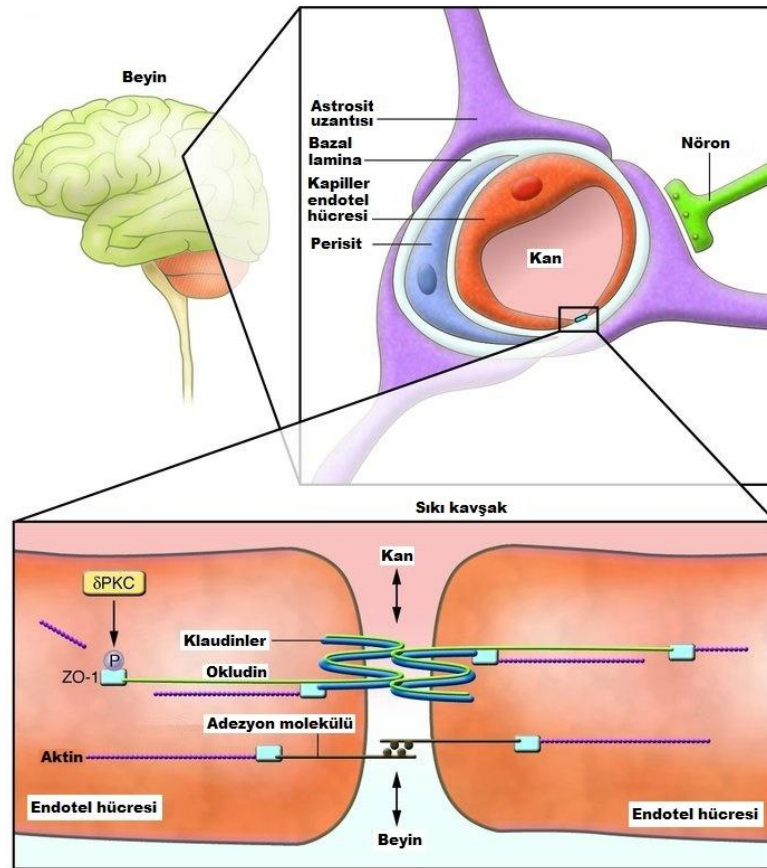
Araştırmamızda beyin tümörlerinin en öldürücü türü olan glioblastomanın kemoterapisinde kullanılmak üzere, primer ve sekonder beyin tümörlerinde yararlı olacağı yapılan faz çalışmaları ile kanıtlanmış, ancak kan-beyin bariyerinden geçemeyen bir kemoterapötik ajan olan pemetreksetin farmasötik nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması planlanmıştır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, glioblastomada miR-21'in artan ekspresyonunun tümör baskılayıcı yolları etkileyerek gliyom hücrelerinin çoğalmasını sağladığını, öldürücülüğünü, kemoterapi ve radyoterapiye direncini artırdığını göstermiştir. MiR-21'in spesifik antisens oligonükleotidlerle inhibisyonu, kemoterapötik ajanların glioblastoma hücrelerine sitotoksik etkilerinin artmasını sağlamıştır. Bu tez

çalışmasında, pemetrekset içeren nanopartikül formülasyonlarına anti-miR-21 oligonükleotidinin de ilave edilmesiyle etkinliğinin artırılması amaçlanmaktadır.

1.1. Kan Beyin Bariyeri

Kan ve beyin arasında seçici geçirgen bir bariyer olduğu ilk kez 1880 yılında Paul-Ehrlich tarafından bulunmuştur. 1900’de Lewandowsky, kan ve beyni ayıran mekanik bir membran olduğunu bazı intravenöz uygulanan ilaçların santral sinir sistemindeki etkisini azalttığını belirtmiştir. Goldman, 1909 ve 1913’te beyin ve omurilik dokusunu boyamak üzere tripan mavisi uygulamıştır ve serebrospinal sıvı ve beyin arasında böyle bir bariyer olmadığını göstermiştir. Ferritin ve horseradish peroksidazla yapılan elektron mikroskopu çalışmaları kan beyin bariyerinin bitişik beyin endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlarda lokalize olduğunu göstermiştir (Zlokovic 2008).



Şekil 1.1. Kan beyin bariyeri ve sıkı kavşakların yapısı (Chou ve Messing, 2008)

Serebral mikrodamarlar 4 hücreden oluşur. Bunlar; endotel hücreleri, perisitler (damar çeperinin dış tabakasındaki hücreler), astrositler, endotel hücrenin nöronal uyarılmasını sağlayan hücrelerdir (Gültürk ve ark., 2007). Kan beyin bariyeri beyine geçişi hem fiziksel (sıkı bağlantılar), hem de metabolik bariyerler (enzimler) vasıtasıyla engeller (Zlokovic 2008) (Şekil 1.1). Kan beyin bariyerini oluşturan endotel hücrelerinde yer alan sıkı kavşaklar, kan ve beyin hücreler arası sıvısı arasında moleküllerin geçişini engelleyen sürekli bir hücrel membran oluşturur. Sıkı kavşaklar, kavşak kompleksine katkıda bulunan birçok periferel proteinle birlikte üçlü membran proteini olarak adlandırılan klaudin, okludin ve kavşak adezyon molekülünden oluşur (Zlokovic 2008). Endotel ve epiteldeki sıkı kavşakların molekülleri için yapı oluşturucu ya da bağlayıcı olarak kabul edilen birçok periferel protein, kavşak hücresi membranına bitişik stoplazmik plak oluşturur. Plak proteinleri, sıkı kavşak kompleksinin bir parçasıdır ve guanilat kinazları (ZO-1 (220 kDa), ZO-2 (160 kDa) ve ZO-3 (130 kDa)) içerir. Diğer plak proteini miyozin benzeri olan ZO kompleksine ve sitoskeletonun F-aktinine bağlanan cingulindir (140 kDa) (Begley ve Brightman, 2003).

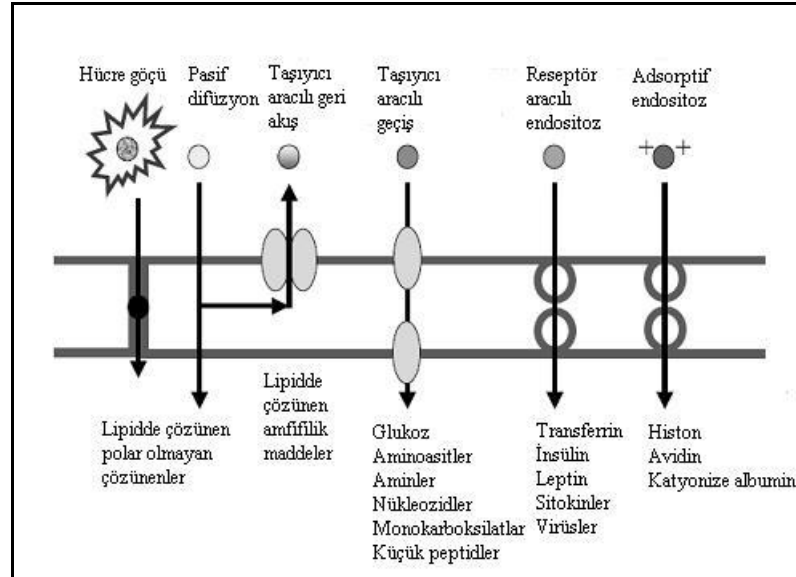
Kan beyin bariyerini oluşturan endotel hücrelerinde yer alan sıkı kavşaklar endotel hücreleri arasında yüksek bir elektrik direnci oluşturmakta ve potansiyel terapötik ajanların penetrasyonunu engellemektedir. Bu elektrik direnci diğer dokularda 3-33 Ω/cm^2 iken kan beyin bariyerinde 1500-2000 Ω/cm^2 dir. Bu endotel hücrelerinin arasında boşlukları yoktur, pinositik aktiviteleri azdır, vücuttaki diğer kapiler endotel hücrelerinden daha çok sayıda mitokondriye sahiptir ve metabolik aktiviteleri yüksektir (Oldendorf, 1977, Gültürk ve ark., 2007; Brasnjevic ve ark., 2009; Visser ve ark., 2005). Serebral endoteldeki enzimatik bariyerler kan beyin bariyerinden geçen çoğu çözünen madde ve ilacı metabolize etme yeteneğine sahiptir. Bariyerler aktif faz 1 (sitokrom P450, flavine bağlı oksijenazlar, monoamin oksidazlar, redüktazlar, hidrolazlar) ve faz 2 (konjuge edici enzimler, sulfotransferazlar, GSH-transferazlar, UDP-glukuronozil transferazlar) enzimlerine sahiptir (Begely, 2003). Beyin kapilerine spesifik birçok enzim vardır. γ -glutamil transpeptidaz (γ -GTP), alkalen fosfataz ve aromatik asit dekarboksilaz gibi enzimler serebral

mikrodamarlarda yüksek konsantrasyonda bulunurken, nöral olmayan kapillerlerde ya çok azdır ya da hiç bulunmazlar. Endotelin luminal yüzünde γ -GTP ve alkalin fosfatazın bulunması ve endotelin abluminal kısmında Na^+ - K^+ -ATPaz ve sodyuma bağlı nötral amino asit taşıyıcısının görev yapması endotelin membran yüzeyine polar özellik kazandırır.

KBB, kandan beyinin ekstraselüler çevresine bileşiklerin geçişini engellemektedir. Küçük moleküllü etkin maddelerin % 98'i KBB'den geçemezken, büyük moleküllü etkin maddelerin neredeyse tamamı KBB'den geçemez (Jaypraka ve ark., 2009). Bir etkin maddenin kan beyin bariyerinden geçebilmesi için; lipitte çözünür olması, fizyolojik pH'da non-iyonize olması, düşük molekül ağırlığına sahip olması, serum proteinlerine düşük oranda bağlanması gerekmektedir (Türk ve ark., 2007).

1.1.1. Kan Beyin Bariyerinden Geçiş Mekanizmaları

Kan beyin bariyerinden geçiş mekanizmaları Şekil 1.2'de şematize edilmiştir.



Şekil 1.2. Kan beyin bariyerinden geçiş mekanizmaları

Hücre göçü

Normal fizyolojik koşullarda santral sinir sistemine lenfosit geçişi çok düşüktür ve kan beyin bariyeri tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir. Buna karşılık santral sinir sisteminin enflamasyonu durumunda (multiple skleroz gibi) dolaşımdaki lenfosit ve monositler/makrofajlar kolayca kan beyin bariyerini geçer ve inflamasyon, ödem ve miyelin tabakasının kaybına yol açarlar. İmmünoisitler santral sinir sistemi endotelinden paraselüler ve transelüler olarak geçebilmektedir (Begley, 2003).

Pasif difüzyon

Basit difüzyon çözünen maddelerin rastgele hareketlerine dayanan bir süreçtir. Bazı lipofilik maddeler (alkol, narkotikler, antikonvülzanlar) endotel hücre membranından pasif olarak difüze olup santral sinir sistemine geçebilir (Begley, 2003).

- Transelüler (hücre içi) yol: Lipidde çözünen ajanların difüzyonla geçişi
- Paraselüler (hücreler arası) yol: Suda çözünen maddelerin çok az miktarda difüzyonla geçişi

Taşıyıcı aracılı geri akış

ATP bağlayıcı kaset taşıyıcıları (ABC), P-glikoprotein (Pgp), çoklu ilaç direnci gösteren protein (MRP), multi-spesifik organik anyon taşıyıcısı (MOAT) ve göğüs kanserine dirençli proteinin (BCRP), çoğu bileşiğin santral sinir sistemi dışına geri taşınmasından ve çoklu ilaç direncinin oluşmasından sorumlu geri akış mekanizmaları olduğu düşünülmektedir. ABC taşıyıcıları substratların konsantrasyon farkına karşı hareketi için enerjiyi sağlayan ATP'yi hidroliz etme yeteneğine sahiptir. KBB'den geçemeyen birçok etkin maddenin P-glikoprotein için substrat olabileceği söylenmiştir. P-glikoprotein, koroid pleksusun apikal yüzeyinde ekspresse olan en önemli ABC taşıyıcısıdır. Çok sayıda etkin maddenin beyine girişini engeller (Pardridge, 1997; Tahara ve ark., 2011).

Taşıyıcı aracılı geçiş

Kan beyin bariyeri, besin ve endojen bileşikler için çeşitli taşıma sistemlerine sahiptir (glukoz, aminoasit taşıyan sistemler gibi). Kan beyin bariyerinde bulunan besin ve endojen bileşikleri taşıyan sistemler ile pasif ya da aktif geçiş sağlanmaktadır. Bu yolla monokarboksilatlar, heksozlar, amino asitler, nükleozidler, glutasyon ve küçük peptidler gibi bazı polar maddeler taşınmaktadır.

Adsorptif endositoz

Adsorptif aracılı endositoz sistemleri, makromolekülün pozitif yüklü grubuyla negatif yüklü plazma membranı arasındaki elektrostatik etkileşime dayanır. Anyonik bölgeler, glikoproteinlerin sialik asit kalıntılarına bağlı olarak beyin kapillerlerinin luminal yüzeyinde yer alır. Adsorptif aracılı endositoz sistemleri kullanılarak etkin maddelerin aktif hedeflendirilmesi katyonize albumin için gerçekleştirilmiştir (Beduneau ve ark., 2007).

Reseptör aracılı endositoz

Reseptör aracılı endositoz sistemleri, KBB'nin luminal membranında yer alan spesifik reseptörlere (transferrin, insülin reseptörü) ligant bağlanması ile gerçekleşir. Beyine aktif maddelerin verilisinde kullanılan reseptör aracılı endositoz sistemleri hem endojen hem de şimerik ligantlara dayanır. İnsülin, transferrin, folik asit, beyin ve tümör hücreleri için yüksek affiniteye sahip endojen ligantlardandır. Biyoyumlu olmaları ve immünojenik olmamaları avantajlarıdır. Transferrin, bir ya da iki demir atomunu taşıyabilen monomerik bir glikoproteindir. Beyin kapiler endotelinde ve beyin tümör hücreleri gibi hızlı çoğalan hücrelerin yüzeyinde çok fazla ekspresse olur. İnsülinin yarı ömrünün kısa olması, yüksek konsantrasyonda hipoglisemi yapması gibi dezavantajları vardır (Beduneau ve ark., 2007).

1.1.2. Kan Beyin Bariyerinden Geçişini Artırmaya Yönelik Stratejiler

Kan beyin bariyerinden geçişini artırmaya yönelik kullanılan stratejiler Çizelge 1.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Kan beyin bariyerinden geçişini artırmak üzere geliştirilen stratejiler

Farmakolojik Stratejiler	Fizyolojik Stratejiler	KBB’nin Permeabilitesini Artırmaya Yönelik Stratejiler
- Yağda çözünürlüğü artırmak - Prodrug verilmesi - İlaç taşıyıcı sistemlerin kullanımı - KBB’ye geçişini sınırlandıran proteolitik enzimlerin ve/veya geri akış pompalarının inhibisyonu	- Şimerik peptid teknolojisi - Merkezi sinir sisteminde yer alan taşıyıcı sistemlerin kullanımı	- KBB’nin osmotik açılması/yıkımı

Yağda çözünürlüğü artırmak

Maddelerin lipofilikliği ile merkezi sinir sistemine permeabiliteleri doğru orantılıdır. Küçük boyutlu, hidrofilik maddelerin hidrofobik analogları KBB’den daha kolay penetre olur (Brasnjevic ve ark., 2009). Molekül ağırlığı 400 Dalton’dan küçük olduğunda lipofilikliğinin artırılmasının permeabiliteyi artırdığı belirtilmiştir (Gentry ve ark., 1999). Lipofiliklik, hidrojen bağlanma potansiyelinin indirgenmesi ya da lipofilik grupların eklenmesi ile artırılabilir. Metilasyon, etkin maddelerin hidrojen bağlanma potansiyelini azaltabilir, böylece membran difüzyonunu artırır. Etkin maddelerin halojenasyonu, lipofilikliği ve KBB’den geçişini artırabilir. Bu bağlamda enkefalin analoglarının halojenasyonu, konjuge halojene bağlı olarak (Cl, Br, F, I) KBB’den geçişini ve analjezik etkiyi önemli derecede artırmıştır. Lipofilikliğin artırılması tek başına yeterli olmamış, beklenmeyen sonuçlarla karşılaşmıştır. Moleküllerin lipofilikliğinin artırılması ile plazma proteinlerine bağlanma ve dağılım hacmi artmıştır, farmakokinetik parametreler etkilenmiştir (Patel, 2007). Barbitüratlarda olduğu gibi sitokrom P450 enzimi ile bloke olma hızı da artmıştır. Sonuç olarak hem lipofilikliğin hem de biyodönüşümün optimize edilmesi gerekmektedir.

Prodrug verilışı

Prodruglar biyolojik olarak aktif bileşiklerin kimyasal modifikasyonuyla oluşan inaktif bileşikleridir. Etkin maddenin suda çözünen KBB'yi geçmeyi engelleyen kısımları lipidde çözünen prodrug haline dönüştürülmektedir (Brasnjevic ve ark., 2009). Prodruglar genelde modifiye grupların hidroliziyle tek basamakta aktif formuna dönüşür. Prodrug metodolojisinin önemli sınırlamaları vardır. Artan lipofilikliğe paralel olarak diğer dokuların alımında istenmeyen artış görülmektedir. Seçiciliğin az olması, reaktif metabolitlere dönüşümün çok olması, prodrug halinde hazırlanan etken maddelerin terapötik indeksini sıklıkla daraltmaktadır.

İlaç taşıyıcı sistemlerin kullanımı

KBB'den geçiş için miseller, lipozomlar, nanopartiküller, emülsiyonlar gibi kolloidal ilaç taşıyıcıları kullanılmaktadır. Bu taşıyıcılar ile etkin maddenin hücrelere, dokulara spesifik verilisinin yanı sıra hedef bölgede açığa çıkışı kontrol edilebilir. Bu şekilde ilacın uygulanma sıklığı ve yan etkileri azaltılabilir. Etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri maskelenerek etkinliği, biyolojik membrandan geçişi, biyoyararlanımı artırılabilir. Etkin madde enzimatik parçalanmaya karşı korunabilir. İlaç taşıyıcı sistemin bir birimi birçok aktif molekülü hapsedebilir. Bu, bir hedefleme grubu ile reseptör başına yüksek miktarda etkin madde verilmesini sağlar (Kabanov ve Batrakova, 2004; Jatariu ve ark., 2010). Sistemik yolla enjekte edilen bu taşıyıcılar biyoparçalanabilir ve biyouyumlu olmalı, immünojenik olmamalı ve kanda stabil olmalıdır (Beduneu ve ark., 2007; Celia ve ark., 2011).

Proteolitik enzimlerin ve/veya geri akış pompalarının inhibisyonu

Beyin tarafından alım aynı zamanda plazmadan ve beyinden atılım hızlarının azaltılmasıyla da artırılabilir. Bu, proteolitik enzimlerin ve/veya geri akış pompasının aktivitesinin inhibe edilmesi ya da by-pass edilmesi ile sağlanabilir. Geri akış pompalarının aktivitesinden kaçınmak üzere geri akış pompalarına spesifik inhibitörler geliştirilip substratların merkezi sinir sistemine girişi artırılmakta ya da etkin maddelerin geri akış pompaları ile reaksiyona girmeyen analogları düzenlenmektedir (Pardridge, 1997). Etkin maddelerin beyine penetrasyonunu

artırmak için geri akış pompalarının substratlarına etkileşiminin ve/veya spesifikliğin azaltılması amacıyla poli(etilenglikol) (PEG) konjugasyonu yapılması, ilaç taşıyıcı sistemlere enkapsülasyon ya da pluronik blok kopolimerlerinin kullanılması araştırılmış, ilaç geri akış sistemlerinin inhibisyonuna katkıda bulundukları belirtilmiştir (Kabanov ve Batrakova, 2004).

Pegilasyon, protein, peptid ya da peptid olmayan bir molekülün PEG zincirleriyle modifikasyonu olarak tanımlanabilir. PEG polimeri toksik, immünojenik ve antijenik olmayan, suda yüksek oranda çözünen ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylı bir polimerdir. PEG-konjugasyonu birçok avantaj sağlar. PEG etkisiyle oluşan sterik engel immün sistem tarafından tanınmayı engellediği için vücutta etkin maddenin kalış süresinin uzaması ile daha az sıklıkta ilaç verilmesi sağlanır. Metabolik enzimlere karşı stabilite artar, parçalanma azalır. Protein immünojenitesi azalır ya da ortadan kalkar. Pegilasyon bu özellikleri nedeniyle özellikle peptid ve proteinlerin terapötik kullanımını artırdıkları için ilaç verilmesinde önemli rol oynamaktadır.

Pegilasyon ile farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri farklı olan, biyolojik aktivitesi aynı kalan moleküller oluşur. Bu işlemde bir PEG polimeri hedef molekülün amino, tiyol, hidroksi ya da amid gruplarına bağlanır. Oluşan konjugat daha büyük moleküler ağırlığa sahip olup, böbrekten ve retikuloendotelial sistemden temizlenmesi gecikir ve böylece vücuttaki yarı ömrü uzar. Pegilasyon koruyucu bir kılıf etkisi yaratır ve bu da molekülün hem tripsin ve kimotripsin gibi çeşitli proteazlar ve nükleazlar ile yıkılmasını, hemde molekülün antijenitesini engelleyerek immünojenitesini azaltır. Böylece yeni molekülün farmakolojik aktif formunun yarı ömrü uzar. Molekülün yarı ömrünün uzaması ile ilacın uygulanım aralıkları uzatılıp, hastaların ilaç tüketimlerinde uyum sorunu azaltılabilir (Reddy, 2000). Dallı zincirli PEG molekülünün termal ve pH stabilitesi daha yüksek olup, lineer PEG yapılarına göre dallı zincirli PEG molekülü proteolitik degradasyona daha dirençlidir (Harris ve ark., 2001). Nanopartiküllerin PEG ile kaplanması sonucu polimer zinciri tarafından oluşturulan sterik engel sayesinde saklama sırasında partikül agregasyonu azalır, partiküllerin stabilitesi artar (Mandal ve ark., 2013).

Şimerik peptid teknolojisi

Etkin maddelerin beyine şimerik peptid teknolojisiyle verilışı reseptör aracılı endositoz yolu ile gerçekleşir. Taşıyıcı vektörün, bağlı olduğu hücre reseptörünün yüzeyi ile etkileşimi vasıtasıyla şimerik peptid endotel hücrelerin luminal plazma membranına bağlanır. Bağlanma sonucunda kompleks endositozla alınır. Şimerik peptid beyin ekstraselüler sıvısına geçer. Etkin madde ve taşıyıcı vektör arasındaki bağ enzimler tarafından parçalanır ve etkin madde serbest kalarak beyin hücresindeki spesifik reseptörüyle etkileşir. Aktif maddelerin şimerik peptide bağlanması avidin-biotin teknolojisiyle kolaylaştırılır. Aktif madde monobiotinlenir ve bir flakonda formüle edilir. Diğer yandan streptavidin monoklonal antikora stabil kükürt-eter bağıyla konjuge edilir. Enjeksiyondan önce 2 flakon içeriğı şimerik peptid oluşturmak üzere karıştırılır. Avidinin biotine yüksek affinitesi nedeniyle biotinlenmiş ilaç hızlıca konjuge olur (Pardridge, 2005).

Merkezi sinir sisteminde yer alan taşıyıcı sistemlerin kullanımı

Merkezi sinir sisteminde peptid taşıyıcı sistemler, heksoz taşıyıcı sistemler, aminoasit taşıyıcı sistemler, nükleosid taşıyıcı sistemler gibi çok sayıda taşıyıcı sistem vardır. Beyine etkin madde geçişini artırmak üzere bu taşıyıcılardan yararlanmak potansiyel stratejiler arasındadır. Etkin maddeleri endojen besinlere (aminoasitler, heksoz, nükleozidler) benzetmek üzere fizikokimyasal özelliklerini modifiye etmek bir seçenektir. Endojen maddeleri KBB'yi geçmek üzere fizyolojik taşıyıcı olarak kullanmak diğer bir seçenektir.

KBB'nin osmotik açılması/yıkımı

KBB'nin permeabilitesini artırmak üzere KBB'nin osmotik açılması/yıkımı sağlanabilir. Bu amaçla mannitol ya da arabinozun hiperozmotik çözeltisi karotis artere enjekte edildikten sonra endotel hücrelerinin su kaybederek büzülmesi sonucu KBB'nin hızlıca açılması sağlanır. Böylece birkaç saatlik zaman periyodunda normal olarak KBByi geçemeyen maddeler serbestçe difüze olabilir (Jaypraka, 2009). Serebral lenfoma ve merkezi sinir sistemi tümörlerine sahip hastalara kemoterapötik

ajanların verililişii için KBB'nin ozmotik açılması başarılı bulunmuştur. Bu tekniğin kullanımının dezavantajları permeabilite artışı ile karşılaşılan sorunlar ve yan etkisinin fazla olmasıdır (nöbetler, var olan nörolojik hastalıkların geçici şiddetlenmesi, geçici nörolojik bozukluklar, beyin ödemi v.b.) (Brasnjevic, 2009). Hipertonik çözeltilerin intrakarotid artere infüzyonu ile deney hayvanlarında felç ve nöropatolojik değışmeler görölmüştür (Pardridge, 1997).

1.2. Kan Beyin Bariyerinden Etkin Madde Geçişini Artırmaya Yönelik Kullanılan İlaç Taşıyıcı Sistemler

KBB'den etkin madde geçişini artırmak üzere yapılan araştırmalarda polimerik miseller, lipozomlar, emülsiyonlar (nanojeller), polimerik nanopartiküller ve lipid nanopartiküller gibi kolloidal ilaç taşıyıcıları kullanılmaktadır.

Polimerik miseller, amfifilik kopolimerlerin sulu ortamda spontan olarak birleşmesiyle oluşurlar. Miselizasyon, kopolimerlerin hidrofobik ve elektrostatik nötral kısımları arasındaki etkileşime dayanmaktadır. Kopolimer konsantrasyonu kritik misel konsantrasyonuna ulaştığında kopolimerler kendiliğinden birleşerek miselleri oluşturmaya başlar. 100 nm'yi aşmayan partikül boyutlarıyla karakterize edilirler. Paklitaksel ve dosetaksel gibi çeşitli antikanser ajanların polimerik misel formülasyonları geliştirilmiştir (Beduneu ve ark., 2007).

Lipozomlar, biyolojik membranlara benzeyen biyouyumlu ve biyoparçalanabilir lipidlerden oluşan, lipid tabakası tarafından çevrilmiş sulu faz içeren tek tabakalı veya iç içe birçok tabakadan oluşmuş taşıyıcılardır. Birçok hücre membranının bileşeni olan kolesterol, lipozomların geçirgenliğini azaltarak plazmadaki stabilitelerini artırdığı için lipozom formülasyonlarında sıklıkla kullanılır. Lipozomların boyutu, yüzey yükü, lipid bileşimi değışkendir ve etkin madde salımını kontrol edebilme özelliğine sahiptir. Hazırlanma yöntemlerine ve boyutlarına göre lipozomlar şu şekilde sınıflandırılmaktadır: Küçük tek tabakalı lipozomlar 20-50 nm,

büyük tek tabakalı lipozomlar ~100 nm, ters faz buharlaştırma ile hazırlanan lipozomlar ~0,5 µm, büyük çok tabakalı lipozomlar 2-10 µm. Lipozomların lipofilikliği yüksek olduğu için etkin maddelerin beyine hedeflendirilmesi amacıyla sıklıkla araştırılmaktadır (Bozkır ve Duman., 1996; Brasnjevic ve ark., 2009).

Nanojeller, çapraz bağlı poli(etilen oksit) zincirleri ve poli(etilenimin)'in oluşturduğu ağısı bir yapıdır. Nanojeller, poli(etilenimin) fragmanının serbest amino gruplarına çeşitli ligantlar bağlanarak modifiye edilebilmektedir (Brasnjevic ve ark., 2009). Nanojeller, Vinogradov ve ark. (2004) tarafından antisens oligonükleotidlerin beyine verilmesi için incelenmiş, ümit verici bir taşıyıcı sistem olduğu belirtilmiştir.

Tez kapsamında nanopartikül formülasyonları yer aldığı için nanopartiküller ayrıntılı olarak araştırılmıştır.

1.2.1. Nanopartiküller

Nanopartiküller, boyutları 1-1000 nm arasında olan kolloidal katı partiküllerdir. Etkin maddeler bu nanopartiküler yapılara çözülerek, hapsedilerek, enkapsüle edilerek, adsorbe olarak bağlanabilir.

Beyine hedeflendirmede nanopartiküllerin taşınması gereken ideal özellikler şunlardır:

- Biyoparçalanabilir, biyouyumlu olmaları, toksik olmamaları gerekir. Küçük partikül boyutları nanopartiküllerin küçük kapillerlere penetrasyonuna imkan verir ve hücreler tarafından tutulmalarını sağlar. Böylece, vücutta hedeflenen bölgede istenen etkin madde salımı sağlanır, diğer organ ve dokular üzerindeki sistemik toksisite azalır.
- Partikül boyutunun 200 nm'nin altında olması beyine verilmesi için önemlidir.
- Kanda fiziksel stabilitesini koruması gerekir. Yüksek etkin madde yükleme kapasitesine sahip olan partiküler yapı, katı matriks içine hapsedilmiş aktif maddeyi

parçalanmaktan korunur. Diğer kolloidal taşıyıcı sistemlerle kıyaslandıklarında nanopartiküller biyolojik sıvılarda çok daha yüksek stabiliteye sahiptirler.

- Nanopartiküllerin yüzey özellikleri çeşitli ajanlarla modifiye edilerek retiküloendotelyal sistem (RES) makrofajları tarafından tanınması engellenir. Bu şekilde nanopartiküllerin kanda bulunma süresi uzar, hedef bölgeye ulaşılabilirliği artırılır.
- Nanopartiküller, kan beyin bariyerine hedeflendirilebilir, reseptör aracılı transitoz ile beyin kapiler endotel hücrelerinden geçerek beyine etkin madde verilmesi artırılabilir.
- Üretim teknikleri genel olarak basit ve kolaydır.
- Küçük moleküllerin, peptid, protein ve nükleik asitlerin taşınması için uygundur.
- Nanopartiküller etkin maddenin hedeflendirilmesini ve kontrollü salımını sağlar. Hedeflenen bölgede enjeksiyonlarını takiben günler hatta haftalar süren bir etkin madde salımına olanak verirler (Olivier, 2005; Brasnjevic ve ark., 2009; Praka ve ark., 2009).

Nanopartiküllerin beyine alımında rol oynayan mekanizmalar şunlardır:

1. Kapiler duvarlarına adsorbe olmaları nedeniyle KBB’de yüksek konsantrasyon sağlanarak kan beyin kapilerlerinde kalış süresinin artması,
2. Kaplama ajanı olarak kullanılan polisorbata 80’in geri akış sistemini özellikle de P-glikoproteini inhibe etmesi,
3. Membran akışkanlaşmasına ve KBB’den etkin madde geçişinin artmasına yol açan endotel hücre membranı lipidlerinin çözünürleşmesiyle karakterize genel surfaktan etkisi,
4. Nanopartiküllerin bulunmasına bağlı olarak kan beyin bariyerindeki sıkı kavşakların açılması,
5. Endotelden nanopartiküllerin transitozu,
6. Yukarıdaki etkilerin kombinasyonu (Kaur ve ark., 2008; Kreuter, 2014).

Nanotaşıyıcılar ya ekzositoza uğrayarak beyin parenkimasına ulaşır ya da lizozomlarla parçalanıp beyin dokusuna aktif madde salınır. Nanopartiküller genelde sistemik olarak uygulandığında retiküloendotelial sistem (RES) tarafından hızlıca alındığı için kan dolaşımında bulunma süreleri kısadır. Nanotaşıyıcılar makrofajlar tarafından kan dolaşımından uzaklaştırılarak karaciğer ve dalağa taşınır ve metabolize edilir. Nanopartiküllerin % 90'dan fazlası 5 dakika içerisinde kan dolaşımından atılmıştır. Etkin maddede taşıyan nanopartikülleri geliştirmek üzere hidrofilik, esnek, noniyonik polimerlerle (polisorbat 80, PEG, polietilenoksit gibi) yüzey modifikasyonu yapılarak çalışmalar yapılmıştır. Nanopartiküllerin Polisorbat 20, 40, 60, 80 gibi surfaktanlarla kaplanması beyindeki farmakolojik etkilerin artışı sağlarken, Polisorbat 81,85, Poloksamer 184, 188, 338, 388, 407 ve 908, Poloksamin 908, Cremophore (EL, RH40 ve RM40) ve Brij 75 gibi surfaktanlarla kaplanan nanopartiküller farmakolojik etkide bir artış sağlamamıştır (Brasnjevic ve ark., 2009).

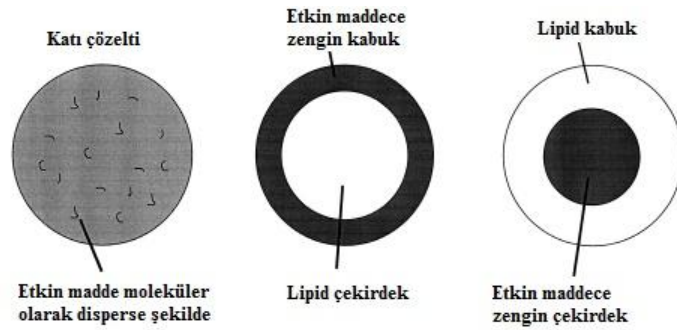
Nanopartiküllerin polisorbat ile kaplanması ile elde edilen etkinin aşağıda yer alan mekanizmalar ile gerçekleştiği belirtilmiştir (Kaur ve ark., 2008):

1. Surfaktan etkisiyle endotel hücre membranı lipidlerinin çözünürleştirilmesi ve membranın akışkanlaşması
2. Polimerik nanopartiküllerin KBB endotel hücreleri ile etkileşiminin kolaylaşmasına bağlı endositoz
3. Aktif geri akış pompalarının inhibisyonu (özellikle P-gp).

Nanopartiküllerin dispersiyondaki stabilitesini artırmak ve dolaşımda bulunma süresini uzatmak amacıyla yüzeyi PEG ile modifiye edilebilir. Sistem maskelenerek makrofajlar tarafından tanınmaz ve kan dolaşımında uzun süre kalır. Yüzeyde PEG gibi hidrofilik grupların olması makrofajların fagositozuna karşı sterik bir engel oluşturur. Hedeflendirme amacıyla kullanılan moleküller PEG zincirlerinin sonuna eklenebilmektedir (Celia ve ark., 2010).

1.2.1.1. Katı Lipid Nanopartiküller

Katı lipid nanopartiküller (SLN), 1990ların başında emülsiyonlar, lipozomlar, polimerik nanopartiküllere alternatif bir taşıyıcı sistem olarak geliştirilmiştir. SLN'ler, katı-lipid partiküllerin su ya da sulu surfaktan çözeltisine disperse edilmesiyle hazırlanan nanometre boyutunda küresel partiküllerdir. Eritilmiş katı-lipid matraste etkin madde çözülebilir ya da disperse edilebilir (You ve ark., 2007; Kaur ve ark., 2008). Etkin maddelerin SLN'lere 3 farklı şekilde yüklenebileceği belirtilmiştir (Şekil 1.3) (Müller ve ark., 2000).



Şekil 1.3. Etkin maddelerin SLN'lere yüklenme şekilleri (Müller ve ark., 2000)

SLN'ler oda sıcaklığında ve vücut sıcaklığında katı olan lipidler içerir. Lipid olarak saf trigliseritler (tristearin, tripalmitin, trimristin, trikaprin, trilaurin), uzun zincirli alkoller (setil alkol), mumlar (balmumu, setil palmitat), steroller (kolesterol) kullanılabilir. Sıklıkla kullanılan surfaktanlar poloksamer 188, poloksamer 182, poloksamer 407, safra tuzları, setil trimetilamonyum bromür, soya lesitini, fosfatidilkolin, polietilenglikoller, polivinilalkoller, tween 80, tween 60, brij 30, brij 98 ve brij 76'dır. SLN'ler organik çözücü kullanılmadan da hazırlanabilirler. SLN hazırlanmasında kullanılan yardımcı maddeler FDA tarafından onaylı GRAS (Genel olarak güvenli kabul edilir) statüsünde yer almaktadır (Kumar ve ark., 2013).

SLN'lerin, nanopartiküllere ek olarak sağladığı avantajlar şunlardır:

- Taşıyıcı lipidler biyoparçalanabilir ve güvenlidir.
- Üretim işleminden kalan bir kontaminasyon olmaz, organik çözücü kalıntısı içermez.

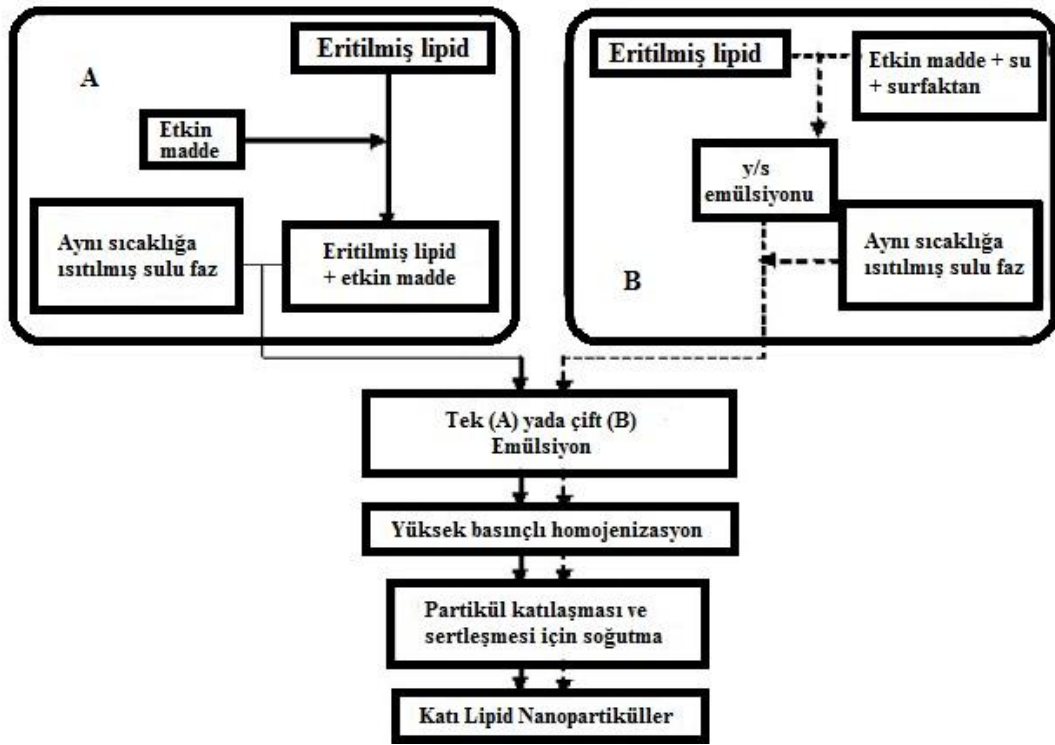
- Yüksek basınçta homojenizasyon yöntemi uygun maliyetlidir ve tekrarlanabilirliği iyidir. Bu yöntem SLN formülasyonlarının büyük ölçekte üretimlerine olanak sağlar.
- Hidrofilik ve lipofilik etkin maddeler yüklenebilir.
- 3 yıla kadar stabil SLN formülasyonları geliştirilmiştir. Diğer kolloidal sistemlere göre önemli bir avantajdır. (Kaur et. al., 2008; Blasi et. Al. 2007).
- SLN'lerin parenteral uygulamadaki avantajlarından biri de kontrollü salım sağlamalarının yanı sıra toksisitelerinin olmamasıdır. Yağ asitlerinden oluşan gliseridler ve parenteral uygulamalar için kabul edilen emülgatörler (lesitin, Tween 80, Poloksamer 188) bu amaçla kullanılmaktadır (Müller ve ark., 2000; Wissing ve ark., 2004).

SLN'lerin hazırlama yöntemleri temel olarak şu şekilde sınıflandırılabilir (Kumar ve ark., 2013) :

1. Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi
2. Mikroemülsiyon yöntemi
3. Çözücü emülsifikasyon / difüzyon yöntemi
4. Çözücü enjeksiyonu yöntemi
5. Su/yağ/su tipi çift emülsiyon yöntemi
6. Ultrasonikasyon yöntemi
7. Süperkritik sıvı tekniği
8. Membrandan geçirme yöntemi
9. Elektrosprey tekniği

Nanopartiküler ilaç taşıyıcılarının ilaç piyasasına girmesi için birinci şart büyük ölçekli üretimlerinin gerçekleştirilebilmesidir. İlaç endüstrisinde intravenöz nanoemülsiyonlar için büyük ölçekli üretim metotlarından biri yüksek basınçlı homojenizasyondur. Yüksek basınçlı homojenizasyon yüksek sıcaklıkta ya da oda sıcaklığının altında yapılabilir ve sırasıyla, sıcak ve soğuk homojenizasyon tekniği olarak adlandırılır.

Sıcak homojenizasyonda lipid erime sıcaklığının üzerine ısıtılır. Etkin madde eritilmiş lipide çözülür yada disperse edilir. Emülgatör içeren sulu faz da aynı sıcaklığa ısıtılır. Lipid faz ve sulu faz yüksek hızlı karıştırıcıda karıştırılarak emülsifiye edilir. Bu emülsiyon yüksek basınçlı homojenizasyon cihazından yüksek basınçta ve birkaç kez geçirilir (Müller ve ark., 2000; Kamboj ve ark., 2010). Sıcak homojenizasyon yöntemi ile SLN'lerin üretiminin şematik gösterimi Şekil 1.4'te yer almaktadır.



Şekil 1.4. Sıcak homojenizasyon yöntemi ile SLN'lerin üretim şeması (Kamboj ve ark., 2010)

Soğuk homojenizasyonda ise etkin madde içeren eritilmiş lipid soğutularak lipid mikropartiküllere (50-100 μm) öğütülür. Bu lipid mikropartiküller soğuk surfaktan çözeltisinde disperse edilir. Oluşan süspansiyon oda sıcaklığında ya da oda sıcaklığının altında homojenize edilir, aşındırma gücü lipid mikropartikülleri katı lipid nanopartiküllere parçalar (Müller ve ark., 2000; Kamboj ve ark., 2010).

Yüksek basınçlı homojenizasyon cihazları sıvıyı yüksek basınçla (100-2000 bar) birkaç mikron çapındaki dar bir delik içerisine iterler. Sıvı çok kısa mesafede çok yüksek hızda hareket eder (1000 km/saat üzerinde). Oluşan çok yüksek kayma gerilimi ve aşındırma güçleri partikülleri mikron altı boyutlara parçalar (Kamboj ve ark., 2010). Tez kapsamında SLN formülasyonlarının hazırlanmasında İKA-HPH-2000/4 yüksek basınçlı homojenizasyon cihazı kullanılmıştır (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. İKA HPH 2000/04 yüksek basınçlı homojenizasyon cihazı

Vücut sıcaklığında katı olan lipidlerden hazırlanan nanopartiküller yeni bir ilaç taşıyıcı sistemdir ve polimerik nanopartiküllerin, yağlı emülsiyonların ve lipozomların avantajlarına sahipken, bu taşıyıcıların bazı dezavantajlarını da ortadan kaldırmıştır.

Katyonik lipidlerin kullanımı ile hazırlanan katyonik SLN'ler genetik materyalin kanser tedavisinde kullanımını mümkün kılmıştır. Son zamanlarda nükleik asit taşıyıcı sistemi olarak katyonik SLN'ler antisens oligonükleotidlerin hücresel verililişi için incelenmektedir. Shi ve ark.'nın (2012) yaptığı bir çalışmada dimetildioktadesilamonyumbromür (DDAB)'ın SLN yüzeyine verdiği kısmi pozitif yükün hücre membranıyla etkileşimi kolaylaştırdığı, hücre permeabilitesini ve transfeksiyon etkinliğini artırdığı belirtilmiştir.

Jin ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada, trimristin ve DOPE (1,2-dioleil-sn-gliserol-3-fosfoetanolamin) ile hazırladıkları katyonik lipid nanopartiküllerine SMAD3 antisens oligonükleotidi yükleyerek keloid fibroblastların kolajen üretiminin inhibisyonunu sağlamıştır.

Lobovkina ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada siRNA'nın katyonik lipid DOTAP (1,2-dioleil-3-trimetilamonyum-propan) ile kompleksini oluşturarak SLN'ye etkin bir şekilde yüklemiştir. Hazırladıkları formülasyon siRNA'nın 10-13 gün süreyle *in vitro* ve *in vivo* uzatılmış salımını sağlamıştır.

Agarwal ve ark. (2011) doksorubisin yüklü katyonik BSA (Bovine serum albumin) konjuge SLN'ler hazırlayarak kan beyin bariyerini geçişini incelemiştir. Beyin kapiller endotel hücreleri tarafından doksorubisin yüklü SLN'lere göre BSA-konjuge edilen SLN'ler daha yüksek oranda alınmıştır.

Dhawan ve ark. (2011), alzheimer tedavisine yönelik olarak kan beyin bariyerinden geçişi artırmak üzere quercetin yüklü SLN formülasyonları hazırlamıştır. SLN formülasyonlarının hazırlanmasında surfaktan olarak tween 80 seçilmiştir. İntravenöz uygulama için kabul edilebilirliğinin iyi olması, etkin madde yükleme etkinliğinin iyi olması, hidrofilik yapısı nedeniyle SLN'leri beyine hedefleme yeteneği tween 80'in seçilmesinin nedenleri olarak sayılmıştır. Tween 80'in formülasyonun içerisinde yer aldığı ve tween 80 ile ilave bir kaplama yapılmayan SLN'ler daha iyi performans göstermiştir. Bunun sebebinin tween 80 ile yapılan ek kaplamanın partiküllerde birleşmeye yol açması, partikül boyutunu artırması ve partiküllerin santral sinir sistemine girişini engellemesi olduğu söylenmiştir.

1.2.1.2. Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller doğal/sentetik ve biyoparçalanabilir/ biyoparçalanabilir olmayan polimerler kullanılarak hazırlanabilirler. Jelatin, pullulan, kitozan ve aljinat doğal, biyoparçalanabilir ve biyoyumlu polimerler arasındadır. Polilaktid (PLA), Poli(laktid-ko-glikolik asit) (PLGA), polianhidritler, poli-(ϵ -kaprolakton) sentetik biyoparçalanabilir polimerlerden; poli(metilmetakrilat) ve polistiren ise biyoparçalanabilir olmayan sentetik polimerlerdendir. PLGA ve PLA polimerlerinin parenteral mikroküreler, implantlar ve periodontal ilaç sistemlerinde kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır (Sah ve ark., 2013).

Polimerik nanopartiküllerin hazırlama yöntemleri temel olarak şu şekilde sınıflandırılabilir:

I. Kimyasal yöntemler

1. Monomer polimerizasyonu

- Emülsiyon polimerizasyonu
- Süspansiyon polimerizasyonu
- Polikondensasyon

2. Polimerler kullanılarak hazırlama

- Kovalan çapraz bağlama yöntemi
- İyonik çapraz bağlama yöntemi
- Şelasyon

II. Fiziksel yöntemler

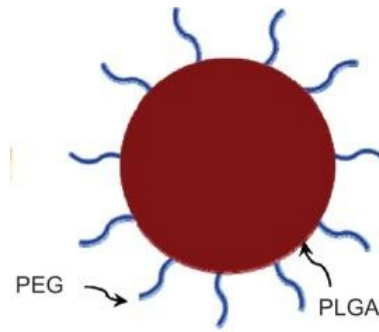
- Çözücü buharlaştırma yöntemi
- Püskürterek kurutma yöntemi
- Püskürterek kaplama yöntemi
- Püskürterek dondurma yöntemi
- Dondurarak kurutma yöntemi
- Koaservasyon yöntemi (Jatariu ve ark., 2010)

Suda çözünen etkin maddeler için uygun olan hazırlama metodu su/yağ/su tipi emülsifikasyon çözücü buharlaştırma tekniğidir, hidrofilik etkin maddenin iç fazdan dış faza difüzyonunu kontrol etmek mümkündür (Zhang ve ark., 2014). Bu yöntemde polimer, su ile karışabilen organik çözücüde (diklorometan, aseton, etil asetat, kloroform gibi) çözülerek emülgatör içeren sulu faza emülsifiye edilerek karıştırılır ve su/yağ tipi primer emülsiyon oluşturulur. Hidrofobik etkin maddeler primer emülsiyonun organik fazına ilave edilirken, hidrofilik etkin maddeler sulu fazına ilave edilir. Daha sonra primer emülsiyon stabilizer içeren ikinci sulu faza ilave edilerek karıştırılır ve su/yağ/su tipi sekonder emülsiyon oluşturulur. Organik çözücü buharlaştırılarak uzaklaştırılır ve nanopartikül oluşumu sağlanır (Olivier, 2005; Dinarvand ve ark., 2011).

Biyoparçalanabilir polimerler içinden glikolik asit ve D,L-laktik asit enantiomerlerinden üretilen polimerler biyouyumlu olmaları ve doğal yollardan sindirilmeleri nedeniyle ilgi çekmiştir. PLA ve PLGA'nın parçalanması ester bağlarının otokatalitik kırılması ile oligomerlere ve D,L-laktik asit ve glikolik asit monomerlerine spontan hidrolizi vasıtasıyla meydana gelir. Parçalanma hızı; molekül ağırlığı, laktik/glikolik oranı, morfolojik özelliklere dayanan hidroliz hız sabiti, absorplanan su miktarı, polimer fragmanlarının polimer matristen difüzyon katsayısı ve parçalanma ürünlerinin sulu ortamdaki çözünürlüğüne bağlı olarak değişir. Metoksi(polietilen)glikol PLA/PLGA (mPEG-PLA/PLGA) blok kopolimerleri de benzer parçalanma özelliğine sahiptir. mPEG blokları ester bağlarının kırılmasıyla serbest kalır ve molekül ağırlığı 1000-20000 arasında olanlar başlıca böbrekler vasıtasıyla atılır. Nanopartiküller PLA/PLGA parçalanana kadar büyük ölçüde morfolojisini ve boyutunu korur (Olivier, 2005).

PLGA nanopartiküllerinin hücreler tarafından endositozla alındığı *in vitro* olarak incelenmiştir. Endositozdan sonra, PLGA nanopartikülleri endolizozomal kompartmandan stoplazmaya kaçmakta ve içerisindeki etkin maddeyi yavaş yavaş açığa çıkarmaktadır (Olivier, 2005).

PLA ve PLGA nanopartikülleri vasküler uygulamadan sonra 2-3 dakikada hızlıca kan dolaşımından uzaklaştırılmakta ve başlıca karaciğer ve dalakta birirmektedirler (Olivier, 2005). Bu nedenle PLA ve PLGA nanopartiküllerinin pegilasyonu akılcı bir seçim olarak önerilmiştir. Çünkü, PEG ile yapılan hidrofilik kaplamanın PLA ve PLGA nanopartiküllerini sterik olarak stabilize ettiği ve makrofajlar tarafından tanınmayı azalttığı *in vitro/ ex vivo* olarak gösterilmiştir. Pegilasyon teknolojisi suda çözünürlüğü ve stabiliteyi artırmakta, etkin maddenin sistemik dolaşımında bulunma süresini uzatmaktadır (Sah ve ark., 2013).



Şekil 1.6. PEG-PLGA nanopartiküllerinin şematik görünümü (Sah ve ark., 2013)

Pegile nanopartiküller mPEG-PLA ya da mPEG -PLGA'dan hazırlanmaktadır, şematik olarak Şekil 1.6'da gösterilmiştir. PLA, PLGA ve PEG'lerin molekül ağırlıklarında çok seçenek bulunmaktadır ve nanopartiküllerin dansitesi, yüzey kıvrımı, polimer parçalanma hızı, *in vivo* yer değişimi gibi çeşitli parametreler molekül ağırlığına bağlı olarak değişebileceği için uygun polimerin seçimi önemlidir.

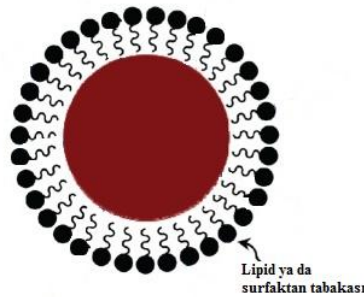
Sıçanlarda BSA yüklü PLGA nanopartiküllerinin kandaki yarılanma ömrü 13.6 dakika iken, mPEG-PLGA nanopartiküllerinin (yaklaşık 200 nm boyutunda) kandaki yarılanma ömrü 270.9 dakika olarak belirlenmiştir (Olivier, 2005).

U87MG glioblastoma implante edilmiş farelerde yapılan bir çalışmada angiopеп bağlı mPEG-poli(ε-kaprolakton) nanopartiküllerinin uygulanması ile ortalama yaşam süresinin 21 günden 37 güne çıkarak %75 arttığı görülmüştür (Kreuter, 2014).

1.2.1.3. Polimer-Lipid Hibrit Nanopartiküller

Polimer-lipid hibrit nanopartiküller, polimer ve lipid olmak üzere en az iki bileşenden oluşan katı, nanoboyutlu partiküllerdir. Biyouyumlu, biyoparçalanabilir olmaları ve toksik olmamaları nedeniyle yaygın olarak seçilen polimerler PLGA, polikaprolakton (PCL), dekstran ya da albumindir. Lesitin, 1,2-dipalmitoil-sn-gliserol-3-fosfokolin, 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamonyum-propan, DOTAP ya da DOPE gibi zwitteriyonik, katyonik, anyonik ve nötral fosfolipidler sıklıkla kullanılan lipidlerdir. Polimerik çekirdeğin kabuğu oluşturan tek ya da çok tabakalı lipid ile kaplandığı sistemler var olan hibrit nanopartiküller arasında öne çıkmıştır (Şekil 1.7). Bu çekirdek-kabuk tipi hibrit nanopartiküllerin nanopartiküllere ek olarak avantajları şu şekildedir:

- Katı polimerik çekirdek iskelet gibi görev yapar ve mekanik stabiliteyi, biyoparçalanabilirliği, dar partikül boyutu dağılımını, spesifik yüzey alanının artmasını sağlar.
 - Kabuk oluşturan lipid tabakası biyouyumludur ve hücre membranlarına benzer davranış sergiler. Kabuk tabakası membran içindeki ya da yüzeyindeki çok çeşitli moleküller ile etkileşme yeteneğine sahiptir.
 - Lipidlerin amfifilik özelliği hidrofilik moleküllerin iki katmanlı yapı yüzeyine adsorbsiyonunu, hidrofobik moleküllerin hidrofobik bölgeye girişini kolaylaştırır.
- (Mandal ve ark., 2013).



Şekil 1.7. Polimer-lipid hibrit nanopartiküllerinin şematik görünümü (Sah ve ark., 2013)

Polimer-lipid hibrit nanopartiküllerin hazırlanmasında iki yöntem kullanılmaktadır. Birincisi iki-aşamalı yöntemdir. Bu yöntemde ayrı ayrı hazırlanan nanopartiküller ve lipid veziküller (ya da lipid filmler) birlikte inkübe edilir. Anyonik polimerik nanopartiküller ve katyonik lipid veziküller elektrostatik olarak etkileşerek nanopartikül yüzeyinde lipid tabaka oluşumunu sağlar. Bu yöntemin dezavantajı inkübasyon sırasında özellikle suda çözünürlüğü yüksek olan etkin maddelerin nanopartikül yüzeyinde lipid tabakası oluşmadan önce dışarıya sızması ve buna bağlı olarak enkapsülasyon etkinliğinin azalmasıdır.

Polimer-lipid hibrit nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan ikinci yöntem tek aşamalı yöntemdir. Tek aşamalı yöntemde polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan yöntemlerden nanoçöktürme yöntemi ve emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma yöntemi modifiye edilerek kullanılmaktadır. Nanoçöktürme yönteminde polimer ve etkin madde önce suyla karışabilen bir çözücüde çözülür, sonrasında lipidleri içeren sulu faza eklenerek sonike edilir. Çözücünün sulu faza difüzyonuyla etkin madde ve polimer nanopartikül şeklinde çöker ve lipidler kendiliğinden yüzeye yerleşir. Bu yöntemin sınırlayıcı yönü suda çözünmeyen etkin maddeler arasında suyla karışabilen çözücülerde çözünenlerin enkapsülasyonu için uygundur.

Polimer-lipid hibrit nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan diğer tek aşamalı yöntem modifiye çözücü buharlaştırma yöntemidir. Bu yöntemde lipid suyla karışmayan bir çözücüde polimer ve etkin madde ile birlikte çözülür. Yağ fazı sulu faza emülsifiye edildiğinde su içinde yağ emülsiyonu oluşur. Lipidlerin hidrofobik kuyruğu polimer yüzeyine kendiliğinden bağlanır, hidrofilik baş kısmı ise dış sulu faza doğru uzanır, böylece lipid kaplı polimerik çekirdek oluşur. Suda çözünen etkin maddeler ve makromoleküller için çoklu emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi lipid-polimer hibrit nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılmaktadır. İlk aşamada polimer ve lipidi içeren organik çözücüye sulu etkin madde çözeltisi ilave edilerek primer emülsiyon oluşturulur. Primer emülsiyon dış sulu faza ilave edilerek sekonder emülsiyon oluşturulur ve organik çözücü buharlaştırılır. (Cheow ve Hadinoto, 2011; Mandal ve ark., 2013; Hadinoto ve ark., 2013).

Hibrit nanopartiküllerin hazırlanmasında lipid bileşimi ve konsantrasyonu önemli rol oynar. Fazla lipid ilavesi partikül üzerinde çok tabakalı lipid kaplamasına neden olurken, serbest lipozomal partiküller de oluşabilir (Mandal ve ark., 2013).

Chan ve arkadaşları (2009), PLGA, lesitin ve PEG kullanarak dosetaksel içeren 60-70 nm boyutunda polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonu hazırlamıştır. Yaptıkları çalışmada, PLGA'nın hidrofobik çekirdeği oluşturduğunu, lesitin bu hidrofobik çekirdeği tek tabaka şeklinde kapladığını ve PEG'in lesitin tek tabakası içine karışarak elektrostatik ve sterik stabiliteyi sağlayan PEG kabuğunu sağladığını belirtmişlerdir.

Cheow ve Hadinoto (2011), siprofloksasin ve tobramisin polimer-lipid hibrit nanopartiküllerini suda çözünen maddeler için uygun üretim yöntemi olarak belirttikleri çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlamıştır. Hazırladıkları polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonları hibrit olmayanlara göre daha yüksek enkapsülasyon etkinliği oluşturmuştur. Bunun sebebinin partikülü saran lipid kaplamasının etkin maddenin sulu faza sızmasını engelleyen bariyer görevi görmesi olduğunu belirtmişlerdir.

1.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

1.3.1. Partikül Boyutu, Polidispersite İndeks ve Zeta Potansiyeli

Partikül boyutu, partikül boyutu dağılımı ve zeta potansiyeli uygun nanot taşıyıcı sistemler oluşturmak için incelenmesi gereken önemli fizikokimyasal parametrelerdir. Partikül boyutunun belirlenmesi amacıyla en sık kullanılan yöntem hızlı sonuç vermesi nedeniyle foton korelasyon spektroskopisidir. Ortalama partikül boyutu ve polidispersite indeksi modern bilgisayar programları ile hesaplanabilmektedir. Bu yöntemde toz, mikrobiyal kontaminasyon, partikül

içeriğinin kristalizasyonu, ikincil partikül aglomeratları gibi farklı partikül boyutları hatalı sonuçlara yol açabilmektedir. Bu hatalı sonuçlardan kaçınmak üzere sonuçların elektron mikroskopisi (TEM/ SEM) gibi uygun diğer yöntemlerle doğrulanması yararlı bulunmuştur (Kaur ve ark., 2008).

Kaur ve ark. (2008), 200 nm'den küçük boyuta sahip SLN'lerin kan dolaşımında daha uzun süre kaldığını ve böylece etkin maddenin beyine geçişi için kan beyin bariyeri ile temasta bulunma süresinin de arttığını belirtmiştir. Patel ve ark. (2013) benzer şekilde boyutları 120-200 nm aralığında olan SLN'lerin RES hücreleri tarafından kolay alınamadığını söylemiştir. Bir diğer çalışmada ise ortalama partikül boyutu 100 nm'den daha az olan ve partikül boyutu dağılımı dar olan kolloidal sistemlerin beyine verilmesi için en uygun aralık olduğu, zeta potansiyel değeri minimum ± 30 mV olduğunda kolloidal sistemlerin agregasyon göstermediği ve stabil nanosüspansiyon oluşumunu sağladığı belirtilmiştir (Celia ve ark., 2011). Clawson ve ark (2011) avantajlı *in vivo* farmakokinetik özellikleri ve tümörde birikimleri nedeniyle sistemik ilaç verilmesi için hidrodinamik çapı 100 nm ya da daha az olan partiküllerin istendiğini belirtmiştir.

1.3.2. Etkin Madde Yükleme Kapasitesi

Nanopartiküllere yüklenen etkin madde miktarının belirlenmesi önemlidir ve sistemden etkin maddenin *in vitro* salım profilinin belirlenmesi için gereklidir. Nanopartikülün birim ağırlığına enkapsüle olan etkin madde miktarı, sulu ortamdaki serbest etkin maddenin partiküllerden ayrılması ile belirlenebilmektedir. Bu işlem ultrasantrifüj, santrifüjle filtrasyon ya da jel permeasyon kromatografisi kullanılarak gerçekleştirilebilir. Santrifüjle filtrasyon amacıyla milipore ve sartorius'un çeşitli filtreli santrifüj tüpleri kullanılmaktadır. Nanopartiküler sisteme yüklenen etkin madde miktarı süzöntüdeki etkin madde miktarı belirlenip total etkin madde miktarından çıkarılarak hesaplanmakta ya da alternatif olarak, nanopartikül sedimenti uygun çözücüde çözülüp etkin madde miktarı analiz edilmektedir (Kaur ve ark., 2008).

1.3.3. İn Vitro Salım

Etkin maddenin nanopartiküler sistemden *in vitro* salımı ideal salım profili sağlamak için önemlidir. Etkin maddenin *in vitro* salım profilinin modifikasyonu, kan konsantrasyonunu ve biyoyararlanımını optimize etmektedir. Hasta uyuncunun sağlanmasının yanı sıra uygun farmakokinetik davranış elde edilebilmektedir. Diyaliz membran yöntemi ve franz difüzyon hücresi en sık kullanılan *in vitro* salım yöntemleridir (Chan ve ark., 2009; Ghanshyam ve ark., 2011; Nair ve ark., 2011; Ghadiri ve ark., 2012; Belletti ve ark., 2012). Beyine etkin madde verilğinde uzatılmış etkin madde salımı, spesifik bölgelere etkin maddenin difüzyonuna izin veren yeterli zaman aralığını sağlamaktadır (Celia ve ark., 2011).

1.3.3.1. İn Vitro Salım Kinetikleri

Sıfır Derece Kinetik

Etkin maddelerin ideal salımı sıfır derece kinetiğe uymaktadır. Bu kinetiğe göre dozaj formundan her bir zaman aralığında etkin maddenin açığa çıkan miktarı sabittir. Sıfır derece kinetik, modifiye salım yapan farmasötik dozaj formlarından etkin maddenin salımını tanımlamak için sıklıkla kullanılmaktadır. Sıfır derece hız ifadesi aşağıdaki eşitlikle verilmektedir. t 'ye karşı Q_t değerleri grafiğe geçirildiğinde eğimi k_0 olan bir doğru elde edilmektedir (Dash ve ark., 2010; Singhvi ve Singh, 2011).

$$Q_t = Q_0 + k_0.t$$

Q_t : t anında açığa çıkan kümülatif etkin madde miktarı (mg)

Q_0 : Etkin maddenin çözeltideki başlangıçtaki miktarı (mg)

k_0 : Sıfır derece çözünme hız sabiti (mg/sa)

t : zaman (sa)

Birinci Derece Kinetik

Birinci derece kinetikte, her zaman aralığında dozaj formunun içinde kalan etkin madde miktarı ile orantılı etkin madde salımı olmaktadır. Klasik dozaj formlarının çoğu bu çözünme mekanizmasını göstermekte ve uzatılmış salım yapan formülasyonlar da bu tip çözünme kinetiğine uyum sağlamaktadır. Bu kinetiğe göre hız ifadesi aşağıdaki eşitlikle verilmektedir. Birinci derece kinetikte t'ye karşı $\ln C$ değerleri grafiğe geçirildiğinde eğimi k olan bir doğru elde edilmektedir. (Bozkır ve ark., 2007; Costa ve Lobo, 2003).

$$\ln C = \ln C_0 - kt$$

C: t anında çözünmeden kalan kümülatif etkin madde miktarı (mg)

C_0 : Başlangıçtaki etkin madde konsantrasyonu (mg)

k: Birinci derece çözünme hız sabiti (sa^{-1})

t: zaman (sa)

Hixson Crowell Küpkök Kuralı

Hixson Crowell küpkök kuralı, yüzey alanında ya da çapında değişiklik olan partikül ya da tablet formlarından etkin madde salımını tanımlamaktadır. Eş boyutlu partiküllerden oluşan toz etkin madde için, partiküllerin küpköküne dayanan çözünme hızını açıklayan bir eşitlik türetilmiştir (Dash ve ark., 2010; Singhvi ve Singh, 2011).

$$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = \kappa \cdot t$$

Q_0 : Etkin maddenin başlangıçtaki miktarı (mg)

Q_t : t anında açığa çıkan kümülatif etkin madde miktarı (mg)

κ : Hixson-crowell eşitliğine ait hız sabiti ($mg^{1/3}/sa$)

t: zaman (sa)

Higuchi Kinetik Modeli

Matris sistemlerden etkin madde salımını tanımlamak amacıyla oluşturulan ilk matematiksel model Higuchi tarafından önerilmiştir. Kontrollü etkin madde salımı elde etmek için bilinen yaklaşımlar arasından en yaygın kullanılanı hidrofilik matris sistemidir. Hidrofilik matrislerden etkin madde salımı zamanla difüzyon yol uzunluğu arttığı için zamana bağlı azalan bir profil gösterir. Eşitlik aşağıdaki şekilde uygulanmaktadır. Denklemden de görüldüğü gibi herhangi bir t anında açığa çıkan etkin madde miktarı zamanın karekökü ile orantılıdır (Dash ve ark., 2010; Singhvi ve Singh, 2011).

$$Q = k_H t^{1/2}$$

Q: t anında açığa çıkan kümülatif etkin madde miktarı

k_H : Higuchi salım hız sabiti ($sa^{-1/2}$)

t: zaman (dak)

Korsmeyer-Peppas Modeli

Etkin maddenin açığa çıkışının difüzyonla ve/veya polimerde meydana gelen gevşeme ile oluşunu açıklamak üzere Peppas ve arkadaşları tarafından geliştirilen denklem sıklıkla kullanılmaktadır.

$$M_t/M_\infty = K t^n$$

Bu denklemin logaritmik formu şu şekildedir.

$$\log M_t/M_\infty = \log k_p + n \cdot \log t$$

M_t : t anında açığa çıkan etkin madde miktarı (mg)

M_∞ : Toplam etkin madde miktarı (mg)

K: Dozaj formunun yapısal ve geometrik özelliklerini içeren bir sabit

n: Salım üssel katsayısı, etkin madde salım mekanizmasının belirleyicisi

Bu denklem etkin madde salımının %60'lık fraksiyonu için geçerlidir. Farklı salım mekanizmalarını karakterize etmek üzere n değeri kullanılır. $n \leq 0.45$ olduğunda etkin maddenin matristen Fick difüzyon mekanizması ile çıkışı söz konusudur. n değeri

0.45 ve 0.89 arasında olduğunda etkin madde çıkışında polimer zincirlerinin gevşemesine bağlı olarak difüzyon ve erozyonun birlikte etkili olduğu, $n > 0.89$ olduğunda erozyon kontrollü salım olduğu, $n = 1$ olduğunda ise sıfır dereceden çıkış olduğu belirtilmiştir (Costa ve Lobo, 2003; Doijad ve ark., 2006; Dash ve ark., 2010; Singhvi ve Singh, 2011; Zhang ve ark., 2014).

Weibull Modeli

Weibull modeline ait eşitlik aşağıda yer almaktadır. $b=1$ olduğunda çözünme hızı grafiğinin şekli k sabiti $1/a$ ile tamamen uyumludur. $b > 1$ ise çözünme grafiği sigmoidal şekildedir. $b < 1$ ise çözünme grafiği $b=1$ 'e göre daha dik bir artış göstermektedir (Singhvi ve Singh, 2011).

$$M = M_0 [1 - e^{-(t-T)^b/a}]$$

M : t anında açığa çıkan etkin madde miktarı (mg)

M_0 : Total etkin madde miktarı (mg)

T : çözünme işleminin sonucu olarak ölçülen gecikme süresi (dak)

a : Zamana bağımlılığı tanımlayan skala parametresi

b : Çözünme grafiğinin ilerleme şeklini tanımlayan sabit

1.3.4. Morfolojik Özellikler

Nanopartiküllerin morfolojik özellikleri geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak tayin edilebilir. Kabuk-çekirdek yapısını daha net görüntülemek amacıyla TEM'de örnekler genellikle uranil asetat, osmium tetraoksit ya da fosfotungstik asit ile boyanmaktadır (Mandal ve ark., 2013).

1.3.5. Termal Özellikler

Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) termal analizde endotermik işlemleri (erime, katı-katı faz geçişi ve kimyasal parçalanma) ve ekzotermik işlemleri (kristalizasyon ve oksidatif dekompozisyon) görüntülemek üzere yaygın olarak kullanılmaktadır. DSC analizi ön formülasyon çalışmaları için oldukça faydalı bulunmuştur, çünkü formülasyondaki olası etkin madde-yardımcı madde ya da yardımcı madde-yardımcı madde etkileşimleri görülebilmektedir. Aynı zamanda etkin maddenin nanopartiküllere hangi formda yüklendiği DSC analizi ile belirlenebilmektedir (Kushwaha ve ark., 2013; Christoper ve ark., 2014).

1.3.6. Sterilizasyon

Avrupa Farmakopesi 5 tip sterilizasyon yöntemine izin vermektedir.

Su buharı ile sterilizasyon: Otoklavda en az 121°C’de 15 dakika süreyle yapılır. Bu yöntem sulu çözeltiler için tercih edilir. 10^{-6} sterilite güvence sınırı (SAL) değeri ya da daha iyi bir sterilizasyon sağlamalıdır.

Kuru ısı sterilizasyonu: En az 160°C’de en az 2 saat süreyle yapılır. 10^{-6} SAL değeri ya da daha iyi bir sterilizasyon sağlamalıdır.

İyonize edici radyasyonla sterilizasyon: Bu yöntemle sterilizasyon, ürünün uygun radyoizotopik kaynaktan (^{60}Co gibi) gama radyasyon şeklinde ya da elektron demetinden elektronların ışınlaması şeklinde iyonize edici radyasyona maruz bırakılmasıyla yapılır. Bu yöntemle terminal sterilizasyon için referans absorbe edilen doz 25 kGy’dir. 10^{-6} SAL değeri ya da daha iyi bir sterilizasyon sağlamalıdır.

Gazlarla sterilizasyon: Etilen oksit ve formaldehit gazları kullanılır. Bu yöntemle sterilizasyon başka uygun alternatif olmadığında kullanılmalıdır.

Filtrasyon: Filtrenin por boyutu 0.2 μm ya da daha küçük olmalıdır.

Son 30 yıldır radyasyonla sterilizasyonla ilgili yayınların büyük kısmında gama radyasyon ya da elektron demetine maruz kalan terapötik maddelerin ya da sulu çözeltilerinin fizikokimyasal özelliklerinin tayini yer almaktadır. Araştırmacılar son çalışmalarında sterilizasyonun etkisini incelemek amacıyla yeni enstrümental metodları kullanmakta ve kesin, tekrarlanabilir sonuçlar elde etmektedir. Son zamanlarda kullanılan yöntemler X-ray difraksiyon, termal yöntemler (DTA, DSC) ve rezonans yöntemleridir (EPR, NMR). Mevcut sonuçlara bakıldığında katı fazda bulunan ilaçların çoğunun iyonize edici radyasyona karşı bozulma göstermediği, etkin maddenin miktarında ya çok küçük bir değişim olduğu ya da hiçbir değişiklik olmadığı belirtilmiştir. Bunun yanı sıra radyasyonla sterilizasyona maruz bırakılan ilaçların biyolojik çalışmaları yetersizdir ve bu yöntemin uygulanabilirliğini sınırlandırmaktadır. Radyasyonla sterilizasyonun değerlendirilmesinde esas problem işlem sırasında oluşan yan ürünlerin incelenmesidir. Radyasyonla sterilizasyonun güvenilir ve başarılı bir şekilde kullanımı, özellikle farmakolojik aktiviteyi ve radyolitik dekompozisyon ürünlerinin toksik etkilerini de gösteren biyolojik yöntemlerle daha detaylı çalışma gerektirmektedir (Marciniec ve Dettlaff, 2008).

Dillen ve ark. (2004) tarafından hazırlanan siprofloksasin içeren PLGA nanopartiküllerinin ^{60}Co kaynağı kullanılarak gama radyasyonla 25 kGy dozda sterilizasyonu yapılmıştır. Gama sterilizasyondan sonra polimerlerin viskoelastik özelliklerinde bir değişiklik olmadığı, ancak salınan etkin madde yüzdesinde artış olduğu görülmüştür.

Ranjan ve ark. (2012) tarafından hazırlanan curcumin yüklü PLGA nanopartikülleri ^{60}Co kaynağı kullanarak gama radyasyonla 16.8 kGy, 25.3 kGy ve 35.8 kGy dozlarında sterilize edilmiştir. Gama radyasyonun partikül boyutu ve yükleme etkinliği üzerine etkisi incelendiğinde farkın istatistiksel olarak anlamsız olduğu görülmüştür.

Maksimento ve ark. (2008) tarafından hazırlanan doksorubisin yüklü PBCA nanopartikülleri ^{60}Co kaynağı kullanarak gama radyasyonla 10 kGy, 15 kGy, 25 kGy

ve 35 kGy dozlarında sterilize edilmiştir. Mikrobiyolojik inceleme sonucunda 15kGy dozun üzerinde yapılan sterilizasyonun başarılı olduğu belirtilmiştir. Sterilizasyonun ortalama partikül boyutunu etkilemediği görülmüştür. Sterilizasyondan sonra doksorubisinin HPLC kromatogramı incelendiğinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiş, miktar tayini sonucu benzer bulunmuştur.

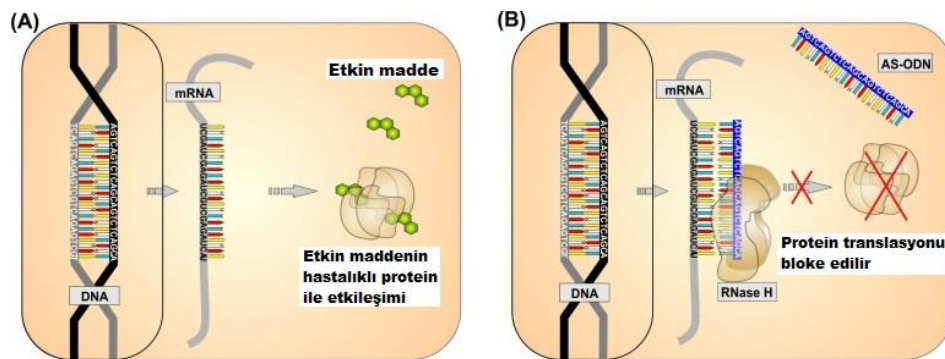
Uddin ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada NF-kB antisens oligonükleotidi yüklenen albumin mikroküreleri gama radyasyonla sterilize edilmiş, antisens oligonükleotidin yapısal bütünlüğüne sterilizasyonun etkisi incelenmiştir. Antisens oligonükleotidin poliakrilamid jel elektroforez üzerindeki ilerleme davranışı, gama radyasyona bağlı olarak önemli bir değişiklik olmadığını doğrulamıştır.

1.4. MikroRNA'lar, Antisens Oligonükleotidler ve Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemlerin Önemi

MikroRNA'lar 1990'ların başında Victor Ambros ve çalışma grubu tarafından keşfedilmiştir. Komplementer hedef mRNA'lara sıklıkla kısmi olarak bağlanarak protein translasyonunu baskılayan, 18-25 nükleotid uzunluğunda, küçük kodlama yapmayan RNA'lardır. Protein kodlayan genlerin intronlarında yer alabileceği gibi genler arası bölgelerde de bulunabilir. Son yıllarda mikroRNA'ların gen ekspresyonundaki düzenleyici rolü kanser biyolojisine büyük ölçüde ışık tutmuştur. Normal hücrelerde mikroRNA'ların kontrol genleri normal hızda hücresel büyüme, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz sağlamaktadır. Ancak hücre döngüsünün ilerlemesini ve terminal farklılaşmayı sağlayan genleri inhibe eden mikroRNA'lar kanser hücrelerinde sıklıkla baskılanırken, hücre döngüsünün ilerlemesini sağlayan ve apoptoza direnç gösteren diğer genler yüksek oranda ekspresse olur. MikroRNA'ların insanlarda yaygın olarak görülen kanserlerde genomik bölgelerde sıklıkla yer aldığı görülmüştür. Bunun yanı sıra insan kaynaklı birçok tümör hücre dizisinde mikroRNA'ların ekspresyon düzeninin bozulduğu bulunmuştur. Bu bulgular mikroRNA'ların diagnostik ve prognostik olarak biyomarker olma potansiyeli taşıdığını göstermiştir (Guz ve ark., 2014) .

Oligonükleotidler, başlıca antisens oligonükleotidler, hedeflemede yüksek seçiciliğe sahip olmaları nedeniyle yeni potansiyel aktif maddeler olarak incelenmektedir. Plazmada ve hücre içinde bulunan nükleazlara karşı düşük stabiliteleri ve küçük boyutları nedeniyle hızlı atılıma uğramalarına bağlı olarak antisens oligonükleotidlerin *in vivo* yarı ömrü kısadır. Negatif yükleri hücre içine kolay penetre olmalarını engeller.

Antisens oligonükleotidler (AON); 15-25 nükleotid uzunluğunda, spesifik mRNA'ya Watson-Crick baz eşleşmesi ile bağlanarak gen ekspresyonunu durduran, sentetik yapılı, tek zincirli DNA molekülleridir (Agrawal ve ark., 1997; Lee ve ark., 2003). Şekil 1.8'de şematize edildiği gibi bu moleküller genetik bilginin DNA'dan proteine transferini engelleme fonksiyonuna sahiptir (Dias ve ark., 2002). Bu sayede geleneksel ilaçlarla sağlanamayan seçicilik antisens yaklaşım ile sağlanabilmektedir (Wartlick ve ark., 2004). Genellikle 4 kDa'dan daha büyük molekül ağırlığına ve molekül başına 12'nin üzerinde negatif yüke sahiptirler (Wu-Pong, 2000). Konvansiyel ilaçlarla kıyaslandığında bu teknolojinin en önemli avantajı spesifik olmasıdır. Bu özellikleri nedeniyle antisens oligonükleotidler birçok hastalığın tedavisi açısından ümit vaat etmektedir ve geliştirilen çok sayıda antisens oligonükleotid preparatı, faz II ve faz III aşamasındadır (Philips, 2005). Bu klinik çalışmalar insanda AON'lerin hedef mRNA'ya karşı etkili olduğunu göstermiştir.



Şekil 1.8. Antisens oligonükleotidlerin etki mekanizması. A: Proteinlerin küçük moleküllü ilaçlarla translyasyondan sonra inhibisyonu, B: Antisens oligonükleotidlerle mRNA'nın translyasyondan önce baskılanması (Barar ve Omid, 2012).

Antisens oligonükleotidlerle tedavide karşılaşılan en önemli sorunlar; bu moleküllerin *in vitro* ve *in vivo* biyolojik ortamlarda nükleazlar tarafından hızla parçalanmaları, intraselüler penetrasyonlarının zayıf olması ve komplementer oldukları hedefe taşınmalarının güçlüğüdür (Fattal ve ark., 2004). AON'lerin stabilitesini ve hücresel penetrasyonunu artırmak ve hibridizasyon kapasitesini desteklemek amacı ile modifikasyon gerekmektedir. AON'ler doğal fosfodiester bileşiklerinden oluşur, kimyasal modifikasyon ile fosfodiester omurgasındaki oksijenin kükürt ile yer değiştirmesi fosforotiyoat oluşturur ve enzimatik parçalanmaya karşı stabilizeyi artırır. Kimyasal modifikasyon ile fosfodiester omurgasındaki oksijen metil grubuyla yer değiştirdiğinde hidrofobikliği artar, RNaz H aktivasyonu indirgenir. Deoksiriboz 2 pozisyonundaki hidrojenin hidroksimetil grubuyla yer değiştirmesi şekeri modifiye riboza dönüştürür, stabilitesini artırır. Bu modifikasyonlarla hedef RNA'nın RNaz H aracılı hidrolizini kuvvetlendirme kapasitesi, hidrofobisitesi, hibritleşme affinitesi gibi özellikler değerlendirilerek uygun AONler sentezlenebilir. Bu kimyasal modifikasyonlar stabilitenin ve hücre penetrasyonunun iyileşmesini sağlasa da antisens aktivitenin spesifikliğinin ortadan kalkması ile de sonuçlanabilir; AON aptamerleri reseptörlere, enzimlere ve diğer proteinlere bağlanarak fonksiyonlarını non-spesifik olarak etkileyebilir (Lambert ve ark., 2001). AON'lerin enzimatik hassasiyeti, fosforotiyoat gibi bazı kimyasal modifikasyonlarla kısmen çözümlenmiştir ancak hala tedavide kullanımlarını kısıtlayan en önemli sorun; uygun bir taşıyıcı sistemin bulunmamasıdır. Bu sorunları çözebilmek ve AON'lerin tedavide etkin olarak kullanılabilmelerini sağlamak için hedef bölgeye taşıyabilecek uygun bir taşıyıcı sistem gerekmektedir. AON'lerin stabilitesini artırmak, hücre penetrasyonunu iyileştirmek, non-spesifik bağlanmalarını engellemek üzere nanopartiküller gibi partiküler taşıyıcıların kullanımı uygun bir yaklaşım olarak görülmektedir (Junghans ve ark., 2000).

Hidrofilik ve polianyonik özelliklerine bağlı olarak AON'ler polimerik materyallerle zayıf olarak etkileşirler. Bu nedenle nanopartiküllere yüklenmesi zordur. Bu amaçla; AON'ler hidrofobik moleküle kovalan bağlarla bağlanarak polimerik yüzeyle hidrofobik etkileşimi sağlanabilir ya da partikülleri kaplamak için katyonik

polimerler kullanılarak negatif yüklü AON'ler iyonik etkileşimle yüklenebilir (Lambert ve ark., 2001).

Chavany ve ark. (1994) hidrofobik kuaterner amonyum tuzu varlığında poliisohexsilsiyanoakrilat nanopartiküllerini hazırlayıp AON'leri nanopartikül yüzeyine adsorbe ettirmiştir. Nanopartiküllere bağlanan AON'ler hem tampon sisteminde hem de hücre kültürü ortamında nükleaz degradasyonuna karşı korunabilmişlerdir. AON'lerin U397 hücrelerindeki hücresel alımları ve stabiliteleri de artmıştır.

AON'lerin polar yapıda olmaları ve büyük partiküllere sahip olmaları, kan beyin bariyerini aşmalarında engel oluşturmaktadır. Bu amaçla Kılıç ve ark. (2005) emülsifikasyon-difüzyon yöntemini kullanarak AON içeren PLGA nanopartikülleri hazırlamışlar ve bu nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, yüzey morfolojisi, enkapsülasyon etkinliği, *in vitro* salım profilleri ve AON stabiliteleri gibi özelliklerini incelemişlerdir. Homojen ve küresel yapıda oldukları belirlenen AON içeren nanopartiküllerin stabil oldukları görülmüştür.

1.4.1. MiR-21 Antisens Oligonükleotidi

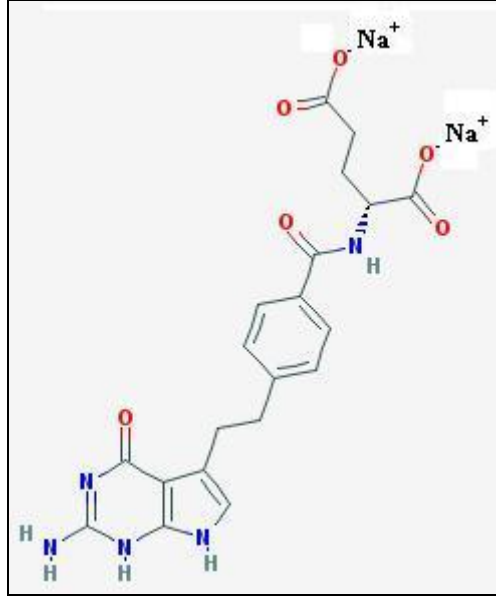
Son yıllarda yapılan çalışmalarda glioblastomanın patojenezinde miR-21'in artan ekspresyonunun tümör baskılayıcı yolları etkileyerek gliyom hücrelerinin çoğalmasını, öldürücülüğünü, kemoterapi ve radyoterapiye direncini artırdığı ve onkojen olarak rol oynadığı belirtilmektedir (Chistiakov ve Chekhonin, 2012). Ancak miR-21'in hücre çoğalması ve apoptozu engellemesine katkıda bulunan etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Yapılan çalışmalarda miR-21'in TGF- β , p53 ve mitokondriyel apoptoz tümör baskılayıcı yolları içeren önemli bileşenleri hedeflediği belirtilmiştir (Papagiannakopoulos ve ark., 2008; Ren ve ark., 2010). Bunun yanı sıra miR-21'in fosfataz ve tensin homoloğu protein seviyelerini düşürerek P13K/Akt'yi aktive ettiği, bu nedenle glioblastoma hücrelerinin

kemoterapi ve apoptoza dirençli olduğu belirtilmiştir (Qian ve ark., 2012). MiR-21 inhibisyonunun gliomları sitotoksik tedaviye duyarlılaştırdığı *in vivo* olarak gösterilmiştir. MiR-21'in spesifik antisens oligonükleotidlerle baskılanması VM-26, taksol ve 5-florourasilin, sırasıyla U373, U251 ve LN229 glioblastoma hücrelerine sitotoksik etkilerinin artmasını sağlamıştır. Benzer şekilde LN229, U251 ve U87 glioblastoma hücrelerinde temozolamide karşı duyarlılık miR-21'in spesifik inhibisyonu ile artmıştır (Ren ve ark., 2010; Qian ve ark., 2012).

Costa ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada miR-21 antisens oligonükleotidini (anti-miR-21) içeren lipid nanopartikül formülasyonlarının uygulanması ile kaspaz aktivitesinin arttığını, sunitinib ve anti-miR-21 kombinasyonunun kaspaz aktivitesini daha da çok artırdığını belirtmiştir.

1.5. Pemetrekset Disodyum (Pemetrekset)

Pemetrekset, 1992 yılında Princeton Üniversitesi'nde Edward C. Taylor tarafından geliştirilmiştir. Pemetreksetin kimyasal yapısı Şekil 1.9'da yer almaktadır. Kimyasal adı 'L -glutamik asit, N-[4-[2-(2-amino-4,7-dihidro-4-okso-1H-pirol[2,3-d] pirimidin-5-il)etil]benzoil] disodyum tuzu' dur. Pemetrekset, molekül ağırlığı 597.49 g/mol olan, beyaz-açık sarı kristalize toz yapısında bir maddedir. Suda kolay çözünür. Fizyolojik pH'da yapısında yer alan iki karboksil grubunun proton kaybına bağlı olarak negatif yüklü şekilde bulunur (Hanauske ve ark., 2001; Li ve ark., 2011; Respaud ve ark., 2011; Sorensen 2011).



Şekil 1.9. Pemetreksetin kimyasal yapısı

Farmakodinamik özellikleri

Antifolat ajanlar, örneğin metotreksat ve 5-fluorourasil, yıllardır kötü huylu tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Folat, DNA sentezine yol açan birden fazla metabolik yolda koenzim olarak görev yapan, hücre bölünmesi için önemli bir elementtir. Folat gerektiren reaksiyonlar bu nedenle, pürin ve pirimidin baz sentezi için önemlidir ve böylece kanser hücrelerinin hızlı çoğalması için gereklidir (Sorensen, 2011).

Pemetrekset, antifolat bir ajandır. Antineoplastik etkisini hücre çoğalması için temel önemi olan folata bağımlı metabolik süreçleri bozarak gösterir. Çok hedefli bir antifolattır, pürin pürimidin yolağındaki önemli enzimleri inhibe eder (timidilat sentaz, dihidrofolat redüktaz, glisinamid ribonükleotid formil transferaz gibi). Bu enzimlerin her biri özellikle hızlı bölünen hücrelerde DNA replikasyonuna yol açan pürin pürimidin nükleotid sentezinde kritik olan folik asit yolağındaki önemli enzimlerdir. Timidilat sentazın inhibisyonu DNA sentezi için gerekli timidin miktarını azaltır (Dai ve ark, 2005; Paz-Ares ve ark, 2003).

Pemetrekset hücre içine indirgenmiş folat taşıyıcısı tarafından alınır. Hücre içine girdiğinde folilpoliglutamat sentaz tarafından poliglutamata metabolize olur. Pemetreksetin pentaglutarat formu üstün intraselüler formudur ve timidilat sentazın inhibisyonunda 60 kat daha etkilidir. Glutamasyon tümör hücresinde daha çok, normal hücrede daha azdır ve hücrede kalış süresini artırmaktadır (Paz-Ares ve ark, 2003; Li ve ark., 2010).

Farmakokinetik özellikleri

Pemetreksetin vücuttaki dağılım hacmi 15 litredir. Plazma proteinlerine %81 oranında bağlanır. Eliminasyon yarı ömrü 3.5 saattir. Lineer farmakokinetik gösterir (Hanauske ve ark., 2001; Paz-Ares ve ark, 2003; Ouellet ve ark., 2000; Li ve ark., 2011). Pemetreksetin %70-90'ının 24 saat içinde değişmemiş olarak idrarla atılımı gerçekleşmektedir. Pemetreksetin çoklu dozlarından sonra birikim gözlenmemiştir (Sorensen, 2011).

Endikasyonları

Pemetrekset, antikanser, antifolat bir ajandır. 2009 yılında FDA pemetrekset enjeksiyonunu (Alimta®) malign plevral mezotelyoma ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri için onaylamıştır.

Tedavi dozu ve uygulanması

Faz I çalışmaları ile günlük ve haftalık pemetrekset uygulamaları araştırılmıştır. Günlük ve haftalık uygulamalar yüksek derecede toksisite, düşük hasta uyuncunu beraberinde getirmiştir. Tedavide her 3 haftada bir 500 mg/m² intravenöz (iv) infüzyon şeklinde uygulanmaktadır (Sorensen, 2011).

Pemetreksetin Yan etkileri

Pemetrekset ile yapılan çalışmalarda, en sık görülen yan etkiler, halsizlik, iştahsızlık, bulantı, döküntü, mukozit, ishal ve reversibl transaminaz seviyesi yükselmeleri, nötropeni ve trombositopeni olmuştur. Döküntü ve bulantı, deksametazon veya prednizolon kullanımı ile düşürülmüştür. Folat ve B12 vitamini durumunun

toksisiteyi etkilediği doğrulanmıştır. Vitamin takviyesi olmadan yapılan pemetrekset tedavisi sonucu, plazma homosistein konsantrasyonunun yüksek olması folat eksikliğinin göstergesi olduğu gösterilmiştir ve genellikle trombositopeni, nötropeni, şiddetli ishal ve mukoziti içeren ağır bir toksisite profili ile sonuçlanmıştır. Bu bulgulardan sonra pemetrekset ile tedavi edilen hastalarda, pemetrekset verilışinden en az 5 gün önce başlayan ve tedavinin seyri boyunca devam eden oral folik asit 350-1000 µg tablet desteğı ile birlikte her 9 haftada bir intramüsküler 1000 mikrogram B12 vitamini verilışine başlanmıştır. Sonraki çalışmalarda elde edilen veriler, bu vitamin takviyesinin ilaca bağı bazı ciddi toksik etkileri düzelttiğini, pemetreksetin etkinliğini ve güvenilirlik profilini geliştirdiğini göstermiştir. B12 vitamini ve folik asitin destek olarak verilmesi antifolat ajanların iyi bilinen yan etkileri myelosuppresion, mukozit ve ishalin potansiyel olarak yaşamı tehdit eden toksisitelerini önemli ölçüde azaltmıştır (Sorensen, 2011).

Stabilitesi

Pemetreksetin 25°C ve %60 bağıl nem koşullarında 36 ay stabil olduğı ve ışığa hassas olmadığı belirtilmiştir (Sorensen, 2011). Pemetreksetin ticari preparatı Alimta®'nın rekonstitüe edilmiş çözeltisinin stabilitesi 24 saat olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmada 2-8 °C'de saklanan çözeltinin stabilitesini 28 gün koruduğı bulunmuştur (Rondelot ve ark., 2007).

Pemetreksetin analiz yöntemleri

Pemetreksetin kantitatif tayini için yapılan çalışmalarda UV spektrofotometrik yöntem ve HPLC yöntemi incelenmiştir (Rivory ve ark., 2001; Rondelot ve ark., 2007; Respaud ve ark., 2011). Patel ve ark. (2011) tarafından pemetreksetin UV'de maksimum absorbans verdiğı dalga boyu 225 nm olarak bulunmuş, hem UV spektrofotometrik yöntem hem de HPLC yöntemi ile kalibrasyonu ve validasyonu yapılmıştır. Lu ve ark. (2012) hazırladıkları nanopartikül formülasyonlarının içerdigi pemetrekset miktarını HPLC'de analiz etmiştir.

Pemetreksetin beyin tümörlerinde kullanımına yönelik araştırmalar

Pemetreksetin folik asit metabolizmasındaki üç önemli enzimi inhibe etmesiyle kombine etki elde edilmektedir. Eğer var olan direnç bir enzimin mutasyonu ya da fazla ekspresyonu sonucu oluşmuşsa elde edilen bu kombine etkinin avantaj sağlayacağı düşünülebilir. Pemetreksetin faz II çalışmalarında mezotelioma, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, göğüs, servikali kolorektal, baş ve boyun ve mesane kanserlerini içeren çeşitli solid tümörler üzerinde antitümöral aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Pemetrekset santral sinir sistemi tümörleri üzerinde düşük direnç gelişimi nedeniyle yararlı bulunmuştur. Bu sadece santral sinir sistemi lenfoması için değil aynı zamanda akciğer ve göğüs kanserlerinin beyin metastazları nedeniyle de önemlidir (Dai ve ark., 2005; Sorensen, 2011).

Metotreksat primer santral sinir sistemi lenfomaları ve diğer primer ve sekonder beyin tümörlerinin tedavisi için kullanılmaktadır. Metotreksat gibi pemetreksetin de primer ve sekonder beyin tümörlerinde kullanılabileceği ve daha az direnç gelişimi elde edilmesi nedeniyle yararlı olabileceği düşünülmüştür. Faz II ve Faz III klinik çalışmaları pemetreksetin çeşitli solid tümörler üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Ancak ilacın terapötik etkisi büyük ölçüde santral sinir sistemine hedeflendirilmesi ile biyoyararlanımına dayanmaktadır. Antitümöral bileşiklerin kan beyin bariyerinden beyine etkin konsantrasyonda geçişi beyin tümörlerinin tedavisindeki en büyük problemdir. Pemetreksetin santral sinir sistemine geçişinin sınırlı olduğu bulunmuştur (Dai ve ark., 2005; Sorensen, 2011).

Pemetreksetin santral sinir sistemindeki düşük dağılımının en önemli sebepleri olarak öncelikle aktif geri akış pompaları tarafından önemli derecede atılımı ve hidrofiliği nedeniyle düşük permeabilite göstermesi olduğu belirtilmiştir. Metotreksatın MRP1, MRP2, MRP3, MRP4 ve organik anyon taşıyıcıları gibi birçok geri akış pompasının substratı olduğu görülmüştür. Metotreksatın bir analogu olarak pemetreksetin de kan beyin bariyerinde ekspresse olan bu geri akış pompalarının substratı olabileceği ve merkezi sinir sistemine dağılımının sınırlandırılabilceği düşünülmüştür (Dai ve ark, 2005).

MCFTDX ve H630RIO hücrelerine karşı 5-FU ve raltitreksetle karşılaştırıldığında pemetreksete karşı daha az direnç gelişimi görülmüştür. Bu bulgular ışığında pemetreksetin aktivitesinde sekonder inhibitör yolaklarının önemli olduğu ve metotreksat, 5-FU ve raltitreksete dirençli tümörlere karşı kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Hanauske ve ark.,2001; Paz-Ares ve ark, 2003).

Pemetreksetin beyine olası geçişi hem akciğer kanseri metastazları gibi sekonder beyin tümörlerinde hem de primer beyin tümörlerinde yararlı olabileceği için ilgi çekmiştir. Diğer bir antifolat ajan olan metotreksatın hidrofilik olmasına ve kan beyin bariyerindeki çeşitli taşıyıcılar ile etkileşimine bağlı olarak beyin içine düşük bir dağılımı vardır. Pemetreksetin yapısal olarak benzer bir antifolat olmasına rağmen, merkezi sinir sistemine dağılımını etkileyen farklı fizikokimyasal özelliklere sahip olabileceği belirtilmiştir. Dai ve ark. (2005), farelerde pemetreksetin merkezi sinir sistemine dağılımını incelemiştir. Kan ve beyindeki serbest pemetrekset miktarı ölçülmüştür. Pemetrekset ve indometazin bolus veya 3 saat sürekli intravenöz infüzyon şeklinde uygulanmıştır. Bolus ve infüzyon çalışmalarının her ikisi de pemetreksetin merkezi sinir sistemine sınırlı dağılımı olduğunu göstermiştir ve geri akış pompalarının substratı olabileceği belirtilmiştir (Sorensen, 2011).

Bir insan primat modelinde (rhesus maymunları) pemetreksetin 400 mg/m^2 10 dakika intravenöz infüzyonundan sonra beyin omurilik sıvısı (BOS) farmakokinetiği üzerinde yapılan araştırmada BOS penetrasyonu gösterilmiştir. Pemetreksetin BOS penetrasyonu %2'nin altında bulunmuştur (Sorensen, 2011).

Kan beyin bariyeri, onkolojide kullanılan hidrofilik etkin maddelerin çoğuna karşı geçirgen değildir. Nanopartiküler taşıyıcı sistemler kullanılarak etkin maddenin hedeflendirilmesi, fizikokimyasal özellikleri maskelenerek etkinliğinin, biyolojik membrandan geçişinin, biyoyararlanımının artırılması, enzimatik parçalanmaya karşı korunması kan beyin bariyerinden geçişi sağlamak üzere önemlidir. Dünya sağlık örgütünün sınıflandırmasına göre IV. derece gliyom olan glioblastoma multiforme

ileri derecede fenotipik değişkenlik ve hücre heterojenitesi sergileyen ve kemoterapiye yüksek derecede dirençli olan bir tümördür. Mevcut tedavi stratejileri bu etkili tümörün iyileşmesi için yeterli değildir ve son 10 yıldır bu hastalığın tedavisine yönelik bir ilerleme kaydedilememiştir. Tümör hücrelerine karşı metotreksat, 5-florourasil ve raltitreksetle karşılaştırıldığında pemetreksete karşı daha az direnç gelişimi görülmüştür. Bu bulgular ışığında pemetreksetin dirençli tümörlere karşı kullanılma olasılığı bulunmaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler

Asetonitril	Sigma
Dimetildioktadesilamonyumbromür(DDAB)	Sigma
Disodyum hidrojen fosfat	Sigma
Diyaliz membranı (12000Da MWCO)	Sigma
DNA belirteci (50 bp)	Thermo Scientific
Enjektör ucu filtre (0,45 µm, 0,22 µm)	Sartorius
Entellan®	Merck
Fetal bovine serum	Biowest
Fosforik asit	Merck
Gliseril tripalmitat	Sigma
Gliseril tristearat	Fluka
Hücre kültürü kapları (T25, T75)	Sarstedt
Hücre kültürü ortamı (EMEM)	ATCC
Hücre kültürü plağı (96 kuyucuklu)	Sarstedt
L-alfa-fosfatidilkolin	Sigma
miR-21 antisens oligonükleotidi	Eurogentec
MTT hücre canlılığı tayin kiti	Calbiochem
Oleik asit	Fluka
Polikaprolakton (PCL)	Aldrich
PEG-PLGA	Aldrich
Pemetrekset disodyum	Koçak Farma İlaç ve Kimya Sanayi A.Ş.
Penisilin-streptomisin	Lonza

PLGA (50:50)	Aldrich
Pluronic F127	Sigma
Pluronic F68	Sigma
Potasyum dihidrojen fosfat	Fluka
Serolojik Pipet (5, 10, 50 ml)	Sarstedt
Sodyum klorür	Sigma
Stearik asit	Merck
Trimristin	Fluka
Tripsin/EDTA	Lonza
Tween 80	Merck
U87MG İnsan Glioblastoma Hücresi	ATCC-HTB-14

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Çalkalayıcı su banyosu	Memmert
Çoklu manyetik karıştırıcı	İka werke
Diferansiyel taramalı kalorimetre	DSC-60 Shimadzu
Elektroforetik jel sistemi	Thermo EC-330 Midicell
	Primo yatay jel sistemi
Geçirimli elektron mikroskopu (TEM)	Tecnai
Hassas terazi	Mettler Toledo
HPLC (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi)	Agilent
HPLC kolonu	Waters Symmetry C18 5µM 4.6x250mm
Isıticılı mantolu karıştırıcı	WiseTherm
Jel görüntüleme sistemi	Herolab UVT-20 M/W
Liyofilizatör	Christ Alpha 1-2 LD plus
pHmetre	İnolab WTW
Santrifüj	Sigma
Sonikator	Bandelin
Spektrofotometre	(UV/VIS) Shimadzu UV Mini 1240
Ultra saf su cihazı	Millipore
Ultrasonik banyo	Elma Ultrasonic LC30
Yüksek basınçlı homojenizatör	İka HPH 2000/04.
Yüksek hızlı karıştırıcı	Ultra-Turrax (İka Labortechnik T25 basic)
Partikül boyutu ölçüm cihazı	Malvern Mastersizer ZS

2.2. Pemetreksenin HPLC ile Miktar Tayinine Yönelik Yapılan Çalışmalar

2.2.1. Ultraviyole (UV) Spektrumu

Pemetreksetin pH 7,4 fosfat-salin tamponu (PBS) içinde 100 µg/ml stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden hareketle hazırlanan 4 µg/ml konsantrasyondaki çözeltinin 200-400 nm aralığında UV spektrumu alınmış ve maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu ($\lambda_{\max}$) belirlenmiştir.

2.2.2. pH 7,4 Fosfat-Salin Tampon Çözeltisinin Hazırlanması

Avrupa Farmakopesi 6'da yer alan pH 7,4 fosfat salin tampon çözeltisi kullanılmıştır. Elde edilen çözeltinin pH'sı ölçülerek 7,4'e ayarlanmıştır.

pH 7,4 Fosfat Salin Tamponu (Avrupa Farmakopesi 6)

Disodyum hidrojen fosfat R 2,38 g
 Potasyum dihidrojen fosfat R 0,19 g
 Sodyum klorür R 8 g
 Distile suy.m..... 1000 ml

2.2.3. Pemetreksenin HPLC ile Miktar Tayini

Pemetreksetin pH 7,4 fosfat-salin tamponu kullanılarak yapılan miktar tayini için 226 nm dalga boyu kullanılmıştır. Ön çalışmalar ile alıkonma zamanı ve mobil faz oranları belirlenmiştir. Buna göre pH 7,4 fosfat-salin çözeltisi için alıkonma zamanı 5 dakika olarak bulunmuştur. Çizelge 2.1'de HPLC ile miktar tayinine ilişkin çalışma parametreleri görülmektedir.

Çizelge 2.1. Pemetreksetin HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar

Mobil faz	%0,1 (h/h) fosforik asit sulu çözeltisi : Asetonitril (82:18 h/h)
Akış hızı	1 ml/dakika
Enjeksiyon hacmi	20 µl
Kolon	Waters Symmetry C18 5µM 4.6x250mm HPLC kolonu
Dedektör	UV dedektör
Sıcaklık	25°C

2.2.4. Kalibrasyon Doğrusunun Çizilmesi

Pemetreksetin pH 7,4 fosfat-salin tamponunda 10 mg/ 100 ml konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden hareketle 0,5–10 µg/ml konsantrasyon aralığında 7 farklı konsantrasyonda hazırlanan çözeltiler HPLC’de 226 nm’de analiz edilmiştir. Konsantrasyona karşı elde edilen alan verileri kullanılarak doğru denklemi hesaplanmıştır. Deney üç paralel yapılmış, elde edilen alan sonuçlarının ortalaması alınmıştır.

2.2.5. Kullanılan Analitik Yöntemin Validasyonu

Analitik yöntemin validasyonu, tasarlanan analitik uygulamalar için istenen şartları sağlayan metodun performans karakteristiklerinin laboratuvar çalışmalarıyla belirlendiği bir işlemdir. Performans karakteristikleri analitik parametrelere dayanarak açıklanır (USP 30, 2007). Miktar tayininin validasyonunda ICH Q2(R1) kılavuzunda yer alan parametreler incelenmiştir.

2.2.5.1. Doğruluk

Bir analitik yöntemin doğruluğu, o yöntemle elde edilen test sonuçlarının gerçek değere yakınlığıdır. Gerçek / teorik değerlerin, pratikte bulunan değerlere yakınlığı

doğruluğu saptamamızı sağlar. Doğruluk, belirli aralığı kapsayan en az üç konsantrasyon noktasında en az üçer kez hazırlanan numune miktarlarının yüzde geri eldelerinin belirlenmesiyle tayin edilmektedir. Bu amaçla pemetreksetin 0.5 µg/ml, 4 µg/ml ve 10 µg/ml konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin HPLC analizi sonucunda elde edilen alanlardan hareketle pratik konsantrasyon ve % geri elde değerleri hesaplanmıştır. Ortalama % geri elde, standart sapma ve % bağıl sapma değerleri belirlenmiştir.

2.2.5.2. Kesinlik

Bir analitik yöntemin kesinliği, aynı homojen örnekten çoklu örneklemeyle elde edilen ölçüm serileri arasındaki yakınlığı ifade eder. Kesinlik, normal işlem koşulları altında, yöntemin tekrarlanabilirliğinin, ara kesinliğinin ve tekrar elde edilebilirliğinin ölçümüdür.

Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, kısa zaman aralıklarında aynı işlem koşulları altındaki kesinliği ifade eder. Belirli aralığı kapsayan en az üç konsantrasyon noktasında en az üçer kez ya da test konsantrasyonunun % 100'ünde en az altı ölçümle belirlenir. Bu amaçla pemetreksetin 0,5 µg/ml, 4 µg/ml ve 10 µg/ml konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler HPLC ile analiz edilerek elde edilen alanlardan hareketle pratik konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır. Ortalama, standart sapma ve % bağıl sapma değerleri belirlenmiştir.

Ara kesinlik

Ara kesinlik; farklı günler, farklı analistler, farklı donanım gibi laboratuvar varyasyonlarının incelenmesini ifade eder. Bu etkilerin herbirinin incelenmesinin gerekli olmadığı belirtilmiştir.

Pemetreksetin pH 7,4 fosfat-salin tampon çözeltisindeki ara kesinliğinin belirlenmesi amacıyla 0,5 µg/ml, 4 µg/ml ve 10 µg/ml konsantrasyonda hazırlanan üç farklı çözelti birbirini takip eden üç farklı günde HPLC analizleri yapılarak konsantrasyonlara karşılık gelen alanlar bulunmuştur. Alan değerlerinin kalibrasyon denkleminde yerine koyulmasıyla elde edilen pratik konsantrasyonlardan hareketle, her bir farklı konsantrasyon için SPSS istatistik programı ile anova testi yapılarak, % 95 güven sınırları içinde üç günlük veriler karşılaştırılmıştır.

Tekrar elde edilebilirlik

Tekrar elde edilebilirlik, laboratuvarlar arasındaki kesinliği ifade eder (İşbirliği ile yapılan çalışmalar, genelde yöntemin standardizasyonu için uygulanır).

2.2.5.3. Seçicilik

Seçicilik, analiz edilen maddeyi diğer bileşenler varlığında tayin edebilme özelliğidir. Seçicilik testi için formülasyonda kullanılan maddelerin ve etkin maddenin HPLC ile analizinde girişim olup olmadığına bakılmıştır.

2.2.5.4. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Teşhis sınırı, belirli koşullar altında örnek içinde analiz edilen maddenin teşhis edilebilen fakat tayin edilemeyen en düşük konsantrasyonudur. Tayin sınırı ise örnekteki analiz edilen maddenin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikle kantitatif olarak tayin edilebilen en düşük miktarıdır. Teşhis ve tayin sınırı ICH kılavuzunda verilen formüllere göre kalibrasyon denkleminin eğim ve kesişim değerleri kullanılarak hesaplanmıştır.

2.2.5.5. Doğrusallık

Bir analitik yöntemin doğrusallığı, verilen bir aralıkta örnek içindeki analiz edilen maddenin konsantrasyonu ile doğrudan orantılı olan test sonuçlarının elde edilebilmesidir. Eğer lineer bir ilişki varsa, test sonuçları, en küçük kareler yöntemiyle regresyon doğrusunun hesaplanması gibi uygun istatistiksel metodlarla değerlendirilebilir. Korelasyon katsayısı, kesişim, regresyon doğrusunun eğimi ve artık kareler toplamı hesaplanmalıdır. Buna ek olarak regresyon doğrusundan gerçek veri noktalarının sapma analizi doğrusallığı hesaplamak için yararlıdır. Doğrusallığın saptanmasında en az 5 konsantrasyon gereklidir.

Pemetreksetin pH 7,4 fosfat-salin tamponu içerisindeki miktar tayini yönteminin doğrusallığının belirlenmesi amacıyla 0,5–10 µg/ml konsantrasyon aralığında 7 farklı konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan konsantrasyonlara karşı elde edilen alan verileri Graphpad InStat istatistik programı yardımıyla değerlendirilmiştir.

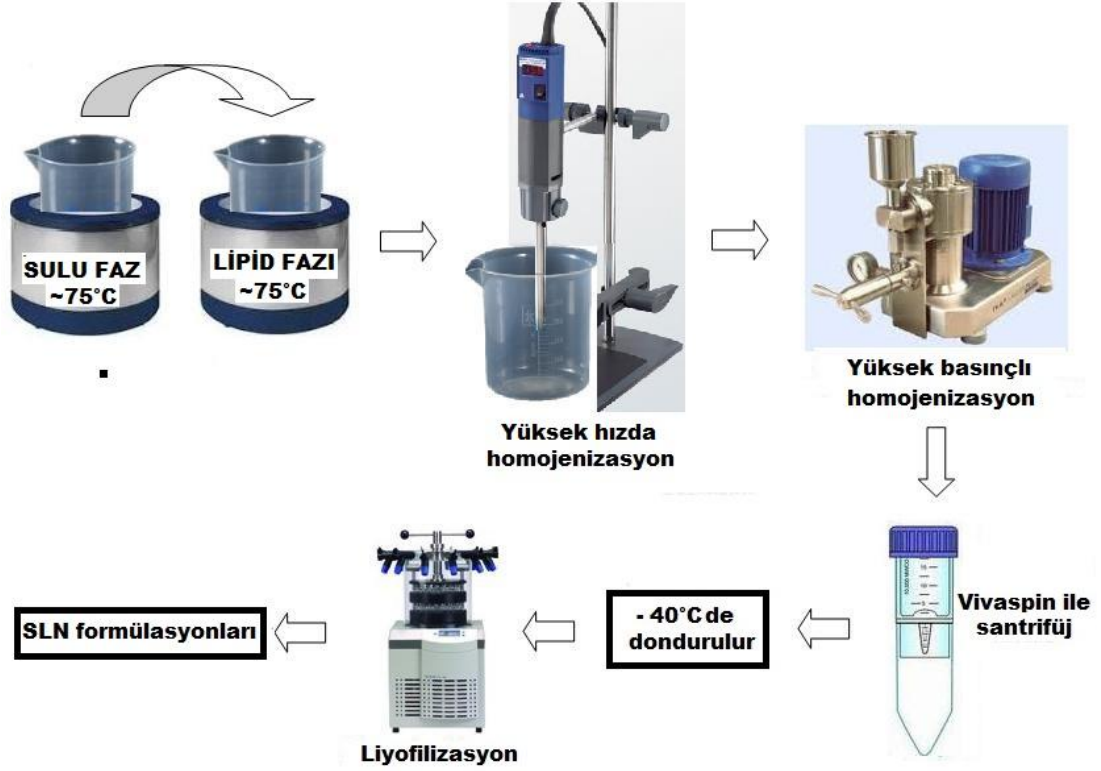
2.3. Nanopartikül Formülasyonların Hazırlanması

2.3.1. Katı Lipid Nanopartikül (SLN) Formülasyonlarının Hazırlanması

SLN formülasyonları yüksek basınçlı homojenizasyon cihazı kullanılarak hazırlanmıştır. Formülasyon hazırlama aşamasında öncelikle cihaz parametreleri değiştirilerek aynı formülasyon üzerinde bu parametrelerin etkisi incelenmiştir.

Formülasyon hazırlanışında lipidler 75-80°C'ye ısıtılmış, aynı şekilde Tween 80 suda çözülerek 75-80°C'ye ısıtılmıştır. Su fazı yağ fazına yavaş yavaş ilave edilerek yüksek hızlı karıştırıcı (Ultra-Turrax Ika Labortechnik T-25) ile farklı hızlarda (13500 rpm/ 24000 rpm) ve farklı sürelerde (2dak/ 5dak/ 10dak) karıştırılmıştır. Sonrasında, çözelti yüksek basınçlı homojenizatörden farklı basınçlarda (500bar/ 1000bar/ 1500bar), farklı siklularda (5siklus/ 7siklus/ 10siklus) ve farklı hızlarda

(150rpm/ 250rpm/ 350rpm) geçirilmiştir. Formülasyonlar vivaspin santrifüj tüpleri kullanarak 4500 rpm’de 30 dakika santrifüj edilip, ultrasaf su ile 1 kez yıkanmış, -40°C’de dondurulduktan sonra, 24 saat süreyle liyofilize edilmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. SLN formülasyonlarının hazırlanışının şematik gösterimi

Sonuçta en uygun partikül boyutunu veren cihaz parametreleri belirlenmiş ve etkin madde ilave edilerek SLN formülasyonları hazırlanmıştır (Çizelge 2.2). Pemetrekset ve/veya anti-miR-21 lipid fazında disperse edilerek formülasyona katılmıştır. Aynı şekilde katyonik SLN’lerin hazırlanmasında kullanılan DDAB lipidlerle birlikte eritilerek formülasyona ilave edilmiştir.

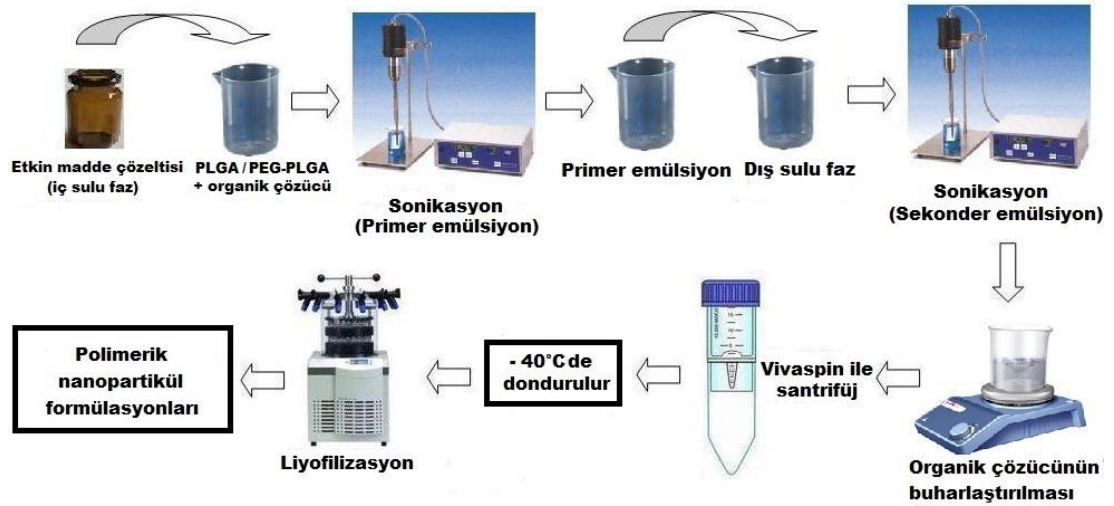
Çizelge 2.2. SLN formülasyonlarının bileşimi

Kod	Lipid fazda kullanılan lipidler	Lipid oranı (%)	Sulu fazda kullanılan surfaktan	Surfaktan oranı (%)	Pemetrekset (mg)	Anti-miR-21 (nmol)
S1	Gliseril tristearat	1	Tween 80	1	10	-
S2	Gliseril tripalmitat	1	Tween 80	1	10	-
S3	Trimristin	1	Tween 80	1	10	-
S4	Stearik asit	1	Tween 80	1	10	-
S5	Gliseril tristearat	1	Pluronic F68	1	10	-
S6	Gliseril tristearat	1	Tween 80	2	10	-
S7	Gliseril tristearat	1	Tween 80	2	10	-
	Lesitin	0,5				
S8	Gliseril tristearat	1	Tween 80	2	10	-
	Lesitin	0,5				
	Oleik asit	0,1				
S9	Trimristin	1	Tween 80	2	10	-
S10	Trimristin	1	Tween 80	2	10	-
	DDAB	0,1				
S11	Trimristin	1	Tween 80	2	10	-
	DDAB	0,3				
S12	Trimristin	1	Tween 80	2	10	-
	DDAB	0,5				
S13	Trimristin	1	Tween 80	2	10	-
	DDAB	1				
S11A	Trimristin	1	Tween 80	2	10	10
	DDAB	0,3				

2.3.2. Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

2.3.2.1 PLGA ve PEG-PLGA İçeren Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

Polimerik nanopartikül formülasyonları s/y/s tipi emülsifikasyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Pemetrekset ve/veya anti-miR-21 pH 7,4 fosfat-salin tamponunda ve PLGA/ PEG-PLGA polimeri organik çözücüde çözölmüştür. Etkin madde çözeltisi ve polimer çözeltisi buz banyosu altında sonikasyonla 1 dakika %100 genlikte karıştırılmıştır. Oluşan primer emülsiyon hızlıca dış sulu faza ilave edilmiş ve buz banyosu altında sonikasyonla emülsifiye edilmiştir. Oluşan su/yağ/su tipi emülsiyon organik çözücünün uzaklaştırılması için 1 gece karıştırılmıştır. Formülasyonlar vivaspin santrifüj tüpleri kullanılarak 4500 rpmde 30 dakika santrifüj edilerek, ultrasaf su ile 1 kez yıkanmış, -40°C’de dondurulup, 24 saat süreyle liyofilize edilmiştir (Şekil 2.2). Formülasyonlarda yer alan PCL ve DDAB organik çözücüde çözölerek polimerik faza ilave edilmiştir.



Şekil 2.2. Polimerik nanopartikül formülasyonlarının hazırlanışının şematik gösterimi

PLGA polimeri kullanılarak hazırlanan ön formülasyonların bileşimi Çizelge 2.3’te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. PLGA içeren polimerik nanopartikül formülasyonlarının bileşimi

Kod	Polimer (100 mg)	Organik çözücü	İç faz	İç faz hacmi (ml)	Dış faz stabilizörü	Dış faz hacmi (ml)	Etkin madde (mg)
P1	PLGA	Diklorometan (2 ml)	pH 7.4 PBS	0,5	%1 Tween80	10	-
P2	PLGA	Diklorometan (2 ml)	pH 7.4 PBS	0,5	%1 PF127	10	-
P3	PLGA	Diklorometan (2 ml)	pH 7.4 PBS	0,5	%1 PVA	10	-
P4	PLGA	Diklorometan (2 ml)	pH 7.4 PBS	0,5	%1 PF127	10	-
P5	PLGA	Diklorometan (2 ml)	pH 7.4 PBS	0,5	%1 PF127	10	-
P6	PLGA	Aseton (2 ml)	pH 7.4 PBS	0,5	%1 PF127	10	-
P7	PLGA	Aseton (8 ml)	pH 7.4 PBS	0,5	%1 PF127	10	10
P8	PLGA	Aseton (8 ml)	pH 7.4 PBS	0,5	%3 PF127	10	10
P9	PLGA	Aseton (8 ml)	pH 7.4 PBS	0,5	%5 PF127	10	10
P10	PLGA	Aseton (8 ml)	pH 7.4 PBS	1	%1 PF127	10	10
P11	PLGA	Aseton (8 ml)	%1 PF127	1	%1 PF127	10	10
P12	PLGA	Aseton (8 ml)	%10 Dekstran	1	%1 PF127	10	10
P13	PLGA	Aseton (8 ml)	pH7.4 PBS/ %1PF127	0,8/ 0,2	%1 PF127	10	10
P14	PLGA	Aseton (8 ml)	pH7,4 PBS/ %10 Dekstran	0,8/ 0,2	%1 PF127	10	10
P15	PLGA	Aseton (8 ml)	pH7.4 PBS/ Tween80	0,8/ 0,2	%1 PF127	10	10
P16	PLGA	Aseton (8 ml)	pH7.4 PBS/ Tween80	0,8/ 0,2	%1 PF127 (pH 4,5)	10	10
P17	PLGA	Aseton (8 ml)	pH7.4 PBS/ Tween80	0,8/ 0,2	%1 PF127 (pH 9)	10	10
P18	PLGA	Aseton (8 ml)	pH7.4 PBS/ Tween80	0,8/ 0,2	%1 PF127 (pH 4,5)	20	10
P19	PLGA	Aseton (8 ml)	pH7.4 PBS/ Tween80	0,8/ 0,2	%1 PF127 (pH 4,5)	50	10

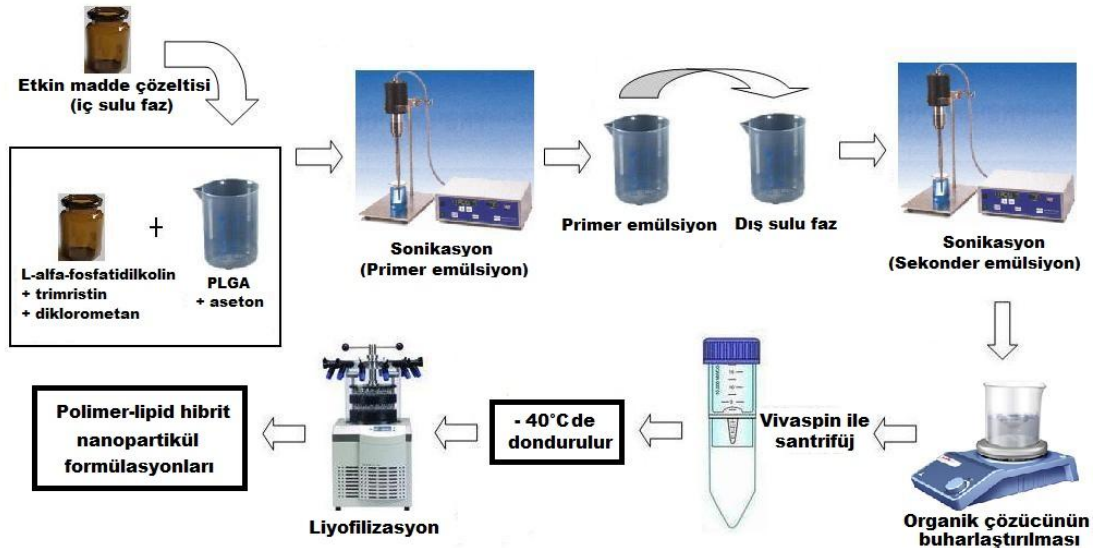
PEG-PLGA polimeri kullanılarak P15 formülasyonundan hareketle polimerik faz içeriğinin değiştirilmesiyle hazırlanan formülasyonların bileşimi Çizelge 2.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. PEG-PLGA içeren polimerik nanopartikül formülasyonların bileşimi

Kod	PEG-PLGA (mg)	PCL (mg)	DDAB (mg)	Organik çözücü	Organik çözücü hacmi (ml)	Pemetrekset (mg)	Anti-miR-21 (nmol)
PEG1	100	-	-	Aseton	8	10	-
PEG2	200	-	-	Aseton	8	10	-
PEG3	180	20	-	Aseton/ diklorometan	6/2	10	-
PEG4	120	80	-	Aseton/ diklorometan	6/2	10	-
PEG5	180	-	20	Aseton	8	10	-
PEG5A	180	-	20	Aseton	8	10	10

2.3.2.2. Polimer-Lipid Hibrit Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

Polimerik-lipid hibrit nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması amacıyla pemetrekset 1 ml pH 7.4 PBS/ Tween80 (0,8/0,2) çözeltisinde, PLGA asetonda, L-alfa-fosfatidilkolin ve trimristin diklorometanda çözülmüştür. Etkin madde çözeltisi, PLGA çözeltisi ve lipid çözeltisi buz banyosu altında sonikasyonla 1 dakika %100 güç ile karıştırılmıştır. Oluşan primer emülsiyon hızlıca 10 ml dış faza (%1 PF127) ilave edilmiş ve buz banyosu altında 2 dakika sonikasyonla emülsifiye edilmiştir. Oluşan s/y/s emülsiyonu organik çözücünün uzaklaştırılması için 1 gece karıştırılmıştır. Formülasyonlar vivaspin santrifüj tüpleri kullanılarak 4500 rpm'de 30 dakika santrifüj edilip, distile su ile 1 kez yıkanmış, 24 saat liyofilize edilmiştir (Şekil 2.3). Formülasyonlarda yer alan PCL organik çözücüde çözülerek polimerik faza ilave edilmiştir.



Şekil 2.3. Polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonlarının hazırlanışının şematik gösterimi

Polimer-lipid hibrit formülasyonlarının bileşimi Çizelge 2.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.5. Polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonlarının bileşimi

Kod	PLGA (mg)	PCL (mg)	Lesitin/ trimristin	Organik çözücü	Organik çözücü hacmi (ml)	Pemetrekset (mg)	Anti-miR-21 (nmol)
H1	100	-	8,5/1,5	Aseton	8	10	-
H2	100	-	1,5/8,5	Aseton	8	10	-
H3	90	10	8,5/1,5	Aseton/ diklorometan	6/2	10	-
H4	60	40	8,5/1,5	Aseton/ diklorometan	6/2	10	-
H3A	90	10	8,5/1,5	Aseton/ diklorometan	6/2	10	10

2.4. Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu

2.4.1. Partikül Boyutu Dağılımı ve Zeta Potansiyeli Ölçümü

Hazırlanan nanopartiküllerin partikül boyutu dağılımı ve zeta potansiyeli ölçümleri, nanopartikül süspansiyonu 1:100 oranında ultrasaf su ile seyreltilerek Malvern Mastersizer ZS (Malvern Instruments, İngiltere) cihazı ile oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

2.4.2. Formülasyonlara Yüklenen Etkin Madde Miktarının ve Enkapsülasyon Etkinliğinin Tayini

Polimerik nanopartiküllerin miktar tayini için 5 mg polimerik nanopartikül (n=3), 1 ml diklorometanda çözülmüş, diklorometan tamamen uzaklaşana kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Sonrasında üzerine 2 ml pH 7,4 fosfat-salin tamponu ilave edilmiş ve 3 saat karıştırılmıştır. Nanopartikül çözeltisi 0,45 µm por çaplı filtreden geçirilerek içerdiği etkin madde miktarı HPLC ile analiz edilmiştir.

Katı-lipid nanopartikül formülasyonlarının etkin madde miktar tayini süpernatanda nanopartiküle yüklenmeden kalan etkin madde miktarı tayin edilerek hesaplanmıştır. Bu amaçla formülasyon vivaspin santrifüj tüpleri kullanılarak 4500 rpmde 30 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatanda yer alan etkin madde miktarı HPLC cihazı ile analiz edilmiştir.

Nanopartikül formülasyonlarına yüklenen etkin madde miktarı (DL) ve enkapsülasyon etkinliği (EE) aşağıda yer alan formüller kullanılarak hesaplanmıştır:

$$DL (\%) = \text{Nanopartiküle yüklenen etkin madde miktarı} / \text{Nanopartikül miktarı} \times 100$$

$$EE (\%) = \text{Yüklenen etkin madde miktarı} / \text{İlave edilen etkin madde miktarı} \times 100$$

2.4.3. MiR-21 Antisens Oligonükleotidi ve Agaroz Jel Elektroforez ile Nanopartiküllere Enkapsülasyonunun İncelenmesi

Çalışmamızda yer alan miR-21 antisens oligonükleotidinin sekansı literatürlerden yararlanılarak belirlenmiştir (5'-TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-3'). Konfokal mikroskop analizinde görüntüleme amacıyla ise 5' ucundan 6-FAM ile konjuge edilmiş anti-miR-21 kullanılmıştır (6-FAM-5'-TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-3') (Davis ve ark., 2006; Li ve ark., 2010; Bai ve ark., 2011; Qian ve ark., 2012).

MiR-21 antisens oligonükleotidinin nanopartiküllere enkapsüle olup olmadığı agaroz jel elektroforez yöntemi ile değerlendirilmiştir. Elektroforez işlemi için % 2'lik agaroz jel kullanılmıştır. 2 g agaroz tartılmış, ısıtıcılı magnetik karıştırıcıda, 100 ml Tris-Asetat-EDTA tamponu içinde tamamen çözünmesi sağlanmış, 5 µl etidyum bromür çözeltisi ilave edilerek karıştırılmıştır. Elde edilen berrak çözelti yan destekleri takılmış, düz zemin üzerindeki jel tepsisine dökülmüştür. Jelin soğumasına yakın uygun tarak jel tepsisine monte edilmiş ve polimerleşmenin tamamen gerçekleşmesi için soğumaya bırakılmıştır. Polimerleşme tamamlandıktan sonra tarak ve yan destekler dikkatlice çıkarılmış, elektroforez tank sistemi içerisine yerleştirilmiştir. Uygulanacak örnekler, örnek yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra tarak ile oluşturulan kuyucuklara aktarılmış ve tankın içi jeli örtecek şekilde Tris-Asetat-EDTA tamponu eklenmiştir. 1 saat süreyle 60V elektrik akımı uygulanarak, bromfenol mavisi jelin sonlarına gelinceye kadar sürüklenmesi sağlanmıştır. Jel yıkama amacıyla distile suda bekletilmiş ve UV ışığı altında görüntülenmiştir.

Anti-miR-21 öncelikle saf halde uygulanarak agaroz jel üzerindeki ilerleme davranışı incelenmiştir. Anti-miR-21 içeren nanopartikül formülasyonları hazırlandıktan sonra formülasyonlara ait süpernatantlar, suda disperse edilen formülasyonlar ve toz haldeki formülasyonlar agaroz jel elektroforez yöntemi ile incelenerek anti-miR-21 içeriği belirlenmiştir.

Elektroforez işleminde kullandığımız çözeltiler;

Tris-Asetat-EDTA Tamponu (50x):

Trizma baz..... 242 g

Asetik asit..... 57,1 mL

EDTA (500 mM, pH 8)..... 100 mL

Arıtılmış suy.m..... 1000 mL

Konsantre olarak hazırlanan Tris-Asetat-EDTA tamponu kullanım sırasında 1/50 oranında seyreltilmiştir.

Örnek yükleme tamponu:

Bromfenol mavisi..... % 0,25

Gliserol (su içerisinde)..... % 30

Örnek yükleme tamponu hazırlandıktan sonra buzdolabında 4°C’de saklanmıştır.

Boyama çözeltisi:

Etidyum bromür, jele uygulanıp yürütülen DNA fragmanları ile birleşerek UV ışığı altında floresans verir. Etidyum bromür stok çözeltisi su içerisinde 10 mg/ml konsantrasyonda hazırlanmıştır. Oda ısısında saklanmıştır. 100 ml % 2 agaroz çözeltisine stoktan 5 µl ilave edilmiştir.

2.4.4. *In Vitro* Salım Çalışmaları

Nanopartikül formülasyonlarından pemetreksetin *in vitro* salım deneyi diyaliz membran yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Hazırlanan nanopartiküller (0,5 mg pemetreksete eşdeğer) 2 ml çözünme ortamında disperse edilerek diyaliz membrana (Sigma, 12000 Da MWCO) yerleştirilmiştir. Membranlar 100 mL pH 7,4 fosfat-salin çözünme ortamına koyulmuş, sıcaklığı 37±0,5°C’de sabit tutulan yatay çalkalayıcı su banyosunda 100 rpm çalkalama hızında çalışılmıştır. Belirli zaman aralıklarında 1

mL örnek alınarak, eşit hacimde ve sıcaklıkta taze salım ortamı ilave edilmiştir. Alınan örnekler HPLC’de analiz edilmiştir.

In vitro salım profillerinin karşılaştırılmasında aşağıda yer alan formüllerden hesaplanan $f1$ (fark faktörü) ve $f2$ (benzerlik faktörü) değerleri kullanılmıştır. $f1$ değeri 0-15 arasında olduğunda ve $f2$ değeri 50-100 arasında olduğunda FDA ve EMEA tarafından iki *in vitro* salım profili benzer kabul edilmektedir (Polli ve ark., 1997; Costa ve Lobo, 2001).

$$f1 = \left\{ \sum_{t=1}^n |R_t - T_t| / \sum_{t=1}^n R_t \right\} \times 100$$

$$f2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \left(1/n \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right) \right]^{-0.5} \cdot 100 \right\}$$

R_t : Referans formülün n adet örnekleme zamanının herbirinde çözünen kümülatif etkin madde yüzdesi

T_t : Test edilen formülün n adet örnekleme zamanının herbirinde çözünen kümülatif etkin madde yüzdesi

2.4.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Pemetreksetin, anti-miR-21’in ve lipidik/polimerik nanopartikül formülasyonlarının termal özellikleri Shimadzu DSC-60 cihazı ile incelenmiştir. 3-5 mg ağırlığındaki örnekler alüminyum pana yerleştirilerek sıkıştırılmıştır. Azot gazı 50 ml/dak akış hızında kullanılarak, örnekler 30-250°C sıcaklık aralığında 5°C/dak lineer ısıtma hızında analiz edilmiştir. Boş pan kör olarak kullanılmıştır.

2.4.6. Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) Analizi

Pemetrekset ve anti-miR-21’i birlikte içeren lipidik ve polimerik nanopartikül formülasyonları distile suda disperse edildikten sonra 200 mesh bakır grid üzerine

damlatılarak fazlası filtre kağıdı ile alınmıştır. %2 uranil asetat çözeltisi ile 2 dakika boyandıktan sonra oda sıcaklığında kurutularak FEI Tecnai G2 marka TEM (120 Kw) cihazı ile görüntülenmiştir.

2.4.7. Gama Radyasyon ile Sterilizasyon

Formülasyonlar Co-60 kaynağından yayınlanan gama ışınları kullanılarak 25,5 kGy radyasyon dozunda 10 saat süre ile sterilize edilmiştir. Formülasyonların sterilizasyonundan sonra etkin maddenin *in vitro* salım deneyleri tekrarlanarak sterilizasyonun etkisi incelenmiştir.

2.4.8. Stabilite Çalışmaları

Stabilite çalışmaları için formülasyonlar +4°C’de 3 ay süreyle karanlık ortamda bekletilmiştir. 3 aylık sürenin başlangıcında ve sonunda formülasyonların partikül boyutu, polidispersite indeks ve zeta potansiyeli ölçümleri ve DSC analizi yapılarak stabiliteeleri incelenmiştir.

2.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

2.5.1. U87MG İnsan Glioblastoma Hücrelerinin Üretilmesi

ATCC’den temin edilen ve -196°C’de dondurularak saklanan U87MG insan glioblastoma hücreleri 37°C’deki su banyosunda çözündürülmüştür. 800 rpm’de 5 dak santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür. Çökelti EMEM, %10 fetal bovin serum, %1 NaHCO₃ (%7,5 a/h) ve %1 penisilin-streptomisin içeren hücre ortamı ilave edilerek 25 cm²’lik hücre kültürü şişesine alınmış, 37°C’deki CO₂ inkübatöründe çoğaltılmıştır. Hücrelerin üreme durumları kontrol edilerek %100 tek tabaka şeklinde üreme görüldükten sonra pasajlama yapılmıştır.

2.5.2. Sitotoksosite Çalışmaları

2.5.2.1. Pemetreksetin U87MG İnsan Glioblastoma Hücrelerine Sitotoksitesi

U87MG hücreleri 96-kuyucuklu polistiren plakalara 4×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. U87MG hücreleri ve pemetreksetin 0,01-100 $\mu\text{g/ml}$ aralığında 5 farklı konsantrasyondaki çözeltisi (100 μl) 37°C 'deki CO_2 inkübatöründe 24, 48 ve 72 saat boyunca kültürlenmiştir. U87MG hücrelerinin canlılığı MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difenil tetrazolium bromür) testi ile belirlenmiştir. Belirlenen süreler sonunda hücrelerin üzerindeki ilaçlı ortam alınarak, 100 μl taze hücre kültürü ortamı ilave edilmiş, üzerine 10 μl MTT ilave edilerek 37°C 'de karanlıkta 4 saat bekletilmiştir. Sonrasında 100 μl izopropil alkol ilave edilerek oluşan mor renk 570 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve aşağıdaki formülle hesaplanmıştır. Deney 3 paralel yapılmıştır.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \text{OD}_{(\text{Pemetrekset uygulanan hücreler})} / \text{OD}_{(\text{Uygulama yapılmayan hücreler})} \times 100$$

2.5.2.2. Formülasyonların U87MG İnsan Glioblastoma Hücrelerine Sitotoksitesi

İnsan U87MG hücreleri 96-kuyucuklu polistiren plakalara 4×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Pemetrekset ve anti-miR-21 içermeyen boş formülasyonlar, sadece pemetrekset içeren formülasyonlar ve hem pemetrekset hem de anti-miR-21 içeren formülasyonlar U87MG hücreleri ile CO_2 inkübatöründe 37°C 'de 72 saat boyunca kültürlenmiştir. U87MG hücrelerinin canlılığı MTT testi ile analiz edilmiştir. Deney 3 paralel yapılmıştır.

2.5.3. Hücresel Alım Çalışmaları

İnsan U87MG hücreleri 6-kuyucuklu plakalara 4×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. 1 µg/ml pemetreksete eşdeğer pemetrekset çözeltisi, pemetrekset içeren nanopartikül formülasyonları ve hem pemetrekset hem de anti-miR-21 içeren nanopartikül formülasyonları U87MG hücreleri ile CO₂ inkübatöründe 37°C’de 4 saat boyunca kültürlenmiştir. Süre sonunda hücre üzerinde bulunan ilaçlı ortam alınarak HPLC ile analiz edilmiştir. Süpernatandaki pemetrekset miktarı, uygulanan pemetrekset miktarından çıkarılarak hücrenin aldığı miktar belirlenmiştir. Deney 3 paralel yapılmıştır.

2.5.4. Hücresel Alımın Konfokal Mikroskop ile Görüntülenmesi

Konfokal mikroskop analizi için 6-kuyucuklu plakalar içerisine lam yerleştirilerek U87MG hücreleri 4×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. 6-FAM (6-karboksi-fluoroscein) ile konjuge anti-miR-21 ile hazırlanan hem pemetrekset hem anti-miR-21 içeren formülasyonlar U87MG hücreleri ile CO₂ inkübatöründe 37°C’de 4 saat boyunca kültürlenmiştir. Süre sonunda hücreler fosfat-salin tamponu ile 3 kez yıkanmış ve fosfat-salin tamponu içerisinde hazırlanan %2 paraformaldehit ile 10 dakika fikse edilmiştir. Nükleus işaretlenmesi için fikse edilen hücreler DAPI (4’,6-diamidino-2-fenilindol) ile 10 dakika inkübe edildikten sonra tekrar fosfat-salin tamponu ile 3 kez yıkanmıştır. Lamlar entellan ile lamel üzerine yerleştirilerek konfokal mikroskopta görüntülenmiştir.

2.6. İstatistiksel Analiz

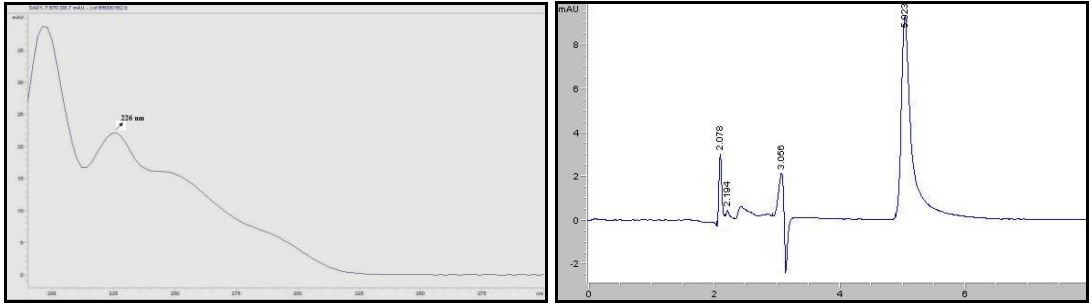
İstatistiksel analiz çalışmaları SPSS Statistics 20 istatistik programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (tek yönlü ANOVA, Tukey testi) ile gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Etkin maddenin HPLC Yöntemi ile Miktar Tayinine Ait Bulgular

3.1.1. Ultraviyole Spektrumu ve HPLC Kromatogramı

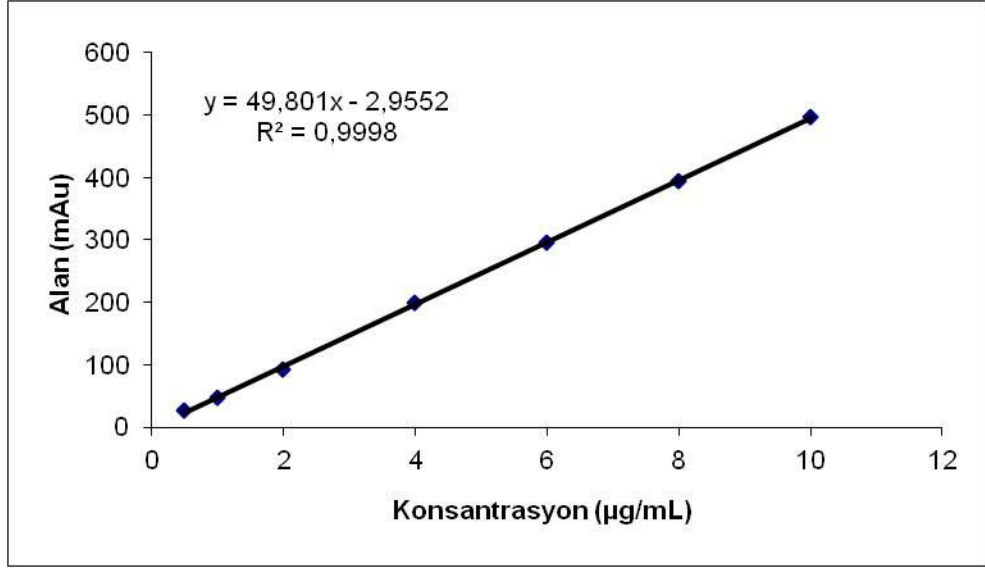
Pemetreksetin pH 7,4 fosfat-salin tampon çözeltisi içindeki UV spektrumu ve HPLC kromatogramı Şekil 3.1’de görülmektedir. Bu ortamda maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu 226 nm olarak görülmüş, Çizelge 2.1’de yer alan koşullarda yapılan HPLC analizi ile alıkonma zamanı 5 dakika olarak bulunmuştur



Şekil 3.1. Pemetreksetin UV spektrumu ve HPLC kromatogramı

3.1.2. Kalibrasyon Doğrusu

Pemetreksetin pH 7,4 fosfat-salin tampon çözeltisi içinde yapılan ölçümler sonucu elde edilen kalibrasyon doğrusu Şekil 3.2’de gösterilmiştir. Kalibrasyon denklemi ve ilgili parametreler Çizelge 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.2. Pemetreksetin pH 7,4 fosfat-salin tamponundaki kalibrasyon doğrusu

Çizelge 3.1. Pemetreksetin kalibrasyon doğrusuna ait parametreler

Ortam	pH 7,4 Fosfat-Salin Tamponu
Eğim	49,801
Kesişim	2,9552
Doğru Denklemi	$Y=49,801X-2,9552$
Determinasyon katsayısı (r^2)	0,9998

3.1.3. Pemetreksetin HPLC Yöntemi ile Kalibrasyonunun Validasyonuna Ait Bulgular

3.1.3.1. Doğruluk

Pemetreksetin pH 7,4 fosfat-salin tamponu içerisindeki miktar tayininin doğruluğuna ilişkin elde edilen bulgular ve ilgili parametreler Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Pemetreksetin miktar tayini yöntemine ait doğruluk bulguları

Teorik Konsantrasyon (µg/ml)					
0,5		4		10	
Pratik Konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde	Pratik Konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde	Pratik Konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde
0,519	103,8	4,039	100,9	10,023	100,2
0,511	102,2	4,015	100,3	10,121	101,2
0,501	100,2	4,043	101,0	10,069	100,6
0,513	102,6	3,989	99,72	10,063	100,6
0,515	103,0	4,023	100,5	10,075	100,7
0,511	102,2	4,051	101,2	10,009	100,0
Ortalama		Ortalama		Ortalama	
% Geri Elde	102,3	% Geri Elde	100,6	% Geri Elde	100,6
Standart Sapma	1,209	Standart Sapma	0,570	Standart Sapma	0,402
% Bağlı Sapma	1,181	% Bağlı Sapma	0,566	% Bağlı Sapma	0,399

3.1.3.2. Kesinlik

Pemetreksetin pH 7,4 fosfat-salin tamponu içerisindeki kalibrasyonunun kesinliğinin saptanmasında tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik parametreleri incelenmiştir.

Tekrarlanabilirlik

Pemetreksetin pH 7,4 fosfat-salin tamponu içerisindeki miktar tayininin tekrarlanabilirliğine ilişkin yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular ve ilgili parametreler Çizelge 3.3’te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Pemetreksenin miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirliğine ait bulgular

Teorik Konsantrasyon (µg/ml)					
0,5		4		10	
Alan (mAu)	Konsantrasyon (µg/ml)	Alan (mAu)	Konsantrasyon (µg/ml)	Alan (mAu)	Konsantrasyon (µg/ml)
22,9	0,519	198,2	4,039	496,2	10,023
22,5	0,511	197	4,015	501,1	10,121
22	0,501	198,4	4,043	498,5	10,069
22,6	0,513	195,7	3,989	498,2	10,063
22,7	0,515	197,4	4,023	498,8	10,075
22,5	0,511	198,8	4,051	495,5	10,009
Ortalama	0,512	Ortalama	4,027	Ortalama	10,060
Standart Sapma	0,006	Standart Sapma	0,023	Standart Sapma	0,040
% Bağıl Sapma	1,181	% Bağıl Sapma	0,566	% Bağıl Sapma	0,399

Ara Kesinlik

Pemetreksenin pH 7,4 fosfat-salin tamponu içerisindeki miktar tayininin ara kesinlik çalışmalarından elde edilen bulgular ve ilgili parametreler Çizelge 3.4'te verilmiştir. Ara kesinlik çalışmasında üç farklı günde elde edilen elde edilen bulgular ile SPSS Statistics 20 istatistik programı kullanılarak ortalamalar arası farkın önem testi uygulandığında ortalamalar arası farkın önemli olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$).

Çizelge 3.4. Pemtreksetin miktar tayini yöntemine ait ara kesinlik bulguları

Gün	Alan	Konsantrasyon (µg/ml)	Gün	Alan	Konsantrasyon (µg/ml)	Gün	Alan	Konsantrasyon (µg/ml)
1	23	0,521	1	198,2	4,039	1	493,1	9,961
1	23,5	0,531	1	197,0	4,015	1	494,4	9,987
1	23,2	0,525	1	198,4	4,043	1	497,4	10,04
1	23,4	0,529	1	195,7	3,989	1	498,8	10,07
1	23,1	0,523	1	197,4	4,023	1	497,9	10,05
1	23,5	0,531	1	198,8	4,051	1	498,8	10,07
2	22,9	0,519	2	192,9	3,933	2	496,2	10,02
2	23,4	0,529	2	193,5	3,945	2	501,1	10,12
2	22,9	0,519	2	192,5	3,925	2	498,5	10,06
2	22,9	0,519	2	191,7	3,909	2	498,2	10,06
2	22,7	0,515	2	192,7	3,929	2	498,8	10,07
2	23,2	0,525	2	192,0	3,915	2	495,5	10,00
3	23,1	0,523	3	196,0	3,995	3	500,9	10,11
3	23,2	0,525	3	196,6	4,007	3	501,8	10,13
3	23,3	0,527	3	196,6	4,007	3	499,3	10,08
3	23,6	0,533	3	196,4	4,003	3	497,5	10,04
3	23,1	0,523	3	197,0	4,015	3	498,7	10,07
3	23,3	0,527	3	195,0	3,975	3	497,5	10,04
Ortalama		0,525	Ortalama		3,984	Ortalama		10,06
Standart Sapma		0,005	Standart Sapma		0,047	Standart Sapma		0,045
%Bağıl Sapma		0,939	%Bağıl Sapma		1,177	%Bağıl Sapma		0,444

3.1.3.3. Seçicilik

Seçicilik analiz edilen maddeyi diğer bileşenler varlığında tayin edebilme özelliğidir. Seçicilik testi için formülasyonda kullanılan maddelerin tek başına ve etkin madde ile hazırlanan karışımları HPLC ile analiz edilmiş, girişim olmadığı görülmüştür.

3.1.3.4. Teşhis ve Tayin Sınırları

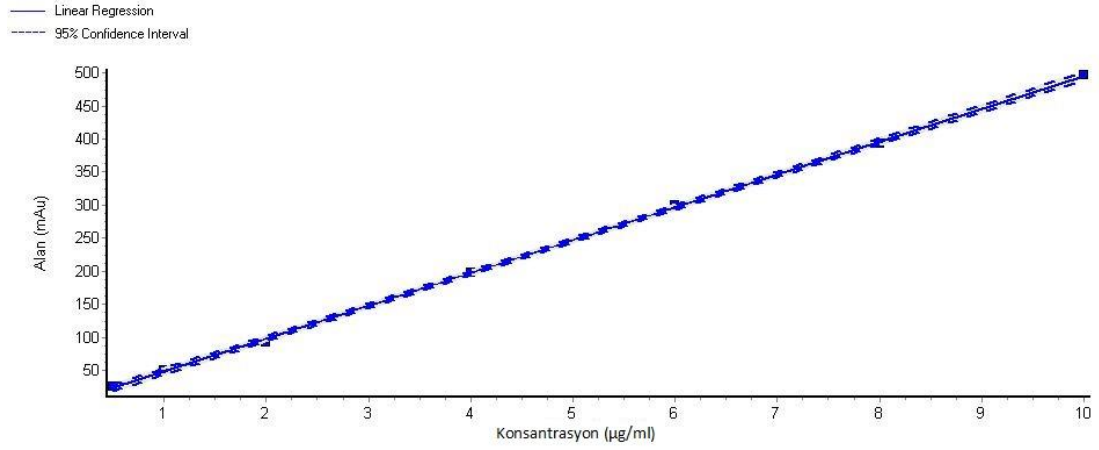
Pemetreksetin pH 7,4 fosfat-salin tamponu içerisindeki miktar tayinine ilişkin hesaplanan teşhis sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri Çizelge 3.5.'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. Pemetreksetin teşhis sınırı ve tayin sınırı değerleri

Teşhis Sınırı (µg/ml)	0,135
Tayin Sınırı (µg/ml)	0,408

3.1.3.5. Doğrusallık

Pemetreksetin pH 7,4 fosfat-salin tamponu içerisindeki miktar tayininin doğrusallık ve aralığı çalışmasından elde edilen doğru Şekil 3.3'te, bu doğruya ait parametreler ise Çizelge 3.6'da verilmiştir.



Şekil 3.3. Pemeteksetin doğrusallık grafiği

Çizelge 3.6. Pemeteksetin miktar tayini yöntemine ait doğrusallık parametreleri

Eğim	49,697
Eğimin standart hatası	0,3721
Güven sınırları (%95)	48,740→50,653
Kesişim (n)	-1,507
Kesişimin standart hatası	2,092
Kesişimin güven aralığı (%95)	-6,885→3,871
Korelasyon katsayısı (r)	0,9999
Determinasyon katsayısı (r ²)	0,9997
Regresyon doğrusundan sapmaların standart hatası (Sy.x)	3,317
Lineer regresyon kareler toplamı	196347
Doğrusallıktan sapmaların kareler toplamı	55,028
Ortalamanın artık kareler toplamı	196402

3.2. SLN Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu

3.2.1. Yüksek Basıncılı Homojenizasyon Cihazı ile Yapılan Ön Formülasyon Çalışmaları

SLN formülasyonlarının hazırlanmasında yüksek basınçlı homojenizasyon cihazı kullanılmıştır. Beyine hedeflendirilen nanopartiküllerin boyutlarının kan beyin bariyerinden geçebilmesi için 200 nm'den küçük olması gerekmektedir. Bu amaçla cihaz parametreleri değiştirilerek partikül boyutunun küçültülmesi amaçlanmıştır.

Ön formülasyon çalışmalarında yüksek basınçlı homojenizasyon işleminde 5 sıklusa kadar partikül boyutunun 200 nm'nin altına düşmediği saptanmıştır. Bu nedenle hazırlanan formülasyonların cihazdan 5, 7 ve 10 siklus geçirildikten sonra partikül boyutları ölçülmüştür. Uygun formülasyonun hazırlanması için kullanılacak cihaz parametrelerinin belirlenmesi amacıyla yapılan denemeler ve alınan sonuçlar çizelge 3.7'de yer almaktadır ve şu şekilde açıklanabilir:

1. Yüksek hızlı homojenizatör ile 13500 rpm'de yapılan homojenizasyon süresi 2 dakikadan 10 dakikaya çıkarıldığında, yüksek basınçlı homojenizasyon cihazından 5,7 ve 10 siklus geçirilen formülasyonların partikül boyutunun 10 dakika homojenizasyon süresinde en küçük olduğu görülmüştür. Bu nedenle homojenizasyon süresi 10 dakika olarak belirlenmiştir.
2. Farklı yüksek basınçlı homojenizasyon hızları (150, 250 ve 350 rpm) arasından, 150 rpm hızda cihazdan 7 siklus geçirilen formülasyon partikül boyutunu ($182,3 \pm 2,145$) istenen seviyeye düşürmüş ve aynı şekilde polidispersite indeksi de daha düşük elde edilmiştir ($0,349 \pm 0,016$). Bu nedenle 150 rpm yüksek basınçlı homojenizasyon hızı seçilmiştir.

3. İlk aşamadaki yüksek hızlı homojenizasyon hızı 24000 rpm'e çıkarılmıştır. 10 dakika homojenize edilen formül yüksek basınçlı homojenizasyon cihazından 1000 bar'da 150 rpm'de geçirilmiştir. 7 siklus sonucunda partikül boyutunun 13500 rpm'de hazırlanan formülden farklı olmadığı ($182,5 \pm 2,501$), ancak polidispersite indeksinin daha düşük olduğu gözlenmiştir ($0,260 \pm 0,014$).

4. İlk aşamada 24000 rpm'de 10 dakika homojenize edilen formül yüksek basınçlı homojenizasyon cihazından 1500 bar'da 150 rpm'de geçirilmiştir, ancak basınç artışı formülasyonun partikül boyutunda ve polidispersite indeksinde herhangi bir iyileşme sağlamamıştır.

Sonuç olarak cihaz parametrelerindeki değişimler ve elde edilen bulgular ışığında en küçük partikül boyutu ($182,5 \pm 2,501$) ve polidispersite indeksine ($0,260 \pm 0,014$) sahip katı-lipid nanopartikül formülasyonu, lipid fazı ve surfaktan fazının ilk aşamada Ultra-Turrax (Ika Labortechnik T-25) cihazı ile 24000 rpm hızda 10 dakika homojenize edilmesi, sonrasında yüksek basınçlı homojenizasyon cihazından 1000 bar basınçta 150 rpm hızda 7 siklus geçirilmesi ile elde edilmiştir. Bu formülasyonun zeta potansiyeli $-36,0 \pm 0,267$ mV olarak ölçülmüştür.

Çizelge 3.7. Cihaz parametrelerinin nanopartikül boyutu ve polidispersite indeks üzerine etkisi

UltraTurrax karıştırma hızı (rpm)	UltraTurrax karıştırma süresi (dak)	Basınç (bar)	Siklus sayısı	Homojenizasyon hızı	Partikül boyutu (nm)*	Polidispersite indeks*
13500	2	1000	5	250	285,6±11,59	0,510±0,014
13500	2	1000	7	250	219,3±2,825	0,427±0,033
13500	2	1000	10	250	235,6±5,317	0,459±0,063
13500	5	1000	5	250	274,3±11,41	0,457±0,044
13500	5	1000	7	250	208,3±5,106	0,408±0,033
13500	5	1000	10	250	239,9±13,31	0,414±0,019
13500	10	1000	5	250	212,4±1,115	0,385±0,008
13500	10	1000	7	250	204,1±6,164	0,421±0,023
13500	10	1000	10	250	182,4±5,066	0,426±0,030
13500	10	1000	5	150	245,6±8,185	0,511±0,084
13500	10	1000	7	150	182,3±2,145	0,349±0,016
13500	10	1000	10	150	256,4±6,194	0,657±0,017
13500	10	1000	5	350	203,1±9,085	0,402±0,054
13500	10	1000	7	350	204,8±6,287	0,452±0,011
13500	10	1000	10	350	240,7±15,27	0,503±0,005
24000	10	1000	5	150	212,6±3,937	0,366±0,039
24000	10	1000	7	150	182,5±2,501	0,260±0,014
24000	10	1000	10	150	232,1±1,431	0,405±0,025
24000	10	1500	5	150	200,5±0,655	0,340±0,018
24000	10	1500	7	150	219,8±6,126	0,400±0,024
24000	10	1500	10	150	229,7±1,73	0,453±0,005

*Ortalama ± standart sapma, n=3

3.2.2. SLN Formülasyonlarının Hazırlanması, Partikül Boyutu, Zeta Potansiyeli ve Enkapsülasyon Etkinliğinin İncelenmesi

Yüksek basınçlı homojenizasyon cihazında en küçük partikül boyutu (182,5±2,501) ve polidispersite indeksine (0,260±0,014) sahip %1 gliseril tristearat ve %1 Tween 80 kullanılarak hazırlanan katı-lipid nanopartikül formülasyonu etkin madde ilavesi yapılarak tekrar hazırlanmıştır. Etkin madde ilavesi sonrasında partikül boyutu 200 nm'nin üzerine çıkmış (204,4 ± 5,497), polidispersite indeks de artmıştır (0,430 ±

0,040). Bu S1 kodlu formülasyonunun etkin madde enkapsülasyon etkinliği %52,84 $\pm$ 0,160 olarak bulunmuştur.

3.2.2.1. Farklı Lipidler Kullanılarak Hazırlanan SLN Formülasyonlarına Ait Bulgular

Çalışmalarımızda partikül boyutunun 200 nm'nin altında kalması gereği ve sonrasında antisens oligonükleotid ilavesi ile de partikül boyutunun artabileceği düşüncesi ile farklı lipidler kullanarak yeni formülasyonlar hazırlanmıştır (Çizelge 3.8). Bu amaçla katı lipid olarak gliseril tripalmitat, trimristin ve stearik asit denenmiştir. Stearik asitle hazırlanan S4 formülasyonda nano-boyuta inilememiştir. Gliseril tripalmitatla hazırlanan S2 formülasyonunun partikül boyutu ise çalışmamız için yüksek bulunmuştur ($385,6 \pm 21,52$). En küçük partikül boyutu ve polidispersite indeks trimristin kullanılarak hazırlanan S3 formülasyonu ile elde edilmiştir ($118,0 \pm 0,913$), ancak enkapsülasyon etkinliğinin trimristine göre 2 katından daha fazla olması nedeni ile öncelikle gliseril tristearat ile hazırlanan S1 formülasyonu kullanılarak devam edilmiş ve partikül boyutunun küçültülmesi amaçlanmıştır.

Çizelge 3.8. Farklı lipidler kullanılarak hazırlanan SLN formülasyonlarının karakterizasyonu

Kod	Lipid fazı	Partikül boyutu (nm)*	Polidispersite indeks*	Zeta Potansiyeli (mV)*	EE (%)*	DL (%)*
S1	Gliseril tristearat (%1)	$204,4 \pm 5,497$	$0,430 \pm 0,040$	$-26,60 \pm 1,852$	$52,84 \pm 0,160$	$1,321 \pm 0,004$
S2	Gliseril tripalmitat (%1)	$385,6 \pm 21,52$	$0,405 \pm 0,013$	$-17,50 \pm 2,440$	$45,39 \pm 0,270$	$1,134 \pm 0,006$
S3	Trimristin (%1)	$118,0 \pm 0,913$	$0,284 \pm 0,007$	$-20,40 \pm 0,458$	$22,92 \pm 0,240$	$0,573 \pm 0,006$
S4	Stearik asit (%1)	-	-	-	-	-

*Ortalama $\pm$ standart sapma, n=3

3.2.2.2. Lipid Olarak Gliseril Tristearat İçeren S1 Kodlu Formülasyondan Hareketle Hazırlanan SLN Formülasyonlarına Ait Bulgular

Gliseril tristearat kullanılarak hazırlanan SLN formülasyonlarında %1 Tween 80 yerine %1 Pluronik F68 kullanıldığında (S5) partikül boyutu artmış, enkapsülasyon etkinliği ise azalmıştır. Sonrasında %1 Tween 80 yerine %2 Tween 80 kullanılarak aynı formülasyon tekrarlanmıştır (S6). Mulla ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmadan yararlanarak formülasyona ilave edilen % 0.5 lesitin, sadece %2 tween 80 kullanılarak hazırlanan formülasyona göre partikül boyutunu küçültmüş, enkapsülasyon etkinliğini de artırmıştır (S7). Aynı şekilde Hu ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmadan yararlanılarak formülasyona ilave edilen % 0,1 oleik asit partikül boyutunu küçültmüştür (S8), ancak her iki formülasyon da partikül boyutunun 200 nm'nin altına düşmesini sağlamamıştır (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. S1 formülasyonundan hareketle hazırlanan SLN formülasyonları ve karakterizasyonu

Kod	Lipid fazı	Sulu faz	Partikül boyutu (nm)*	Polidispersite indeks*	Zeta Potansiyeli (mV)*	EE (%)*	DL (%)*
S1	Gliseril tristearat (%1)	Tween80 (%1)	204,4 ± 5,497	0,430 ± 0,040	-26,60 ± 1,852	52,84 ± 0,160	1,321 ± 0,004
S5	Gliseril tristearat (%1)	Pluronik F68 (%1)	243,0 ± 2,066	0,388 ± 0,011	-36,90 ± 1,140	38,36 ± 0,570	1,020 ± 0,015
S6	Gliseril tristearat (%1)	Tween80 (%2)	325,2 ± 1,460	0,490 ± 0,040	-29,00 ± 1,350	52,22 ± 0,119	1,372 ± 0,003
S7	Gliseril tristearat (%1) Lesitin (%0.5)	Tween80 (%2)	312,0 ± 9,512	0,410 ± 0,038	-29,70 ± 1,090	63,14 ± 4,161	1,550 ± 0,092
S8	Gliseril tristearat (%1) Lesitin (%0.5) Oleik asit (%0.1)	Tween80 (%2)	223,9 ± 4,304	0,371 ± 0,028	-40,00 ± 0,610	48,35 ± 2,100	1,179 ± 0,080

*Ortalama ± standart sapma, n=3

3.2.2.3. Lipid Olarak Trimristin İçeren S3 Kodlu Formülasyondan Hareketle Hazırlanan SLN Formülasyonlarına Ait Bulgular

Gliseril tristearat kullanılarak yapılan formülasyonlarda enkapsülasyon etkinliği yüksek olmasına rağmen partikül boyutunun istenen seviyeye düşürülememesi nedeniyle katı lipid olarak trimristin kullanılarak formülasyon geliştirme çalışmalarına devam edilmiştir (Çizelge 3.10). Trimristin kullanılarak hazırlanan katı-lipid nanopartikül formülasyonunda Tween 80 oranı %2'ye çıkarıldığında (S9) enkapsülasyon etkinliğinin arttığı gözlenmiştir. Partikül boyutunun 200 nm'nin altında ölçülmesi ile bu formülasyonun antisens oligonükleotid ilavesi için uygun olabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla bu formülasyon katyonik lipid olarak DDAB eklenerek tekrar hazırlanmıştır. DDAB oranı %0,1 ve %0,3 olan S10 ve S11 formülasyonunda boyutu sırasıyla $149,2 \pm 1,321$ nm ve $135,7 \pm 1,485$ nm olarak elde edilmiştir ve etkin maddemiz olan pemetrekset % 90'ın üzerinde enkapsüle edilerek başarılı bir sonuca ulaşılmıştır. DDAB oranının % 0,5 ve % 1'e çıkarılması ile partikül boyutu 200 nm'nin üzerine çıkmıştır (S12, S13). Partikül boyutu dağılımının dar aralıkta olması için polidispersite indeks değeri daha düşük olması tercih edilmektedir. Partikül boyutu ve polidispersite indeks değerleri en düşük bulunan DDAB oranı % 0,3 olan S11 formülasyonu seçilerek, bu formülasyona anti-miR-21 oligonükleotidi ilavesine karar verilmiştir.

Hazırladığımız SLN formülasyonlarında zeta potansiyeli değeri 30 mV'ye yakın ya da bu değerin üzerinde bulunmuştur. DDAB katyonik bir lipid olduğundan dolayı formülasyonların zeta potansiyelini pozitif değere dönüştürmüştür.

Çizelge 3.10. S3 formülasyonundan hareketle hazırlanan SLN formülasyonları ve karakterizasyonu

Kod	Lipid fazı	Sulu faz	Partikül boyutu (nm)*	Polidispersite indeks*	Zeta Potansiyeli (mV)*	EE (%)*	DL (%)*
S3	Trimristin (%1)	Tween80 (%1)	118,0 ± 0,913	0,284 ± 0,007	-20,40 ± 0,458	22,92 ± 0,240	0,573 ± 0,006
S9	Trimristin (%1)	Tween80 (%2)	166,2 ± 1,199	0,283 ± 0,007	-37,80 ± 0,438	32,13 ± 6,305	0,409 ± 0,080
S10	Trimristin (%1) DDAB (%0.1)	Tween80 (%2)	149,2 ± 1,321	0,409 ± 0,013	27,60 ± 0,931	97,63 ± 0,525	1,501 ± 0,007
S11	Trimristin (%1) DDAB (%0.3)	Tween80 (%2)	135,7± 1,485	0,299 ± 0,007	50,80 ± 1,910	99,27± 0,176	2,240 ± 0,003
S12	Trimristin (%1) DDAB (%0.5)	Tween80 (%2)	213,9 ± 6,090	0,408 ± 0,026	55,10 ± 0,854	99,79 ± 0,010	1,128 ± 0,001
S13	Trimristin (%1) DDAB (%1)	Tween80 (%2)	225,0 ± 5,736	0,469 ± 0,020	52,00 ± 1,170	99,86 ± 0,056	0,989 ± 0,001

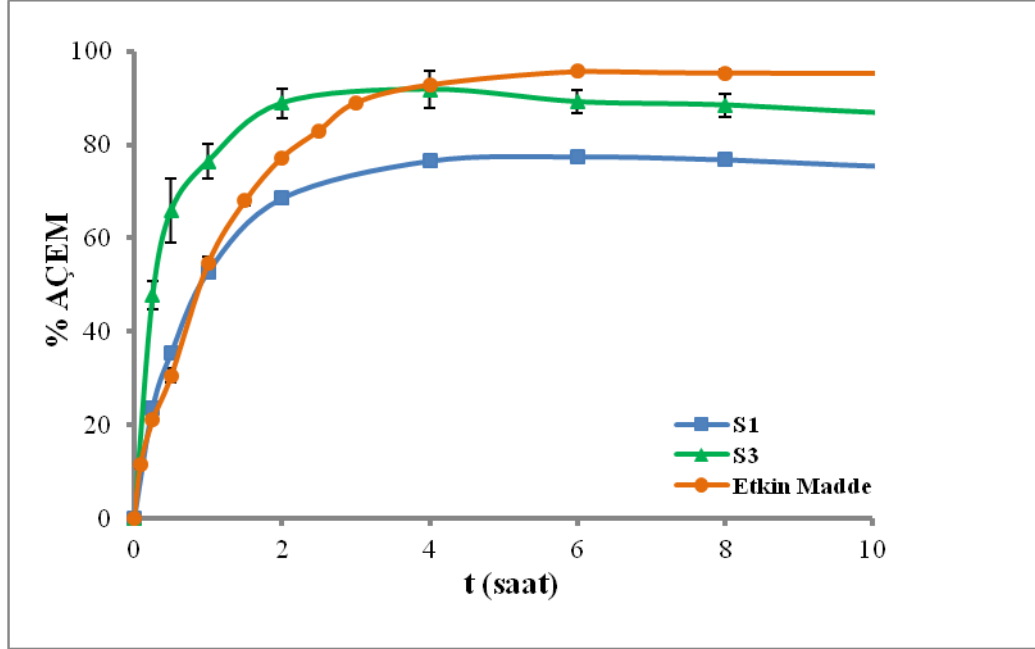
*Ortalama ± standart sapma, n=3

3.2.3. SLN Formülasyonlarından Etkin Maddenin *İn Vitro* Salımına Ait Bulgular

3.2.3.1. Farklı Lipidler Kullanılarak Hazırlanan SLN Formülasyonlarından Etkin Maddenin *İn Vitro* Salımı

Gliseril-tristearat ve trimristin lipidleri kullanılarak hazırlanan katı-lipid nanopartikül formülasyonları ile saf etkin maddenin *in vitro* salım profilleri incelendiğinde, suda çözünen bir madde olan pemetreksetin lipid yapısına hapsolmadığı ve hızlıca *in vitro* salım ortamına çıktığı görülmüştür (Şekil 3.4). Gliseril-tristearat ile hazırlanan S1

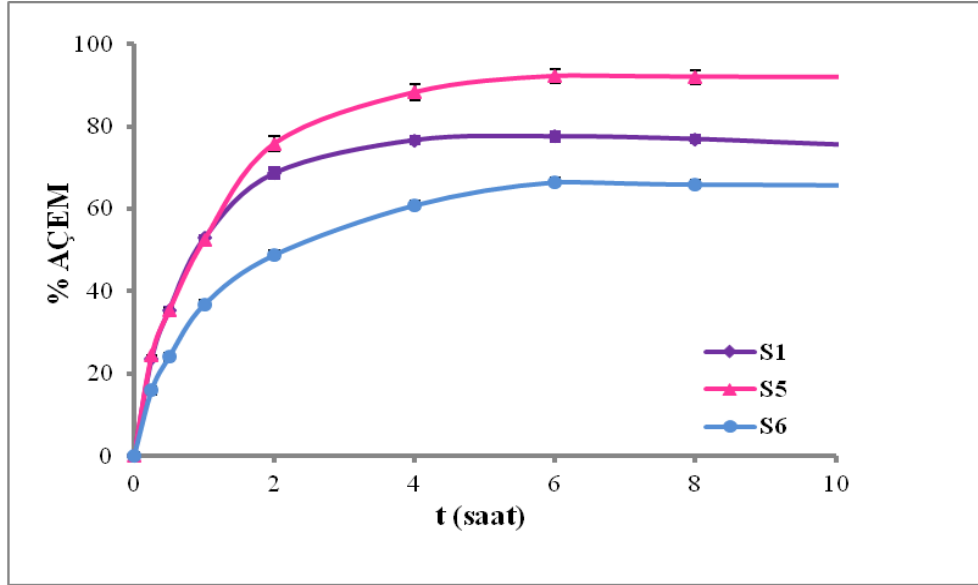
formülasyonu, trimristin ile hazırlanan S3 formülasyonuna göre daha yavaş etkin madde salımı sergilemiştir.



Şekil 3.4. Saf etkin madde çözeltisinden, S1 ve S3 formülasyonlarından etkin maddenin *in vitro* salımı

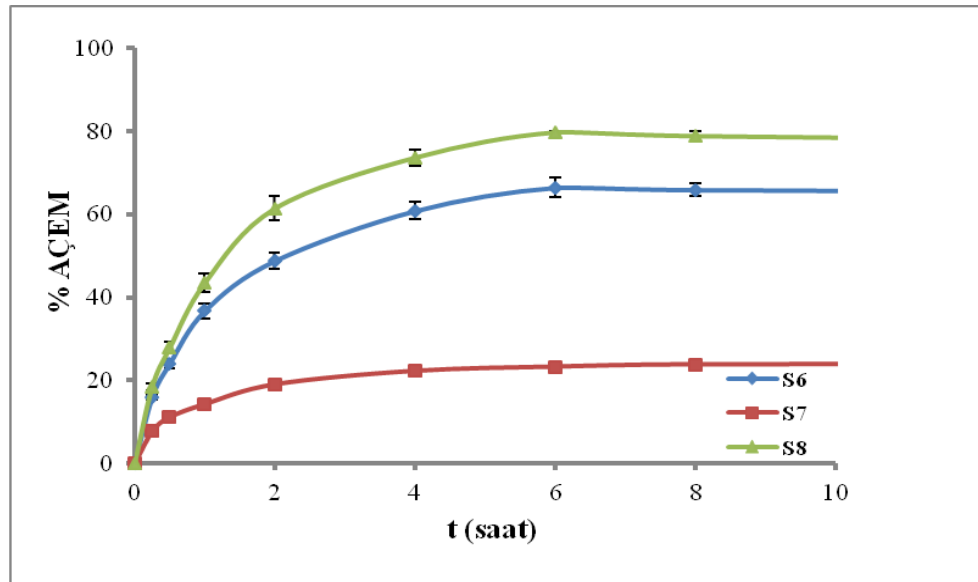
3.2.3.2. Gliseril Tristearat ile Hazırlanan SLN Formülasyonlarından Etkin Maddenin *İn Vitro* Salımı

Gliseril tristearat içeren S1 formülasyonundan hareketle hazırlanan S5 formülasyonunda surfaktan olarak %1 Pluronic F68'in etkisi incelenmiş salım hızını artırdığı için kullanımından vazgeçilmiştir. S1 formülasyonunda %1 olan Tween 80 oranının %2'ye çıkarıldığı S6 formülasyonunda etkin maddenin salınan miktarının azaldığı ve salım hızının yavaşladığı görülmüştür (Şekil 3.5). Diğer formülasyonlarla karşılaştırıldığında salım hızının yavaşlamasından dolayı çalışmalara bu formülasyonla devam edilmiştir.



Şekil 3.5. S1 kodlu formülasyondan hareketle surfaktan tipi ve oranı değiştirilerek hazırlanan SLN formülasyonlarının *in vitro* salım profilleri (S1: %1 Tween 80, S5: %1 PF68, S6: %2 Tween 80)

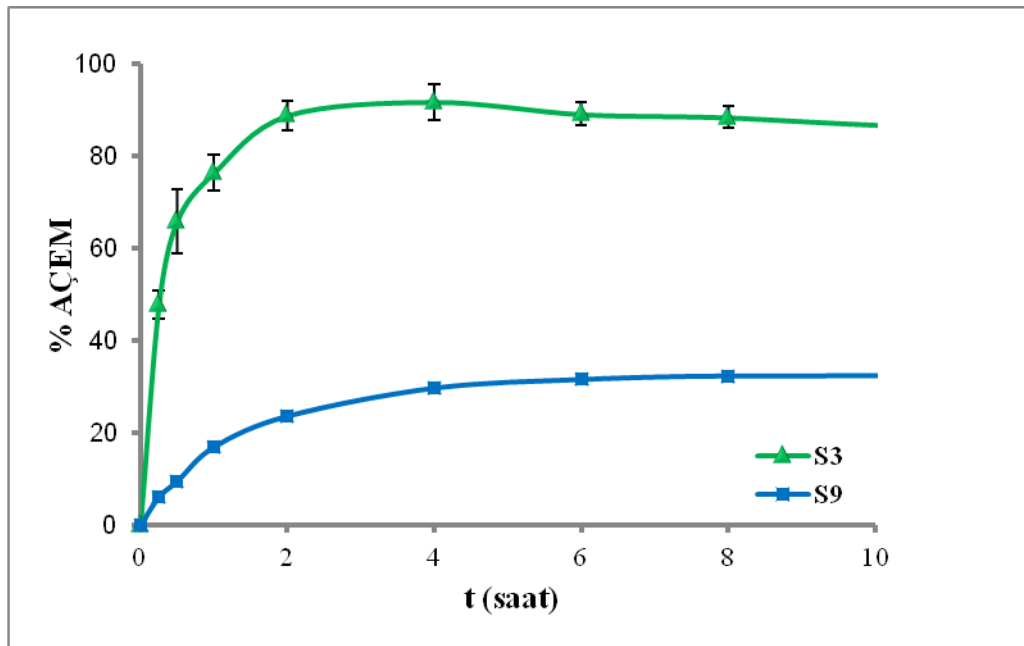
S6 formülasyonundan hareketle hazırlanan S7 formülasyonunda lesitin ilavesi *in vitro* etkin madde salım hızını aynı zamanda açığa çıkan etkin madde miktarını azaltmıştır. S8 formülasyonunda ilave edilen oleik asit ise salınan etkin madde miktarını artırsada etkin maddenin salımı 6 saatte bitmiştir, kontrollü bir salım gözlenmemiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. S6 formülasyonundan hareketle hazırlanan S7 ve S8 SLN formülasyonlarında lesitin (S7) ve oleik asit (S8) ilavesinin *in vitro* salım hızına etkisi

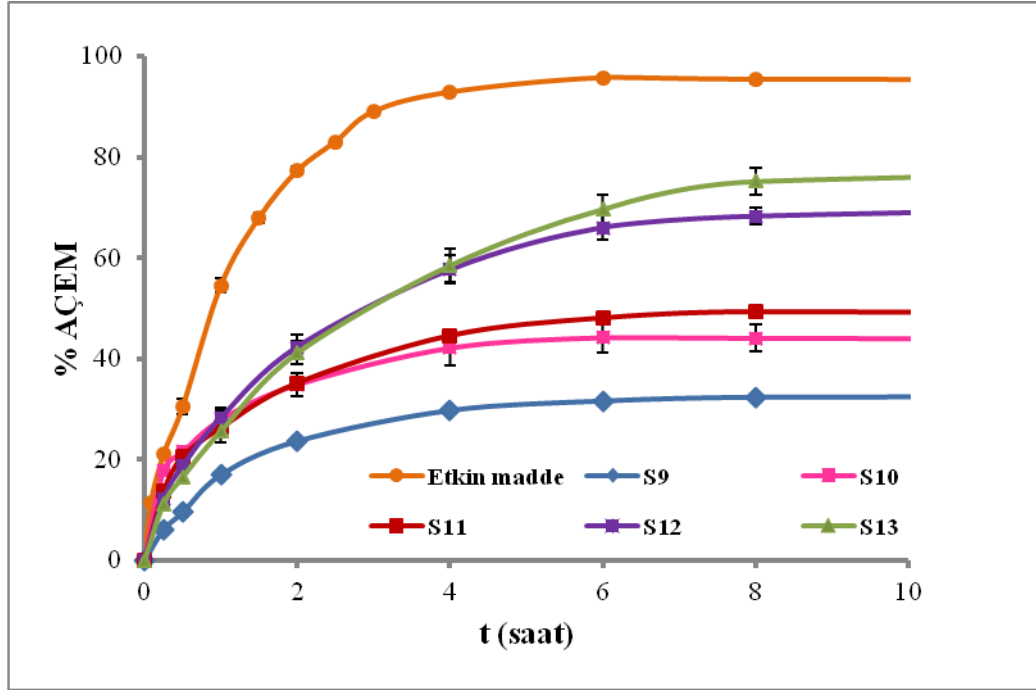
3.2.3.3. Trimristin ile Hazırlanan SLN Formülasyonlarından Etkin Maddenin *In Vitro* Salımı

Katı lipid olarak trimristin kullanıldığında gliseril tristearat ile benzer sonuçlar bulunmuştur. Trimristin içeren S3 formülasyonundan hareketle hazırlanan S9 formülasyonunda Tween 80 oranının % 2'ye çıkarılması etkin madde salımını yavaşlatmıştır (Şekil 3.7). %2 Tween 80 kullanılarak hazırlanan S9 formülasyonunda etkin madde salımı 8. saate kadar artış göstermiştir.



Şekil 3.7. S3 kodlu formülasyondan hareketle Tween 80 oranı değiştirilerek hazırlanan S9 kodlu SLN formülasyonunun *in vitro* salım profili (S3: %1 Tween 80, S9: %2 Tween 80)

Trimristin ve %2 tween 80 kullanılarak hazırlanan S9 kodlu SLN formülasyonuna DDAB ilave edilerek katyonik SLN formülasyonları hazırlanmıştır. Katyonik SLN'lerde farklı DDAB oranlarının *in vitro* salıma etkisi incelenmiştir (Şekil 3.8). DDAB'nin ilavesi ile açığa çıkan etkin madde miktarı artmış, aynı zamanda etkin maddenin salımı uzatılmıştır. DDAB oranı % 0,1 (S10) ve % 0,3 (S11) olduğunda *in vitro* salım profilleri benzer bulunmuştur (f_1 fark faktörü = 8,028; f_2 benzerlik faktörü = 73,93). % 0,1 DDAB içeren formülasyonun % 44'ü 6.saatte, %0,3 DDAB içeren formülasyonun ise % 48'i 8. saatte açığa çıkmış ve etkin madde salımı durmuştur. DDAB oranı % 0,3 olan nanopartikül formülasyonu seçilerek anti-miR-21 oligonükleotidinin bu formülasyona yüklenmesine karar verilmiştir.



Şekil 3.8. S9 kodlu SLN formülasyonundan hareketle hazırlanan katyonik SLN'lerin *in vitro* salım profilleri (S10: %0,1 DDAB, S11: %0,3 DDAB, S12: %0,5 DDAB, S13: %1 DDAB)

3.2.4 MiR-21 Antisens Oligonükleotidinin S11 Formülasyonuna Yüklenmesi ve Formülasyonun İn Vitro Özellikleri Üzerine Etkisi

DDAB oranı % 0,3 olan S11 kodlu SLN formülasyonu anti-miR-21 ilave edilerek tekrar hazırlanmıştır (S11A). Anti-miR-21'in formülasyonlara yüklenip yüklenmediği agaroz jel elektroforezle teşhis edilmiştir.



Şekil 3.9. Anti-miR-21 ve S11A formülünün agaroz jel elektroforez ile analizi. 1: DNA belirteci (50bp), 2: 0,700 µg/ml anti-miR-21, 3: 0,525µg/ml anti-miR-21, 4: 0,350 µg/ml anti-miR-21, 5: S11A formülasyonuna ait süpernatant, 6,7,8: Disperse S11A formülasyonu (sırasıyla 10, 50, 100 mg), 9: S11A formülasyonu (toz)

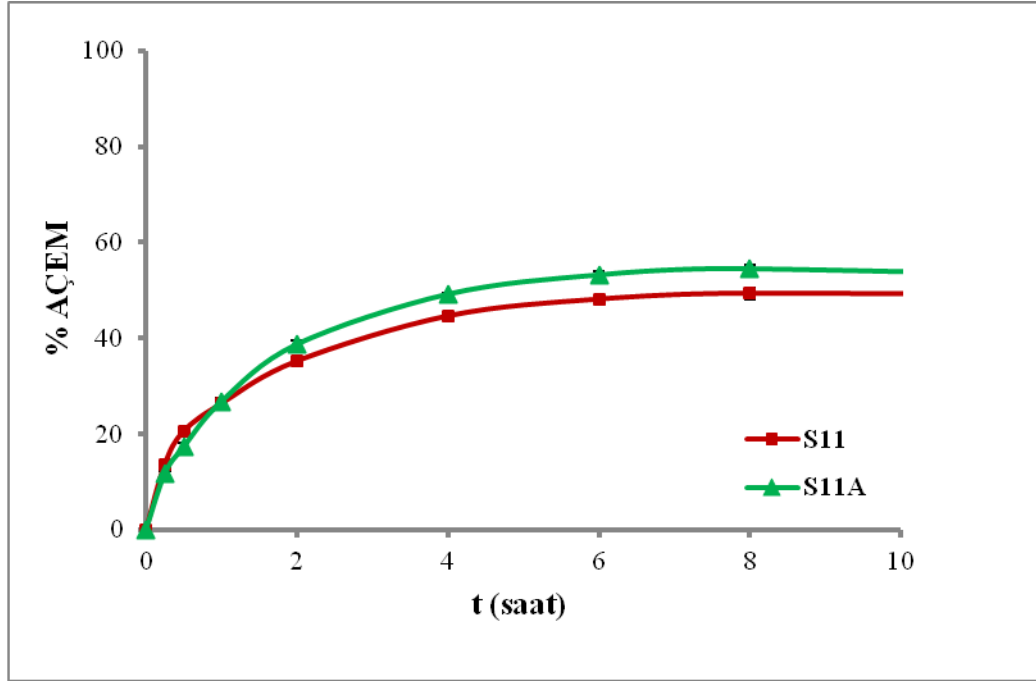
Şekil 3.9’da görülen DNA belirtecinin en altta görülen bantı 50 baz çiftine aittir. Anti-miR-21 oligonükleotidi 22 bazdan oluştuğu için gözlenen bantlar DNA belirtecinin daha altında olmuştur. Antisens oligonükleotid konsantrasyonu azaldıkça bantların boyutunda ve şiddetinde azalma görülmüştür. S11A formülasyonuna ait süpernatant uygulandığında herhangi bir bant oluşumu görülmemiştir. S11A formülasyonu agaroz jele artan miktarlarda suda disperse edilerek uygulandığında artan şiddette ve boyutta bantlar oluşturmuştur. Yine toz halde uygulanan formülasyonda da yoğun bir bant oluşumu görülmüştür.

Antisens oligonükleotidin ilavesi ile partikül boyutu, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliğinde azalma görülmüştür (Çizelge 3.11).

Çizelge 3.11. Anti-miR-21 ilavesinin S11 formülasyonunun özelliklerine etkisi

Kod	Partikül boyutu (nm)*	Polidispersite indeks*	Zeta Potansiyeli (mV)*	EE (%)*	DL (%)*
S11	135,7±1,485	0,299 ±0,007	50,80 ±1,910	99,27±0,176	2,240 ±0,003
S11A	124,9±1,579	0,302 ±0,002	27,30 ±1,630	91,37 ±0,062	1,623 ±0,001

*Ortalama ± standart sapma, n=3



Şekil 3.10. Anti-miR-21 ilavesinin S11 formülasyonundan etkin maddenin *in vitro* salımına etkisi

Anti-miR-21 ilavesinin S11 formülasyonundan etkin maddenin *in vitro* salımına etkisi incelendiğinde, S11 formülasyonu ile S11A formülasyonlarının *in vitro* salım profilleri benzer bulunmuş ($f1$ fark faktörü = 10,75; $f2$ benzerlik faktörü = 69,09), anti-miR-21 ilavesinin etkin maddenin *in vitro* salımına önemli bir etkisi olmadığı görülmüştür (Şekil 3.10).

3.2.5. S11 ve S11A kodlu SLN Formülasyonlarının *İn Vitro* Salım Kinetiklerinin Belirlenmesi

S11 ve S11A kodlu SLN formülasyonlarının *in vitro* salım kinetikleri incelendiğinde sırasıyla Weibull, Korsmeyer-Peppas ve Higuchi kinetiklerine uyum görülmüştür (Çizelge 3.12). Anti-miR-21'in ilavesi ile *in vitro* salım kinetiklerine uyumda bir farklılık olmamıştır.

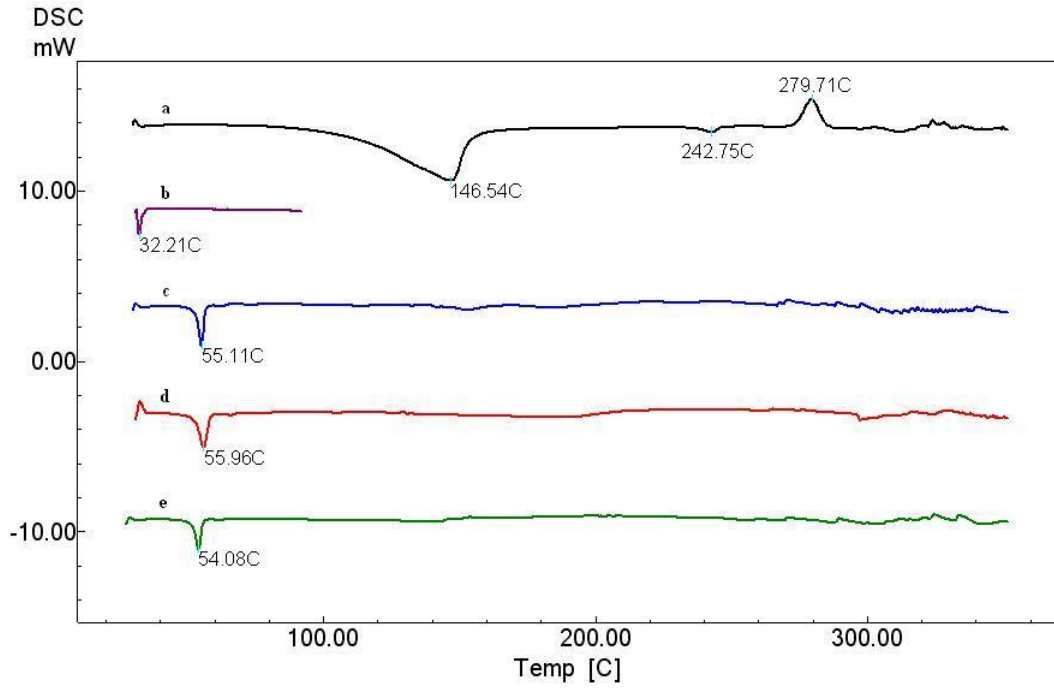
Çizelge 3.12. S11 ve S11A formülasyonlarının *in vitro* salım kinetikleri

		S11	S11A
0°	r^2	0,771	0,799
	k_0 ($\mu\text{g}/\text{sa}$)	5,235	6,174
	SH	1,164	1,266
	RMS	84,29	99,59
1°	r^2	0,829	0,861
	k (sa^{-1})	0,077	0,094
	SH	0,014	0,016
	RMS	0,013	0,015
Higuchi	r^2	0,945	0,954
	K_H ($\mu\text{g}/\text{sa}^{-1}$)	17,39	20,25
	SH	1,717	1,810
	RMS	20,36	22,60
Korsmeyer-Peppas	r^2	0,976	0,970
	n	0,367	0,457
	SH	0,026	0,036
	RMS	0,001	0,003
Weibull	r^2	0,985	0,980
	β	0,446	0,551
	SH	0,025	0,035
	T_d (sa)	15,03	9,419
	RMS	0,001	0,002
Hixson-crowell	r^2	0,422	0,473
	κ ($\mu\text{g}^{1/3}/\text{sa}$)	0,264	0,291
	SH	0,126	0,126
	RMS	0,992	0,983

* r^2 : Determinasyon katsayısı, β : Şekil faktörü, T_d : Etkin maddenin %63,2'sinin çözünmesi için geçen süre, n : difüzyonal sabit, SH: Hız sabitlerinin standart hatası, RMS:Artık ortalama kareler toplamı

3.2.6. S11 ve S11A Kodlu SLN Formülasyonlarının DSC Analizi

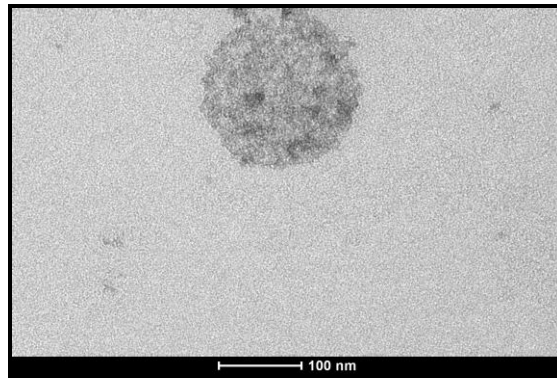
DSC analizi sonucunda etkin maddemiz olan pemetreksetin 146,54°C ve 242,75°C'de endotermik ve 279,71°C'de ekzotermik pik oluşturduğu görülmüştür. Anti-miR-21 oligonükleotidi ise 32,21°C'de endotermik pik oluşturmuştur. Pemetrekset ve anti-miR-21 içermeyen SLN formülasyonu 55,11°C'de trimristine ait endotermik bir pik oluşturmuştur. Boş formülasyona benzer şekilde sadece pemetrekset içeren S11 formülasyonu ve hem pemetrekset hem anti-miR-21 içeren S11A formülasyonu sırasıyla 55,96 ve 54,08°C erime sıcaklığında endotermik pik oluşturmuştur (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. SLN formülasyonlarının DSC termogramı. a: pemetrekset; b: anti-miR-21; c: Pemetrekset ve anti-miR-21 içermeyen S11 formülasyonu; d: S11 formülasyonu; e: S11A formülasyonu

3.2.7. SLN Formülasyonlarının TEM Analizi

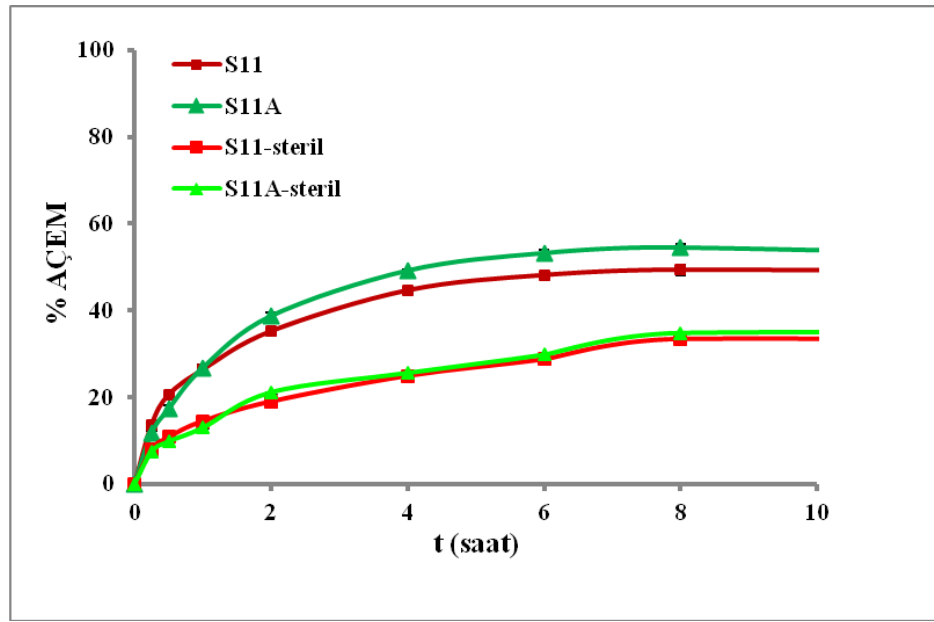
SLN formülasyonlarının morfolojisini incelemek amacıyla TEM analizi yapılmıştır. S11A formülasyonunun Şekil 3.12’de yer alan TEM görüntüsüne bakıldığında küresel şekilde olduğu, boyutunun 100 nm’nin biraz üstünde olduğu görülmüştür.



Şekil 3.12. S11A formülasyonunun TEM görüntüsü

3.2.8. Sterilizasyon Sonrasında S11 ve S11A Kodlu SLN Formülasyonlarının *İn Vitro* Salımı

Hücre kültürü çalışmaları için seçilen S11 ve S11A formülasyonu gama radyasyon ile sterilize edildikten sonra etkin maddenin *in vitro* salımına etkisi incelenmiştir (Şekil 3.13). Her iki formülasyonda da sterilizasyon sonrası etkin maddenin açığa çıkan miktarı azalmış, salım yavaşlamıştır.



Şekil 3.13. Gama radyasyon ile sterilizasyonun SLN formülasyonlarının *in vitro* salımına etkisi

3.2.9. S11 ve S11A Kodlu SLN Formülasyonlarının Stabilitesine Ait Bulgular

S11 ve S11A kodlu SLN formülasyonlarının +4°C'de 3 ay süreyle bekletilmesi sonrasında ölçülen partikül boyutu ve zeta potansiyeli değerleri Çizelge 3.13'te, DSC analizi sonuçları Şekil 3.14'te yer almaktadır.

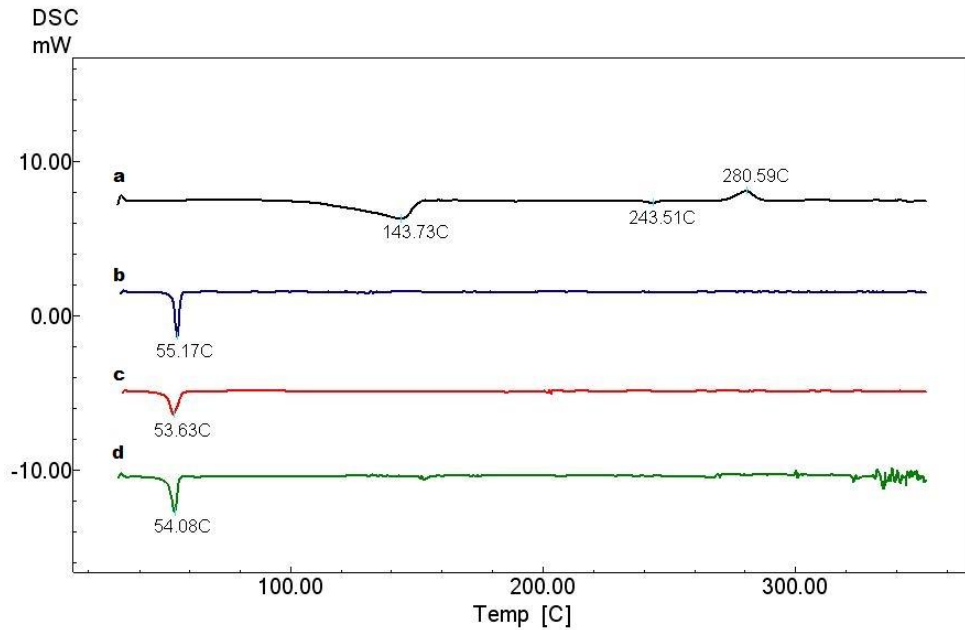
S11 ve S11A kodlu SLN formülasyonlarının +4°C'de 3 ay bekletilmesi sonucunda her iki formülasyonun da partikül boyutunun arttığı, formülasyonların zeta potansiyeli pozitif değerinin azaldığı görülmüştür. SPSS Statistics 20 istatistik programı kullanılarak ortalamalar arası farkın önem testi uygulandığında S11A

formülasyonunun zeta potansiyelinde görülen azalmanın anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$).

Çizelge 3.13. S11 ve S11A kodlu SLN formülasyonlarının 3 ay sonunda ölçülen partikül boyutu, polidispersite indeks ve zeta potansiyeli değerleri

Kod	Başlangıç			3 ay sonra		
	Partikül boyutu (nm)*	Polidispersite indeks*	Zeta Potansiyeli (mV)*	Partikül boyutu (nm)*	Polidispersite indeks*	Zeta Potansiyeli (mV)*
S11	135,7±1,485	0,299 ±0,007	50,80 ±1,910	147,8 ± 1,385	0,140 ±0,018	39,20 ±1,190
S11A	124,9±1,579	0,302 ±0,002	27,30 ±1,630	173,7± 2,053	0,318 ±0,062	24,60 ±0,642

*Ortalama ± standart sapma, n=3



Şekil 3.14. S11 ve S11A formülasyonlarının 3 aylık stabilite süresi sonunda elde edilen DSC termogramı. a: pemetrekset; b: Pemetrekset ve anti-miR-21 içermeyen S11 formülasyonu; c: S11 formülasyonu; d: S11A formülasyonu.

DSC analizi sonucunda etkin maddemiz olan pemetreksetin 146,54°C, 242,75°C ve 279,71°C’de oluşturduğu pikleri 3 ay stabilite süresi sonunda benzer şekilde 143,73°C, 243,51°C ve 280,59°C’de oluşturduğu görülmüştür. S11 ve S11A formülasyonlarında ise boş formülasyona benzer olarak sadece trimristine ait pik gözlenmiştir (Şekil 3.14).

3.3. Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu

3.3.1. Ön Formülasyon Çalışmaları

Polimerik nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında polimer olarak Poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA) polimeri (50:50; MW 24000-38000, Aldrich) kullanılmıştır. Nanopartiküller, suda çözünen etkin maddeler için uygun bir yöntem olan s/y/s emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. Beyine hedeflendirilen nanopartiküllerin boyutlarının kan beyin bariyerinden geçebilmesi için 200 nm'den küçük olması gerekmektedir. Bu amaçla formülasyon hazırlama aşamasında öncelikle partikül boyutunun 200 nm altına düşürülmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır (Çizelge 3.14).

Çizelge 3.14. Organik çözücü, stabilizör tipi ve sonikasyon süresinin partikül boyutu ve polidispersite indeks üzerine etkisi

Kod	Organik çözücü	Dış faz (10 ml)	Sonikasyon süresi (dak)	Partikül boyutu (nm)*	Polidispersite indeks*
P1	Diklorometan (2ml)	%1 Tween80	1	-	-
P2	Diklorometan (2ml)	%1 PF127	1	304,3±6,648	0,351±0,027
P3	Diklorometan (2ml)	%1 PVA	1	412,3±21,75	0,412±0,028
P4	Diklorometan (2ml)	%1 PF127	2	261,4±7,75	0,342±0,015
P5	Diklorometan (2ml)	%1 PF127	3	321,3±15,16	0,299±0,029
P6	Aseton (2ml)	%1 PF127	2	-	-
P7	Aseton (8ml)	%1 PF127	2	249,4±5,455	0,164±0,022
P8	Aseton (8ml)	%3 PF127	2	183,9±2,369	0,207±0,012
P9	Aseton (8ml)	%5 PF127	2	197,1±0,682	0,178±0,018

*Ortalama ± standart sapma, n=3

Partikül boyutunun küçültülmesine yönelik yapılan çalışmalarda şu sonuçlar elde edilmiştir:

1. Nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında polimerin organik çözücüsü olarak diklorometan kullanıldığında dış fazda kullanılan farklı stabilizörlerin partikül boyutuna etkisi incelenmiştir. Bu amaçla Tween 80, Pluronic F127 (PF127) ve Poli(vinil alkol) (PVA) stabilizör olarak denenmiştir. Tween 80 kullanılarak hazırlanan formülasyonun çok polidispers olması nedeniyle partikül boyutu ölçülememiş, santrifüj sonucunda ise verimin çok düşük olması nanopartikül oluşmadığı şüphesi oluşturmuş, Tween 80'in kullanılmamasına karar verilmiştir. Dış fazda stabilizör olarak kullanılan PF127 ve PVA çözeltisi karşılaştırıldığında PF127 çözeltisi ile hazırlanan P2 formülasyonunda daha küçük partikül boyutu elde edilmiştir ($304,3 \pm 6,648$ nm).

2. P2 formülasyonunun partikül boyutunun küçültülmesi amacıyla s/y/s emülsiyonu oluşturulurken, ikinci aşamadaki 1 dakika olan sonikasyon süresi 2 ve 3 dakikaya çıkarılmıştır. En küçük partikül boyutu sonikasyon süresi 2 dakika olan P4 formülasyonu ile elde edilmiştir ($261,4 \pm 7,75$ nm).

3. Organik çözücünün partikül boyutuna etkisini incelemek amacı ile dış fazda Pluronic F127 içeren ikinci aşamada sonikasyon süresi 2 dakika olan P4 formülasyonu 2 ml diklorometan yerine 2 ml aseton kullanılarak hazırlanmıştır. Primer emülsiyon oluşturma aşamasında 2 ml aseton yetersiz olmuş, homojen görümlü stabil bir primer emülsiyon elde edilememiştir. Aseton miktarı 8 ml'ye çıkarıldığında primer emülsiyon stabil bir şekilde elde edilmiş, partikül boyutu küçülmüş ve polidispersite indeksi 0,1'e yakın bulunmuştur. Bu nedenle polimerin organik çözücüsü olarak aseton kullanılmasına karar verilmiştir.

4. P7 formülasyonundan hareketle Pluronic F127 yüzdesi %3 (a/h) ve %5 (a/h)'e çıkarılarak iki ayrı formülasyon daha hazırlanmıştır (P8 ve P9). Hazırlanan P8 ve P9 formülasyonlarında partikül boyutu 200 nm'nin altına düşürülebilmektedir.

P7, P8 ve P9 formülasyonları etkin madde ilavesi ile tekrar hazırlanmıştır. Dış fazda %1 PF127 içeren P7 formülünde enkapsülasyon etkinliği daha yüksek bulunduğu için bu formülde modifikasyon yoluna gidilmiştir (Çizelge 3.15).

Çizelge 3.15. P7, P8 ve P9 formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliği

Kod	Partikül Boyutu (nm)*	Polidispersite indeks*	EE (%)*	DL (%)*
P7	249,4±5,455	0,157±0,035	1,260±0,161	0,026±0,003
P8	183,9±2,369	0,159±0,022	0,812±0,026	0,023±0,001
P9	197,1±0,682	0,169±0,016	0,697±0,004	0,015±0,000

*Ortalama ± standart sapma, n=3

Öncelikle etkin maddenin çözüldüğü iç sulu fazın miktarı değiştirilerek ve surfaktan ilave edilerek enkapsülasyon etkinliğinin artırılması ve partikül boyutunun uygun aralıkta elde edilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır (Çizelge 3.16).

Çizelge 3.16. İç faz miktarı ve içeriğinin partikül boyutu ve enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi

Kod	İç sulu faz	Partikül boyutu (nm)*	Polidispersite indeks*	Zeta Potansiyeli (mV)*	EE (%)*	DL (%)*
P7	pH 7.4 PBS (0,5ml)	249,4±5,455	0,157±0,035	-20,5±2,59	1,260±0,161	0,026±0,003
P10	pH 7.4 PBS (1ml)	191,9±2,899	0,109±0,020	-26,4±1,55	1,375±0,425	0,038±0,012
P11	%1 PF127 (1ml)	194,1±4,624	0,254±0,012	-26,0±2,51	1,51±0,145	0,045±0,004
P12	%10 Dekstran (1ml)	307,4±6,583	0,267±0,029	-7,05±1,08	0,936±0,169	0,028±0,005
P13	pH7.4 PBS/ %1PF127 (0,8ml/0,2ml)	259,8±7,643	0,177±0,064	-17,1±2,79	1,98±0,020	0,050±0,001
P14	pH7,4 PBS/ %10 Dekstran (0,8ml/0,2ml)	257,4±9,573	0,184±0,027	-18,1±1,05	0,602±0,176	0,016±0,005
P15	pH7.4 PBS/ Tween80 (0,8ml/0,2ml)	172,9±5,346	0,153±0,056	-32,4±1,99	1,223±0,312	0,037±0,009

*Ortalama ± standart sapma, n=3

Çizelge 3.16’da yer alan bulgulardan hareketle şu sonuçlar elde edilmiştir:

- İç fazda etken maddenin çözöldüğü pH 7,4 PBS hacmi 1 ml’ye çıkarıldığında hem partiköl boyutu 200 nm’den daha küçük bulunmuştur, hem de enkapsölasyon etkinliğinde hafif bir artış gözlenmiştir.

- Daha sonra literatürlerde enkapsölasyon etkinliğini artırdığı öne sürölen %1 PF127 ve % 10 dekstran çözeltisi iç sulu faz olarak denenmiştir. İç fazda %1 PF127 kullanıldığında pH 7,4 PBS’ye göre partiköl boyutunda ve enkapsölasyon etkinliğinde önemli bir artış sağlanamamıştır. İç fazda %10 dekstran kullanıldığında ise hem partiköl boyutunda çok fazla artış olmuştur ($307,4 \pm 6,583$ nm), hem de enkapsölasyon etkinliği ve zeta potansiyeli düşük bulunmuştur.

- İç faz 1 ml olacak şekilde %1 PF127 ve %10 dekstran çözeltisinden 0,2 ml, pH7,4 PBS’den 0,8 ml kullanılarak hazırlanan iki formölasyonda da partiköl boyutu 200 nm’nin üzerine çıkmıştır. Buna ilaveten dekstran çözeltisi enkapsölasyon etkinliğini önemli ölçüde düşürmüştür.

- İç fazda pH 7,4 PBS/ Tween 80 (0,8 ml/ 0,2 ml) içeren P15 formölasyonu hazırlanmış, iç faza 0,2 ml Tween 80 ilavesi enkapsölasyon etkinliğinde önemli bir artış sağlamasa da partiköl boyutu en küçük bu formölasyonda elde edilmiştir ($172,9 \pm 5,346$ nm). Aynı zamanda bu formölasyonun zeta potansiyeli değeri de diğer formölasyonlara göre yüksek bulunmuştur ($-32,4 \pm 1,99$).

Çalışmamızın devamında etkin maddenin nanopartiköl formölasyonlarına enkapsölasyonunu artırmaya yönelik olarak dış fazda bulunan PF127 sulu çözeltisi farklı pH’larda (pH 4,5 ve pH 9) hazırlanarak partiköl boyutu ve etkin maddenin enkapsölasyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Formölasyonun partiköl boyutu her iki pH’da da artış göstererek 200 nm’nin üzerine çıkmıştır. pH 9 olduğunda etkin maddenin enkapsölasyonu çok azalma göstermiştir. pH 4,5 olduğunda ise etkin maddenin enkapsölasyon etkinliği artmıştır. Bu nedenle dış fazı pH 4,5 olan

formülasyonlarda 10 ml olan dış faz hacmi sırasıyla 20 ve 50 ml'ye çıkarılarak partikül boyutunun küçültülmesi amaçlanmıştır. Dış faz hacmi 20 ml'ye çıkarıldığında partikül boyutu artmış, 50 ml'ye çıkarıldığında ise nanopartikül oluşmamıştır (Çizelge 3.17).

Çizelge 3.17. Dış faz miktarı ve pH'sının partikül boyutu ve enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi

Kod	Dış faz	Partikül boyutu (nm)*	Polidispersite indeks*	Zeta Potansiyeli (mV)*	EE (%)*	DL (%)*
P15	%1 PF127 (10 ml)	172,9±5,346	0,153±0,056	-32,4±1,99	1,223±0,312	0,037±0,009
P16	%1 PF127 (pH 4,5) (10 ml)	250,0±7,316	0,396±0,051	-10,4±3,92	2,301±0,308	0,073±0,009
P17	%1 PF127 (pH 9) (10 ml)	227,7±7,699	0,208±0,050	-37,8±0,556	0,196±0,080	0,017±0,006
P18	%1 PF127 (pH 4,5) (20 ml)	317,5±7,443	0,170±0,121	-11,2±0,221	1,855±0,080	0,052±0,002
P19	%1 PF127 (pH 4,5) (50 ml)	-	-	-	-	-

*Ortalama ± standart sapma, n=3

Sonuç olarak enkapsülasyon etkinliğinin ve etkin madde yükleme kapasitesinin istenen şekilde artırılmaması nedeniyle iç sulu fazda 0,8 ml PBS ve 0,2 ml Tween 80 içeren, dış sulu fazda %1 Pluronik F127 içeren **P15** formülasyonunda polimerik fazın içeriği değiştirilerek ilk olarak PLGA yerine **PEG-PLGA** ile formülasyonların hazırlanmasına, ikinci olarak ise **polimer-lipid hibrit nanopartiküllerinin** hazırlanmasına karar verilmiştir.

3.3.2. PEG-PLGA İçeren Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarına Ait Bulgular

3.3.2.1. PEG-PLGA İçeren Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması, Partikül Boyutu, Zeta Potansiyeli ve Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi

PEG hidrofilik özelliğinden dolayı suda çözünen etkin maddelerin nanopartikül formülasyonlarına yüklenmesini kolaylaştırdığı için iç sulu fazda 0,8 ml PBS ve 0,2 ml Tween 80 içeren, dış sulu fazda %1 Pluronic F127 olan P15 formülasyonunda PLGA yerine PEG-PLGA kullanılarak ve polimerik fazın içeriği değiştirilerek formülasyon geliştirilmesi amaçlanmıştır (Çizelge 3.18).

Çizelge 3.18. PEG-PLGA içeren polimerik nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonu

Kod	Polimerik faz	Partikül boyutu (nm)*	Polidispersite indeks*	Zeta Potansiyeli (mV)*	EE (%)*	DL (%)*
PEG1	100mg PEG-PLGA	-	-	-	-	-
PEG2	200mg PEG-PLGA	35,95±2,087	0,436±0,017	-19,6±1,49	36,83±0,512	1,010±0,033
PEG3	180mg PEG-PLGA, 20mg PCL	101,3±1,576	0,245±0,008	-4,19±0,488	60,32±1,063	1,340±0,023
PEG4	120mg PEG-PLGA 80 mg PCL	164,3±0,309	0,129±0,029	-37,4±1,69	34,61±0,623	0,910±0,016
PEG5	180mg PEG-PLGA 20mg DDAB	43,65±1,252	0,446±0,013	-3,58±0,266	68,08±5,00	1,660±0,121

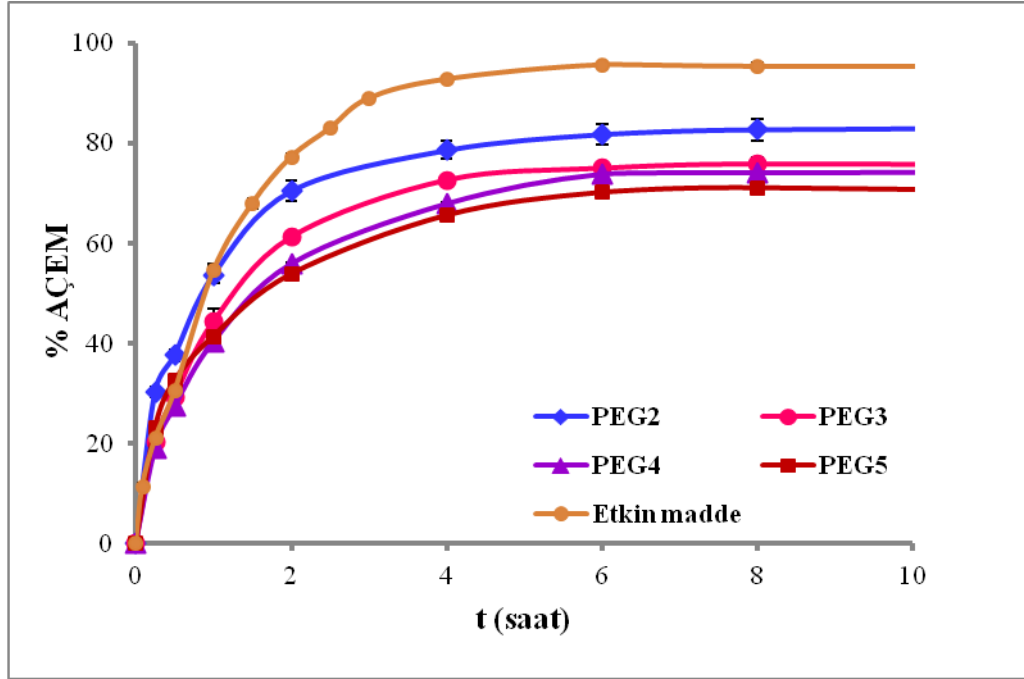
*Ortalama ± standart sapma, n=3

PLGA yerine aynı miktarda (100 mg) PEG-PLGA kullanılarak hazırlanan PEG1 formülasyonunda nano-boyutta partikül oluşumu görülmemiştir. PEG-PLGA oranı

200 mg'a çıkarıldığında partikül boyutu $35,95 \pm 2,087$ nm olan ve enkapsülasyon etkinliği de $\%36,83 \pm 0,512$ olan PEG2 nanopartikül formülasyonu başarıyla oluşturulmuştur. PEG-PLGA'nın $\%10$ 'unun PCL polimeri ile değiştirilmesi ile hazırlanan PEG3 formülasyonu partikül boyutunu $101,3 \pm 1,576$ nm'ye çıkarmasına rağmen enkapsülasyon etkinliğini 1,5 kat artırarak $\%60,32 \pm 1,063$ 'a çıkarmıştır. PEG4 formülasyonunda PEG-PLGA'nın $\%40$ 'ının PCL polimeri ile değiştirilmesi ise partikül boyutunu daha çok artırmış ($164,3 \pm 0,309$) enkapsülasyon etkinliğini ise düşürmüştür ($34,61 \pm 0,623$). Etkin maddemiz pemetreksetin ve anti-miR-21 oligonükleotidinin PEG-PLGA nanopartikül formülasyonuna enkapsülasyonunu artırmak üzere PEG-PLGA'nın $\%10$ 'u DDAB ile değiştirilmiş, partikül boyutu $43,65 \pm 1,252$ nm, enkapsülasyon etkinliği $\%68,08 \pm 5,00$ olarak elde edilmiştir (PEG5). Enkapsülasyon etkinliğinin yüksek olması nedeniyle bu formülasyona anti-miR-21 oligonükleotidi ilavesine karar verilmiştir.

3.3.2.2. PEG-PLGA İçeren Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının *In Vitro* Salım Çalışmalarına Ait Bulgular

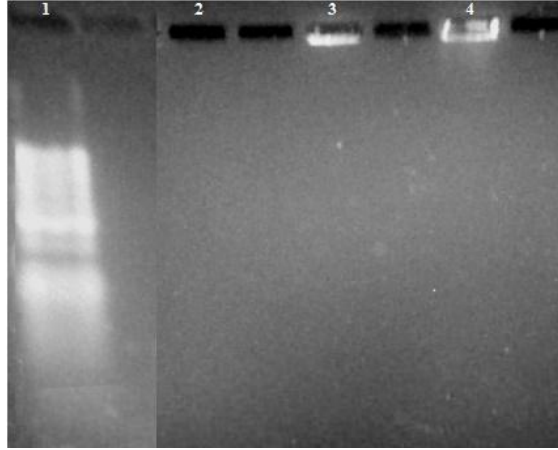
200 mg PEG-PLGA polimeri kullanılarak hazırlanan PEG2 formülasyonundan etkin maddenin ilk 2 saatte $\%70$ 'inin salındığı görülmüştür. Bu formülasyondan etkin maddenin salım hızını yavaşlatmak amacıyla formülasyona $\%10$ oranında PCL polimeri ilave edildiğinde (PEG3) etkin maddenin salım hızının yavaşladığı görülmüştür. PEG4 formülasyonunda PCL oranı $\%40$ 'a çıkarılmış, in vitro salım hızı PEG3 formülüne benzer bulunmuştur (f_1 fark faktörü = 5,32; f_2 benzerlik faktörü = 73,07). PEG5 formülasyonunda PCL yerine $\%10$ DDAB ilave edilmiş, in vitro salım profili PEG3 (f_1 fark faktörü = 8,75; f_2 benzerlik faktörü = 64,3) ve PEG4 (f_1 fark faktörü = 6,02; f_2 benzerlik faktörü = 72,8) formülasyonlarına benzer bulunmuştur. Enkapsülasyon etkinliği sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde en yüksek enkapsülasyon etkinliği PEG5 formülasyonunda elde edildiği için bu formülasyona antisens oligonükleotid ilavesine karar verilmiştir (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. PCL ve DDAB ilavesinin PEG-PLGA içeren polimerik nanopartikül formülasyonlarından etkin maddenin *in vitro* salım hızına etkisi

3.3.2.3. MiR-21 Antisens Oligonükleotidinin PEG5 Formülasyonuna Yüklenmesi ve Formülasyonun İn Vitro Özellikleri Üzerine Etkisi

PEG5 kodlu formülasyon seçilerek anti-miR-21 oligonükleotidi ilavesiyle tekrar hazırlanmıştır. Anti-miR-21'in formülasyonlara yüklenip yüklenmediği agaroz jel elektroforezle teşhis edilmiştir (Şekil 3.16). PEG5A formülasyonuna ait süpernatant uygulandığında herhangi bir bant oluşumu görülmemiştir. PEG5A formülasyonu suda disperse edilerek uygulandığında ve toz halde uygulandığında uygulama yerinde bant oluşumu görülmüştür.



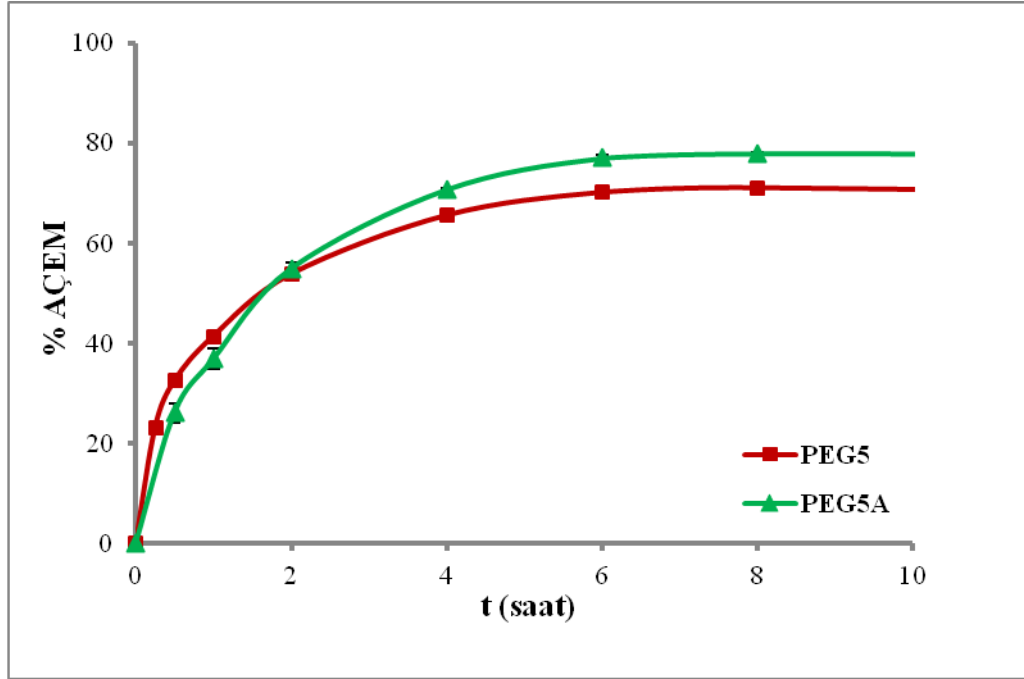
Şekil 3.16. PEG5A formülasyonunun agaroz jel elektroforez ile analizi. 1: DNA belirteci, 2: PEG5A formülasyonuna ait süpernatant, 3: Disperse PEG5A formülasyonu, 4: PEG5A formülasyonu (toz)

PEG5 kodlu pegile nanopartikül formülasyonunda antisens oligonükleotidin ilavesi ile partikül boyutu ve polidispersite indeks artmıştır. Enkapsülasyon etkinliği ve zeta potansiyeli değerleri arasında görülen farkın anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$) (Çizelge 3.19).

Çizelge 3.19. Anti-miR-21 ilavesinin PEG5 formülasyonunun fizikokimyasal özellikleri üzerine etkisi

Kod	Partikül boyutu (nm)*	Polidispersite indeks*	Zeta Potansiyeli (mV)*	EE (%)*	DL (%)*
PEG5	43,65±1,252	0,446±0,013	-3,58±0,26	68,08±5,00	1,660±0,121
PEG5A	53,18±3,755	0,565±0,039	-3,93±0,38	62,39±1,319	1,889±0,040

*Ortalama ± standart sapma, n=3



Şekil 3.17. Anti-miR-21 ilavesinin PEG5 nanopartikül formülasyonunun *in vitro* salım hızına etkisi

Anti-miR-21 ilavesinin PEG5 formülasyonundan etkin maddenin *in vitro* salımına etkisi incelendiğinde, PEG5 formülasyonu ile PEG5A formülasyonlarının *in vitro* salım profilleri benzer bulunmuş ($f1$ fark faktörü = 9,29; $f2$ benzerlik faktörü = 62,4), anti-miR-21 ilavesinin etkin maddenin *in vitro* salımına önemli bir etkisi olmadığı görülmüştür (Şekil 3.17).

3.3.2.4. PEG5 ve PEG5A Formülasyonlarının *In Vitro* Salım Kinetiklerinin Belirlenmesi

PEG5 ve PEG5A kodlu polimerik nanopartikül formülasyonlarından etkin maddenin *in vitro* salımı ise sırasıyla Weibull, Korsmeyer-Peppas ve Higuchi kinetiklerine uyum göstermiştir (Çizelge 3.20).

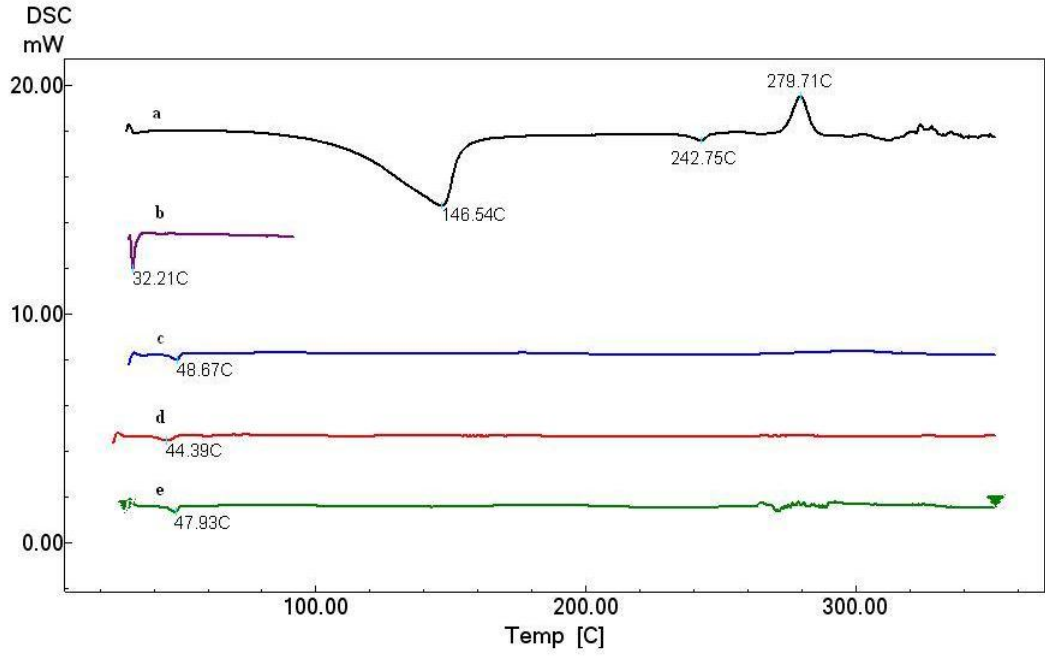
Çizelge 3.20. PEG5 ve PEG5A formülasyonlarının *in vitro* salım kinetikleri

		PEG5	PEG5A
0°	r^2	0,776	0,866
	k_0 ($\mu\text{g/sa}$)	13,59	15,98
	SH	3,653	3,628
	RMS	150,7	131,6
1°	r^2	0,896	0,966
	k (sa^{-1})	0,238	0,296
	SH	0,041	0,032
	RMS	0,019	0,010
Higuchi	r^2	0,966	0,993
	k_H ($\mu\text{g/sa}^{-1}$)	32,40	36,11
	SH	3,017	1,566
	RMS	22,55	5,520
Peppas	r^2	0,994	0,993
	n	0,373	0,487
	SH	0,017	0,028
	RMS	0,000	0,000
Weibull	r^2	0,998	0,997
	β	0,503	0,690
	SH	0,014	0,026
	T_d (sa)	3,379	2,918
	RMS	0,000	0,000
Hixson-crowell	r^2	0,409	0,530
	κ ($\mu\text{g}^{1/3}/\text{sa}$)	0,627	0,762
	SH	0,376	0,414
	RMS	1,601	1,712

* r^2 : Determinasyon katsayısı, β : Şekil faktörü, T_d : Etkin maddenin %63,2'sinin çözünmesi için geçen süre, n: difüzyonal sabit, SH: Hız sabitlerinin standart hatası, RMS:Artık ortalama kareler toplamı

3.3.2.5. PEG5 ve PEG5A Formülasyonlarının DSC Analizi

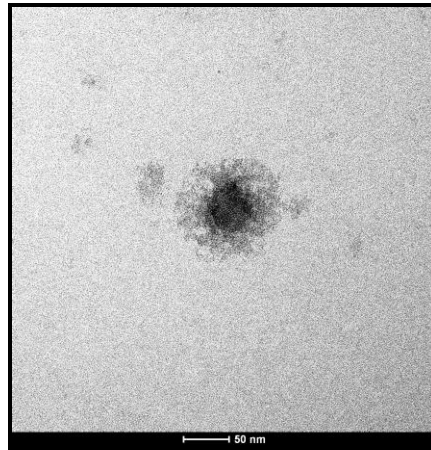
PEG-PLGA içeren polimerik nanopartiküllerin DSC analizi sonucunda pemetrekset ve anti-miR-21 içermeyen formülasyon 48,67°C'de PEG-PLGA'ya ait endotermik bir pik oluşturmuştur. Boş formülasyona benzer şekilde sadece pemetrekset içeren PEG5 formülasyonu ve hem pemetrekset hem anti-miR-21 içeren PEG5A formülasyonu sırasıyla 44,39°C ve 47,93°C'de endotermik pik oluşturmuştur. Formülasyonların DSC analizinde pemetrekset ve anti-miR-21'e ait pikler gözlenmemiştir (Şekil 3.18).



Şekil 3.18. PEG-PLGA nanopartiküllerinin DSC termogramı. a: pemetrekset; b: anti-miR-21; c: Etkin madde ve anti-miR-21 içermeyen PEG5 formülasyonu; d: PEG5 formülasyonu; e: PEG5A formülasyonu

3.3.2.6. PEG-PLGA İçeren Polimerik Nanopartikül Formülasyonunun TEM Analizi

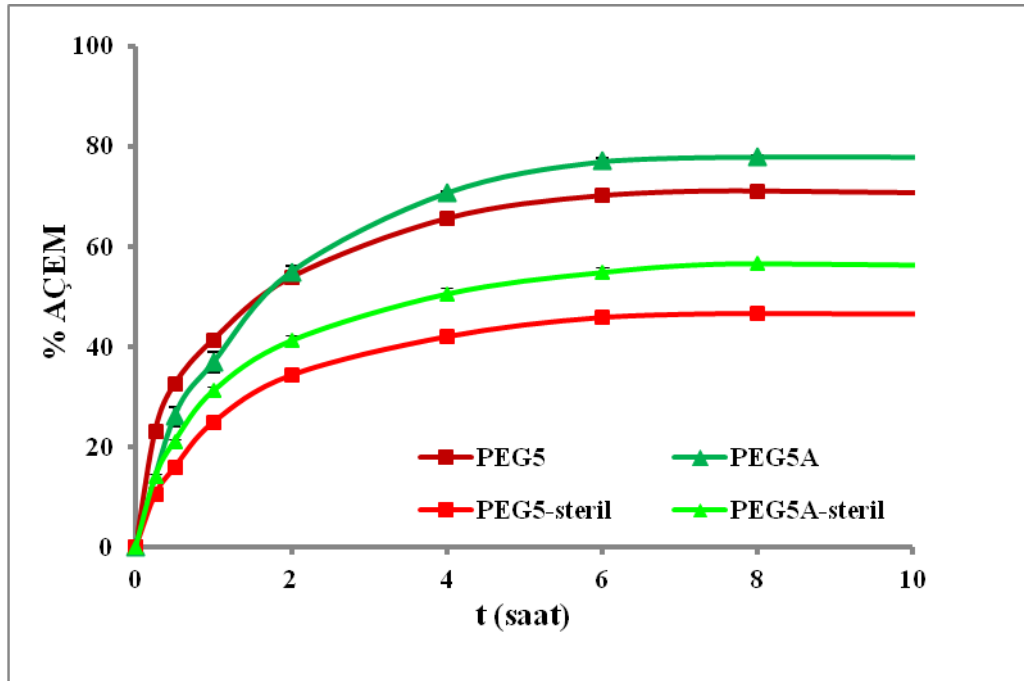
PEG-PLGA içeren PEG5A kodlu polimerik nanopartikül formülasyonunun TEM fotoğrafına bakıldığında partikül şeklinin küresel olduğu ve boyutunun 50 nm civarında olduğu görülmüştür (Şekil 3.19).



Şekil 3.19. PEG5A formülasyonuna ait TEM görüntüsü

3.3.2.7. Sterilizasyon Sonrasında PEG5 ve PEG5A Formülasyonlarının İn Vitro Salımı

PEG5 ve PEG5A formülasyonları gama radyasyon ile sterilize edildikten sonra etkin maddenin *in vitro* salımına etkisi incelenmiştir. Her iki formülasyonda da sterilizasyon sonrası etkin maddenin açığa çıkan miktarı azalmış, salım yavaşlamıştır (Şekil 3.20).



Şekil 3.20. Sterilizasyonun PEG5 ve PEG5A formülasyonundan etkin maddenin *in vitro* salımına etkisi

3.3.2.8. PEG5 ve PEG5A Formülasyonlarının Stabilitesine Ait Bulgular

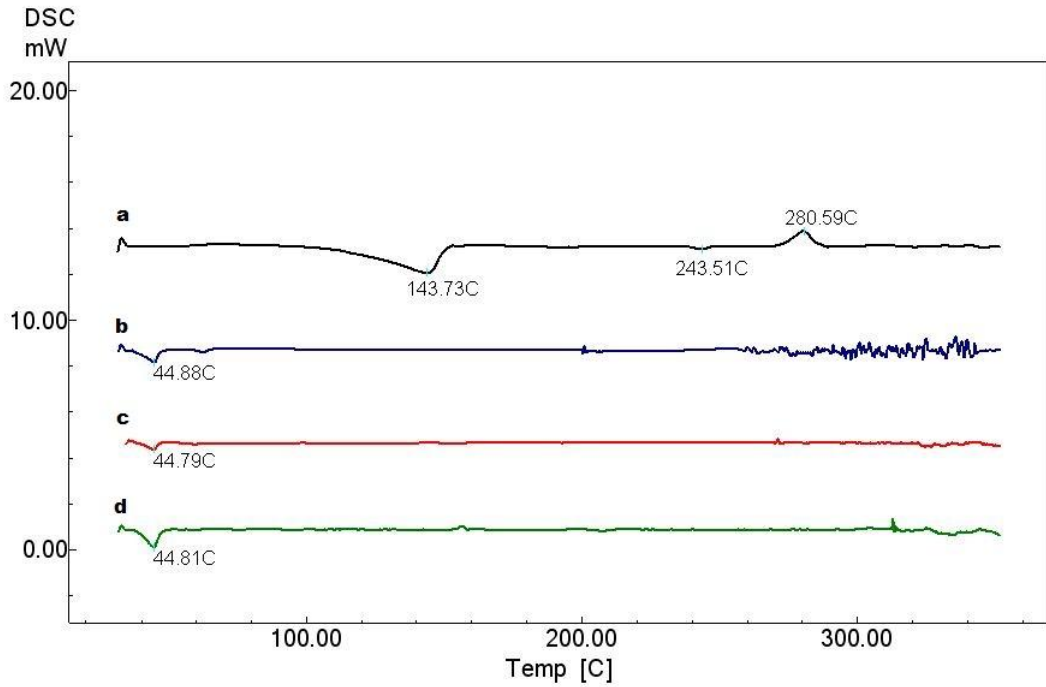
PEG5 ve PEG5A kodlu formülasyonların +4°C'de 3 ay süreyle bekletilmesi sonrasında ölçülen partikül boyutu ve zeta potansiyeli değerleri Çizelge 3.21'de, DSC analizi sonuçları Şekil 3.21'de yer almaktadır.

PEG5 ve PEG5A kodlu formülasyonların +4°C’de 3 ay bekletilmesi sonucunda her iki formülasyonun da partikül boyutunun ve zeta potansiyeli negatif değerinin arttığı görülmüştür.

Çizelge 3.21. PEG5 ve PEG5A formülasyonlarının 3 ay sonunda ölçülen partikül boyutu, polidispersite indeks ve zeta potansiyeli değerleri

Kod	Başlangıç			3 ay sonra		
	Partikül boyutu (nm)*	Polidispersite indeks*	Zeta Potansiyeli (mV)*	Partikül boyutu (nm)*	Polidispersite indeks*	Zeta Potansiyeli (mV)*
PEG5	43,65±1,252	0,446±0,013	-3,58±0,26	73,24 ± 0,316	0,309 ±0,004	-7,95 ± 0,581
PEG5A	53,18±3,755	0,565±0,039	-3,93±0,38	72,41± 1,665	0,356 ±0,018	-9,75 ± 2,88

*Ortalama ± standart sapma, n=3



Şekil 3.21. PEG5 ve PEG5A formülasyonlarının 3 aylık stabilite süresi sonunda elde edilen DSC termogramı. a: pemetrekset; b: pemetrekset ve anti-miR-21 içermeyen PEG5 formülasyonu; c: PEG5 formülasyonu;d: PEG5A formülasyonu

3 ay sonunda yapılan DSC analizi sonucunda PEG5 ve PEG5A kodlu formülasyonlarda boş formülasyona benzer şekilde sadece PEG-PLGA’ya ait pik gözlenmiş, formülasyonların stabilitesini koruduğu belirlenmiştir (Şekil 3.21).

3.3.3. Polimer-Lipid Hibrit Nanopartikül Formülasyonlarına Ait Bulgular

3.3.3.1. Polimer-Lipid Hibrit Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması, Partikül Boyutu, Zeta Potansiyeli ve Enkapsülasyon Etkinliğinin İncelenmesi

P15 formülasyonundan hareketle polimerik faz içeriği değiştirilerek hazırlanan ikinci formülasyon grubu olan polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonlarına ait bulgular Çizelge 3.22’de verilmiştir.

Çizelge 3.22. Polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonları

Kod	Organik faz	Partikül boyutu (nm)*	Polidispersite indeks*	Zeta Potansiyeli (mV)*	EE (%)*	DL (%)*
H1	100mg PLGA lesitin/trimristin 8,5/1,5	153,9±11,63	0,351±0,036	-23,9±1,68	14,53±0,307	0,414±0,008
H2	100 mg PLGA lesitin/trimristin 1,5/8,5	216,0±4,757	0,442±0,012	-35,2±0,474	18,47±1,385	0,527±0,039
H3	90 mg PLGA 10 mg PCL lesitin/trimristin 8,5/1,5	91,31±1,134	0,131±0,013	-36,4±6,3	30,37±0,113	0,839±0,003
H4	60 mg PLGA 40 mg PCL lesitin/trimristin 8,5/1,5	159,3±4,497	0,158±0,028	-39,1±2,19	23,95±0,73	0,629±0,019

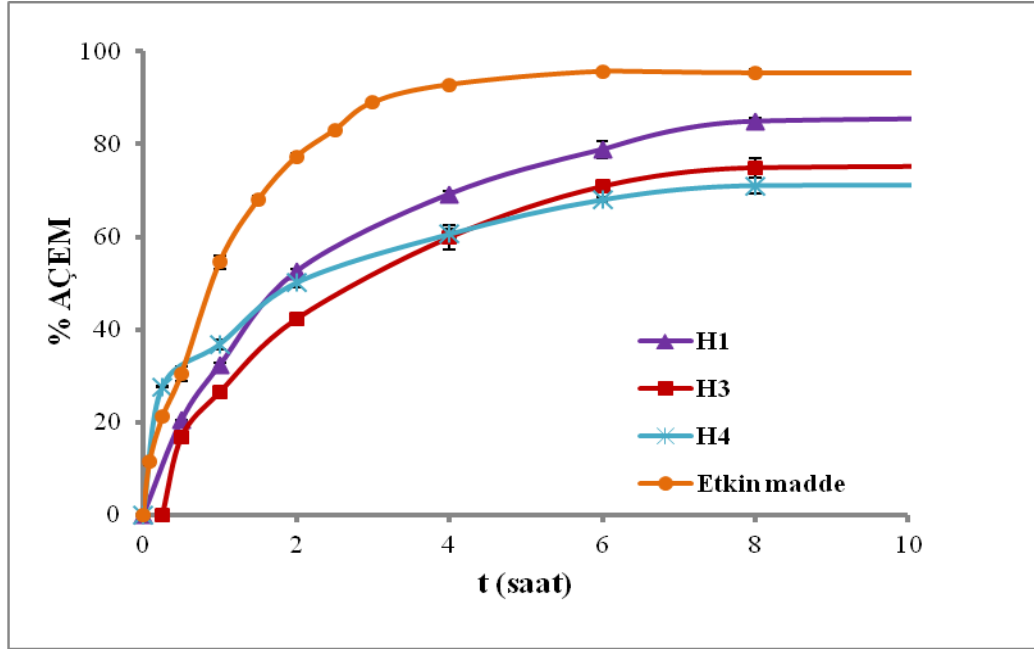
*Ortalama ± standart sapma, n=3

Literatürden hareketle P15 formülasyonunun polimerik fazına 8,5:1,5 molar oranda lesitin:trimristin ilave edilerek H1 kodlu polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonu hazırlanmıştır (Mandal ve ark..2013). Bu H1 kodlu formülasyon ile hem partikül boyutu küçülmüş ($153,9 \pm 11,63$ nm), hem de enkapsülasyon etkinliği artmıştır (%14,53±0,307). Lesitin:trimristin molar oranı 1,5:8,5 olarak değiştirildiğinde (H2 formülasyonu) partikül boyutu 200 nm’nin üstüne çıkmıştır. Lesitin:trimristin molar oranı 8,5:1,5 olan H1 formülasyonunda PLGA’nın

%10'unun PCL polimeri ile değiştirilmesi ile H3 formülasyonu oluşturulmuş, partikül boyutu önemli ölçüde küçülmüş ($91,31 \pm 1,134$ nm), enkapsülasyon etkinliği ise artmıştır ($\%30,37 \pm 0,113$). H4 formülasyonunda PLGA'nın %40'unun PCL polimeri ile değiştirilmesi ise partikül boyutu ve enkapsülasyon etkinliğini daha fazla iyileştirmemiştir. Bu nedenle lesitin: trimristin molar oranı 8,5:1,5 olan PLGA'nın %10'unun PCL polimeri ile değiştirilmesi ile hazırlanan H3 formülasyonu seçilerek anti-miR-21 oligonükleotidinin bu formülasyona yüklenmesine karar verilmiştir.

3.3.3.2. Polimer-Lipid Hibrit Nanopartikül Formülasyonlarının İn Vitro Salım Çalışmalarına Ait Bulgular

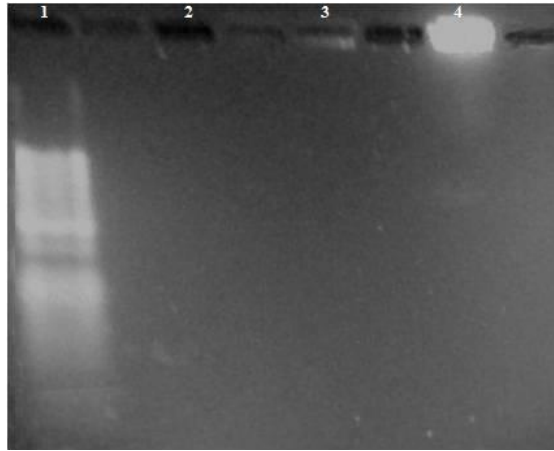
PLGA polimeri kullanılarak hazırlanan lesitin:trimristin molar oranı 8,5:1,5 olan H1 hibrit formülasyonunundan etkin maddenin *in vitro* salımı ile saf etkin maddenin *in vitro* salım hızı grafiğe geçirildiğinde formülasyonun etkin maddenin açığa çıkış hızını yavaşlattığı görülmüştür (Şekil 3.22). %10 oranında PCL ilave edilerek hazırlanan H3 hibrit formülasyonunda tek başına PLGA içeren formülasyona göre etkin madde salım hızı yavaşlamıştır. PCL oranı %40'a çıkarılarak hazırlanan H4 formülasyonunun *in vitro* salımının H3 formülü ile benzer olduğu görülmüştür ($f1$ fark faktörü = 13,93; $f2$ benzerlik faktörü = 53,90). Bu nedenle %10 PCL içeren H3 formülasyonu seçilerek, bu formülasyona antisens oligonükleotid ilavesi yapılmıştır.



Şekil 3.22. Polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonlarından etkin maddenin *in vitro* salımı

3.3.3.3. MiR-21 Antisens Oligonükleotidinin H3 Formülasyonuna Yüklenmesi ve Formülasyonun İn Vitro Özellikleri Üzerine Etkisi

H3 kodlu polimer-lipid hibrit formülasyonu seçilerek anti-miR-21 oligonükleotidi ilavesiyle tekrar hazırlanmıştır. Anti-miR-21'in formülasyonlara yüklenip yüklenmediği agaroz jel elektroforezle teşhis edilmiştir.



Şekil 3.23. H3A formülasyonunun agaroz jel elektroforez ile analizi. 1: DNA belirteci, 2: H3A formülasyonuna ait süpernatant, 3: Disperse H3A formülasyonu, 4: Toz H3A formülasyonu

H3A formülasyonuna ait süpernatant agaroz jele uygulandığında herhangi bir bant oluşumu görülmemiştir. H3A formülasyonu suda disperse edilerek agaroz jele uygulandığında bant oluşumu hafif olmakla birlikte, toz halde uygulanan formülasyonda yoğun bir bant oluşumu görülmüştür (Şekil 3.23).

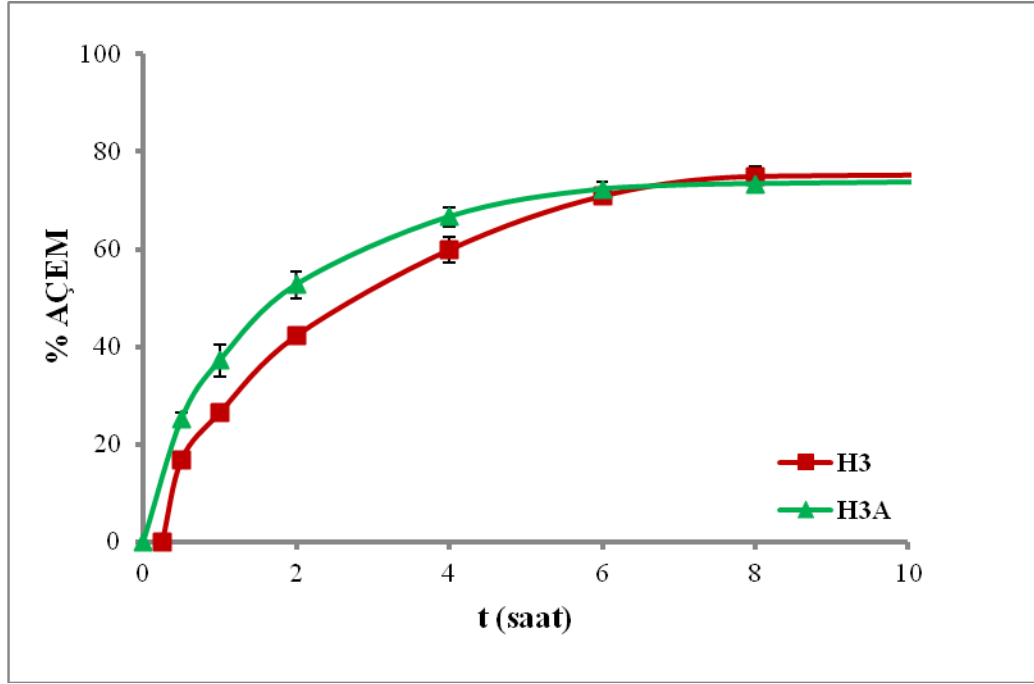
H3 kodlu polimer-lipid hibrit formülasyonuna antisens oligonükleotidin ilavesi ile partikül boyutu ve polidispersite indeksin önemli olarak değişmediği ($p>0,05$) belirlenmiş, enkapsülasyon etkinliğinin ise arttığı görülmüştür ($p<0,05$) (Çizelge 3.23).

Çizelge 3.23. Anti-miR-21 ilavesinin H3 formülasyonunun fizikokimyasal özellikleri üzerine etkisi

Kod	Partikül boyutu (nm)*	Polidispersite indeksi*	Zeta Potansiyeli (mV)*	EE (%)*	DL (%)*
H3	91,31±1,134	0,131±0,013	-36,4±6,30	30,37±0,113	0,839±0,003
H3A	93,98±1,887	0,146±0,014	-33,4±2,81	34,46±1,785	0,975±0,050

*Ortalama ± standart sapma, n=3

Anti-miR-21 ilavesinin H3 formülasyonundan etkin maddenin *in vitro* salımına etkisi incelendiğinde, H3 formülasyonu ile H3A formülasyonlarının *in vitro* salım profilleri benzer bulunmuş (f_1 fark faktörü = 6,305; f_2 benzerlik faktörü = 68,28), anti-miR-21 ilavesinin etkin maddenin *in vitro* salımına önemli bir etkisi olmadığı görülmüştür (Şekil 3.24).



Şekil 3.24. Anti-miR-21 ilavesinin H3 hibrit nanopartikül formülasyonunun *in vitro* salımına etkisi

3.3.3.4. H3 ve H3A Formülasyonlarının *İn Vitro* Salım Kinetiklerinin Belirlenmesi

H3 ve H3A polimer-lipid hibrit nanopartiküllerinden etkin madde salımı sırasıyla Weibull, Higuchi ve Korsmeyer-Peppas kinetiklerine uyum göstermiştir (Çizelge 3.24).

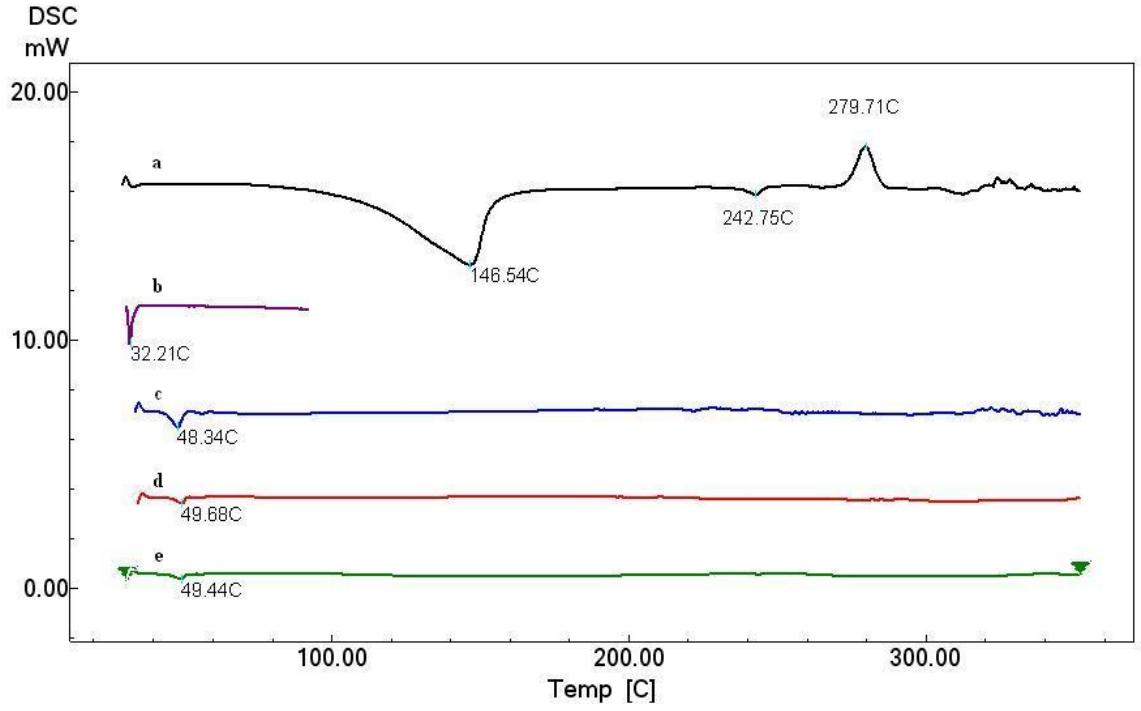
Çizelge 3.24. H3 ve H3A formülasyonlarının *in vitro* salım kinetikleri

		H3	H3A
0°	r^2	0,832	0,846
	k_0 ($\mu\text{g/sa}$)	16,23	14,92
	SH	3,641	3,683
	RMS	149,8	135,6
1°	r^2	0,932	0,945
	k (sa^{-1})	0,301	0,260
	SH	0,041	0,036
	RMS	0,019	0,013
Higuchi	r^2	0,976	0,991
	k_H ($\mu\text{g/sa}^{-1}$)	37,53	34,07
	SH	2,967	1,898
	RMS	21,81	8,102
Peppas	r^2	0,972	0,987
	n	0,533	0,470
	SH	0,053	0,038
	RMS	0,002	0,001
Weibull	r^2	0,990	0,998
	β	0,703	0,647
	SH	0,041	0,022
	T_d (sa)	2,585	3,317
	RMS	0,002	0,000
Hixson-crowell	r^2	0,489	0,516
	κ ($\mu\text{g}^{1/3}/\text{sa}$)	0,703	0,740
	SH	0,359	0,414
	RMS	1,457	1,712

* r^2 : Determinasyon katsayısı, β : Şekil faktörü, T_d : Etkin maddenin %63,2'sinin çözünmesi için geçen süre, n: difüzyonal sabit, SH: Hız sabitlerinin standart hatası, RMS:Artık ortalama kareler toplamı

3.3.3.5. H3 ve H3A Formülasyonlarının DSC Analizi

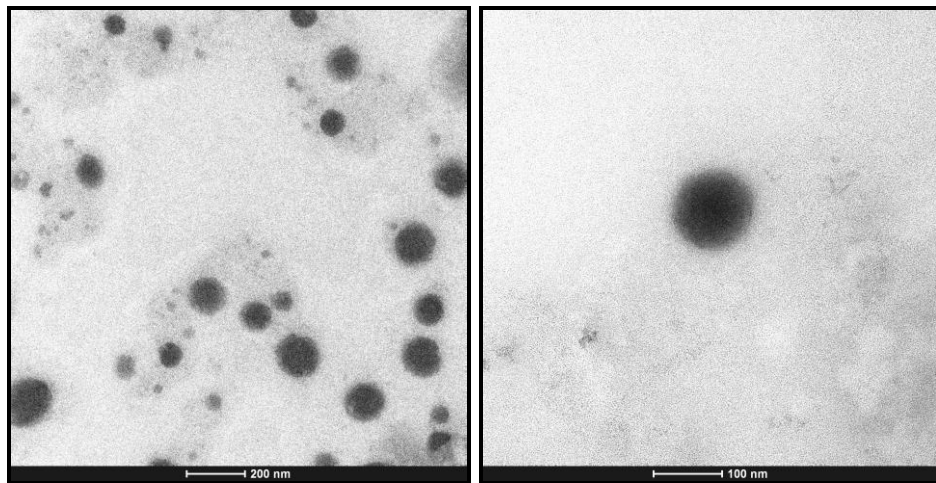
Polimer lipid hibrit nanopartiküllerinin DSC analizi sonucunda Pemetrekset ve anti-miR-21 içermeyen formülasyon 48,34°C'de PLGA'ya ait endotermik bir pik oluşturmuştur. Boş formülasyona benzer şekilde sadece pemetrekset içeren H3 formülasyonu ve hem pemetrekset hem anti-miR-21 içeren H3A formülasyonu sırasıyla 49,68 ve 49,44°C'de endotermik pik oluşturmuştur. Formülasyonların DSC analizinde pemetrekset ve anti-miR-21'e ait pikler gözlenmemiştir (Şekil 3.25).



Şekil 3.25. Polimer-lipid hibrit nanopartiküllerinin DSC termogramı. a: pemetrekset; b: anti-miR-21; c: Pemetrekset ve anti-miR-21 içermeyen H3 formülasyonu; d: H3 formülasyonu e: H3A formülasyonu

3.3.3.6. Polimer-lipid Hibrit Nanopartikül Formülasyonlarının TEM Analizi

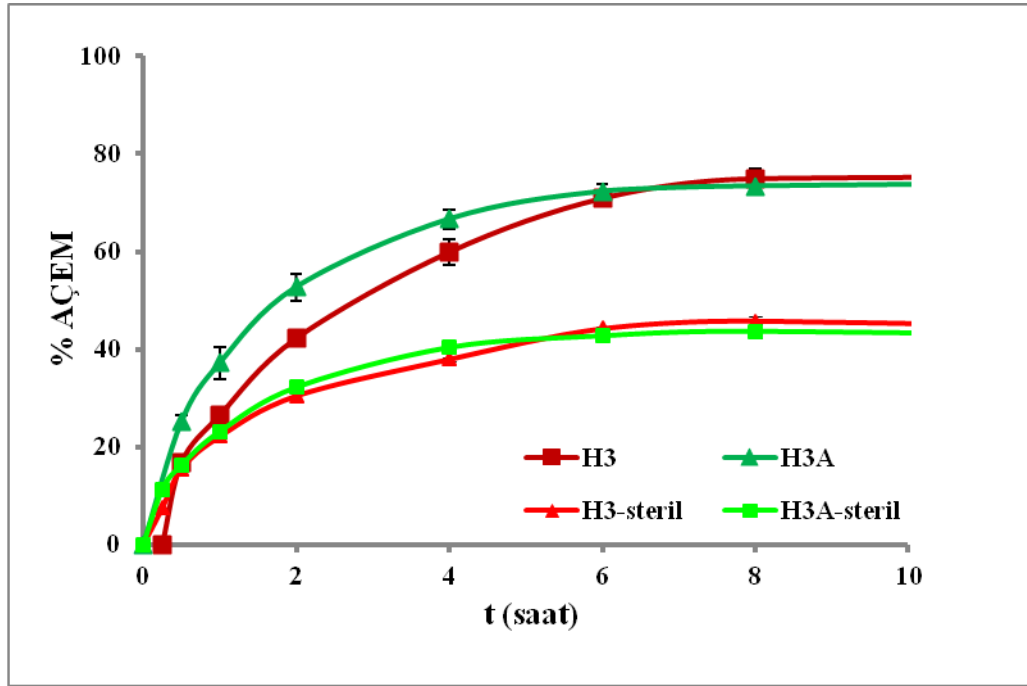
Polimer-lipid hibrit nanopartiküllerin morfolojisini incelemek amacıyla TEM analizi yapılmıştır. TEM fotoğraflarına bakıldığında partiküllerin küresel şekilde olduğu ve boyutlarının 100 nm'nin altında olduğu görülmüştür (Şekil 3.26).



Şekil 3.26. H3A formülasyonuna ait TEM görüntüsü

3.3.3.7. Sterilizasyonun H3 ve H3A Formülasyonlarının *İn Vitro* Salımına Etkisi

H3 ve H3A formülasyonları gama radyasyon ile sterilize edildikten sonra etkin maddenin *in vitro* salımına etkisi incelenmiştir. Her iki formülasyonda da sterilizasyon sonrası etkin maddenin açığa çıkan miktarı azalmış, salım yavaşlamıştır (Şekil 3.27).



Şekil 3.27. Sterilizasyonun H3 ve H3A formülasyonlarından etkin maddenin *in vitro* salımına etkisi

3.3.3.8. H3 ve H3A Formülasyonlarının Stabilitesine Ait Bulgular

H3 ve H3A kodlu formülasyonların +4°C'de 3 ay süreyle bekletilmesi sonrasında ölçülen partikül boyutu ve zeta potansiyeli değerleri Çizelge 3.25'te, DSC analizi sonuçları Şekil 3.28'de yer almaktadır.

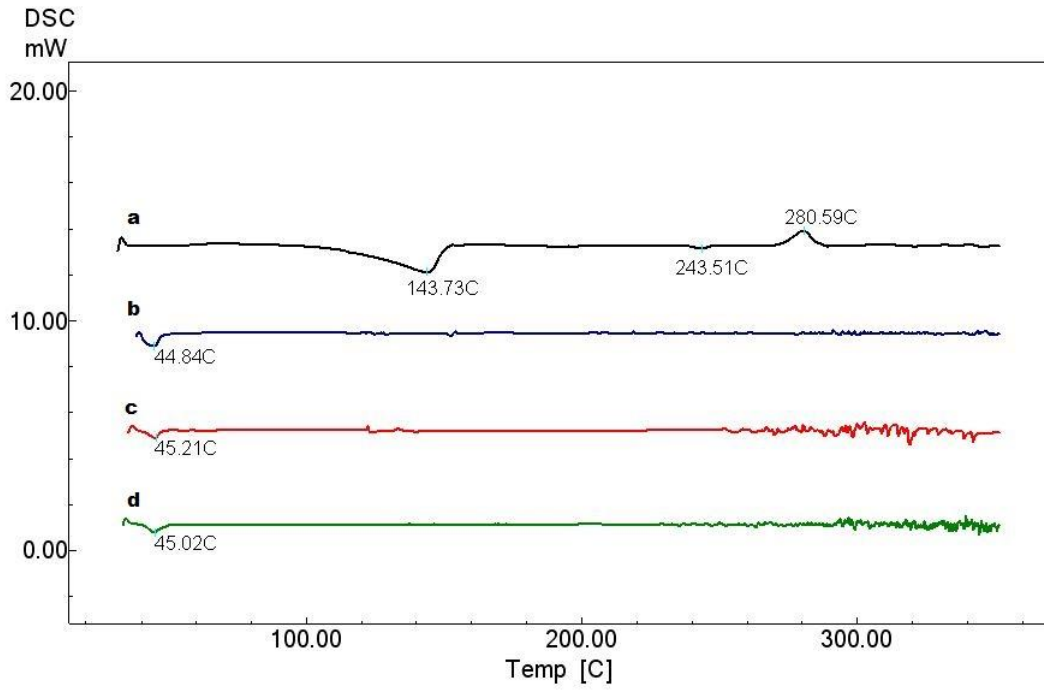
H3 ve H3A kodlu polimerik nanopartikül formülasyonlarının +4°C'de 3 ay bekletilmesi sonucunda her iki formülasyonun da partikül boyutunun ve

polidispersite indeksinin arttığı, zeta potansiyeli negatif değerinin ise azaldığı görülmüştür ($p<0,05$) (Çizelge 3.25).

Çizelge 3.25. H3 ve H3A kodlu formülasyonların 3 ay sonunda ölçülen partikül boyutu, polidispersite indeks ve zeta potansiyeli değerleri

Kod	Başlangıç			3 ay sonra		
	Partikül boyutu (nm)*	Polidispersite indeks*	Zeta Potansiyeli (mV)*	Partikül boyutu (nm)*	Polidispersite indeks*	Zeta Potansiyeli (mV)*
H3	91,31±1,134	0,131±0,013	-36,4±6,30	125,1 ± 3,399	0,306 ±0,037	-31,40 ± 0,295
H3A	93,98±1,887	0,146±0,014	-33,4±2,81	117,7 ± 1,357	0,284 ±0,004	-29,5 ± 0,402

*Ortalama ± standart sapma, n=3

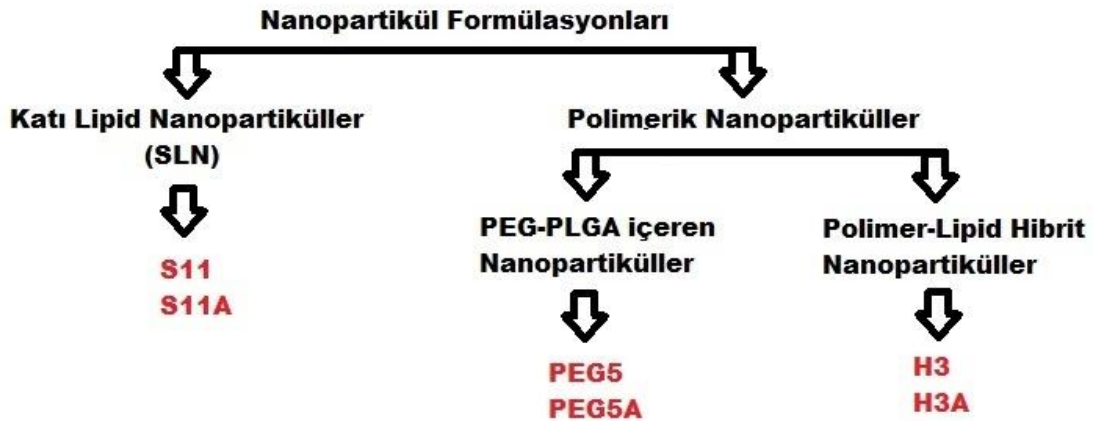


Şekil 3.28. H3 ve H3A formülasyonlarının 3 aylık stabilite süresi sonunda elde edilen DSC termogramı. a: pemetrekset; b: Pemetrekset ve anti-miR-21 içermeyen H3 formülasyonu; c: H3 formülasyonu d: H3A formülasyonu

3 ay sonunda yapılan DSC analizi sonucunda H3 ve H3A kodlu formülasyonlarının DSC termogramı incelendiğinde, boş formülasyona benzer şekilde sadece PLGA'ya ait pik gözlenmiştir (Şekil 3.28).

3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları İçin Seçilen Formülasyonlar

Hücre kültürü çalışmalarında uygulanmak üzere tez kapsamında hazırlanan farklı yapıdaki nanopartikül formülasyonlarının her birinden en iyi formülasyon seçilmiştir. Anti-miR-21'in etkisini görmek amacıyla sadece pemetrekset içeren formülasyonların yanı sıra pemetrekset ve anti-miR-21'i birlikte içeren formülasyonların da hücre kültürü çalışmalarının yapılması uygun bulunmuştur. Bu amaçla, S11 ve S11A kodlu SLN formülasyonları, PEG5 ve PEG5A kodlu polimerik nanopartikül formülasyonları ve H3 ve H3A kodlu polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonları hücre kültürü çalışmalarında uygulanmak üzere seçilmiştir (Şekil 3.29).



Şekil 3.29. Hücre kültürü çalışmaları için seçilen formülasyonlar

3.5. Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular

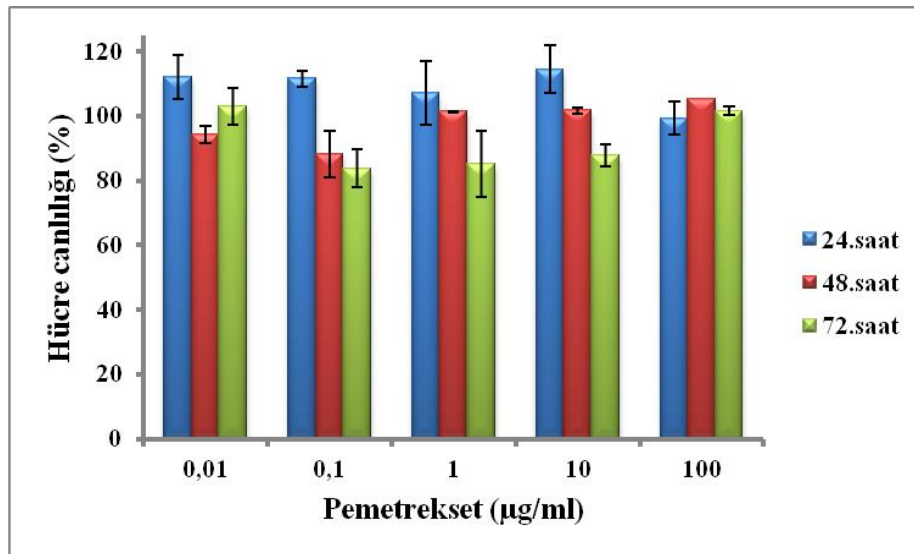
3.5.1. Sitotoksikite Çalışmalarına Ait Bulgular

3.5.1.1. Pemetreksetin U87MG İnsan Glioblastoma Hücrelerine Sitotoksitesisi

U87MG hücreleri ve pemetreksetin 0,01-100 $\mu\text{g/ml}$ aralığında 5 farklı konsantrasyondaki çözeltisinin 24, 48 ve 72 saat boyunca kültürlenmesi sonucunda elde edilen hücre canlılığına ilişkin bulgular Şekil 3.30'da görülmektedir.

Farklı dozlarda uygulanan pemetrekset çözeltilerinin 24. saat ve 48. saatte elde edilen hücre canlılığı değerleri karşılaştırıldığında birbirlerinden anlamlı olarak farklı olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

Farklı dozlarda uygulanan pemetrekset çözeltilerinin 72. saatte elde edilen hücre canlılığı değerleri karşılaştırıldığında 0,1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ ve 10 $\mu\text{g/ml}$ dozlarında hücre canlılığı 0,01 $\mu\text{g/ml}$ ve 100 $\mu\text{g/ml}$ dozlarına göre önemli olarak azalmıştır ($p<0,05$). Elde edilen sonuçlara göre 0,1 ve 1 $\mu\text{g/ml}$ pemetrekset dozu ve 72 saat uygulama süresi seçilerek formülasyonların uygulanmasına karar verilmiştir.

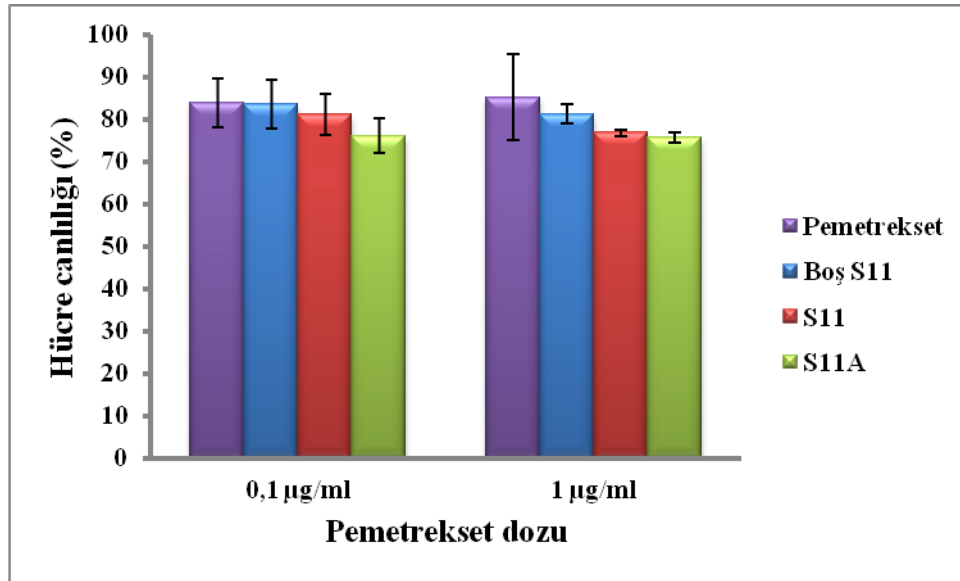


Şekil 3.30. Pemetreksetin U87MG hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (ortalama $\pm$ standart hata)

3.5.1.2. Formülasyonların U87MG İnsan Glioblastoma Hücrelerine Sitotoksitesi

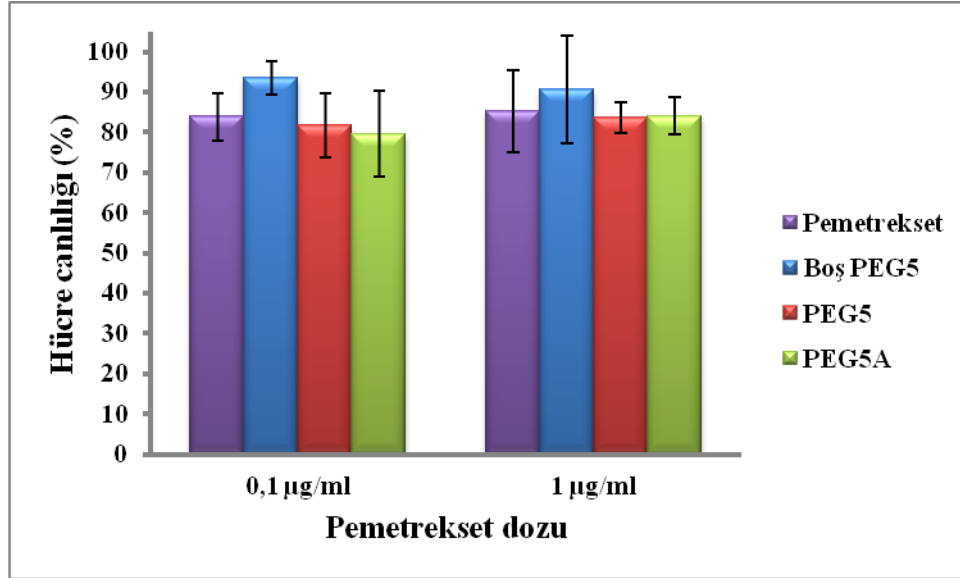
Pemetrekset, pemetrekset ve anti-miR-21 içermeyen boş formülasyonlar, sadece pemetrekset içeren formülasyonlar ve hem pemetrekset hem de anti-miR-21 içeren formülasyonların U87MG hücreleri ile 72 saat boyunca kültürlenmesi sonucunda elde edilen hücre canlılığına ilişkin bulgular Şekil 3.31, Şekil 3.32 ve Şekil 3.33'de görülmektedir.

SLN formülasyonlarının uygulanması ile her iki dozda da hücre canlılığı pemetrekset çözeltisi > boş formülasyon > S11 > S11A sırasıyla azalmıştır. En düşük hücre canlılığı yaklaşık olarak % 75 civarındadır ve her iki dozda da hem pemetrekset hem anti-miR-21 içeren S11A kodlu formülasyonda görülmüştür (Şekil 3.31).



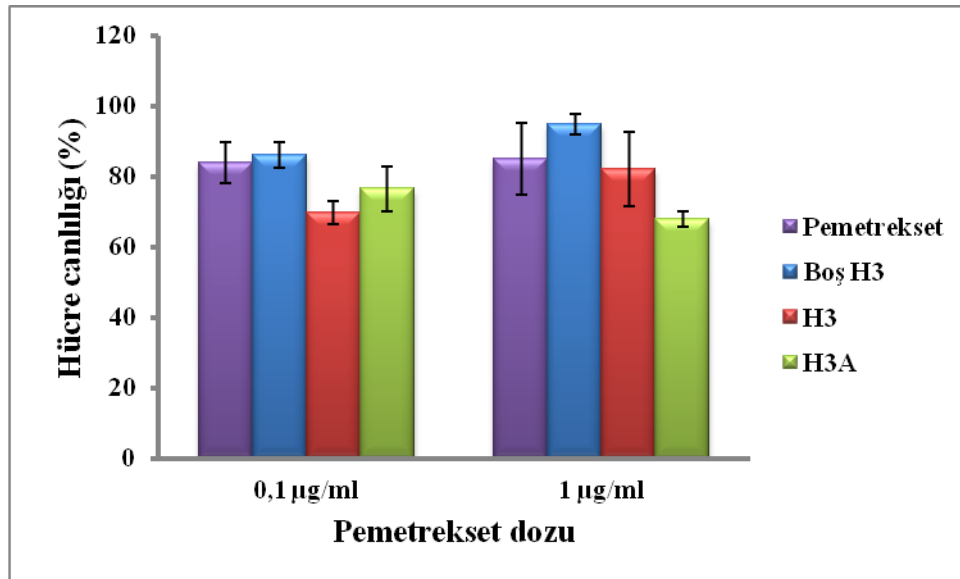
Şekil 3.31. SLN formülasyonlarının U87MG hücre canlılığı üzerine etkisi (ortalama ± standart hata)

Pegile nanopartikül formülasyonlarının uygulanması ile her iki dozda da hücre canlılığı boş formülasyon > pemetrekset çözeltisi > PEG5 ≥ PEG5A şeklinde azalmıştır. En düşük hücre canlılığı % 79'dur ve 0,1 µg/ml dozda hem pemetrekset hem anti-miR-21 içeren PEG5A kodlu formülasyonda görülmüştür (Şekil 3.32).



Şekil 3.32. Pegile polimerik nanopartikül formülasyonlarının U87MG hücre canlılığı üzerine etkisi (ortalama $\pm$ standart hata)

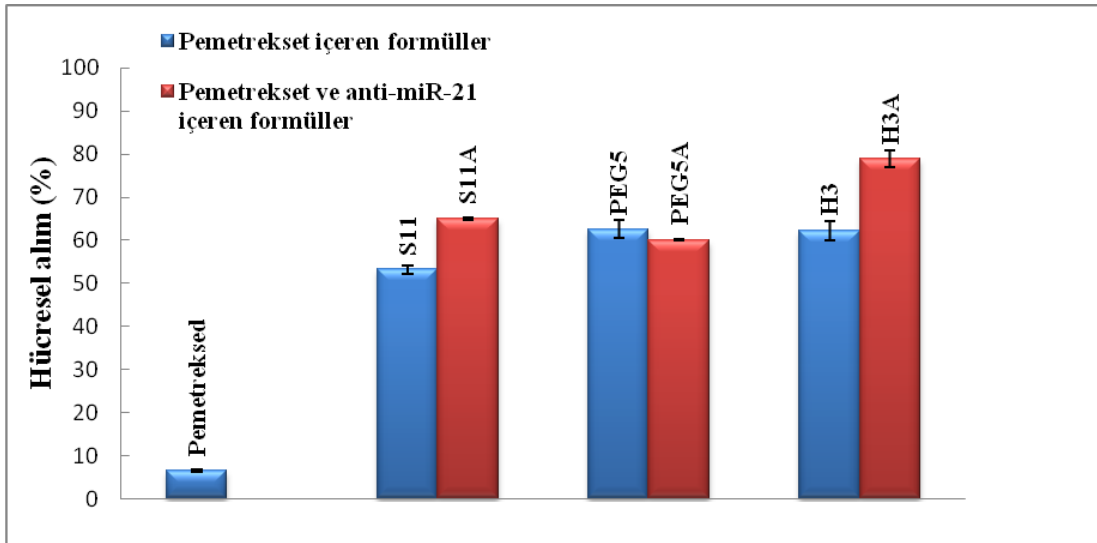
Polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonlarının uygulanması ile 0,1 µg/ml dozda hücre canlılığı boş formülasyon > pemetrekset çözeltisi > H3A > H3 şeklinde azalırken, 1 µg/ml dozda boş formülasyon > pemetrekset çözeltisi > H3 > H3A şeklinde azalmıştır. En düşük hücre canlılığı % 67'dir ve 1 µg/ml dozda hem pemetrekset hem anti-miR-21 içeren H3A kodlu formülasyonda görülmüştür (Şekil 3.33).



Şekil 3.33. Polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonlarının U87MG hücre canlılığı üzerine etkisi (ortalama $\pm$ standart hata)

3.5.2. Hücresel Alımın Belirlenmesine Ait Bulgular

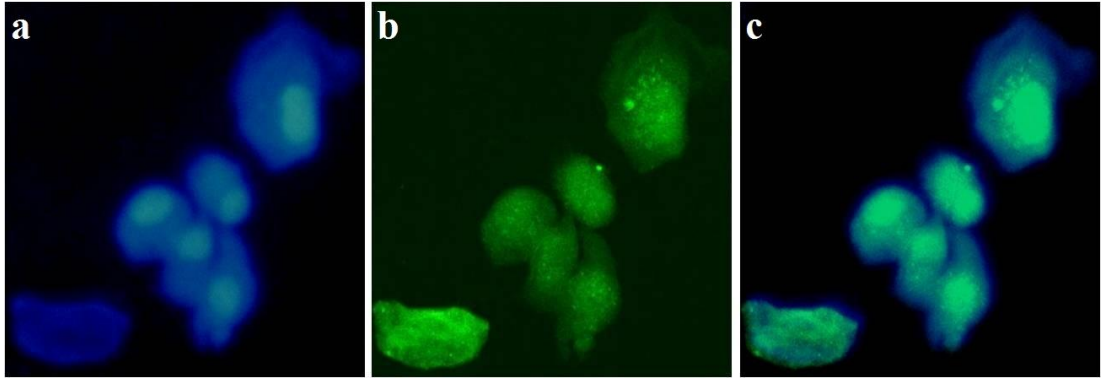
Pemetrekset çözeltisi, pemetrekset içeren nanopartikül formülasyonları ve hem pemetrekset hem de anti-miR-21 içeren nanopartikül formülasyonlarının U87MG hücreleri ile kültürlenmesi sonucunda hücreler tarafından alınan pemetrekset miktarına ilişkin bulgular Şekil 3.34'te görülmektedir. Pemetrekset tek başına çözelti şeklinde uygulandığında hücreler tarafından % 6'sının alındığı görülmüştür. Tüm formülasyonlar pemetreksetin hücresel alımını %50'nin üzerine çıkarmıştır. S11 ve S11A kodlu SLN formülasyonlarında ve H3 ve H3A kodlu polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonlarında anti-miR-21 ilavesi ile pemetreksetin hücresel alımı önemli ölçüde artmıştır ($p < 0,01$). PEG5 ve PEG5A kodlu pegile polimerik nanopartikül formülasyonlarında ise anti-miR-21 ilavesi ile pemetreksetin hücresel alımı, sadece pemetrekset olan formülasyona benzer bulunmuştur ($p > 0,05$). En yüksek hücresel alım H3A kodlu polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonu ile elde edilmiştir ($78,9 \pm 1,87$).



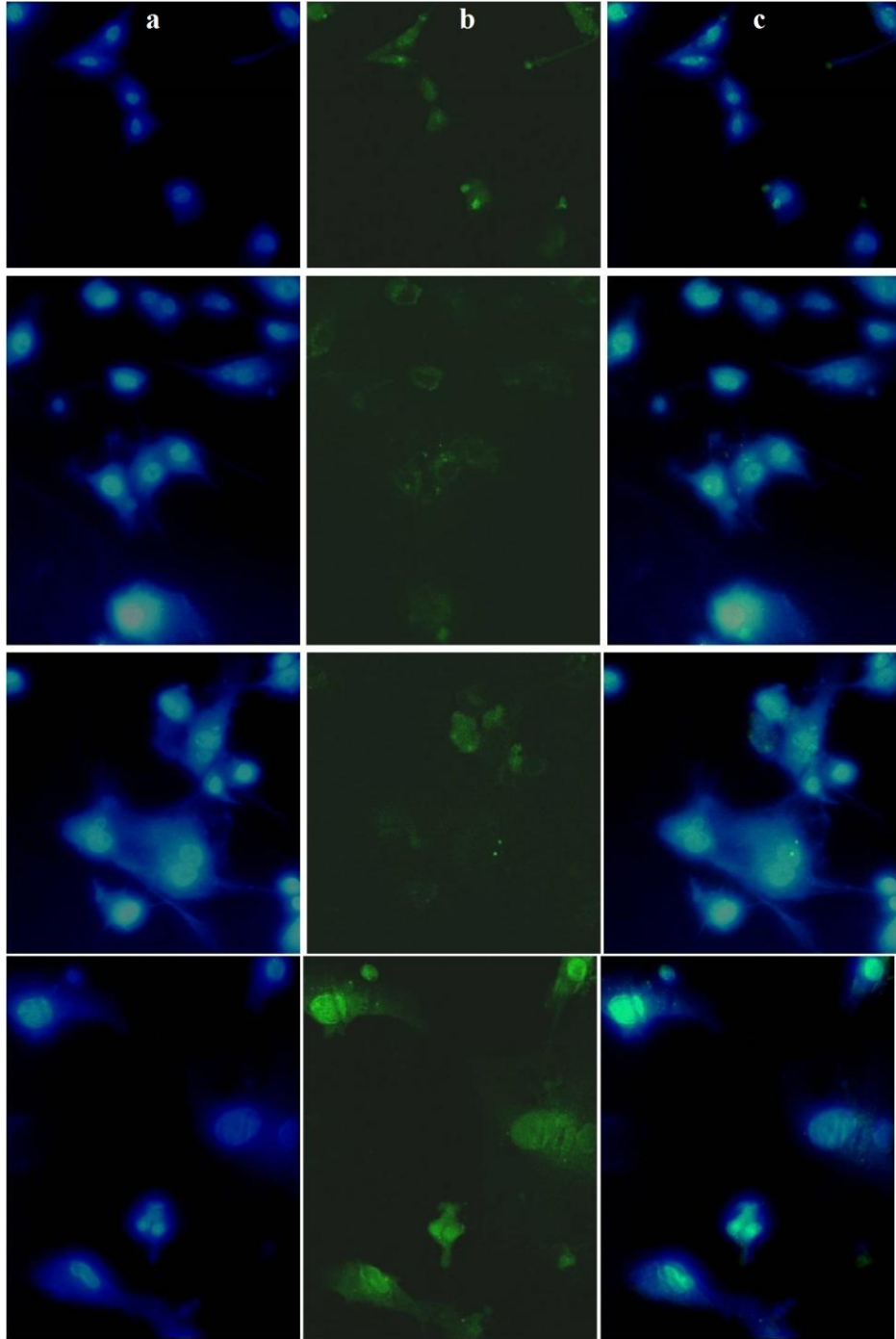
Şekil 3.34. U87MG hücreleri tarafından pemetreksetin hücresel alımı (ortalama $\pm$ standart hata)

3.5.3. Hücresel Alımın Konfokal Mikroskop ile Görüntülenmesine Ait Bulgular

Lazer konfokal mikroskop resimleri, fluoresans özellik gösteren anti-miR-21'in ve anti-miR-21 yüklü nanopartiküllerin uygulanması ile U87MG hücreleri tarafından alımını göstermektedir. Soldaki resimler DAPI ile boyanmış hücre çekirdekleri (mavi), ortadaki resimler ise aynı hücrelerin konfokal görüntüsüdür ve 6-FAM-anti-miR-21/ 6-FAM-anti-miR-21 içeren nanopartiküllerin (yeşil) hücresel alımını göstermektedir. Sağdaki resimler ise iki görüntünün üst üste çakıştırılması ile elde edilmiştir. Anti-miR-21'in saf halde uygulandığında hücrelerin hem çekirdeğinde hem de stoplazmasında yer aldığı görülmüştür (Şekil 3.35).

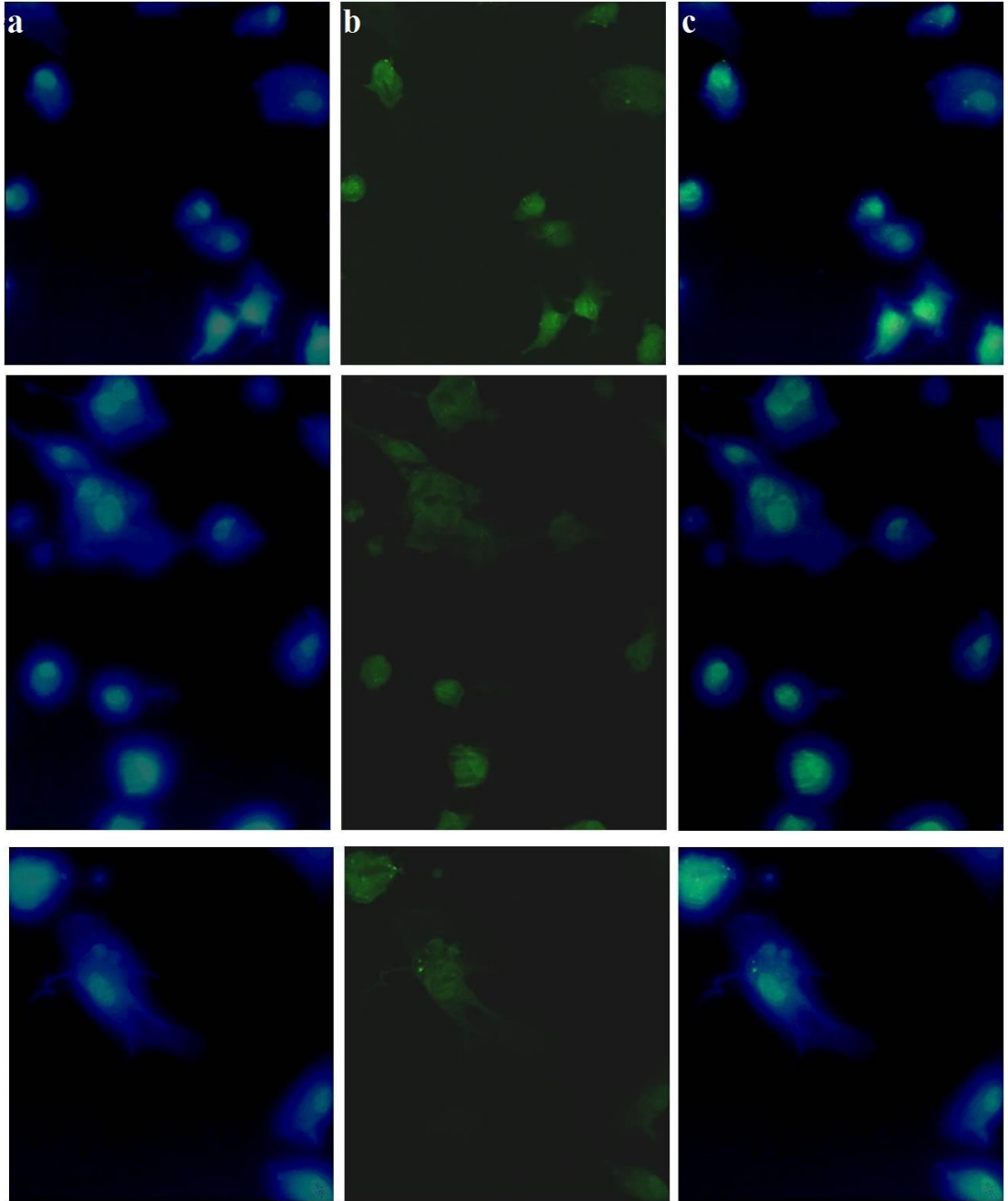


Şekil 3.35. Anti-miR-21'in U87MG hücreleri tarafından alımı (a: DAPI ile boyanmış hücre çekirdekleri (mavi floresan); b: Hücreler tarafından 6-FAM-anti-miR-21'in alımı (yeşil floresan); c: a ve b'nin üst üste çakıştırılması ile elde edilen görüntü)

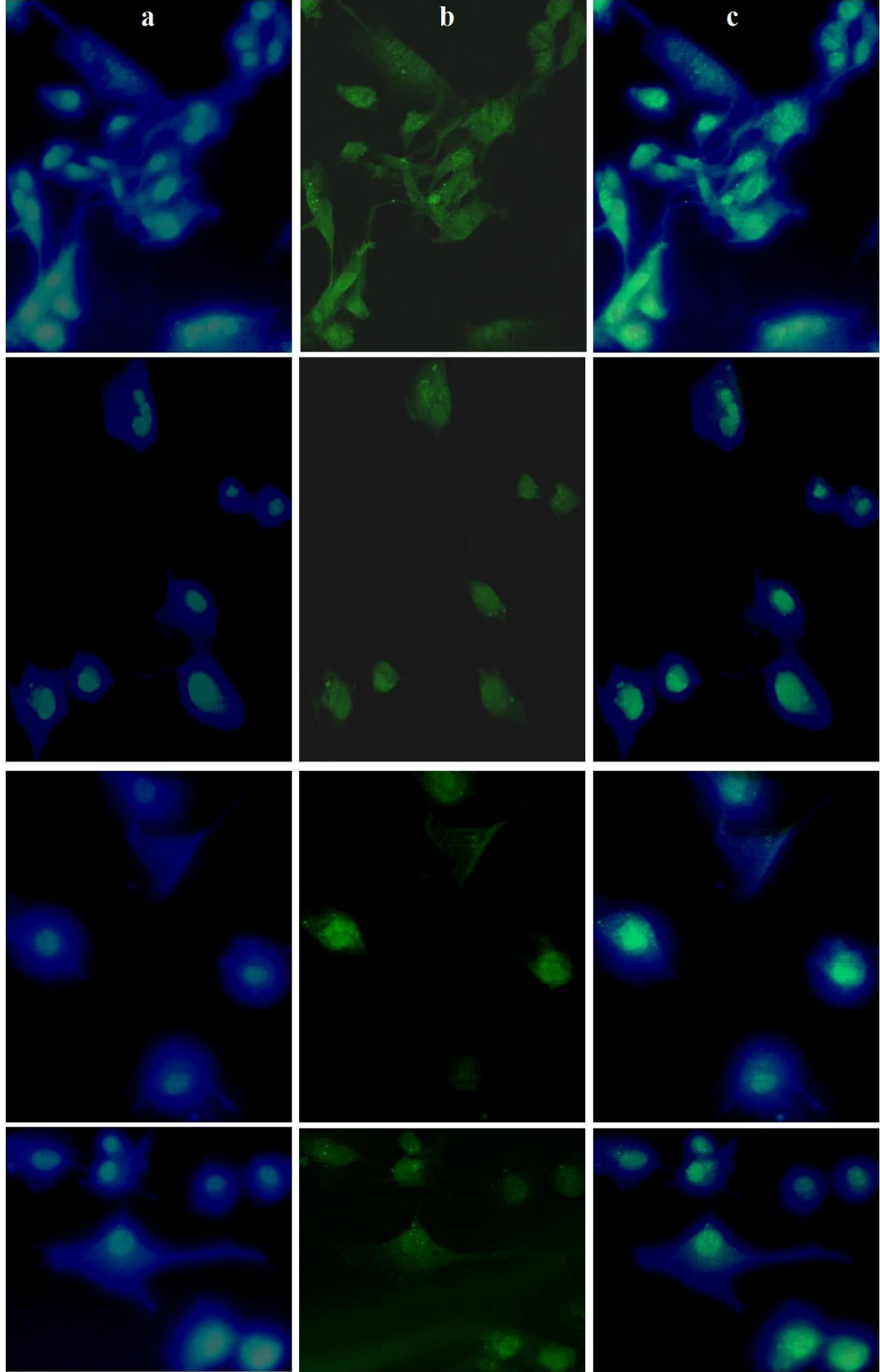


Şekil 3.36. Anti-miR-21 içeren S11A formülasyonunun U87MG hücreleri tarafından alımı (a: DAPI ile boyanmış hücre çekirdekleri (mavi floresan); b: Hücreler tarafından 6-FAM-anti-miR-21 yüklü S11A formülasyonunun alımı (yeşil floresan); c: a ve b'nin üst üste çakıştırılması ile elde edilen görüntü)

Anti-miR-21 içeren S11A SLN formülasyonunun hücrelerin hem çekirdeğinde hem de stoplazmasında yer aldığı görülmüştür (Şekil 3.36).



Şekil 3.37. Anti-miR21 yüklü PEG5A formülasyonunun U87MG hücreleri tarafından alımı (a: DAPI ile boyanmış hücre çekirdekleri (mavi floresan); b: Hücreler tarafından 6-FAM-anti-miR-21 yüklü PEG5A formülasyonunun alımı (yeşil floresan); c: a ve b'nin üst üste çakıştırılması ile elde edilen görüntü)



Şekil 3.38. Anti-miR-21yüklü H3A formülasyonunun U87MG hücreleri tarafından alımı (a: DAPI ile boyanmış hücre çekirdekleri (mavi floresan); b: Hücreler tarafından 6-FAM-anti-miR-21 yüklü H3A formülasyonunun alımı (yeşil floresan); c: a ve b'nin üst üste çakıştırılması ile elde edilen görüntü)

Anti-miR-21 yüklü PEG5A polimerik nanopartikül formülasyonu ve H3A polimer-lipid hibrit formülasyonunun hücrelerin çekirdeğinde daha yoğun olarak yer aldığı görülmüştür (Şekil 3.37 ve Şekil 3.38).

4. TARTIŞMA

4.1. Pemetreksetin HPLC Yöntemi ile Miktar Tayininin ve Yöntemin Validasyonunun Değerlendirilmesi

Pemetreksetin pH 7,4 fosfat-salin tampon çözeltisi içinde UV spektrumu alındığında Şekil 3.1’de görüldüğü gibi maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu 226 nm olarak bulunmuştur ve literatür verileriyle uyumludur. Patel ve ark. (2011) tarafından benzer şekilde pemetreksetin UV’de maksimum absorbans verdiği dalga boyu 225 nm olarak bulunmuştur. Lu ve ark. (2012) hazırladıkları nanopartikül formülasyonlarının içerdiği pemetrekset miktarını HPLC’de 227 nm’de analiz etmiştir. Miklan ve ark. (2011) ise pemetreksetin peptit konjugatını hazırlayarak HPLC’de 220 nm’de analiz etmiştir.

Pemetreksetin Çizelge 3.1’de yer alan pH 7,4 fosfat-salin tampon çözeltisi içinde yapılan kalibrasyon doğrusuna ait r^2 değerinin 1’e yakın olması (0,9998), okunan absorbanslardan bulunan konsantrasyon değerlerinin güvenilir sonuçlar vereceğini göstermektedir.

Pemetreksetin kalibrasyonunun validasyonu amacıyla incelenen Çizelge 3.2, .3.3 ve 3.4’te yer alan doğruluk ve kesinlik (tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik) parametreleri sonucunda elde edilen verilere ait bağıl sapma değerlerinin % 2’nin altında olması, kalibrasyon denkleminin doğru ve kesin sonuçlar verdiğini göstermiştir. Seçicilik parametresi incelendiğinde formülasyonda kullanılan maddelerin HPLC analizi sonucunda etkin madde ile girişim yapmaması yöntemin etkin maddemiz için seçici olduğunu doğrulamıştır. Pemetreksetin pH 7.4 fosfat-salin tamponu içerisindeki miktar tayinine ilişkin hesaplanan teşhis sınırı (LOD) (0,135 µg/ml) ve tayin sınırı (LOQ) (0,408 µg/ml) değerlerinin kalibrasyon doğrusunda yer alan en küçük konsantrasyon değeri olan 0,5 µg/ml’den küçük olması kalibrasyon aralığımızın

etkin maddenin tayin edilebildiği aralıkta yapıldığını göstermiştir. Çizelge 3.6’da yer alan doğrusallık deneyi sonucunda elde edilen doğrunun r^2 değerinin yüksek, regresyon doğrusundan sapmaların standart hatasının düşük oluşu, elde edilen verilerin güvenilirliğini göstermektedir.

4.2. SLN Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi

4.2.1. Yüksek Basıncılı Homojenizasyon Cihazı ile Yapılan Ön Formülasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

SLN formülasyonlarının hazırlanmasında yüksek basınçlı homojenizasyon cihazı kullanılmıştır. Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi, organik çözücü kullanılmaması, dar partikül boyutu dağılımına sahip nanopartiküllerin elde edilebilmesi, ölçek büyütme ile endüstriyel boyutta üretime olanak sağlaması gibi sağladığı önemli avantajlardan dolayı seçilmiştir. Etkin maddelerin beyine geçişi için SLN formülasyonlarının partikül boyutunun 200 nm’den küçük olması, kan dolaşımında daha uzun süre kalması ve kan beyin bariyeri ile temas süresinin artması nedeniyle avantajlı bulunmuştur (Kaur ve ark., 2008). Çizelge 3.7’de yer alan yüksek basınçlı homojenizasyon cihazı ile yapılan ön formülasyon çalışmalarının sonuçları değerlendirilmiş ve SLN formülasyonlarının hazırlanmasında en küçük partikül boyutu ($182,5 \pm 2,501$ nm) ve polidispersite indeksinin ($0,260 \pm 0,014$) elde edildiği yüksek basınçlı homojenizasyon parametreleri kullanılmıştır.

4.2.2. SLN Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve Karakterizasyonunun Değerlendirilmesi

Yüksek basınçlı homojenizasyon cihazında belirlenen parametreler ile formülasyon çalışmalarına devam edilmiştir. Pemetreksetin yanı sıra antisens oligonükleotid

ilavesi de yapılacağı için SLN'lerin hazırlanmasında farklı lipidler, farklı surfaktanlar denenerek enkapsülasyon etkinliği yüksek, partikül boyutu 200 nm'nin altında olan SLN formülasyonunun geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Çizelge 3.8'de görüldüğü gibi katı lipid olarak gliseril tripalmitat, trimristin ve stearik asit lipidleri kullanılarak pemetrekset yüklü nanopartiküller hazırlanmıştır. Stearik asitle hazırlanan S4 formülasyonda nano-boyuta inilememiştir. Xie ve ark.nın (2011) yaptıkları çalışmada da benzer olarak stearik asit ile hazırlanan SLN'ler daha büyük boyut ve boyut dağılımına sahip bulunmuştur. Bunun stearik asitin yüksek viskozitesi ve erime noktası ile bağlantılı olabileceği söylenmiştir. Lipidlerin erime noktasının yüksek olmasının daha az etkin homojenizasyon işlemine, dolayısıyla daha büyük partikül boyutu ve boyut dağılımına yol açabileceği belirtilmiştir. Gliseril tripalmitatla hazırlanan S2 formülasyonunun partikül boyutu ise çalışmamız için yüksek bulunmuştur ($385,6 \pm 21,52$). En küçük partikül boyutu ve polidispersite indeks trimristin kullanılarak hazırlanan S3 formülasyonu ile elde edilmiş, pemetrekset için en yüksek enkapsülasyon etkinliği ise gliseril tristearat ile hazırlanan S1 formülasyonu ile elde edilmiştir. Öncelikle gliseril tristearat içeren S1 formülasyonunda partikül boyutunun küçültülmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla hazırlanan, gliseril tristearat lipidi içeren S5, S6, S7 ve S8 formülasyonlarında (Çizelge 3.9) enkapsülasyon etkinliği yüksek nanopartiküller elde edilmesine rağmen partikül boyutu istenen seviyeye düşürülemedi. Bu nedenle katı lipid olarak trimristin kullanılarak formülasyon geliştirilme çalışmalarına devam edilmiştir. Trimristin kullanılarak hazırlanan SLN formülasyonunda emülgatör olarak kullanılan Tween 80 oranı %2'ye çıkarıldığında (S9) pemetreksetin enkapsülasyon etkinliğinin arttığı gözlenmiştir (Çizelge 3.10). Partikül boyutunun 200 nm'nin altında ölçülmesi ile bu formülasyonun antisens oligonükleotid ilavesi için uygun olabileceği düşünülmüştür.

Katyonik lipidler kullanılarak negatif yüklü antisens oligonükleotidlerin nanopartiküllere iyonik etkileşimle etkin bir şekilde yüklenmesi sağlanabilir. Bu amaçla S9 formülasyonuna katyonik lipid olarak DDAB ilave edilerek değerlendirilmiştir. DDAB, Çizelge 3.10'da görüldüğü gibi % 0,1-1 (a/h) aralığında 4 farklı konsantrasyonda formülasyona ilave edilmiştir. Kuo ve ark. (2009) lipid

fazına ilave ettikleri DDAB oranı %1'in üstünde olduğunda enkapsülasyon etkinliğine önemli bir etkisi olmadığını belirtmiştir. Asasutjarit ve ark. (2007) benzer şekilde DDAB içeren katyonik SLN formülasyonu hazırlayarak polianyonik pDNA ile kompleks oluşturma özelliğine formülasyon bileşiminin etkisini incelemiştir. Yapılan çalışmada DDAB'ın ilavesi ile partikül boyutunun ve pozitif yüzey yükünün arttığı belirtilmiştir. Formülasyonlarımızda da benzer şekilde DDAB konsantrasyonunun artması ile partikül boyutu da artış göstermiştir. En küçük partikül boyutu ve polidispersite indeks değeri DDAB konsantrasyonu %0,3 olan S11 formülasyonu ile elde edilmiştir ($135,7 \pm 1,485$ nm).

DDAB içeren SLN formülasyonlarında zeta potansiyeli değeri 30 mV'ye yakın ya da bu değerin üzerinde bulunmuştur. DDAB katyonik bir lipid olduğundan dolayı, formülasyonların zeta potansiyelini pozitif değere dönüştürmüştür. Zeta potansiyel değeri minimum ± 30 mV olduğunda partiküller arası itme kuvvetine bağlı olarak kolloidal sistemlerin agregasyon göstermediği ve stabil olarak disperse olabileceği belirtilmiştir (Celia ve ark., 2011; Xie ve ark., 2011). Ayrıca pozitif yüklü nanopartiküllerin negatif yüklü hücre membranıyla kolayca etkileşerek hücre stoplazmasına etkin maddenin geçişini artırabilecekleri söylenmiştir (Bozkir ve Saka, 2004). Aynı zamanda, DDAB'ın ilavesi hafif negatif yüke sahip olan etkin maddemiz pemetreksetin de %90'ın üzerinde enkapsülasyonunu sağlamıştır. S11 formülasyonu anti-miR-21 oligonükleotidi ilavesi ile tekrar hazırlanarak değerlendirilmiştir.

4.2.3. SLN Formülasyonlarından Etkin Maddenin İn Vitro Salımının Değerlendirilmesi

Pemetrekset suda çözünen bir madde olduğu için farklı lipidler kullanılarak hazırlanan SLN formülasyonlarından *in vitro* salımı hızlı gerçekleşmiştir (Şekil 3.4). Literatürde yer alan çalışmalarda gliseridlerin karbon zinciri uzunluğu ve sayısının, katı-lipid nanopartiküllerin *in vitro* salımının uzatılmasında büyük etkisi olduğu belirtilmiştir (Xie ve ark., 2011). Etoposid yüklü tripalmitin ($C_{51}H_{98}O_6$)

nanopartikülleri, gliseril distearat ($C_{39}H_{76}O_5$) ve gliseril monostearat ($C_{21}H_{42}O_4$) ile hazırlananlara göre daha uzun kontrollü salım etkisi oluşturmuştur (Reddy ve Murthy, 2005). Çalışmamızda da karbon zinciri uzunluğu ve karbon sayısı daha fazla olan gliseril tristearat lipidi ($C_{57}H_{110}O_6$) ile hazırlanan S1 formülasyonu, trimristin ($C_{45}H_{86}O_6$) ile hazırlanan S3 formülasyonuna göre nispeten daha yavaş etkin madde salımı sergilemiştir.

Partikül büyüklüğü sonuçlarına göre trimristin içeren SLN formülasyonu seçilmesine rağmen, *in vitro* salım hızı daha yavaş olduğu için gliseril tristearat ile hazırlanan SLN formülasyonunda partikül büyüklüğünü küçültmek için çalışmalar yapılmış, ancak istenen sonuç elde edilememiştir.

Gliseril tristearat içeren S1 formülasyonunda %1 olan Tween 80 oranı %2'ye çıkarıldığında (S6 formülasyonu) etkin maddenin açığa çıkan miktarının azaldığı ve salım hızının yavaşladığı görülmüştür (Şekil 3.5). Diğer formülasyonlarla karşılaştırıldığında salım hızının yavaşlamasından dolayı çalışmalara bu formülasyonla devam edilmiştir. Lipid faza ilave edilen lesitin etkin maddenin salımını yavaşlatmış, oleik asit ise *in vitro* salım hızını artırmıştır, ancak her iki formülasyonda da partikül boyutu 200 nm'den küçük olmadığı için kullanılamamıştır (Şekil 3.6).

Katı lipid olarak trimristin kullanıldığında gliseril tristearat ile benzer sonuçlar bulunmuştur. S9 formülasyonunda surfaktan oranının % 2'ye çıkarılması ile açığa çıkan etkin madde miktarı azalmıştır (Şekil 3.7). Andreozzi ve ark. (2013) çalışmamıza benzer şekilde hazırladıkları lipid nanopartiküllerden *in vitro* salım deneyi sonucunda çok düşük miktarda etkin madde çıkışı elde etmiştir. Araştırmacılar *in vivo* koşullarda fizyolojik enzimler özellikle lipazlar tarafından bu lipidlerin parçalandığını, ancak *in vitro* koşullarda katı-lipid matriksinin kırılmadığı için başlangıçtaki hızlı salımdan sonra etkin madde çıkışının olmadığını belirtmiştir. Bu durum, hazırladığımız SLN formülasyonlarında surfaktan oranı %1'den %2'ye çıkarıldığında gözlenmiştir. Surfaktan oranı arttığında etkin maddenin lipid yapı

içerisine daha çok girdiği sonucuna varılmıştır. %2 Tween 80 kullanılarak hazırlanan formülasyonda etkin madde salımı 8. saate kadar artış göstermiştir.

Trimristin kullanılarak hazırlanan katyonik SLN'lerde farklı DDAB oranlarının *in vitro* salıma etkisi incelendiğinde, DDAB'nin ilavesi ile açığa çıkan etkin madde miktarı artmış, aynı zamanda etkin maddenin salımı uzatılmıştır (Şekil 3.8). DDAB oranı % 0,3 olan S11 formülasyonundan etkin maddenin salımı 8. saate kadar uzatılmıştır. Partikül boyutu da uygun olan S11 formülasyonu anti-miR-21 oligonükleotidi ilavesi ile tekrar hazırlanarak değerlendirilmiştir.

4.2.4 MiR-21 Antisens Oligonükleotidinin S11 Kodlu SLN Formülasyonuna Yüklenmesi ve Formülasyonun İn Vitro Özellikleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

DDAB oranı % 0,3 olan S11 kodlu SLN formülasyonu anti-miR-21 ilave edilerek tekrar hazırlanmıştır (S11A). Anti-miR-21'in formülasyonlara yüklenip yüklenmediği agaroz jel elektroforezle teşhis edilmiştir. S11A formülasyonuna ait süpernatant agaroz jele uygulandığında herhangi bir bant oluşumunun görülmemesi, S11A formülasyonu uygulandığında ise anti-miR-21'e ait bantların oluşumu bize anti-miR-21'in katı-lipid nanopartikül formülasyonuna yüklendiğini göstermiştir (Şekil 3.9). S11A formülasyonunun yüzey yükünün pozitif olması nedeniyle, negatif yüke sahip anti-miR-21'in formülasyona iyonik etkileşimle yüklendiği düşünülmüştür. Formülasyonların uygulanmasıyla gözlenen bantların, serbest anti-miR-21'in uygulanması ile elde edilenlere benzer şekilde, uygulama yerinde kalmayıp sürüklenmesi, anti-miR-21'in katı-lipid-nanopartiküllerin yüzeyine yakın ve gevşek bağlarla bağlı olma ihtimalini düşündürmüştür. Benzer şekilde Vighi ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada pEGFP plasmidi ile hazırladıkları katyonik SLN formülasyonlarının oluşturduğu kompleksi agaroz jel elektroforezle analiz etmiştir. Fosfat-salin tamponunda disperse ederek uyguladıkları formülasyonda yer alan plasmidin, saf plasmidle benzer şekilde jelde sürüklenmesini oluşturan kompleksin stabil olmadığı şeklinde yorumlamışlardır.

Antisens oligonükleotidin ilavesi ile SLN'lerin partikül boyutunda, zeta potansiyelinde ve enkapsülasyon etkinliğinde azalma olmuştur (Çizelge 3.11). Siddiqui ve ark. (2010) hazırladıkları katyonik SLN formülasyonlarında antisens oligonükleotidin yüzeye bağlanması ile yüzey yükü nötralize olduğu için, antisens oligonükleotid oranı arttıkça zeta potansiyelinin azaldığını belirtmiştir. Çalışmamızda da benzer şekilde negatif yüklü anti-miR-21 ilavesi formülasyonun pozitif yükünü azaltmıştır. Anti-miR-21 ilavesi ile pemetreksetin enkapsülasyon etkinliği de azalmıştır. Her iki maddenin de negatif yüklü olması nedeniyle pozitif yüklü DDAB ile iyonik olarak etkileşerek yapıya bağlandığı, yapıda var olan DDAB miktarı aynı olduğu için anti-miR-21 ilavesi ile pemetreksetin bir miktarının enkapsüle olmadan kaldığı düşünülmüştür.

Ren ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada hazırladıkları formülasyona yükledikleri anti-miR-21 miktarının çok az olması nedeniyle etkin maddenin *in vitro* salımını çok az etkilediğini belirtmiştir. Çalışmamızda da anti-miR-21 ilavesi sonrasında pemetreksetin S11A kodlu SLN formülasyonundan *in vitro* salımı sadece pemetrekset içeren S11 formülasyonuna benzer bulunmuştur (Şekil 3.10).

4.2.5. S11 ve S11A Kodlu SLN Formülasyonlarının İn Vitro Salım Kinetiklerinin Değerlendirilmesi

S11 ve S11A kodlu SLN formülasyonlarının *in vitro* salım kinetikleri incelendiğinde sırasıyla Weibull, Korsmeyer-Peppas ve Higuchi kinetiklerine uyum görülmüştür (Çizelge 3.12). Weibull kinetiğinde yer alan şekil faktörü β değerinin 1'den küçük olması başlangıçta hızlı etkin madde salımı ve sonrasında hızla platoya ulaşıldığını göstermiştir. Yine Peppas kinetiğinde yer alan n değerlerinin 0,45'ten az ya da eşit olması ve Higuchi kinetiğine uyum görülmesi etkin maddenin lipid matristen salımının Fick difüzyon mekanizmasına uyduğunu, difüzyon kontrollü salım gerçekleştiğini göstermiştir.

4.2.6. S11 ve S11A Kodlu SLN Formülasyonlarının DSC Analizinin Değerlendirilmesi

Katyonik katı-lipid nanopartiküllerinin DSC termogramı incelendiğinde pemetrekset ve antisens oligonükleotid içermeyen formül 55°C erime sıcaklığında endotermik pik oluşturmuştur (Şekil 3.11). Bu görülen pikin trimristine ait olduğu, literatürdeki benzer sonuçlar ile doğrulanmıştır (Naguib ve ark., 2014; Thatipamula ve ark., 2011). Bu pikin nanopartikül formülasyonlarında görülme sebebi trimristinin nanopartikül yüzeyini kaplayan tabakayı oluşturmasındandır. Pemetreksete (146,54°C, 242,75°C, 279,71°C) ve anti-miR-21'e (32,21°C) ait piklerin formülasyonların DSC termogramında görülmemesi etkin maddelerin formülasyona amorf halde yüklendiğini ve homojen bir şekilde disperse olduğunu göstermiştir.

4.2.7. S11A Kodlu SLN Formülasyonunun TEM Analizinin Değerlendirilmesi

SLN formülasyonlarının morfolojisini incelemek amacıyla yapılan TEM analizi sonucunda S11A formülasyonunun küresel şekilde olduğu, boyutunun foton korelasyon spektroskopisiyle ölçülen ortalama partikül boyutuna ($124,9 \pm 1,579$ nm) yakın olduğu görülmüştür (Şekil 3.12).

4.2.8. Sterilizasyonun S11 ve S11A Formülasyonlarının İn Vitro Salımına Etkisi

Hücre kültürü çalışmaları için seçilen S11 ve S11A formülasyonlarının gama radyasyon ile sterilizasyonu sonrası etkin maddenin açığa çıkan miktarı yaklaşık olarak % 20 oranında azalmıştır (Şekil 3.13).

4.2.9. S11 ve S11A Formülasyonlarının Stabilitésinin Değerlendirilmesi

S11 ve S11A kodlu SLN formülasyonlarının +4°C’de 3 ay bekletilmesi sonucunda partikül boyutunda gözlenen artışın istatistiksel olarak anlamlı olmasına rağmen, 200 nm’nin altında kalması uygun bulunmuştur. Partikül boyutundaki artışın bekleme sırasında partiküllerin bir miktar agregasyona uğramasından kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. S11A formülasyonunun zeta potansiyeli pozitif değerinde azalma olmasına rağmen zeta potansiyeli değerinin +30 mV’in üzerinde bulunması formülasyonun 3 ay sonunda stabil olduğunu göstermiştir (Çizelge 3.13).

3 ay sonunda yapılan DSC analizi sonucunda pemetreksetin, S11 ve S11A kodlu SLN formülasyonlarının DSC termogramları başlangıçtaki DSC termogramları ile karşılaştırıldığında benzer noktalarda piklerin elde edilmesi formülasyonların stabilitésini koruduğunu göstermiştir (Şekil 3.14).

4.3. Polimerik Nanopartikül Formülasyonları Üzerinde Yapılan Ön Formülasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

PLGA, FDA tarafından parenteral sistemlerde kullanımı için onaylı bir polimer olması ve biyoparçalanabilir olması nedeniyle polimerik nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında tercih edilmiştir. Suda çözünen etkin maddeler için uygun hazırlama yöntemi su/yağ/su tipi çözücü buharlaştırma tekniği olduğu için formülasyonlar bu yöntemle hazırlanmıştır.

Nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında polimerin organik çözücüsü (diklorometan ve aseton), dış fazda kullanılan stabilizör (Tween 80, Pluronic PF127 ve PVA), dış faz sonikasyon süresi (1,2,3 dakika) değiştirilerek partikül boyutuna etkisi incelenmiştir. Organik çözücü olarak diklorometanın kullanıldığı formüllerde 200 nm’nin altına inilememiş, bu nedenle asetonun kullanılmasına karar verilmiştir. Organik çözücü olarak asetonun kullanıldığı, dış fazda PF127 içeren ve sonikasyon

süresi 2 dakika olan formülasyonlara partikül boyutunun 200 nm'nin altında elde edilebilmesi nedeniyle etkin madde ilavesi yapılmıştır. Bu amaçla hazırlanan P6-P9 formülasyonlarında enkapsülasyon etkinliğinin %1 civarında elde edilmesi nedeniyle enkapsülasyon etkinliğini artırmaya yönelik çalışmalar yapılmıştır. İç faz miktarı (0,5, 1 ml), iç faz içeriği (pH 7,4 PBS, %1 PF127, %10 dekstran, pH7,4 PBS ile %1 PF127, %10 dekstran ve Tween 80 kombinasyonları), dış faz pH'sı (pH 4,5 ve 9), dış faz hacmi (10, 20 ve 50 ml) değiştirilerek formülasyon çalışmaları yapılmıştır. Çizelge 3.14, Çizelge 3.15, Çizelge 3.16 ve Çizelge 3.17'da bulguları yer alan tüm bu çalışmalar enkapsülasyon etkinliğinde bir artış sağlamamıştır

Dış fazda % 1 PF127 içeren, iç fazda pH7.4 PBS/ Tween 80 (0,8 mL/0,2 mL) içeren P15 formülasyonu enkapsülasyon etkinliğinde önemli bir artış sağlamamakla birlikte ($1,223 \pm 0,312$), partikül boyutu en küçük bu formülasyonda elde edilmiştir ($172,9 \pm 5,346$ nm). Aynı zamanda bu formülasyonun zeta potansiyeli değeri de diğer formülasyonlara göre yüksek bulunmuştur ($-32,4 \pm 1,99$ mV).

4.4. PEG-PLGA İçeren Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Değerlendirilmesi

Enkapsülasyon etkinliğinin ve etkin madde yükleme kapasitesinin istenen şekilde artırılabilmesi nedeniyle ilk olarak P15 formülasyonunda PLGA yerine PEG-PLGA kullanılarak formülasyon geliştirilmesi amaçlanmıştır. PLGA'ya kovalan olarak bağlı bulunan PEG hidrofilik özelliğinden dolayı suda çözünen etkin maddelerin nanopartikül formülasyonlarına yüklenmesini artırmaktadır. Polimerik fazda PEG-PLGA (100 ve 200 mg), PEG-PLGA'nın PCL (%10 ve %40) ile kombinasyonu, PEG-PLGA'nın DDAB (%10) ile kombinasyonu kullanılarak yeni formülasyonlar hazırlanmıştır (Çizelge 3.18). PEG-PLGA'nın %10 PCL ile kombinasyonu partikül boyutunu artırmış, aynı zamanda enkapsülasyon etkinliğini de artırmıştır. PEG-PLGA'nın %40 PCL ile kombinasyonu ise partikül boyutu ve enkapsülasyon etkinliğini %10 PCL içeren formüle göre daha fazla iyileştirmemiştir. Katyonik bir surfaktan olan DDAB pozitif yükü nedeniyle DNA ve nükleotidler ile elektrostatik

olarak etkileşmektedir. Dawson ve ark.nın (2004) yaptığı çalışmada DNA'nın PLGA-DDAB nanopartiküllerine yüklenmesi ile transfeksiyon etkinliğinde 50 kat artış olduğu belirtilmiştir. Anti-miR-21 oligonükleotidinin PEG-PLGA nanopartikül formülasyonuna enkapsülasyonunu artırmak üzere formülasyonda DDAB bulunmasının avantajlı olduğu düşünüldüğü için ve enkapsülasyon etkinliği ($68,08 \pm 5,00$) en yüksek bu formülasyonda elde edildiği için polimerik fazda %10 DDAB içeren partikül boyutu $43,65 \pm 1,252$ nm olan PEG5 formülasyonu seçilmiştir. Kolloidal taşıyıcıların zeta potansiyeli mutlak değeri 30 mV'nin üzerinde olduğunda iyi stabilite sağladığı bilinmektedir. Ancak zeta potansiyeli kritik değer altında olmasına rağmen, sterik stabilite tabakası yeterince kalınsa nanopartiküllerin benzer uzun süreli stabiliteye sahip olabileceği belirtilmiştir (Jia ve ark., 2012). Olivier ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada, PLA nanopartiküllerine göre PEG-PLA nanopartiküllerinin zeta potansiyeli yüzeyinin PEG ile kaplı olması nedeniyle daha düşük bulunmuştur. PEG5 formülasyonunda benzer şekilde sterik stabilizer görevi yapan PEG'in zeta potansiyelini düşürdüğü görülmüştür. Bunun yanı sıra PEG5 formülasyonunun yüzey yükünün nötrale yakın olmasının kan dolaşımından hızlı atılıma yol açan serum proteinleri ile etkileşimi azaltarak partikülün biyoyararlanımını artırabileceği düşünülmüştür (Costa ve ark.,2013).

4.4.1. PEG-PLGA İçeren Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının İn Vitro Salım Çalışmalarının Değerlendirilmesi

PEG-PLGA polimeri kullanılarak hazırlanan formülasyonlardan etkin maddenin *in vitro* salım hızı ile saf etkin maddenin *in vitro* salım hızı grafiğe geçirildiğinde formülasyonların etkin maddenin salım hızını yavaşlattığı görülmüştür (Şekil 3.15). PEG3, PEG4 ve PEG5 formülasyonlarının *in vitro* salım profilleri benzer bulunmuş, bu nedenle en yüksek enkapsülasyon etkinliği elde edilmiş olan %10 DDAB içeren PEG5 formülasyonuna antisens oligonükleotid ilavesi yapılmıştır.

4.4.2. MiR-21 Antisens Oligonükleotidinin PEG5 Formülasyonuna Yüklenmesi ve Formülasyonun İn Vitro Özellikleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

PEG5 kodlu polimerik nanopartikül formülasyonu seçilerek anti-miR-21 oligonükleotidi ilavesiyle tekrar hazırlanmıştır. Anti-miR-21'in formülasyonlara yüklenip yüklenmediği agaroz jel elektroforezle teşhis edilmiştir. Anti-miR-21 içeren PEG5A nanopartikül formülasyonuna ait süpernatant agaroz jele uygulandığında herhangi bir bant oluşumu gözlenmezken, PEG5A formülasyonu uygulandığında bantların oluşumu bize anti-miR-21'in formülasyonlara yüklendiğini, formülasyonların uygulama yerinde kalıp sürüklenmemesi ise anti-miR-21'in nanopartikül yapısından kolay ayrılmadığını göstermiştir (Şekil 3.16).

PEG5 kodlu polimerik nanopartikül formülasyonuna anti-miR-21 ilavesi ile hazırlanan PEG5A kodlu formülasyonda partikül boyutu ve polidispersite indeks değerinde artış görülmesine rağmen elde edilen $53,18 \pm 3,755$ nm partikül boyutu 100 nm'nin de altındadır ve çalışmamız için uygun bulunmuştur. PEG5A kodlu formülasyonun zeta potansiyeli değeri PEG5 formülasyonuna benzer bulunmuştur. Anti-miR-21 oligonükleotidi de negatif yüklü olduğu ve miktarı çok az olduğu için formülasyonun negatif olan yüzey yükü üzerine önemli bir etkisi olmadığı düşünülmüştür. PEG5A formülasyonunda, pemetreksetin enkapsülasyon etkinliği ve in vitro salım profili PEG5 formülasyonuna benzer bulunmuştur (Çizelge 3.19, Şekil 3.17).

4.4.3. PEG5 ve PEG5A Formülasyonlarının İn Vitro Salım Kinetiklerinin Değerlendirilmesi

PLGA içeren partiküler ilaç taşıyıcı sistemlerden etkin madde salımında karşılaşılan iki temel mekanizma difüzyon ve parçalanma/erozyondur (Fredenberg ve ark., 2011).

PEG5 ve PEG5A polimerik nanopartiküllerinden etkin madde salımı sırasıyla Weibull, Korsmeyer-Peppas ve Higuchi kinetiklerine uyum göstermiştir (Çizelge 3.20). Weibull kinetiğinde yer alan şekil faktörü β değerinin 1den küçük olması başlangıçta hızlı etkin madde salımı ve sonrasında hızla platoya ulaşıldığını göstermiştir. PEG5 formülasyonunda Korsmeyer-Peppas kinetiğinde yer alan n değerinin 0,45'in altında olması ve Higuchi kinetiğine uyum görülmesi matris yapısından etkin maddenin difüzyonla salındığını göstermiştir. Aynı formülasyona anti-miR-21 ilavesinden sonra ise Higuchi kinetiğine uyum görülmesi matris tipi yapıdan başlıca difüzyonla salımın gerçekleştiğini, ancak Korsmeyer-Peppas kinetiğinde yer alan n değerinin 0,45-0,89 arasında olması, etkin madde salımında difüzyonun yanı sıra polimer zincirlerinin gevşemesine bağlı olarak erozyonun da etkili olduğunu göstermiştir.

4.4.4. PEG5 ve PEG5A Formülasyonlarının DSC Analizinin Değerlendirilmesi

PEG-PLGA nanopartiküllerinin DSC termogramı incelendiğinde pemetrekset ve anti-miR-21 içermeyen boş formülde, pemetrekset içeren PEG5 formülünde ve pemetrekset ve anti-miR-21 içeren PEG5A formülünde sadece PEG-PLGA'ya ait DSC piki görülmüştür. Etkin maddeye ait piklerin nanopartikül formülasyonlarının DSC termogramında görülmemesi, formülasyona amorf halde yüklendiğini, homojen bir şekilde disperse olduğunu göstermiştir (Şekil 3.18).

4.4.5. PEG-PLGA Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının TEM Analizinin Değerlendirilmesi

PEG-PLGA içeren polimerik nanopartikül formülasyonunun morfolojisini incelemek amacıyla yapılan TEM analizi sonucunda nanopartiküllerin küresel şekilde olduğu, boyutunun foton korelasyon spektroskopisiyle ölçülen ortalama partikül boyutuna ($53,18 \pm 3,755$ nm) yakın olduğu görülmüştür. TEM fotoğrafında PEG zincirlerinin oluşturduğu dış tabaka gözlemlenmiştir (Şekil 3.19).

4.4.6. Sterilizasyonun PEG5 ve PEG5A Formülasyonlarının *İn Vitro* Salımına Etkisi

Hücre kültürü çalışmaları için seçilen PEG5 ve PEG5A formülasyonları gama radyasyon ile sterilize edildikten sonra sterilizasyonun etkin maddenin *in vitro* salımına etkisi incelenmiştir. Sterilizasyon sonrasında salınan etkin madde yüzdesi azalmıştır (Şekil 3.20).

4.4.7. PEG5 ve PEG5A Formülasyonlarının Stabilitesinin Değerlendirilmesi

PEG5 ve PEG5A kodlu polimerik nanopartikül formülasyonlarının +4°C’de 3 ay bekletilmesi sonucunda partikül boyutlarında gözlenen artışın istatistiksel olarak anlamlı olmasına rağmen, 100 nm’nin altında kalması uygun bulunmuştur, bekleme süresinde partiküllerin agrege olmaya başlamasından kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Formülasyonların zeta potansiyeli negatif değerinde 3 ay sonunda hafif bir artış görülmüştür (Çizelge 3.21).

3 ay sonunda yapılan DSC analizi sonucunda pemetreksetin, PEG5 ve PEG5A kodlu formülasyonların DSC termogramı incelendiğinde önemli bir değişim olmadığı görülmüş, formülasyonların stabilitesini koruduğu belirlenmiştir (Şekil 3.21).

4.5. Polimer-Lipid Hibrit Nanopartikül Formülasyonlarının Geliştirilmesine Yönelik Yapılan Çalışmaların Değerlendirilmesi

P15 formülasyonundan hareketle polimerik fazın içeriği değiştirilerek hazırlanan ikinci formülasyon grubu polimer-lipid hibrit nanopartikülleridir (Çizelge 3.22). Mandal ve ark. (2013), etkin maddenin hem lipid kabuğa hemde polimerik çekirdeğe yüklenebilmesi nedeniyle lipid-polimer hibrit nanopartiküllerin etkin madde yükleme kapasitesini artırdığını belirtmiştir. Literatürden hareketle hazırlanan H1 kodlu

polimer-lipid hibrit formülasyonu ile hem partikül boyutu küçülmüş ($153,9 \pm 11,63$ nm), hemde P15 formülasyonuna göre enkapsülasyon etkinliği 10 kattan fazla artış göstermiştir ($\%14,53 \pm 0,307$). Bunun sebebinin Cheow ve Hadinoto (2011)'nin çalışmasında da belirtildiği gibi partikülü saran lipid kaplamasının etkin maddenin sulu faza sızmasını engelleyen bariyer görevi görmesi olduğu düşünülmüştür. H1 kodlu polimer-lipid hibrit formülasyonunda 8,5:1,5 olan lesitin:trimristin molar oranının 1,5:8,5 olarak değiştirilerek hazırlandığı H2 kodlu formülasyonda partikül boyutunun arttığı görülmüştür. Bu sonuç, polimer-lipid hibrit formülasyonunda partikül boyutunun küçülmesinde lesitin daha etkin olduğunu göstermiştir. PLGA'nın %10'unun PCL polimeri ile değiştirilmesi partikül boyutunu 100 nm'nin altına düşürmüş ($91,31 \pm 1,134$ nm), aynı zamanda enkapsülasyon etkinliğini 2 katından fazla artırmıştır ($\%30,37 \pm 0,113$). H4 formülasyonunda PLGA'nın %40'unun PCL polimeri ile değiştirilmesi ise partikül boyutunu ve enkapsülasyon etkinliğini daha fazla iyileştirmemiştir. En küçük partikül boyutu ve en yüksek enkapsülasyon etkinliğinin elde edildiği H3 formülasyonu seçilmiştir. Zeta potansiyel değeri minimum ± 30 mV olduğunda kolloidal sistemlerin agregasyon göstermediği ve stabil nanosüspansiyon oluşumunu sağladığı belirtilmiştir (Celia ve ark., 2011). H3 formülasyonunun zeta potansiyeli değerinin 30 mV'nin üstünde olması nedeniyle stabil bir dispersiyon olduğu sonucuna varılmıştır. H3 formülasyonu pemetreksetin yanı sıra anti-miR-21 oligonükleotidi de ilave edilerek tekrar hazırlanmış ve değerlendirilmiştir.

4.5.1 Polimer-Lipid Hibrit Nanopartikül Formülasyonlarının İn Vitro Salım Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonlarından etkin maddenin *in vitro* salımı ile saf etkin maddenin *in vitro* salım hızı grafiğe geçirildiğinde formülasyonların etkin maddenin açığa çıkış hızını yavaşlattığı görülmüştür (Şekil 3.22). %10 PCL içeren H3 formülasyonu ile %40 PCL içeren H4 formülasyonunun *in vitro* salım grafikleri benzer bulunmuş, partikül boyutu ve enkapsülasyon etkinliği parametreleri

ile birlikte değerlendirildiğinde H3 formülasyonu seçilerek antisens oligonükleotid ilavesi yapılmıştır.

4.5.2. MiR-21 Antisens Oligonükleotidinin H3 Formülasyonuna Yüklenmesi ve Formülasyonun *İn Vitro* Özellikleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

H3 kodlu polimer-lipid hibrit formülasyonu seçilerek anti-miR-21 oligonükleotidi ilavesiyle tekrar hazırlanmıştır. Anti-miR-21'in formülasyonlara yüklenip yüklenmediği agaroz jel elektroforezle teşhis edilmiştir. Anti-miR-21 oligonükleotidi içeren H3A nanopartikül formülasyonuna ait süpernatant agaroz jele uygulandığında herhangi bir bant oluşumu görülmemesi, H3A formülasyonu uygulandığında bantların oluşumu bize anti-miR-21'in formülasyonlara yüklendiğini, formülasyonların uygulama yerinde kalıp sürüklenmemesi ise anti-miR-21'in nanopartikül yapısından kolay ayrılmadığını göstermiştir (Şekil 3.23).

H3 kodlu polimer-lipid hibrit formülasyonuna anti-miR-21 ilavesi ile hazırlanan H3A kodlu formülasyonda partikül boyutu, polidispersite indeks ve zeta potansiyeli değerleri H3 formülasyonuna benzer bulunmuştur. Anti-miR-21 oligonükleotidi de negatif yüklü olduğu ve miktarı çok az olduğu için formülasyonun negatif olan yüzey yükü üzerine önemli bir etkisi olmadığı düşünülmüştür. Anti-miR-21 ilavesi sonrası pemetreksetin enkapsülasyon etkinliğinde hafif bir artış görülmüştür (Çizelge 3.23). Anti-miR-21 ilavesi polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonundan pemetreksetin *in vitro* salım profilini değiştirmemiştir (Şekil 3.24).

4.5.3. H3 ve H3A Formülasyonlarının *İn Vitro* Salım Kinetiklerinin Değerlendirilmesi

H3 ve H3A polimer-lipid hibrit nanopartiküllerinden etkin madde salımı sırasıyla Weibull, Higuchi ve Korsmeyer-Peppas kinetiklerine uyum göstermiştir (Çizelge 3.24). Weibull kinetiğinde yer alan şekil faktörü β değerinin 1den küçük olması

başlangıçta hızlı etkin madde salımı ve sonrasında hızla platoya ulaşıldığını göstermiştir. Higuchi kinetiğine uyum görülmesi matris tipi yapıdan başlıca difüzyonla salımın gerçekleştiğini, Korsmeyer-Peppas kinetiğinde yer alan n değerlerinin 0,45-0,89 arasında olması ise etkin madde salımında difüzyonun yanı sıra polimer zincirlerinin gevşemesine bağlı olarak erozyonun da etkili olduğunu göstermiştir.

4.5.4. H3 ve H3A Formülasyonlarının DSC Analizinin Değerlendirilmesi

Polimer-lipid hibrit nanopartiküllerinin DSC termogramı incelendiğinde pemetrekset ve antisens oligonükleotid içermeyen formül 48.34°C erime sıcaklığında endotermik pik oluşturmuştur. Literatürdeki verilere bakıldığında PLGA'nın bu noktada pik verdiği belirlenmiştir (Terry ve ark., 2014; Alimohammadi ve ark., 2012). Bu pikin nanopartikül formülasyonlarında görülme sebebi PLGA'nın nanopartikül yüzeyini kaplayan tabakayı oluşturmasındandır. Pemetreksete (146,54°C, 242,75°C, 279,71°C) ve anti-miR-21'e (32,21°C) ait piklerin formülasyonların DSC termogramında görülmemesi etkin maddelerin formülasyona amorf halde yüklendiğini, homojen bir şekilde disperse olduğunu göstermiştir (Şekil 3.25).

4.5.5. Polimer-Lipid Hibrit Nanopartikül Formülasyonlarının TEM Analizinin Değerlendirilmesi

Polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonunun morfolojisi incelemek amacıyla yapılan TEM analizi sonucunda nanopartiküllerin küresel şekilde ve birbirlerinden ayrı şekilde disperse olduğu ve agregasyon olmadığı belirlenmiştir. Nanopartiküllerin boyutlarının foton korelasyon spektroskopisiyle ölçülen ortalama partikül boyutuna ($93,98 \pm 1,887$ nm) yakın olduğu görülmüştür (Şekil 3.26).

4.5.6. Sterilizasyonun H3 ve H3A Formülasyonlarının İn Vitro Salımına Etkisi

Hücre kültürü çalışmaları için seçilen H3 ve H3A formülasyonları gama radyasyon ile sterilize edildikten sonra etkin maddenin *in vitro* salımına etkisi incelenmiştir. Dillen ve ark. (2004) tarafından hazırlanan siprofloksasin içeren PLGA nanopartikülleri ^{60}Co kaynağı kullanarak gama radyasyonla 25 kGy dozda sterilize edilmiştir. Gama sterilizasyondan sonra polimerlerin viskoelastik özelliklerinde bir değişiklik olmadığı, ancak salınan etkin madde yüzdesinde artış olduğu görülmüştür. Çalışmamızda bunun aksine sterilizasyon sonrası salınan etkin madde yüzdesi azalmıştır (Şekil 3.27).

4.5.7. H3 ve H3A Polimer Lipid Hibrit Nanopartikül Formülasyonlarının Stabilitésinin Değerlendirilmesi

H3 ve H3A kodlu polimerik nanopartikül formülasyonlarının $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 3 ay bekletilmesi sonucunda her iki formülasyonun da partikül boyutunun arttığı görülmüştür. Formülasyonların partikül boyutunun artmasına rağmen, 200 nm'nin altında kalması uygun bulunmuştur. Formülasyonların zeta potansiyeli değerlerinde azalma olmasına rağmen -30 mV değerine yakın ya da bu değerin üzerinde olması 3 ay sonunda stabil olduklarını göstermiştir (Çizelge 3.25).

3 ay sonunda yapılan DSC analizi sonucunda pemetreksetin, H3 ve H3A kodlu formülasyonların DSC termogramı incelendiğinde önemli bir değişim olmadığı görülmüş, formülasyonların stabilitesini koruduğu belirlenmiştir (Şekil 3.28).

4.6. Hücre Kültürü Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Çalışmamızda hazırladığımız formülasyonların hücre kültürü çalışmaları U87MG insan glioblastoma hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. U87MG insan glioblastoma hücreleri yaygın olarak çalışılan IV. derece gliyom hücresidir. Son 40 yıldır bu hücre dizisi ile çalışılmış 1700'ün üstünde yayın bulunmaktadır (Vazquez-Blomquist ve ark, 2012).

4.6.1. Sitotoksosite Çalışmalarının Değerlendirilmesi

4.6.1.1. Pemetreksetin U87MG İnsan Glioblastoma Hücrelerine Sitotoksitesinin İncelenmesi

Lu ve ark.nın (2012) melanom hücrelerine uyguladıkları pemetrekset dozlarından hareketle belirlenen 0,01-100 µg/ml aralığında 5 farklı konsantrasyondaki pemetrekset çözeltisi 24, 48 ve 72 saat boyunca U87MG hücrelerine uygulandığında hücre canlılığında doza veya zamana bağlı orantılı bir azalma görülmemiştir (Şekil 3.30). Elde edilen bu sonucun doz artsa bile saf pemetreksetin U87MG hücrelerine alınamamasından kaynaklı olabileceği düşünülmüştür.

4.6.1.2. Formülasyonların U87MG İnsan Glioblastoma Hücrelerine Sitotoksitesinin İncelenmesi

Pemetrekset, boş formülasyonlar, pemetrekset içeren formülasyonlar ve hem pemetrekset hem de anti-miR-21 içeren formülasyonlar 0,1 ve 1 µg/ml konsantrasyonda ve 72 saat süreyle U87MG hücrelerine uygulanarak sitotoksitesileri değerlendirilmiştir.

Boş formülasyonlar kıyaslandığında pegile polimerik nanopartikül formülasyonlarının hücre canlılığı % 90'ın üzerindedir ve etkin madde içermediğinde hücrelere en az zarar veren formülasyon grubu olarak görülmüştür.

SLN formülasyonlarında hem pemetrekset hem anti-miR-21 içeren S11A kodlu formülasyon pemetrekset çözeltisine göre hücre canlılığını 0,1 µg/ml dozda %7,7 oranında, 1µg/ml dozda %9,5 oranında azaltmıştır (Şekil 3.31).

Hem pemetrekset hem anti-miR-21 içeren PEG5A formülasyonu pemetrekset çözeltisine göre hücre canlılığını 0,1 µg/ml dozda %4,2 oranında, 1µg/ml dozda %1 oranında azaltmıştır (Şekil 3.32).

Polimer-lipid hibrit nanopartikülleri ise boş formülasyonların hücre canlılığı ile etkin madde içeren formülasyonların hücre canlılığı arasında en fazla farkın bulunduğu formülasyon grubudur. Şekil 3.33'te görüldüğü gibi hücre alım deneyi sonucunda hücreler tarafından en yüksek oranda alınan H3A formülasyonunda en düşük hücre canlılığı elde edilmiştir ve pemetrekset ve anti-miR-21 içeren bu formülasyon hücre canlılığını boş formülasyona göre % 26,8 oranında, pemetrekset çözeltisine göre %17,2 oranında, pemetrekset içeren H3 formülasyonuna göre ise %14,3 oranında azaltmıştır. 0,1 µg/ml dozda ise H3 formülasyonu H3A formülasyonuna göre hücre canlılığını %7 oranında daha çok azaltmıştır. Bunun sebebinin dozun 10 kat azaltılması ile anti-miR-21 miktarının da 10 kat azalması ile etkinliğini gösterememesi olduğu düşünülmüştür.

Yapılan son çalışmalar avantajlı *in vivo* farmakokinetikleri ve tümörde birikmeleri nedeniyle sistemik ilaç verilmesi için hidrodinamik çapı 100 nm ya da daha az olan partiküllerin istendiğini belirtmiştir (Clawson ve ark., 2011). Formülasyonlarımız arasında partikül boyutu 100 nm'den az olan H3A kodlu polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonumuzda en düşük hücre canlılığı elde edilmiştir. Bunun yanı sıra partikül boyutu 50 nm civarında olan PEG5 ve PEG5A kodlu pegile polimerik nanopartikül formülasyonlarımızda hücre canlılığı en yüksek bulunmuştur. Bunun sebebinin PEG tabakasının formülasyonun dolaşımdaki yarıömürünü

artırmakta yararlı olmasına rağmen, hücre membranıyla etkileşime karşı da sterik bariyer oluşturması nedeniyle nanopartikülün hücre içine girişini ya da endositozla alındığında endozomdan kurtuluşunu engelleyerek partiküllerin hedef dokuya ulaşmasının önüne geçmesi olduğu düşünülmüştür (Clavson ve ark., 2011; Saka ve Bozkır, 2012).

Qian ve ark. (2012) U87 glioblastoma hücrelerinde anti-miR-21'in temel hedefi olarak düşünülen PTEN fonksiyonunun kaybolduğunu, STAT3'ün miR-21'in etkisini belirleyen temel protein olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan çalışmada STAT3'ün ilaç rezistansını, tümör hücrelerinin çoğalmasını ve apoptozunu sağladığı söylenmiştir. Ayrıca, STAT3 miR-21'in direk hedefi olmadığı için U87 hücrelerinde kemoterapi ve anti-miR-21'in sinerjik etkisinin daha uzun zaman periyodunda gözlenebileceği belirtilmiştir. Lu ve ark. (2012) ise pemetrekset içeren nanopartikül formülasyonlarının sitotoksitesite testinde önemli fark görülmemesini etkin maddenin nanopartikül içerisine enkapsülasyonu nedeniyle hücre ortamında yavaş artış göstermesi olduğunu belirtmiştir. Çalışmamızda 72. saatte yapılan sitotoksitesite analizi ile bazı formülasyonlarda pemetrekset ve anti-miR-21'in sinerjik etkisi çok net görülememiştir. Literatürdeki benzer sonuçlara dayanarak formülasyonların sitotoksitesitesinin daha uzun zaman periyodunda daha etkin gözleneceği düşünülmektedir.

4.6.2. Hücresel Alım Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Pemetrekset çözeltisi, pemetrekset içeren nanopartikül formülasyonları ve hem pemetrekset hem de anti-miR-21 içeren nanopartikül formülasyonlarının U87MG hücreleri ile kültürlenmesi sonucunda saf pemetrekset çözeltisinin hücresel alımı % $6,53 \pm 0,203$ olarak bulunmuştur. SLN'ler (S11, S11A), pegile nanopartikül formülasyonları (PEG5, PEG5A) ve polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonlarının (H3, H3A) her üçünde de pemetreksetin hücresel alımı önemli ölçüde artmıştır. Anti-miR-21'in ilavesi SLN ve polimer-lipid hibrit formülasyonlarında pemetreksetin hücresel alımını belirgin bir şekilde artırırken,

pegile polimerik nanopartikül formülasyonlarında anti-miR-21'in etkisi çok net görülememiştir (Şekil 3.34).

4.6.3. Hücresel Alımın Konfokal Mikroskop Görüntüleri ile Değerlendirilmesi

Lazer taramalı konfokal mikroskop analizinde hücre çekirdeği DAPI ile boyanmıştır ve mavi renkli floresan vermektedir. FAM-anti-miR-21 ise konfokal görüntüde yeşil floresan özellik göstermektedir. Çalışmamızda anti-miR-21 saf halde uygulandığında hücrelerin hem çekirdeğinde hem de stoplazmasında yer aldığı görülmüştür (Şekil 3.35). Benzer şekilde Corsten ve ark.nın (2007) yaptığı çalışmada da U87 insan glioblastoma hücrelerinde miR-21 antisens oligonükleotidi hem stoplazmada hem de çekirdekte görülmüştür.

Costa ve ark (2013) ise anti-miR-21 yüklü lipozomları U87 glioblastoma hücrelerine uyguladıklarında anti-miR-21'in hücre stoplazmasında yer aldığını konfokal mikroskop ile görüntülemiştir. Aynı şekilde Qian ve ark. (2012) da miR-21 inhibitörü ile hazırladıkları PAMAM polipleksinin U87 hücrelerinin stoplazmasında yer aldığını görmüştür. Anti-miR-21 içeren S11A kodlu SLN formülasyonu benzer şekilde stoplazmada ve çekirdekte yer almıştır (Şekil 3.36). Bunun yanı sıra, anti-miR-21 içeren PEG5A kodlu polimerik nanopartikül formülasyonunun ve H3A kodlu polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonunun hücrelerin çekirdeğinde daha belirgin olarak yer aldığı, formülasyonların anti-miR21'in hücre çekirdeğine girişini artırdığı belirlenmiştir (Şekil 3.37 ve Şekil 3.38).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kemoterapiye yüksek derecede dirençli bir tümör olan glioblastomanın baskılanması ve tedavisine yönelik hazırlanan farmasötik nanopartikül formülasyonlarının tasarımı ve değerlendirilmesi ile ilgili bu tez çalışmasında şu sonuçlar elde edilmiştir:

- Dirençli tümörlere karşı ümit verici bir kemoterapötik ajan olan pemetrekset ile miR-21'in baskılanması amacıyla kullanılan anti-miR-21 oligonükleotidi kombine edilerek nanopartikül formülasyonlarına etkin bir şekilde yüklenmeleri sağlanmıştır.
- İlaç endüstrisinde intravenöz nanoemülsiyonlar için büyük ölçekli üretim metotlarından biri olan yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi ile SLN formülasyonları geliştirilmiştir. SLN formülasyonlarının hazırlanmasında FDA tarafından onaylı GRAS statüsünde yer alan farklı lipidler denenmiş, trimristin lipidi ile partikül boyutu 200 nm'nin altında olan SLN'ler elde edilmiştir.
- Pemetreksetin enkapsülasyon etkinliği ve formülasyonların partikül boyutu sonuçları göz önünde bulundurularak seçilen S11 kodlu katyonik SLN formülasyonuna negatif yüklü anti-miR-21 enkapsüle edilmiş, agaroz jel elektroforez ile enkapsülasyonu doğrulanmıştır. Anti-miR-21'in enkapsülasyonu için katyonik SLN formülasyonunda yer alan DDAB, pemetreksetin de %90'ın üzerinde enkapsülasyonunu sağlamıştır.
- S11 ve S11A kodlu SLN formülasyonları ile pemetreksetin in vitro salımı 8 saate uzatılmış, yapılan kinetik değerlendirmeler sonucunda salımın difüzyonla gerçekleştiği belirlenmiştir.
- Pegile polimerik nanopartikül formülasyonları ve polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında FDA tarafından parenteral yolla kullanımı onaylanmış olan PEG-PLGA ve PLGA polimerleri kullanılmış, partikül boyutu 100

nm'nin altında olan nanopartiküller su/yağ/su tipi emülsifikasyon çözücü buharlaştırma tekniği ile hazırlanmıştır.

- Pemetrekset yüklü formülasyonların fizikokimyasal özellikleri incelenerek PEG5 ve H3 formülasyonlarına anti-miR-21'in enkapsülasyonuna karar verilmiştir. Anti-miR-21'in formülasyonlara enkapsülasyonu agaroz jel elektroforez ile teşhis edilmiştir.

- PEG5, PEG5A, H3 ve H3A formülasyonları ile pemetreksetin in vitro salımı 8 saate uzatılmış, yapılan kinetik değerlendirmeler sonucunda in vitro salımın PEG5 formülasyonunda difüzyonla gerçekleştiği, PEG5A, H3 ve H3A formülasyonlarında ise difüzyonla birlikte erozyonun da in vitro salımda etkili olduğu görülmüştür.

- Hücre kültürü çalışmaları için seçilen S11, S11A, PEG5, PEG5A, H3 ve H3A kodlu formülasyonlar gama radyasyonla sterilize edilmiş, sterilizasyon sonrasında in vitro salımın bir miktar azaldığı görülmüştür.

- S11, S11A, PEG5, PEG5A, H3 ve H3A kodlu formülasyonların +4°C'de 3 ay süreyle bekletilmesi sonucu stabilitelerini koruduğu belirlenmiştir.

- Pemetrekset tek başına çözelti şeklinde U87MG hücrelerine uygulandığında hücre canlılığında doza veya zamana bağlı orantılı bir azalma görülmemiş, hücresel alım deneyi sonucunda pemetreksetin U87MG hücrelerine alımının çok düşük olduğu ($6,53 \pm 0,203$) belirlenmiştir.

- PEG5 ve PEG5A kodlu pegile polimerik nanopartikül formülasyonlarında hücre canlılığında belirgin bir azalma görülememiştir. Bunun PEG tabakasının hücre membranıyla etkileşime karşı sterik bariyer oluşturması nedeniyle olduğu düşünülmüştür.

- SLN'ler, pegile polimerik nanopartiküller ve polimer-lipid hibrit nanopartikülleri karşılaştırıldığında U87MG hücrelerine karşı en düşük hücre canlılığı polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonunun (H3A) uygulanması ile elde edilmiştir.
- Pemetrekset çözeltisi ile karşılaştırıldığında, SLN'ler (S11, S11A), pegile nanopartikül formülasyonları (PEG5, PEG5A) ve polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonlarının (H3, H3A) pemetreksetin hücresel alımını önemli ölçüde artırdığı görülmüştür. Anti-miR-21'in ilavesi SLN ve polimer-lipid hibrit formülasyonlarında pemetreksetin hücresel alımını belirgin bir şekilde artırırken, pegile polimerik nanopartikül formülasyonlarında anti-miR-21'in etkisi çok net görülememiştir.
- En düşük hücre canlılığı oluşturan H3A formülasyonunun hücresel alım deneyinde hücreler tarafından en yüksek oranda ($\% 78,9 \pm 1,87$) alınan formülasyon olduğu tespit edilmiştir.
- Konfokal mikroskop analizi sonuçlarına göre anti-miR-21 yüklü S11A formülasyonunun hücrelerin hem çekirdeğinde hem de stoplazmasında yer aldığı, PEG5A ve H3A formülasyonlarının ise hücrelerin çekirdeğinde daha belirgin olarak yer aldığı görülmüştür.
- Hazırlanan tüm nanopartikül formülasyon grupları üzerinde yapılan in vitro karakterizasyon ve hücre kültürü çalışmaları sonucunda H3A polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonu ile bu tez çalışmasının hedeflenen amacına yönelik en başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Tez çalışmamız sırasında gerek zamanın sınırlı olması nedeniyle gerçekleştirilemeyen, gerekse çalışma sırasında oluşan düşünce ve öneriler doğrultusunda ileride yapılması planlanan çalışmalar şu şekildedir:

- Seçilen formülasyonlar üzerinde uzun süreli stabilite çalışmalarının yapılması,

- Farklı glioblastoma hücre dizilerinde formülasyonların etkinliğinin karşılaştırılması,
- Hücre kültürü sonuçlarına göre başarılı bulunan nanopartikül formülasyonlarının glioblastoma oluşturulmuş deneysel hayvan modelinde intravenöz yolla uygulanarak *in vivo* etkinliğinin test edilmesidir.

ÖZET

Kan-Beyin Bariyerinden Etkin Madde Geçişinin Artırılmasına Yönelik İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Glioblastoma multiforme en sık görülen primer beyin tümörü olup, bilinen en hızlı seyirli ve ölümcül tümörlerdendir. Erkeklerde daha sık görülür. Tanı sonrası ortalama sağkalım bir yıldan azdır ve son 10 yıldır bu sürede önemli bir ilerleme olmamıştır. Beyin tümörlerinde standart tedavi prosedürü cerrahi tedaviye ilaveten radyoterapi ve kemoterapidir. Kemoterapide kullanılan ilaçların çoğu kan beyin bariyeri nedeniyle merkezi sinir sisteminde yeterli doku konsantrasyonlarına ulaşamaz. Partikül boyutu 200 nm'nin altında olan nanopartiküller ile etkin maddelerin kan beyin bariyerinden geçişi artırılabilir.

Bu tez çalışmasında, kemoterapiye yüksek derecede dirençli bir tümör olan glioblastomanın baskılanmasına yönelik farmasötik nanopartikül formülasyonları hazırlanmış ve incelenmiştir. Bu amaçla katı-lipid nanopartikül formülasyonları, pegile polimerik nanopartikül formülasyonları ve polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonlara kemoterapötik ajan olarak pemetrekset yüklenmiştir. MiR-21'in spesifik antisens oligonükleotidlerle inhibisyonu kemoterapötik ajanların glioblastoma hücrelerine sitotoksik etkilerinin artmasını sağlamıştır. Literatürde yer alan bulgulardan hareketle yapılan bu çalışmada, formülasyonlara pemetreksetin yanı sıra anti-miR-21 oligonükleotidi de ilave edilerek glioblastoma hücrelerinin çoğalmasına karşı sinerjik bir etki sağlanması amaçlanmıştır.

Formülasyonların partikül boyutu, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği, *in vitro* salım profilleri, morfolojileri incelenerek başarılı olanlar seçilmiş, insan glioblastoma hücreleri üzerinde etkinlikleri test edilmiştir.

Sonuç olarak tüm nanopartikül formülasyonları pemetreksetin glioblastoma hücrelerine alımını önemli ölçüde artırmıştır. Sitotoksikite çalışmaları sonucunda polimer-lipid hibrit nanopartikül formülasyonları ile en başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Glioblastoma, hibrit nanopartikül, katı lipid nanopartikül, miR21 antisens oligonükleotidi, pemetrekset.

SUMMARY

Preparation and Characterization of Drug Transport Systems to Increase Blood Brain Penetration of Drug Substances

Glioblastoma multiforme is the most common primary brain tumor and the most rapidly progressive and fatal one among the known tumors. It is more common in men. The average survival after diagnosis is less than a year and in the last 10 years there has not been made a significant improvement in survival time. The standard treatment procedure of brain tumors is radiotherapy and chemotherapy in addition to the surgery. Many of the drugs used in chemotherapy can not reach sufficient tissue concentration in the central nervous system because of the blood-brain barrier. Passage of drug substances through the blood-brain barrier can be increased with using nanoparticles that have particle sizes less than 200 nm.

In this thesis study, pharmaceutical nanoparticle formulations for glioblastoma which is a highly resistant tumor to chemotherapy were prepared and evaluated. For this purpose the solid-lipid nanoparticle formulations, pegylated polymeric nanoparticle formulations and polymer-lipid hybrid nanoparticle formulations were prepared. Pemetrexed was loaded into the prepared formulations as chemotherapeutic agent. Inhibition of miR-21 with specific antisense oligonucleotides has led to an increase in the cytotoxic effects of chemotherapeutic agents to glioblastoma cells. According to the literature data, providing a synergistic effect against glioblastoma cell proliferation is aimed by adding anti-miR-21 besides pemetrexed into the formulations.

Successful formulations were selected and their activities on human glioblastoma cells were tested by analyzing particle size, zeta potential, encapsulation efficiency, *in vitro* release profiles and morphologic features.

In conclusion, all nanoparticle formulations significantly increased the uptake of pemetrexed into the glioblastoma cells. As a result of cytotoxicity studies, the most prospering results were obtained with polymer-lipid hybrid nanoparticle formulations.

Key Words: Glioblastoma, hybrid nanoparticle, miR21 antisense oligonucleotide, pemetrexed, solid lipid nanoparticle.

KAYNAKLAR

- AGARWAL A, AGRAWAL H, TIWARI S, JAIN S, AGRAWAL GP. (2011). Cationic ligand appended nanoconstructs: a prospective strategy for brain targeting. *Int J Pharm*, 421(1):189-201.
- AGRAWAL S, IYER RP.(1997). Perspectives in antisense therapeutics. *Pharmacol Ther*,76: 151-160.
- ALIMOHAMMADI S, SALEHI R, AMINI N, DAVARAN S. (2012). Synthesis and Physicochemical Characterization of Biodegradable PLGA-based Magnetic Nanoparticles Containing Amoxicilin. *Bull Korean Chem Soc*, 33(10): 3225-3232.
- ASASUTJARIT R, LORENZEN SI, SIRIVICHAYAKUL S, RUXRUNGTHAM K, RUKTANONCHAI U, RITTHIDEJ GC. (2007). Effect of solid lipid nanoparticles formulation compositions on their size, zeta potential and potential for *in vitro* pHIS-HIV-Hugag transfection. *Pharm Res*, 24:1098-1107.
- BAI H, XU R, CAO Z, WEI D, WANG C. (2011). Involvement of miR-21 in resistance to daunorubicin by regulating PTEN expression in the leukaemia K562 cell line. *FEBS Letters*, 585:402-408.
- BARAR J, OMIDI Y. (2012). Translational approaches towards cancer gene therapy: hurdles and hopes. *Bioimpacts*, 2(3): 127-143.
- BEDUNEAU A, SAULNIER P, BENOIT JP. (2007). Active targetting of brain tumors using nanocarriers. *Biomaterials*, 28: 4947-4967.
- BELLETTI D, TOSI G, FORNI F, GAMBERINI MC, BARALDI C, VANDELLI MA, RUOZI B. (2012). Chemico-physical investigation of tenofovir loaded polymeric nanoparticles. *Int J Pharm*, 436: 753-763.
- BEGLEY DJ, BRIGHTMAN MW. (2003). Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Prog Drug Res*, 61: 39-78.
- BLASI P, GIOVAGNOLI S, SCHOUBBEN A, RICCI M, ROSSI C. (2007). Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 59: 454-477.
- BOZKIR A, DUMAN E. (1996). Lipozomların kan ve plazmadaki stabiliteleri. *Ank Ecz Fak Der*, 25(1): 1-13.
- BOZKIR A, KARATAŞ A, HASÇİÇEK C, CANEFE K, KILIÇARSLAN M, TARIMCI N, YÜKSEL N, GÖNÜL N, ÖZDEMİR N, BAYKARA T, KILINÇ-ŞEN T, ÇOMOĞLU

- T. (2007). Bolum 31, Parenteral Preparatlar, *Farmasötik Teknoloji*, Ankara Üniversitesi Basımevi, s: 258.
- BOZKIR A, SAKA OM. (2004). Chitosan nanoparticles for plasmid DNA delivery: effect of chitosan molecular structure on formulation and release characteristics. *Drug Deliv*, 11: 107-112.
- BRASNJEVIC I, STEINBUSCH HWM, SCHMITZ C, MARTINEZ PM. (2009). Delivery of peptide and protein drugs over the blood-brain barrier. *Prog Neurobiol*, 87: 212-251.
- BUCKNER JC. (2003). Factors influencing survival in high grade gliomas. *Semin Oncol*, 19: 10-14.
- CELIA C, COSCO D, PAOLINO D, FRESTA M. (2011). Nanoparticulate devices for brain drug delivery, *Med Res Rev*, 31(5): 716–756.
- CHAN JM, ZHANG L, YUET KP, LIAO G, RHEE JW, LANGER R, FAROKHZAD OC. (2009). PLGA-lecithin-PEG core-shell nanoparticles for controlled drug delivery. *Biomaterials*, 30: 1627-1630.
- CHAVANY C, SAISON-BEHMOARAS T, LE DOAN T, PUISIEUX F, COUVREUR P, HELENE C.(1994). Adsorption of oligonucleotides onto polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles protects them against nucleases and increases their cellular uptake. *Pharm Res*, 11: 1370-1378.
- CHEOW WS, HADINOTO K. (2011). Factors affecting drug encapsulation and stability of lipid-polymer hybrid nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 85: 214-220.
- CHISTIAKOV DA, CHEKHONIN VP. (2012). Contribution of microRNAs to radio- and chemoresistance of brain tumors and their therapeutic potential. *Eur J Pharmacol*, 684(1-3):8-18.
- CHOU WH, MESSING RO. (2008). Hypertensive encephalopathy and the blood-brain barrier: is deltaPKC a gatekeeper? *J Clin Invest*, 118(1):17-20.
- CHRISTOPER GVP, RAGHAVAN CV, SIDDHARTH K, KUMAR MSS, PRASAD RH. (2014). Formulation and optimization of coated PLGA – Zidovudine nanoparticles using factorial design and *in vitro in vivo* evaluations to determine brain targeting efficiency. *Saudi Pharm J*, 22(2): 133–140.
- CLAWSON C, TON L, ARYAL S, FU V, ESENER S, ZHANG L. (2011). Synthesis and characterization of lipid-polymer hybrid nanoparticles with pH-triggered PEG shedding. *Langmuir*, 27(17): 10556-10561.
- CORSTEN MF, MIRANDA R, KASMIEH R, KRICHEVSKY AM, WEISSLEDER R, SHAH K. (2007). MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth *in vivo* and

displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell-derived S-TRAIL in human gliomas. *Cancer Res*, 67(19): 8994-9000.

COSTA P, LOBO JMS. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci*, 13(2): 123-133.

COSTA P, LOBO JMS. (2003). Evaluation of mathematical models describing drug release from estradiol transdermal systems. *Drug Dev Ind Pharm*, 29: 89-97.

COSTA PM, CARDOSO AL, MENDONÇA LS, SERANI A, CUSTODIA C, CONCEIÇÃO M, SIMÕES S, MOREIRA JN, ALMEIDA LP, LIMA MCP. (2013). Tumor-targeted chlorotoxin-coupled nanoparticles for nucleic acid delivery to glioblastoma cells: A promising system for glioblastoma treatment. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2(6): e100.

DAI H, CHEN Y, ELMQUIST F. (2005). Distribution of the Novel Antifolate Pemetrexed to the Brain. *J Pharmacol Exp Ther*, 315: 222-229.

DASH S, MURTHY PN, NATH L, CHOWDHURY P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm*, 67(3): 217-223.

DAVIS S, LOLLO B, FREIER S, ESAU C. (2006). Improved targeting of miRNA with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*, 34(8): 2294-2304.

DAWSON M, KRAULAND E, WIRTZ D, HANES J. (2004). Transport of polymeric nanoparticle gene carriers in gastric mucus. *Biotechnol Prog*, 20: 851-857.

DHAWAN S, KAPIL R, SINGH B. (2011). Formulation development and systematic optimization of solid lipid nanoparticles of quercetin for improved brain delivery. *J Pharm Pharmacol*, 63(3):342-351

DIAS N, STEIN CA. (2002). Antisense oligonucleotides: Basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther*, 1: 347-355.

DILLEN K, WEYENBERG W, VANDERVOORT J, LUDWIG A. (2004). The influence of the use of viscosifying agents as dispersion media on the drug release properties from PLGA nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*, 58(3):539-549.

DINARVAND R, SEPEHRI N, MANOOCHERI S, ROUHANI H, ATYABI F. (2011). Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *Int J Nanomedicine*, 6: 877-895.

DOIJAD RC, MANVI FV, MALLESWARA RVS, PRAJAKTA A. (2006). Sustained ophthalmic delivery of gatifloxacin from In situ gelling system. *Indian J Pharm Sci*, 68: 814-818.

- EROĞLU C, SOYUER S, YILDIZ OG, ÖZKAN M, MENKÜ A, ORHAN O, KAPLAN B. (2008). Adjuvan temozolomid ilavesinin tedavi sonuçlarına katkısı. *Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi*, 18: 65-73.
- FATTAL E, COUVREUR P, DUBERNET C.(2004). ‘Smart’ delivery of antisense oligonucleotides by anionic pH-sensitive liposomes. *Adv Drug Del*, 56 (7): 931-946.
- FREDENBERG S, WAHLGREN M, RESLOW M, AXELSSON A. (2011). The mechanism of drug release in poly(lactide-co-glycolic acid)-based drug delivery systems- a review. *Int J Pharm*, 415: 34-52.
- GENTRY CL, EGLETON RD, GILLESPIE T, ABBRUSCATO TJ, BECHOWSKI HB, HRUBY VJ, DAVIS TP. (1999). The effect of halogenation on blood-brain barrier permeability of a novel peptide drug. *Peptides*, 20: 1229-1238.
- GHADIRI M, FATEMI S, VATANARA A, DOROUD D, NAJAFABADI AR, DARABI M, RAHIMI AA. (2012). Loading hydrophilic drug in solid lipid media as nanoparticles: Statistical modeling of entrapment efficiency and particle size. *Int J Pharm*, 424(1–2): 128–137.
- GREENLEE RT, MURRAY T, BOLDEN S. (2000). Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 50: 7-33.
- GUZ M, RIVERO-MÜLLER A, OKON E, STENZEL-BEMBENEK A, POLBERG K, SLOMKA M, STEPULAK A. (2014). MicroRNAs-role in lung cancer. *Dis Markers*, 2014: 1-13.
- GÜLTÜRK S, IMIR G, TUNCER E. (2007). Kan-beyin bariyeri. *Erciyes tıp dergisi*, 29 (2): 147-154.
- UMARETIYA GHANSHYAM M, PATEL PRIYAL R, PATEL JAYVADAN K. (2011). Formulation and characterization of solid lipid nanoparticles dry powder inhaler containing triamcinolone acetonide. *IJRPC*, 1(3): 662-673.
- HADINOTO K, SUNDARESAN A., CHEOW WS,. (2013). Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A Review. *Eur J Pharm Biopharm*, 85(3): 427-443.
- HANAUSKE AR, CHEN V, PAOLETTI P, NIYIKIZA C. (2001). Pemetrexed Disodium: A novel antifolate clinically active against multiple solid tumors. *The Oncologist*, 6: 363-373.
- HARRIS JM, MARTIN NE, MODI M.(2001) Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet*, 40: 539-551.
- JATARIU AN, POPA M, PEPTU CA. (2010). Different particulate systems-bypass the biological barriers. *J Drug Target*, 18 (4): 243-253.

- JAYPRAKA M, RAMNAR J, SHAH S. (2009). An overview on brain targeting drug delivery system. *Pharmaceutical Reviews*, 7(1).
- JIA L, SHEN J, ZHANG D, DUAN C, LIU G, ZHENG D, TIAN X, LIU Y, ZHANG Q. (2012). *In vitro* and *in vivo* evaluation of oridonin-loaded long circulating nanostructured lipid carriers. *Int J Biol Macromol*, 50(3):523-529.
- JIN SE, KIM CK, KIM YB. (2012). Cellular delivery of cationic lipid nanoparticle based SMAD3 antisense oligonucleotides for the inhibition of collagen production in keloid fibroblasts. *Eur J Pharm Biopharm*, 82: 19-26.
- JUNGHANS M, KREUTER J, ZIMMER A. (2000). Antisense delivery using protamineoligonucleotide particles. *Nucl Acids Res*, 28: E45.
- KABANOV AV, BATRAKOVA EV. (2004). New technologies for drug delivery across the blood brain barrier. *Curr Pharm Des*, 10: 1355-1363.
- KAMBOJ S, BALA S, NAIR AB. (2010). Solid lipid nanoparticles: An effective lipid based technology for poorly water soluble drugs. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 5(2): 78-90.
- KAUR IP, BHANDARI R, BHANDARI S, KAKKAR V. (2008). Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting. *J Cont Rel*, 127: 97–109.
- KILIÇ AC, CAPAN Y, VURAL I, GÜRSOY RN, DALKARA T, CUINE A, HINCAL AA.(2005). Preparation and characterization of PLGA nanospheres for the targeted delivery of NR2B-specific antisense oligonucleotides to the NMDA receptors in the brain. *J Microencapsul*, 22: 633-641.
- KREUTER J. (2014). Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: What do we know? *Adv Drug Del Rev*, 71:2-14.
- KUMAR S, RANDHAWA JK. (2013). High melting lipid based approach for drug delivery: Solid lipid nanoparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 33:1842-1852.
- KUO YC, CHEN HH. (2009). Entrapment and release of saquinovir using novel cationic solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm*, 365 (1-2): 206-213.
- KUSHWAHA AK, VUDDANDA PR, KARUNANIDHI P, SINGH SK, SINGH S. (2013). Development and Evaluation of Solid Lipid Nanoparticles of Raloxifene Hydrochloride for Enhanced Bioavailability. *Biomed Res Int*, ID 584549.
- LAMBERT G, FATTAL E, COUVREUR P. (2001). Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides. *Adv Drug Del Rev*, 47: 99-112.

- LEE LK, ROTH C. (2003). Antisense technology in molecular and cellular bioengineering. *Curr Opin Biotechnol*, 14: 505-511.
- LI T, LARA PN, MACK PC, PEREZ-SOLER R, GANDARA DR. (2010). Intercalation of erlotinib and pemetrexed in the treatment of non-small cell lung cancer. *Curr Drug Targets*, 11: 85-94.
- LI L, SNAM YY, BIKADI Z, ELMQUIST WF. (2011). pH dependent transport of Pemetrexed by breast cancer resistance protein. *Drug Metab Dispos*, 39(9):1478-1485.
- LI Y, ZHU X, GU J, DONG D, YAO J, LIN C, HUANG K, FEI J. (2010). Anti-miR-21 oligonucleotide sensitizes leukemic K562 cells to arsenic trioxide by inducing apoptosis. *Cancer Sci*, 101(4): 948-954.
- LOBOVKINA T, JACOBSON GB, GONZALEZ-GONZALEZ E, HICKERSON RP, LEAKE D, KASPAR RL, CONTAG CH, ZARE RN. (2011). *In vivo* sustained release of siRNA from solid lipid nanoparticles. *ACS Nano*, 5(12):9977-9983.
- LU N, LIU Q, LI R, XIE L, SHEN J, GUAN W, QIAN X, YU L, DING Y, JIANG X, LIU B. (2012). Superior antimetastatic effect of pemetrexed-loaded gelatinase-responsive nanoparticles in a Mouse metastasis model. *Anticancer Drugs*, 23(10):1078-1088.
- MAKSIMENKO A, PAVLOV E, TOUSHOV E, MOLIN A, STUKALOV Y, PRUDSKOVA T, FELDMAN V, KREUTER J, GELPERINA S. (2008). Radiation sterilisation of doxorubicin bound to poly(butyl cyano-acrylate) nanoparticles. *Int J Pharm*, 356: 325-332.
- MANDAL B, BHATTACHARJEE H, MITTAL N, SAH H, BALABATHULA P, THOMAS LA, WOOD GC. (2013). Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. *Nanomedicine*, 9: 474-491.
- MARCINIEC B, DETTLAFF K. (2008). Radiation sterilization of drugs, Trends in Radiation Sterilization of Healthcare Products, bölüm 13, International atomic energy agency, Viyana, Avusturya.
- MEHNERT W, MÄDER K. (2001). Solid lipid nanoparticles production, characterization and applications. *Adv Drug Del Rev*, 47: 165-196.
- MIKLÁN Z, ORBÁN E, BÁNÓCZI Z, HUDECZ F. (2011). New pemetrexed-peptide conjugates: synthesis, characterization and *in vitro* cytostatic effect on non-small cell lung carcinoma (NCI-H358) and human leukemia (HL-60) cells. *J Pept Sci*, 17(12):805-811.
- MONTENEGRO L, CAMPISI A, SARPIETRO MG, CARBONE C, ACQUAVIVA R, RACITI G, PUGLISI G. (2011). *In vitro* evaluation of idebenone-loaded solid lipid nanoparticles for drug delivery to the brain. *Drug Dev Ind Pharm*, 37(6):737-746.

- MOORE LM, ZHANG W. (2010). Targeting miR-21 in glioma: a small RNA with big potential. *Expert Opin Ther Targets*, 14(11): 1247-1257.
- MÜLLER RH, MÄDER K, GOHLA S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm*, 50: 161-177.
- NAGUIB YW, RODRIGUEZ BL, LI X, HURSTING SD, WILLIAMS RO, CUI Z. (2014). Solid lipid nanoparticle formulations of docetaxel prepared with high melting point triglycerides: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Mol Pharm*, 11(4):1239-1249.
- NAIR R, VISHNU PRIYA K, ARUN KUMAR KS, BADIVADDIN TMD, SEVUKARAJAN M.(2011). Formulation and evaluation of solid lipid nanoparticles of water soluble drug: isoniazid. *J Pharm Sci & Res*, 3(5):1256-1264.
- OLDENDORF WH, CORNFORD ME, BROWN WJ. (1977). The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann Neurol*, 1: 409-417.
- OLIVIER JC. (2005). Drug Transport to Brain with Targeted Nanoparticles. *NeuroRx*, 2(1): 108–119.
- OUELLET D, PERICLOU AP, JOHNSON RD, WOODWORTH JR, LALONDE RL. (2000). Population pharmacokinetics of pemetrexed disodium (ALIMTA) in patients with cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 46: 227-234.
- PAPAGIANNAKOPOULOS T, SHAPIRO A, KOSIK KS. (2008). MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Res*, 68(19): 8164-8172.
- PARDRIDGE WM. (1997). Drug delivery to the brain. *JCBFM*, 17: 713-731.
- PARDRIDGE WM. (2005). Drug and gene targetting to the brain via blood-brain barrier receptor-mediated transport systems. *International Congress Series*, 1277: 49-62.
- PATEL AD, PARIKH SK, SEN DJ, PATEL CN. (2011). Development and validation of high performance liquid chromatographic and uv spectrophotometric method for estimation of pemetrexed disodium in bulk drug and pharmaceutical formulation. *IJDDR*, 3(2): 301-307.
- PATEL M, SOUTO EB, SINGH KK. (2013). Advances in brain drug targeting and delivery: limitations and challenges of solid lipid nanoparticles. *Expert Opin Drug Deliv*, 10(7): 889-905.
- PATEL TB. (2007). Recent trends in brain targeted drug delivery systems: an overview. *Pharmaceutical reviews*, 5(2).

- PAZ-ARES L, BEZARES S, TABERNERO JM, CASTELLANOS D, CORTES-FUNES H. (2003). Review of a Promising New Agent-Pemetrexed Disodium. *Cancer*, 97(8): 2056-2063
- PHILIPS MI.(2005). Antisense Therapeutics. Humana Press, New Jersey.
- POLLI JE, REKHI GS, AUGSBURGER LL, SHAH VP. (1997). Methods to compare dissolution profiles and a rationale for wide dissolution specifications for metoprolol tartrate tablets. *J Pharm Sci*, 86(6): 690-700.
- QIAN X, REN Y, SHI Z, LONG L, PU P, SHENG J, YUAN X, KANG C. (2012). Sequence-dependent synergistic inhibition of human glioma cell lines by combined temozolamide and miR-21 inhibitor gene therapy. *Mol Pharmaceutics*, 9: 2636-2645.
- RANJAN AP, MUKERJEE A, HELSON L, VISHWANATHA JK. (2012). Scale up, optimization and stability analysis of Curcumin C3 complex-loaded nanoparticles for cancer therapy. *J Nanobiotechnology*, 10:38
- REDDY K. (2000). Controlled release, pegylation, liposomal formulation: new mechanisms in the delivery of injectable drugs. *Ann Pharmacother*, 34: 915-923.
- REDDY LH, MURTHY RS. (2005). Etoposide-loaded nanoparticles made from glyceride lipids: formulation, characterization, *in vitro* drug release, and stability evaluation. *AAPS PharmSciTech*, 6(2): E158-166.
- REN Y, KANG CS, YUAN X, ZHOU X, XU P, HAN L, WANG GX, JIA Z, ZHONG Y, YU S, SHENG J, PU P.(2010). Co-delivery of as-miR-21 and 5-FU by poly(amidoamine) dendrimer attenuates human glioma cell growth *in vitro*. *J Biomater Sci Polym Ed*, 21:303-314.
- RESPAUD R, TOURNAMILLE JF, CROIX C, LABORIE H, ELFAKIR C, VIAUD-MASSUARD MC. (2011). Development of an ion-pairing reversed phase liquid chromatography method using a double detection analysis (UV and evaporative light scattering detection) to monitor the stability of Alimta-pemetrexed preparations: Identification and quantification of L-glutamic acid as a potential degradation product. *J Pharm Biomed Anal*, 54(2): 411-416.
- RIVORY LP, CLARKE SJ, BOYER M, BISHOP JF. (2001). Highly sensitive analysis of the antifolate pemetrexed sodium, a new anticancer agent, in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*, 765: 135-140.
- RONDELOT G, SERRURIER C, VIGNERON J, ZENIER H, MAY I, DEMORE B. (2007). Stability of pemetrexed 25 mg/mL in a glass vial and 5 mg/mL stored in a PVC container after storage for one month at 2-8°C. *EJHP Science*, 13(1): 14-16.

- SAH H, THOMA LA, DESU HR, SAH E, WOOD GC. (2013). Concepts and practices used to develop functional PLGA-based nanoparticulate systems. *Int J Nanomedicine*, 8: 747-765.
- SAKA OM, BOZKIR A. (2012). Formulation and in vitro characterization of PEGylated chitosan and polyethylene imine polymers with thrombospondin-I gene bearing pDNA. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 100(4): 984-992.
- SHEGOKAR R, SINGH KK, MÜLLER RH. (2010). Production & stability of stavudine solid lipid nanoparticles--from lab to industrial scale. *Int J Pharm*, 416 (2): 461-470.
- SHI SJ, ZHONG ZR, LIU J, ZHANG ZR, SUN X, GONG T. (2012). Solid lipid nanoparticles loaded with anti-microRNA oligonucleotides (AMOs) for suppression of microRNA-21 functions in human lung cancer cells. *Pharm Res*, 29: 97-109.
- SIDDIQUI A, PATWARDHAN GA, LIU YY, NAZZAL S. (2010). Mixed backbone antisense glucosylceramide synthase oligonucleotide (MBO-asGCS) loaded solid lipid nanoparticles: *in vitro* characterization and reversal of multidrug resistance in NCI/ADR-RES cells. *Int J Pharm*, 400: 251-259.
- SORENSEN JB. (2011). Pharmacokinetic evaluation of pemetrexed, *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 7(7): 919-928.
- SINGHVI G, SINGH M. (2011). Review: *in vitro* drug release characterization models. *IJPSR*, 2(1): 77-84.
- TAHARA K, KATO Y, YAMAMOTO H, KREUTER J, KAWASHIMA Y. (2011). Intracellular drug delivery using polysorbate 80 modified poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres to glioblastoma cells. *J Microencapsul*, 28(1): 29-36.
- TERRY AB, SALAAM AD, NYAIRO E, THOMAS V, DEAN DR. (2014). PLGA Nanoparticles for the sustained release of rifampicin. *J Nanogenomics and Nanomedicine*, 2(1): 1-9.
- THATIPAMULA RP., PALEM CR., GANNU R., MUDRAGADA S., YAMSANI MR. (2011). Formulation and *in vitro* characterization of domperidone loaded solid lipid nanoparicles and nanostructured lipid carriers. *DARU*, 19 (1): 23-32.
- TÜRK CTŞ, HASÇIÇEK C, GÖNÜL N. (2007). Nanoparticulate drug delivery systems for targeting the drugs to the brain. *Journal of Neurological Sciences*, 24(3): 254-263.
- UDDIN MN, DO DP, PAI SB, GAYAKWAD S, OETTINGER CW, D'SOUZA MJ. (2009). A methodology for quantitation and characterization of oligonucleotides in albumin microspheres. *Analyst*, 134: 1483-1489.
- USP 30 NF 25. (2007). Port city pres, Baltimore, United States, Vol.1, s: 680-682.

- VÁZQUEZ-BLOMQUIST D, FERNÁNDEZ JR, MIRANDA J, BELLO C, SILVA JA, ESTRADA RC, NOVOA LI, PALENZUELA D, BELLO I. (2012). Selection of reference genes for use in quantitative reverse transcription PCR assays when using interferons in U87MG. *Mol Biol Rep*, 39(12):11167-11175.
- VERONESE FM, PASUT G. (2005). PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov Today*, 10 (21): 1451-1458.
- VIGHI E, RUOZI B, MONTANARI M, BATTINI R, LEO E. (2007). Re-dispersible cationic solid lipid nanoparticles (SLNs) freeze-dried without cryoprotectors: characterization and ability to bind the pEGFP-plasmid. *Eur J Pharm Biopharm*, 67: 320-328.
- VINOGRADOV SV, BATRAKOVA EV, KABANOV AV. (2004). Nanogels for oligonucleotide delivery to the brain. *Bioconjug Chem*, 15(1): 50-60.
- VISSER CC, STEVANOVIC S, VOORWINDEN LH, BLOOIS LV, GAILLARD PJ, DANHOF M, CROMMELIN DJA, DE BOER AG. (2005). Targeting liposomes with protein drugs to the blood-brain barrier *in vitro*. *Eur J Pharm Sci*, 25: 299-305.
- WALKER MD, ALEXANDER E, HUNT WE.(1978). Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. *J Neurosurg*, 49: 333-343.
- WARTLICK H, SPÄNKUCH-SCHMITT B, STREBHARDT K, KREUTER J, LANGER K.(2004). Tumour cell delivery of antisense oligonucleotides by human serum albumin nanoparticles. *J Control Release*, 96: 483-495.
- WISSING, SA, KAYSER O, MÜLLER RH.(2004). Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 56, 1257-1272.
- WU-PONG S.(2000). Alternative interpretations of the oligonucleotide transport literature: insights from nature. *Adv Drug Deliv Rev*, 44: 59-70.
- XIE S, ZHU L, DONG Z, WANG X, WANG Y, LI X, ZHOU W. (2011). Preparation, characterization and pharmacokinetics of enrofloxacin-loaded solid lipid nanoparticles: influences of fatty acids. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 83(2):382-387.
- YOU J, WAN F, DE CUI F, SUN Y, DU YZ, HU FQ. (2007). Preparation and characteristic of vinorelbine bitartrate-loaded solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm*, 343(1-2):270-276.
- ZHANG K, TANG X, ZHANG J, LU W, LIN X, ZHANG Y, TIAN B, YANG H, HE H. (2014). PEG-PLGA copolymers: their structure-influenced drug delivery applications. *J Cont Rel*, 183: 77-86.
- ZLOKOVIC BV. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57: 178-201.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Berrin
Soyadı : Küçüktürkmen
Doğum yeri ve tarihi : Beypazarı, 19.02.1984
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Evli
İletişim adresi :Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
 Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 06100
 Tandoğan-ANKARA
İletişim Telefonu : 0312 203 3159
Elektronik posta : bbasaran@pharmacy.ankara.edu.tr

II- Eğitimi

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
 (2005-2008)
Lisans : Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
 (2001-2005)
Orta ve Lise : Beypazarı Anadolu Lisesi (1994-2001)
Yabancı Dili : İngilizce
Endüstri Stajı : Mustafa Nevzat İlaç Sanayi (2004)

III- Ünvanları

Uzman Eczacı : 2008
Eczacı : 2005

IV-Mesleki Deneyimi

Araştırma Görevlisi : Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik
 Teknoloji Anabilim Dalı (2005-devam ediyor.)

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği (TÜFTAD)

VI-Bilimsel İlgi Alanları

SCI’de Yer Alan Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

- BOZKIR, A., DENLİ, Z.F., BASARAN, B. “Effect of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on the solubility, stability and *in vitro* release of ciprofloxacin for ocular drug delivery”, Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research, 69(4):719-724,2012.
- BASARAN, B., BOZKIR, A. “Thermosensitive and pH induced in situ ophthalmic gelling system for ciprofloxacin hydrochloride: hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complex”, Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research, 69(6):1137-1147,2012.

SCI’de Yer Almayan Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

- YÜKSEL, N., TÜRKMEN, B., KURTOĞLU, A.H., BASARAN, B., ERKİN, J., BAYKARA, T. “Lubricant efficiency of magnesium stearate in direct compressible powder mixtures comprising cellactose[®]80 and pyridoxine hydrochloride”, Fabad J. Pharm. Sci., 32:173-183, 2007.

Kitap Bölümü

- BASARAN, B., BOZKIR, A. “Preparation and evaluation of chitosan-based in situ gelling ophthalmic formulations containing ciprofloxacin”, 8th International Conferences of the European Chitin Society, 2007, Advances in Chitin Science vol X, 343-348. ISBN: 978-975-491-250-0.

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Poster Bildirileri

- BASARAN, B., BOZKIR, A., “Thermosensitive, prolonged release ophthalmic gel for ciprofloxacin/HP- β -CD complex”, 2nd PharmSciFair, 8-12 Haziran, Nice-Fransa, 2009.
- BOZKIR, A., BASARAN, B., ÇOBAN, S., HINÇ, D., AMASYA, G., “The preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing ovalbumin”, 9th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 23-26 Haziran, Ankara-Türkiye, 2009.
- YÜKSEL, N., TÜRKMEN, B., KURTOĞLU, A.H., BASARAN, B., ERKİN, J., BAYKARA, T., “A study on lubricant efficiency of magnesium stearate in direct compressible powder mixtures”, 9th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 23-26 Haziran, Ankara-Türkiye, 2009.
- BASARAN, B., BOZKIR, A. “pH induced in situ ophthalmic gelling system for ciprofloxacin / HP- β -CD complex”. Eur. J. Pharm. Sci. 38(1): 111-112, 2009, Supplement 3rd BBBB International

Symposium on Pharmaceutical Sciences, 26-28 Ekim, Antalya-Türkiye, 2009.

- ANASIZ, Y., BASARAN, B., BOZKIR, A., “Thermoreversible In Situ Gelling Solutions for Ophthalmic Delivery of Pilocarpine Hydrochloride”, 3rd PharmSciFair, 13-17 Haziran, Prag-Çek Cumhuriyeti, 2011.
- DEVRİM, B., KÜÇÜKTÜRKMEN B., DİNÇ E., BOZKIR A., “Partial least squares and principal component regression for the simultaneous quantitative estimation of diphenhydramine hydrochloride in dry powder and syrup forms in the presence of excipient effects”, 1st International Conference on New Trends in Chemometrics and Applications , 8-11 Ekim, Antalya-Türkiye, 2011.
- KÜÇÜKTÜRKMEN B., BOZKIR A., “The effect of high pressure homogenization process on the particle size of solid lipid nanoparticles”, 16th International Pharmaceutical Technology Symposium , 10-12 Eylül, Antalya-Türkiye, 2012.

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Tamamlanan Tezler

Yüksek Lisans Tezi (2008), “Siprofloksasin ve hidrokispropil-betasiklodekstrin kompleksini içeren oftalmik in-situ jel formülasyonlarının geliştirilmesi ve değerlendirilmesi”(Danışman: Prof.Dr.Asuman BOZKIR)

Aldığı Ödüller

8-11 Ekim 2011 tarihli ‘Conference on New Trends in Chemometrics and Applications’ isimli kongrede ‘partial least squares and principal component regression for the simultaneous quantitative estimation of diphenhydramine hydrochloride in dry powder and syrup forms in the presence of excipient effects’ başlıklı poster ile ikincilik ödülü.

Görev Aldığı Projeler

- “Kan-beyin bariyerinden etkin madde geçişinin artırılmasına yönelik ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması ve karakterizasyonu” adlı projede araştırmacı, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri No: 12B3336004. 2012- devam ediyor.
- "Bifosfonat Yüklü Membran ve in-situ Jel Formülasyonlarının Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu Üzerine Etkisinin *in vitro* ve *in vivo* Değerlendirilmesi " adlı projede bursiyer, TÜBİTAK 1001, Proje No:112S533. 2013- devam ediyor.